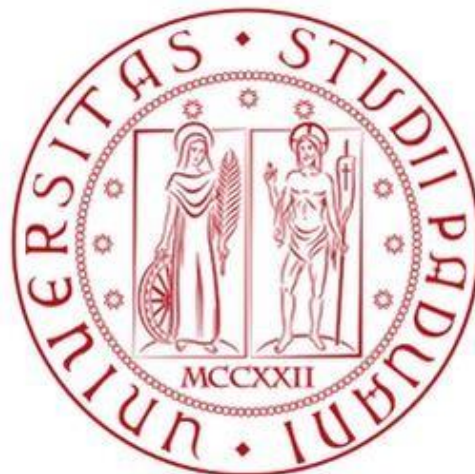


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Isolamento di mutanti fotorespiratori in *Nannochloropsis
gadicana***

Relatore: Prof. Tomas Morosinotto
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dr. Giorgio Perin
Dipartimento di Biologia

Controrelatrice: Prof.ssa Eleonora Sforza
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Laureando: Flavio Collura

Anno Accademico 2021/2022

Sommario

ABSTRACT	6
1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 Cambiamento climatico e le proposte sostenibili	8
1.2 Agricoltura e sfruttamento terrestre	9
1.3 Le microalghe: una soluzione sostenibile	10
1.3.1 Biocarburanti dalle microalghe	13
1.3.2 <i>Nannochloropsis gaditana</i>	14
1.4 Ingegneria genetica in <i>N. gaditana</i>	15
1.4.1 Ricombinazione omologa.....	16
1.5 Fotosintesi	17
1.6 Ciclo di Calvin-Benson	21
1.7 L'enzima RUBISCO e il suo legame con i meccanismi di concentrazione del carbonio (CCM)	22
1.8 La Fotorespirazione	24
1.9 Bypass Fotorespiratori	27
1.10 Ciclo del Beta-Idrossiaspartato	28
2. SCOPO DELLA TESI.....	30
3. MATERIALI E METODI.....	32
3.1 Tecniche di biologia molecolare	32
3.1.1 Reazione polimerasica a catena (PCR)	32
3.1.2 Overlap Extension PCR (OE-PCR).....	36
3.1.3 Elettroforesi su gel di agarosio.....	42
3.1.4 Purificazione di DNA	42
3.1.5 Reazione di ligazione.....	43
3.1.6 Quantificazione di acidi nucleici.....	45
3.1.7 Trasformazione delle cellule di <i>E.coli</i> DH5 α	45
3.1.8 Estrazione di DNA plasmidico dalle cellule batteriche.....	45
3.1.9 Restrizione enzimatica.....	46
3.1.10 Estrazione di DNA genomico di <i>N.gaditana</i>	46
3.1.11 Estrazione di RNA da <i>N. gaditana</i> e retrotrascrizione.....	47

3.1.12 Preparazione e assemblaggio delle ribonucleoproteine per la trasformazione di <i>N.gaditana</i>	48
3.1.13 Trasformazione delle cellule di <i>N.gaditana</i>	50
3.2 Coltura di cellule di E.coli.....	51
3.3 Coltura di cellule di <i>N.gaditana</i>	52
3.4 Conta cellulare.....	52
3.5 Misure di fluorescenza dei mutanti fotorespiratori.....	53
3.6 Protocollo di assemblaggio BASIC.....	54
4. RISULTATI	59
4.1 Geni della fotorespirazione	59
4.2 Ottenimento dei costrutti per la delezione dei geni bersaglio.....	60
4.3 Generazione dei Knock-Out di <i>N. gaditana</i>	64
4.4 Studio preliminare in <i>Nannochloropsis oceanica</i>	65
4.5 Analisi fenotipiche e genomiche	66
4.5.1 Screening fenotipici dei mutanti gox	67
4.5.2 Screening genomico dei mutanti gox.....	69
4.5.3 Screening fenotipico dei ceppi KO del gene pglp	72
4.5.4 Screening genomico dei ceppi KO del gene PGLP	74
4.6 Screening genomici dei ceppi KO del gene BASS6	74
4.7 Protocollo BASIC e Bypass Fotorespiratorio	76
4.7.1 Principio del metodo.....	79
4.7.2 Generazione del costrutti del Bypass.....	81
4.7.3 Cassette di espressione dei geni GDH e BHAA	82
5. DISCUSSIONE	89
6. CONCLUSIONI	95
7. BIBLIOGRAFIA	97

ABSTRACT

Il sistema produttivo mondiale di beni di prima necessità dipende in larga parte da fonti energetiche inquinanti e non rinnovabili. Le problematiche climatiche e ambientali richiedono una rapida transizione verso un sistema sostenibile, che si inquadri all'interno di una prospettiva di economia circolare, attraverso l'utilizzo di alternative rinnovabili che portino a una maggiore indipendenza da risorse fossili. Le microalghe sono organismi fotosintetici, capaci di sintetizzare e accumulare vari tipi di molecole che trovano diverse applicazioni nell'economia odierna come fonte sostenibile di biomassa, biocarburanti, bio-commodities e composti bioattivi. In particolare, *Nannochloropsis gaditana* è un organismo eucariotico unicellulare che ha acquistato un crescente interesse dal punto di vista biotecnologico, per via della sua abilità di produrre grandi quantità di molecole di interesse commerciale. Tra queste si annoverano carotenoidi, acidi grassi omega-3, clorofille e triacilgliceroli, gli ultimi in grado di essere convertiti facilmente in biodiesel tramite transesterificazione. Tuttavia, il potenziale di questa microalga non viene sfruttato a pieno, per via delle rese e dei costi ad oggi non competitivi. Queste problematiche potrebbero essere superate sfruttando tecniche di ingegneria genetica, per ottenere dei ceppi capaci di maggiore produttività. L'oggetto di studio è il pathway fotorespiratorio, un processo metabolico fondamentale negli organismi fotosintetici, ma che limita la generazione di biomassa. L'obiettivo è trasformare *N.gaditana* tramite ingegneria genetica, sfruttando la tecnica CRISPR-Cpf1, isolare ceppi privati di alcuni geni chiave implicati nella fotorespirazione e studiare il fenotipo derivante. Inoltre, parte del progetto prevede la messa a punto di una strategia efficace per l'implementazione di un pathway sintetico. Questo processo deve interrompere le reazioni della fotorespirazione, che risultano energeticamente costose per la cellula, limitandone la crescita. Al contempo, esso deve garantire un flusso di metaboliti alternativo ottimizzato, che risulti più efficiente e porti una maggiore produzione di biomassa.

1. INTRODUZIONE

1.1 Cambiamento climatico e le proposte sostenibili

La nostra capacità di estrarre e utilizzare fonti fossili ha permesso nel corso della storia di disporre di energia a basso costo, permettendo lo sviluppo economico e demografico. Le attività umane e le tecnologie alla base della società moderna, come trasporti, infrastrutture, industria, energia, agricoltura, sono supportate da fonti energetiche non rinnovabili. Le più rappresentative come petrolio, gas e carbone, sono intrinsecamente legate all'aumento delle emissioni di gas serra, principali responsabili del surriscaldamento globale. L'eccessivo sfruttamento di queste risorse ha portato alla loro depauperazione e alla degradazione degli ecosistemi. Secondo le prospettive attuali, la popolazione mondiale raggiungerà i 10 miliardi di persone entro il 2060 ("World Population Prospects - Population Division - United Nations," n.d.), il che presuppone un rapido cambiamento sistemico, che porti in direzione di un quanto più rapido smantellamento dell'utilizzo di risorse non rinnovabili. Infatti, secondo i dati in nostro possesso, le emissioni di gas serra non diminuiranno abbastanza velocemente da evitare numerosi danni provocati del surriscaldamento globale. Inoltre, secondo gli attuali andamenti, non sarà possibile raggiungere i traguardi prefissati dall'accordo di Parigi sui cambiamenti climatici, che proponevano misure atte a contenere il riscaldamento globale entro gli 1.5°C nel 2030(Environnement, 2021).

Nonostante la gravità della situazione, gli sforzi collettivi mondiali degli ultimi anni, hanno portato risvolti positivi. Molte tecnologie rinnovabili, che fino al decennio scorso si riteneva sarebbero rimaste troppo dispendiose, sono maturate celermente, diventando competitive. Ad esempio, l'energia eolica è passata da circa 150 dollari/MWh nel 2009 a meno di 50 dollari/MWh nel 2021(Ray, 2021). In pari tempo, l'energia solare, ora risulta 10 volte più economica rispetto allo stesso intervallo temporale. Ciò ha permesso l'espansione del suo utilizzo di 25 volte rispetto al 2010("Renewable energy generation," n.d.). Il progressivo coinvolgimento politico e sociale verso le tematiche ambientali, il sempre crescente aumento di consapevolezza da parte delle comunità, unito agli sforzi comuni della rete scientifica globale, ha permesso di ottenere tecnologie sostenibili ed economie di scala. Ciò ha permesso un'inversione di un paradigma, ormai constatato superato ed obsoleto: la crescita economica non è più accompagnata forzatamente dall'aumento delle emissioni. Alcune nazioni, negli ultimi 20 anni, sono riuscite ad aumentare il proprio prodotto interno lordo (PIL) al contempo diminuendo le proprie emissioni, investendo in soluzioni innovative. Le tecnologie legate alle

risorse fossili, nonostante siano dannose, sono tuttavia profondamente radicate. Inoltre, molte soluzioni come l'energia eolica e solare al momento attuale non sono sufficienti per una completa transizione ecologica. La gestione dei problemi legati al riscaldamento globale presuppone l'implementazione di multiple soluzioni che dialoghino tra loro nella creazione di una rete globale intelligente di tecnologie complementari, allargando le alternative economiche e tecnologiche, che possano nell'insieme portare alla riduzione delle emissioni. In questa prospettiva, risulta quindi fondamentale l'implementazione di sistemi alternativi, tra cui le microalghe.

Questi microrganismi risultano essere una fonte di biomassa estremamente flessibile in quanto possono crescere in aree non produttive, in terreni marginali, non coltivabili, desertici, direttamente negli oceani o persino in acque contaminate. Possono quindi essere coltivate per la produzione dei beni di interesse per la produzione di biocarburanti, bioplastiche, composti farmaceutici, senza competere per terreno coltivabile e quindi con il settore agroalimentare, con impatto ambientale estremamente inferiore (Gong and Jiang, 2011; Mutanda et al., 2020).

1.2 Agricoltura e sfruttamento terrestre

La superficie del pianeta biologicamente produttiva è indispensabile alla crescita sociale, demografica ed economica, poichè l'uomo necessita di terreno per le proprie attività. Gli organismi fotosintetici fissano la CO₂ sfruttando l'energia luminosa proveniente dal Sole generando biomassa. Questo processo corrisponde alla così detta produzione primaria lorda (GPP, gross primary production), che è la misura della quantità totale di energia che essi sono in grado di accumulare in biomassa attraverso la fotosintesi. Tuttavia, l'energia convertita non è pienamente accessibile, poichè una parte di essa va dispersa in processi cellulari (i.e. respirazione cellulare).

La differenza tra queste due componenti, la GPP e la frazione consumata nella respirazione, rappresenta la produzione primaria netta (NPP). Quest'ultima costituisce la porzione sfruttabile dall'uomo. La HANPP (Human Appropriation of Net Primary Production) è un indicatore che quantifica questo fenomeno e stima l'interferenza antropogenica negli ecosistemi (fig. da (Haberl et al., 2014)). (Haberl et al., 2014).

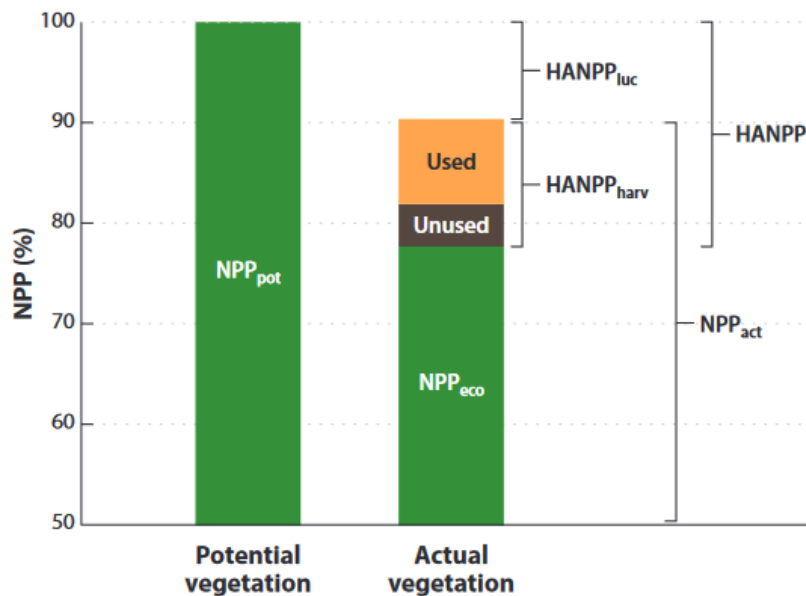


Figura 1: istogramma realizzato utilizzando stime relative all'anno 2000.
Immagine tratta da: Haberl et al., 2014

La domanda è esponenzialmente cresciuta nel corso dell'ultimo secolo, facendo salire di conseguenza anche il valore globale di HANPP. Questo parametro è strettamente legato allo sfruttamento agricolo, poiché la crescita sociodemografica è direttamente proporzionale alla domanda di beni primari alimentari.

Inoltre, per via dell'utilizzo estensivo di fertilizzanti e di superficie sfruttata, l'agricoltura risulta responsabile per il 26% delle emissioni totali di gas serra (Poore and Nemecek, 2018). Ad esempio, alla produzione annuale di riso è legata all'1.3% delle emissioni globali di gas serra, principalmente metano, dato comparabile al settore del trasporto aereo, responsabile del 1.9% delle emissioni (Ritchie et al., 2020).

In totale, metà del terreno abitabile del pianeta è utilizzato per l'agricoltura, così come il 70% del totale dell'acqua dolce sfruttata (United Nations, 2013). Questo settore inoltre è imputabile per l'eutrofizzazione di quasi l'80% delle acque dolci e marine. Fosforo e azoto sono i principali elementi implicati in questo processo, derivati principalmente da effluenti di scarico dell'agricoltura e di impianti industriali (Environment Agency, 2021).

Per questo motivo, il rimodellamento del sistema agricolo e alimentare risulta una sfida necessariamente da affrontare.

1.3 Le microalghe: una soluzione sostenibile

Per risolvere le problematiche sopracitate è possibile seguire due vie. La prima è aumentare l'efficienza fotosintetica, in maniera da generare organismi piante in grado di convertire l'energia luminosa in biomassa in maniera più efficiente. La seconda soluzione si esplica nell'incrementare il valore di NNP, sfruttando aree non produttive, come ad esempio zone desertiche, oceani, acque reflue, terre marginali, o addirittura tetti di edifici. In questo contesto, le microalghe si propongono come una soluzione rinnovabile, che può contribuire al raggiungimento di obiettivi globali ecologici e di mitigazione del riscaldamento climatico.

Questi organismi hanno la caratteristica di possedere un'efficienza fotosintetica maggiore rispetto alle piante usate a scopi agroalimentari o energetici. Infatti, esse compongono circa l'1% della biomassa fotosintetica globale, ma sono responsabili della generazione di quasi la metà di tutto il carbonio fissato a livello mondiale. Tendenzialmente, convertono l'energia solare in sistemi industriali con un'efficienza del 3%, da comparare allo 0.2-1% delle piante terrestri (de Vree et al., 2015) e presentano un tasso di crescita superiore a quello di altri organismi vegetali (Mutanda et al., 2020).

Inoltre, le microalghe sono organismi molto versatili, che possono crescere in varie condizioni di pH, intensità di luce e temperatura. Sono adatte ad essere coltivate in bioreattori, senza la necessità di competere per terreno coltivabile (Stephenson et al., 2011), ampliando le loro applicazioni anche nel biorisanamento, essendo capaci di sfruttare gas di scarico industriali da cui sequestrano la CO₂ (Cheah et al., 2015) e di crescere in acque reflue urbane e agricole contaminate da nitrati e fosfati (Gong and Jiang, 2011; Mutanda et al., 2020).

Le microalghe sono in grado di sintetizzare una vasta gamma di metaboliti e composti bioattivi, prodotti ad alto valore aggiunto, che trovano applicazioni in campo alimentare, chimico, cosmetico, energetico, farmaceutico e nutraceutico (Ahmed, 2018). Tra i vari prodotti ricavabili dalle microalghe si trovano carotenoidi e vitamine come beta-carotene, astaxantina, fucoxantina, molecole con attività antiossidanti, antitumorali e ipocolesterolemizzanti.

Altri prodotti di rilievo sono proteine, clorofille e polisaccaridi. In particolare, le microalghe sono in grado di accumulare una grande quantità di lipidi. Sfruttati dalle cellule come riserva energetica, possono arrivare al 70% del peso secco se coltivate in opportune condizioni di crescita (i.e. stress da carenza di nutrienti) (Stephenson et al., 2011). I lipidi prodotti dalle microalghe hanno acquistato sempre più interesse per via delle loro applicazioni come precursori di biocarburanti, di composti farmaceutici e come supplementi alimentari. Nello specifico in quest'ultimo caso, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) non sono

sintetizzati in animali e sono introdotti nella dieta principalmente tramite consumo di prodotti ittici. Infatti, la principale fonte di PUFA è rappresentata dal fitoplancton(Puccinelli et al., 2021) alla base della catena alimentare, grazie al quale vengono accumulati nei pesci e propagati a livelli trofici superiori. Tuttavia, PUFA omega-3, come acido eicosapentanoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA), componenti delle membrane di alcune cellule e essenziali in processi cerebrali(Morgese et al., 2016), possono essere estratti sostenibilmente direttamente dalle microalghe(Ahmed, 2018), riducendo la dipendenza dalla pesca intensiva e del suo impatto ambientale.

Tra i più importanti acidi grassi che sono in grado di sintetizzare, hanno particolare rilevanza i triacilgliceroli (TAG), poiché possono essere convertiti in biodiesel tramite transesterificazione.

La coltivazione di questi microrganismi presenta ancora problematiche legate all'economicità del processo per quanto riguarda la produzione in scala industriale. In particolare, la produzione di biodiesel non risulta tutt'ora sufficientemente competitiva. Tuttavia, un processo di "bioraffineria" come quello rappresentato dalla coltivazione delle microalghe, permette la produzione di composti ad alto valore aggiunto parallelamente alla produzione di biocarburante. Questo, se accoppiato alla generazione di un sistema di sequestro della CO₂, utilizzata dalla fotosintesi, può significativamente controbilanciare gli svantaggi legati agli alti costi produttivi e garantire la sostenibilità del processo (Mutanda et al., 2020).

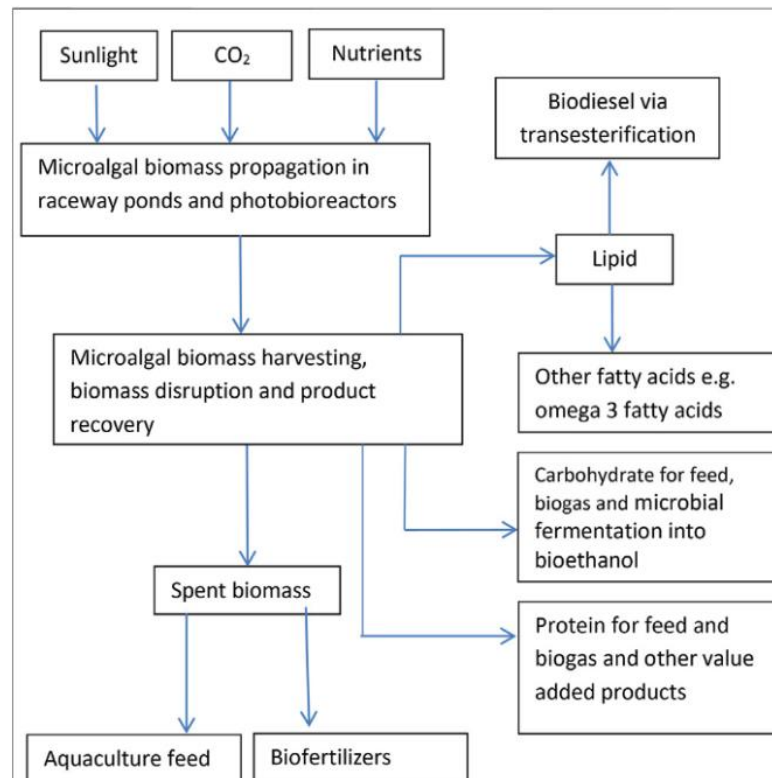


Figura 2: rappresentazione schematica del concetto di bioraffineria basato su microalghe. Immagine adattata da Mutanda et al., 2020

1.3.1 Biocarburanti dalle microalghe

Nella produzione di biofuel di prima e seconda generazione, come bioetanolo, biodiesel e biometano, viene sfruttata biomassa utilizzata anche per l'alimentazione, ad esempio, mais (*Zea mays*), palma da olio (*Elaeis guineensis*), canna da zucchero (*Saccharum* spp.). Questo tipo di produzione crea di per sé una contraddizione interna, generando competizione tra l'utilizzo di questa materia prima per la produzione di biocarburanti e il suo impiego alimentare.

Il biodiesel di origine vegetale, prodotto principalmente da colture come palma da olio, palma da cocco e *Jatropha*, possiede diversi vantaggi (Ong et al., 2015): possono essere create miscele con il diesel fossile, ha simile numero di ottani, non contiene zolfo, emette minori quantità di particolato e permette di ridurre le emissioni di anidride carbonica e di monossido di carbonio. Tuttavia, la produzione di questo tipo di biocarburante presenta dei limiti (Datta et al., 2019). La resa di produzione risulta piuttosto bassa rispetto alle richieste del mercato. Ad esempio, dedicare tutta la produzione statunitense di mais e soia ai biocarburanti soddisferebbe solo il 12% della domanda di benzina e il 6% della

domanda di diesel (Hill et al., 2006). Pertanto, considerando la superficie coltivabile necessaria per raggiungere quantità soddisfacenti, la produzione di questo biocarburante non può sostituire efficacemente il petrolio senza influire sulle forniture alimentari.

Le microalghe invece, sono una fonte di biomassa estremamente più flessibile grazie ai vantaggi precedentemente elencati. Possono quindi essere fatte crescere senza competere con il settore alimentare, con impatto ambientale estremamente inferiore. Inoltre, grazie a un'efficienza fotosintetica relativamente elevata e ad un tasso di crescita superiore, possono raggiungere una produttività maggiore se comparate a piante terrestri utilizzate per gli stessi scopi. Ad esempio, la palma da cocco e la *Jatropha* raggiungono rispettivamente, per la produzione di olio, 2700 L/ha e 1900 L/ha, mentre le microalghe si stima possano raggiungere valori di quasi 59000 L/ha (Mutanda et al., 2020).

1.3.2 *Nannochloropsis gaditana*

Nannochloropsis gaditana è un'alga marina fotoautotrofa eucariotica, appartenente al phylum degli eteroconti. Sono organismi unicellulari di forma sferica, di grandezza compresa tra i 2-4 μm . Sono dotati di una parete cellulare polisaccaridica, in cui contengono un singolo voluminoso cloroplasto formato da 4 membrane in cui è presente unicamente la clorofilla di tipo *a*, caratteristica che la distingue dagli altri generi di microalghe.

Sono microrganismi importantissimi in acquacultura, soprattutto perché si trovano alla base della piramide alimentare (Rocha et al., 2003). Le specie del genere *Nannochloropsis* sono molto apprezzate per la loro capacità di sintetizzare sostenibilmente non solo grandi quantità di lipidi, ma anche molti composti come beta-carotene, zeaxantina, violaxantina (Perin and Morosinotto, 2019). In particolare, *N.gaditana* è in grado di produrre grandi quantità di TGA per la produzione di biodiesel ("The influence of cultivation period on growth and biodiesel properties of microalga *Nannochloropsis gaditana* 1049 | Elsevier Enhanced Reader," n.d.). Coltivata in condizioni di Azoto limitante (Simionato et al., 2013), arriva a accumularne fino al 60-70% della sua biomassa. In queste particolari circostanze, l'organismo viene spinto ad aumentare la sintesi de novo di acidi grassi e ad attivare meccanismi di ricircolo dei lipidi presenti in membrana. Inoltre, in queste condizioni, non solo aumenta la quantità di oli da poter estrarre, ma cambia anche la loro composizione, aumentando in rapporto il contenuto in TGA. Tuttavia, la deprivazione di N influisce negativamente sulla crescita, poiché blocca la sintesi proteica implicata nella produzione di pigmenti

necessari alla fotosintesi. Per questo motivo, il processo va diviso in due fasi: la prima si focalizza sull'accumulo di biomassa, la seconda sulla produzione di lipidi

N.gaditana quindi può essere utilizzata in sistemi di "bioraffineria", generando una vasta gamma di molecole e parallelamente apportando vantaggi ambientali, inquadrandosi in una prospettiva di economia circolare.

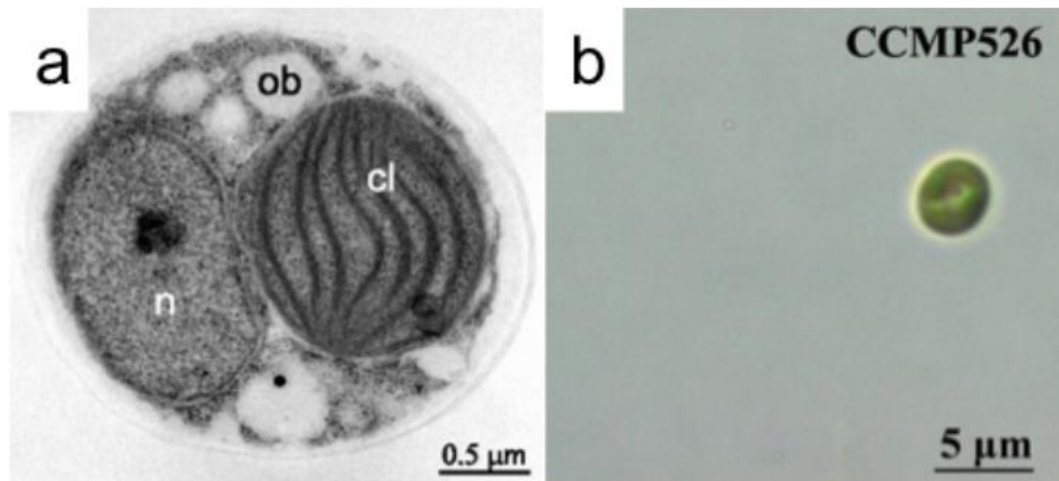


Figura 3: *N. gaditana*. In a) è presente una immagine di microscopia elettronica dei *N.gaditana*. Sono segnati il nucleo (n), il cloroplasto (cl) e corpi oleosi (ob). b) immagine al microscopio ottico di *N.gaditana*. immagine riadattata da Jackson, 2018

1.4 Ingegneria genetica in *N. gaditana*

Le caratteristiche delle microalghe rendono il loro sfruttamento particolarmente interessante dal punto di vista biotecnologico e la loro coltivazione permette di ricavare in maniera innovativa diverse tipologie di prodotti. Per ottenere un sistema produttivo efficace, gli studi si concentrano sulle strategie da attuare per migliorare le rese, per incontrare le esigenze di mercato. Gli aspetti più rilevanti in merito riguardano ad esempio la selezione delle specie da utilizzare e l'ottimizzazione delle condizioni di coltivazione. In particolare, per sfruttare il pieno potenziale di questi organismi, l'ingegneria genetica rappresenta un valido strumento da applicare nella ricerca in ambito biotecnologico. Questo approccio offre nuove opportunità per l'isolamento di specie ottimizzate per scopi industriali, che permettano di ottenere maggiori rese produttive.

La maggior parte degli studi al riguardo sono stati condotti sulla specie modello *Chlamydomonas reinhardtii*, dimostrando la potenzialità dell'utilizzo di tecniche come il sistema CRISPR-Cas nell'effettuare efficientemente editing genomico per la generazione di ceppi microalgali ottimizzati per la produzione di composti per applicazioni farmaceutiche e biofuel (Mutanda et al., 2020).

Il sistema CRISPR-Cas sfrutta un sistema di difesa procariotico diretto contro i batteriofagi e può essere sfruttato in ricerca come meccanismo alla base di tecniche di biologia molecolare per effettuare editing genomico. Questa tecnologia ha rivoluzionato l'ingegneria genetica. La sua efficienza si basa sulla formazione di tagli a doppio filamento (DSB) effettuate dagli enzimi Cas, guidate da specifiche sequenze di RNA. Esistono tre sistemi CRISPR-Cas, che si differenziano per gli enzimi Cas coinvolti. Tra le varie tipologie di effettori del meccanismo CRISPR, può essere utilizzata la proteina Cpf1, una endonucleasi di classe II, in grado di effettuare un taglio nella doppia elica del DNA, lasciando

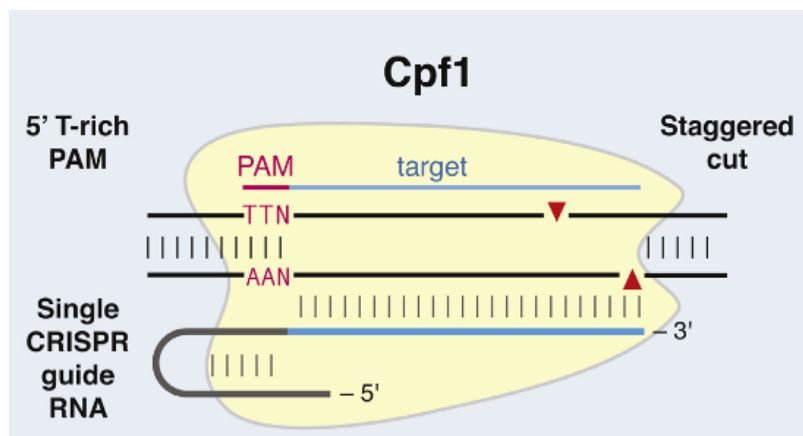


Figura 4: Cpf1 è una nucleasi guidata da RNA che fa parte del sistema di difesa in batteri e può essere utilizzata per l'editing genomico. La figura schematizza il suo meccanismo di azione: essa riconosce la sequenza PAM 5'-TTN-3' per effettuare il DSB. Immagine riadattata da: Zetsche et al., 2015

estremità coesive di 4-5 nucleotidi. Questo enzima agisce con grande specificità grazie all'intervento di una molecola di RNA guida, una sequenza di circa 40 nucleotidi (crRNA) in grado di ibridarsi alla regione bersaglio scelta all'interno del genoma. In particolare, la proteina Cpf1 è in grado di riconoscere una particolare sequenza PAM (Protospacer Adjacent Motif) ricca in timidina presente al 5' del sito bersaglio (Zaidi et al., 2017; Zetsche et al., 2015). L'endonucleasi effettua il taglio a doppio filamento tra questa particolare sequenza presente nel genoma e la regione di legame dell'RNA che funge da guida. Questa tecnologia è compatibile con ulteriori applicazioni in biologia molecolare per poter ottenere organismi knock out (KO), sfruttando la specificità del sistema per effettuare tagli in locus genici di interesse. Questa particolare caratteristica può anche essere utilizzata per l'inserzione di sequenze di DNA tramite meccanismo di ricombinazione omologa (HR).

1.4.1 Ricombinazione omologa

La riparazione omologa avviene tra una coppia di sequenze omologhe di DNA. Fisiologicamente, è un meccanismo fondamentale alla cellula per riparare fratture a doppio filamento che spesso avvengono durante i processi di replicazione e in alcuni organismi viene utilizzato per aumentare la variabilità genetica, permettendo lo scambio di pezzi di informazione tra diversi cromosomi (Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, “Biologia Molecolare della Cellula”; Quinta Edizione, Zanichelli Editore, 2009; p.320-332).

Questo meccanismo può essere sfruttato in combinazione con tecnica CRISPR-Cpf1 per inserire nel genoma ospite una determinata sequenza di interesse a seguito del taglio a doppio filamento effettuato dalla endonucleasi.

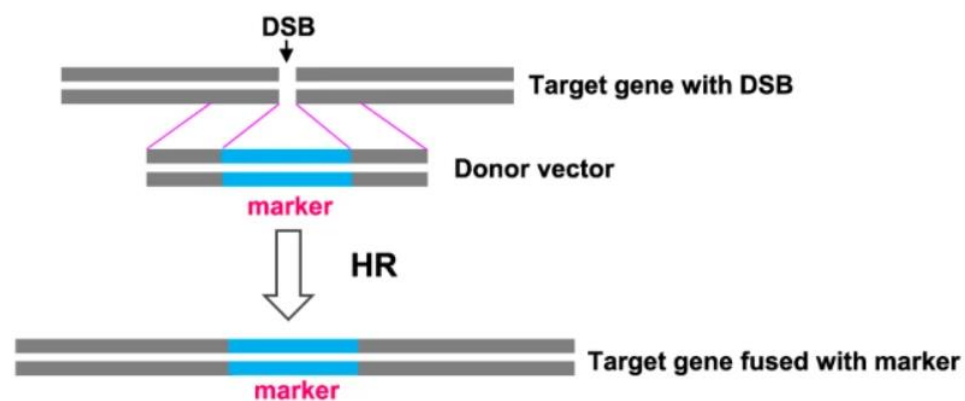


Figura 5: illustrazione schematica dell'evento di ricombinazione omologa. Questo meccanismo può essere sfruttato per introdurre sequenze di DNA all'interno di un determinato gene bersaglio. immagine riadattata da Yoshino et al., 2019

La biologia molecolare è emersa come strumento biotecnologico nella ricerca di ceppi geneticamente ingegnerizzati, con caratteristiche ottimizzate per scopi industriali rispetto al ceppo parentale evolutosi in natura (wild type, wt). Le tecniche utilizzate in questo campo consentono di ottenere ceppi modificati, ad esempio che presentano sovraespressione dei geni coinvolti nella sintesi della molecola di interesse, risultando in maggior produttività. In particolare, in letteratura è possibile trovare esempi di applicazioni del metodo CRISPR/Cas per il KO di geni bersaglio in *N.gaditana* (Vogler et al., 2021) e della tecnica CRISPR-Cpf1 per isolare ceppi ottimizzati nella produzione lipidica (Naduthodi et al., 2019).

1.5 Fotosintesi

La fotosintesi è un processo biologico grazie al quale l'energia luminosa proveniente dal sole, viene catturata e convertita in energia chimica, per alimentare il metabolismo delle cellule. In particolare, gli organismi fotosintetici sono in grado di generare ossigeno e composti organici, a partire da materia inorganica quale CO₂ e acqua, in presenza di luce solare. Le prime fasi avvengono grazie a proteine integrali di membrana e pigmenti. Gli ultimi step avvengono invece in proteine libere in fase acquosa. Nelle cellule fotosintetiche, la fotosintesi avviene nei cloroplasti, strutture subcellulari grandi pochi micrometri di diametro. Questi compartimenti subcellulari derivano da cianobatteri, che si sono integrati nelle cellule grazie ad un processo di endosimbiosi.



(reazione generale della fotosintesi)

I cloroplasti sono formati internamente da un complesso sistema di membrane chiamati tilacoidi, al cui interno è presente lo stroma, ovvero la fase acquosa che ospita diversi enzimi liberi e sede del metabolismo del carbonio.

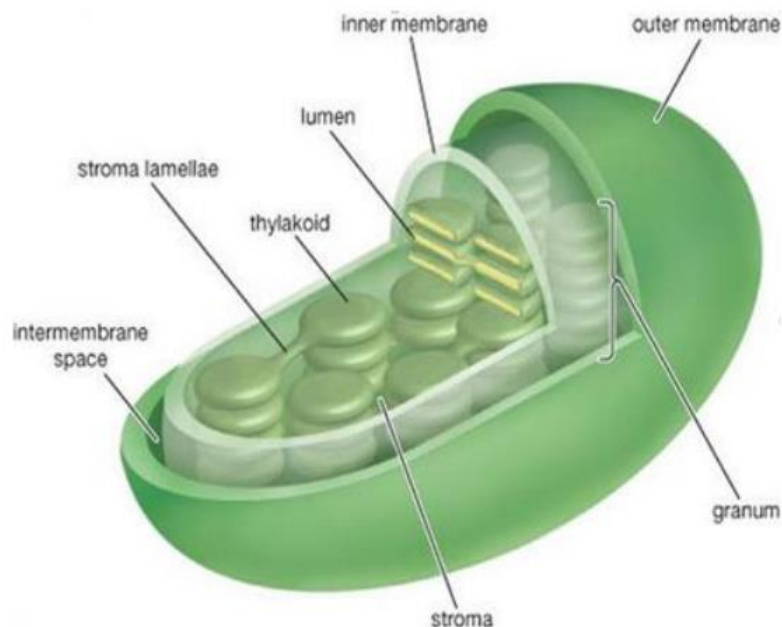


Figura 6: immagine che mostra la struttura interna di un cloroplasto (in piante). Immagine riadattata da Hu, 2014

La radiazione solare, per poter essere sfruttata nella fotosintesi, necessita di un apparato funzionale al trasferimento di energia da fotoni a elettroni. Gli

organismi fotosintetici sono dotati di complessi antenna molecole cromofore altamente coniugate come clorofilla a, batterioclorofille, ficoeritrobiline, ficocianobiline, beta-carotene e luteina (a seconda dell'organismo di appartenenza), in grado di incanalare l'energia luminosa e trasmetterla ai centri di reazione del Fotosistema II (PSII) P680 e del Fotosistema I (PSI) P700 (Voet and Voet, 2010, p. 905). Queste permettono la migrazione di elettroni eccitati a livelli energetici superiori, da una molecola a un'altra. Questo trasferimento avviene per risonanza, ossia un'interazione tra gli orbitali molecolari delle molecole coinvolte, tale per cui l'eccitazione viene trasferita tra i membri del gruppo molecolare che possiedono un accoppiamento elettronico sufficientemente elevato. I centri di reazione iniziano una serie di complesse reazioni chimiche, che permettono il trasferimento elettronico da una molecola donatrice, che si trova in uno stato eccitato dalla radiazione luminosa, a una molecola accettore, che verrà quindi ridotta. Il PSII, una volta eccitato, convoglia gli elettroni verso il PSI, passando attraverso il complesso del citocromo b_6/f (fig.8). La catena di trasporto elettronica così generata servirà in ultima istanza a ridurre il NADP^+ in NADPH.

Il trasferimento di elettroni viene accoppiato, come si vede in fig.9, a un movimento protonico attraverso la membrana tilacoidale, che si orienta dalla parte stromale, in direzione del lume. Questo flusso di protoni unidirezionale, genera un gradiente elettrochimico che può essere sfruttato dall'ATP sintasi per accumulare l'energia generata da questo sistema sotto forma di legame chimico nelle molecole di ATP, che vengono poi sfruttate per ridurre l'anidride carbonica assorbita dall'ambiente, in carboidrati (Blankenship, 2021).

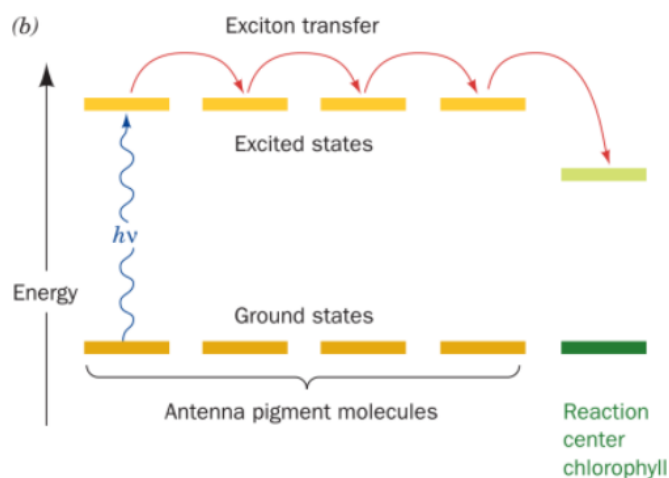


Figura 7: schema del trasferimento di energia dalla luce solare al centro di reazione. Immagine riadattata da Voet, 2004

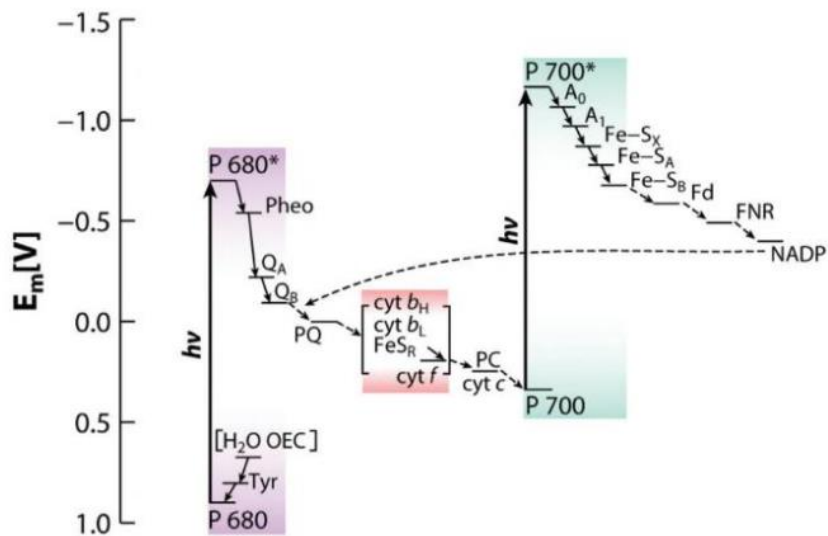
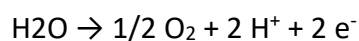


Figura 8: rappresentazione dello schema Z della fotosintesi. Questo schema è utile per comprendere le proprietà ossidative dei due fotosistemi. La luce irradia i pigmenti che trasmettono l'energia al centro di reazione. I centri di reazione eccitati trasferiscono l'energia al plastochinone, il quale diffonde verso il citocromo *b₆/f*. In questo modo, il centro di reazione del PSI riceve gli elettroni che serviranno infine a ridurre il NADP. immagine da: "Biochemistry", Donald Voet, Judith G. Voet. Edizione 4, John Wiley & Sons, 2010. p. 906

Il flusso di elettroni è continuo nei due fotosistemi, il che presuppone esista un sistema di rifornimento che garantisca la generazione di ATP e di NADPH. Circa tre miliardi di anni fa, l'evoluzione di batteri fotosintetici ha permesso lo sviluppo di un macchinario molecolare in grado di ottenere elettroni dall'acqua in maniera continua, ovvero l'oxygen-evolving complex (OEC)(Raymond and Blankenship, 2008), secondo la reazione:



Gli elettroni così sviluppati vengono trasferiti al P680, il centro di reazione del PSII, tramite le proteine D1. Queste proteine fanno parte del supercomplesso PSII (Liu and Blankenship, 2019) e sono in grado di accogliere gli elettroni generati dalla fotolisi dell'acqua e trasferirli al centro di reazione P680 (I principi di biochimica di Lehninger", Nelson e Cox, Quinta edizione. p.802).

I protoni vengono pompato attraverso la membrana tilacoidale per la generare il potenziale elettrochimico e l'ossigeno può diffondere liberamente in atmosfera.

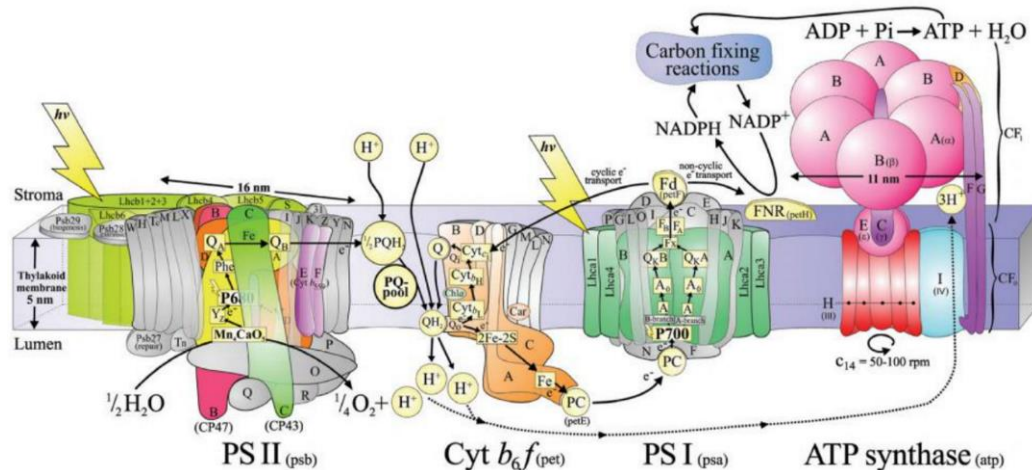


Figura 9: rappresentazione semplificata della fotosintesi ossigenica. I principali attori nella catena di trasporto elettronica sono il PSII, il citocromo b_6/f e il PSI. Questi tre elementi sono composti da diverse subunità implicate nel trasporto degli elettroni attraverso la membrana. Il gradiente protonico, generato in parallelo al movimento delle cariche negative, è utilizzato dall'ATP sintasi per la generazione di ATP. Durante questo processo, la ferredossina (Fd) agisce in concerto con la ferredossina-NADP⁺ reduttasi (FNR) per ridurre il NADP⁺ in NADPH. Il trasporto degli elettroni è un processo complesso che coinvolge molti elementi, quali chinoni, composti inorganici come il Manganese, che facilita l'ossidazione dell'acqua nella reazione di fotolisi, e centri Fe-S. Immagine da: "Molecular Mechanisms of Photosynthesis", Robert E. Blankenship, Edizione 3; John Wiley & Sons, 2021. p. 8

1.6 Ciclo di Calvin-Benson

Il ciclo di Calvin-Benson è un insieme di reazioni indipendente dalla luce, che utilizza l'energia chimica dell'ATP ed il potere riducente del NADPH prodotti dalle fasi precedenti della fotosintesi, per sintetizzare zuccheri, lipidi, proteine e componenti organici a partire da CO₂ atmosferica e acqua.

La fissazione della CO₂ avviene all'interno dei cloroplasti, dove sono presenti gli enzimi coinvolti nella reazione. Il ciclo ha bisogno di un accettore a 5 atomi di carbonio, rappresentato dal ribulosio 1,5 bifosfato (RuBP), il quale viene condensato con una molecola di anidride carbonica, che viene fissata ad opera dell'enzima ribulosio 1,5 bifosfato carbossilasi/ossigenasi (RUBISCO), a formare il primo intermedio del ciclo, il 3-fosfoglicerato (3-PGA). Nella fase successiva viene generata gliceraldeide 3-fosfato (G3P) in due passaggi, sfruttando il gruppo fosforico dell'ATP e gli elettroni donati dal NADPH. La G3P può subire destini alternativi, ma la maggior parte di essa viene riciclata per rigenerare RuBP, fondamentale per mantenere il ciclo attivo e per fissare altre molecole di CO₂.

La stechiometria complessiva della reazione (come segnato in fig.) indica che servono 3 molecole di CO_2 e altrettante molecole di RuBP per la generazione di 6 molecole di G3P a spese di 6 molecole di ATP e 6 molecole di NADPH. Ad ogni giro del ciclo di Calvin, delle 6 molecole di G3P prodotte, una esce dal ciclo come fonte energetica per la cellula, mentre le altre 5 vengono riarrangiate per rigenerare 3 molecole di RuBP, a spese di 3 ulteriori molecole di ATP.

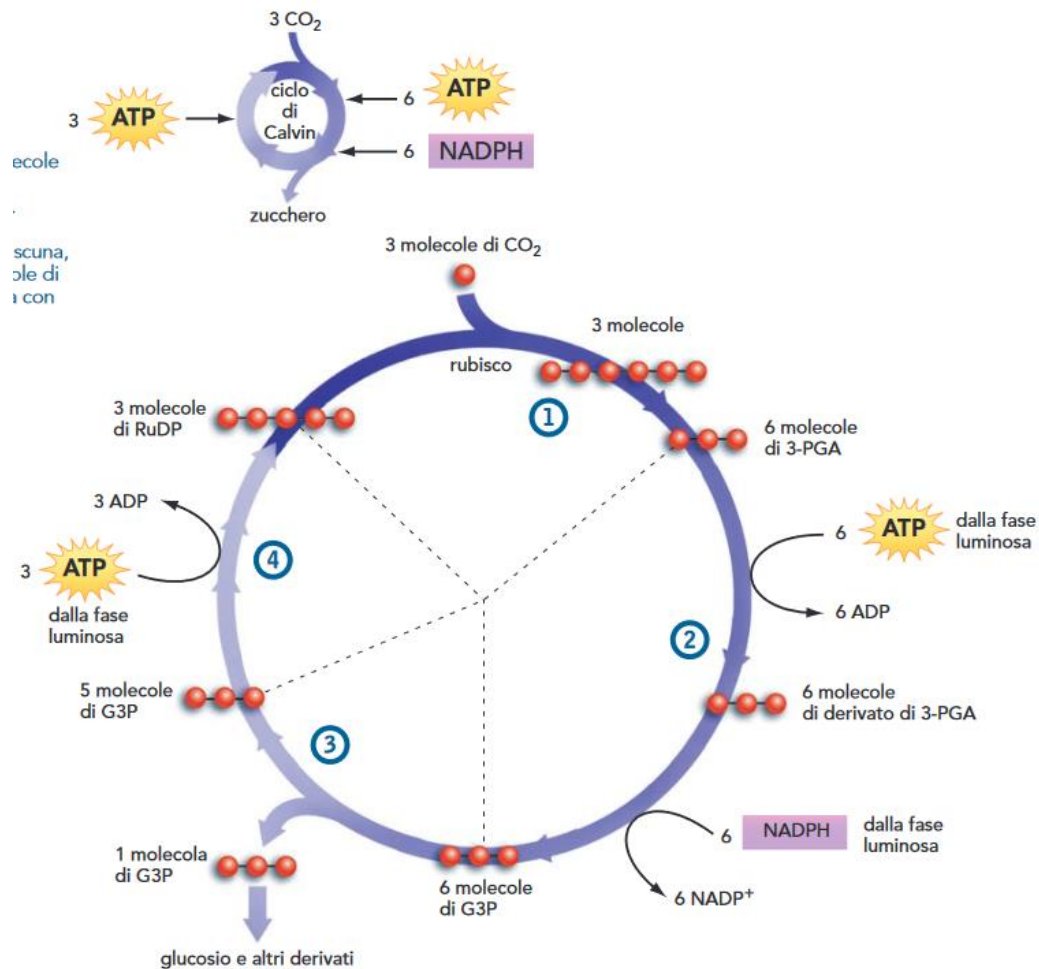


Figura 10: schema ciclo di Calvin Benson. Adattato da *La fotosintesi* – Istituto San Giovanni Bosco, p.263

1.7 L'enzima RUBISCO e il suo legame con i meccanismi di concentrazione del carbonio (CCM)

L'enzima RUBISCO è il più abbondante in natura e può essere presente in diverse forme. Ad esempio, la forma I, presente in alghe e cianobatteri, è composto da 8 subunità, ciascuna delle quali presenta un sito attivo per la fissazione della CO_2 .

Esso presenta un numero di turnover piuttosto basso (circa 3), se comparato ad altri enzimi (ad esempio l'anidrasi carbonica presenta un numero di turnover di 600000)(Cummins et al., 2018). Questo parametro rappresenta, a saturazione, la quantità di prodotto generato nell'unità di tempo. Infatti, a 25°C l'enzima fissa circa 3 molecole di CO₂ al secondo. Per questo motivo, gli organismi fotosintetici necessitano grandi quantità di questo enzima (circa 250 mg/mL nei cloroplasti), e un meccanismo di concentrazione del carbonio (CCM) in prossimità dell'enzima RUBISCO, per poter massimizzare la reazione di carbossilazione ("I principi di biochimica di Lehninger", Nelson e Cox, Quinta edizione, p.820).

I sistemi CCM sono stati sviluppati in organismi fotosintetici acquatici, poiché la diffusione in acqua della CO₂ è minore che in aria. Di conseguenza, essi sfruttano enzimi come l'anidrasi carbonica (CA), in grado di convertire il carbonio inorganico disciolto (DIC, dissolved inorganic carbon) in ione idrogenocarbonato (HCO₃⁻) e parallelamente presentano trasportatori del bicarbonato, in maniera da aumentare la concentrazione di CO₂ nel cloroplasto in vicinanza del sito attivo dell'enzima RUBISCO (Gee and Niyogi, 2017). Questo è un meccanismo di CCM di tipo biofisico, la tipologia di CCM più rappresentativa nelle microalghe (I principi di biochimica di Lehninger", Nelson e Cox, Quinta edizione). Studi in specie appartenenti al genere *Nannochloropsis* hanno dimostrato la presenza di una CA di tipo alfa, chiamata CAH1, localizzata nel lume del reticolo endoplasmatico, che converte gli ioni bicarbonato provenienti dai trasportatori in CO₂ utilizzabile dall'enzima RUBISCO (Wei et al., 2019).

L'enzima RUBISCO, inoltre, presenta un'attività secondaria ossigenasica, a cui partecipa l'O₂ atmosferico, che ne compromette l'efficienza (Hagemann et al., 2016). L'ossigeno compete con la CO₂ per il sito attivo dell'enzima RUBISCO, il quale viene utilizzato dall'enzima per una reazione di condensazione con il RuBP, formando una molecola di 3PGA, che viene subito utilizzata nel ciclo di Calvin e una molecola di 2-fosfoglicolato (2PG). Quest'ultima è una molecola tossica per la cellula, che deve essere detossificata.

L'ossigenazione del ribulosio 1-5 bifosfato è influenzato da diversi parametri ambientali. Ad esempio, le alte temperature diminuiscono la solubilità della CO₂, che decresce più velocemente rispetto a quella dell'ossigeno. In questi casi la reazione di ossigenazione viene favorita, specialmente negli organismi acquatici (Hagemann et al., 2016).

I meccanismi CCM, oltre a favorire la reazione di carbossilazione, diminuiscono la velocità dell'ossigenazione che genera il 2PG. La cellula utilizza il processo di fotorespirazione per metabolizzare questa molecola (Busch, 2020).

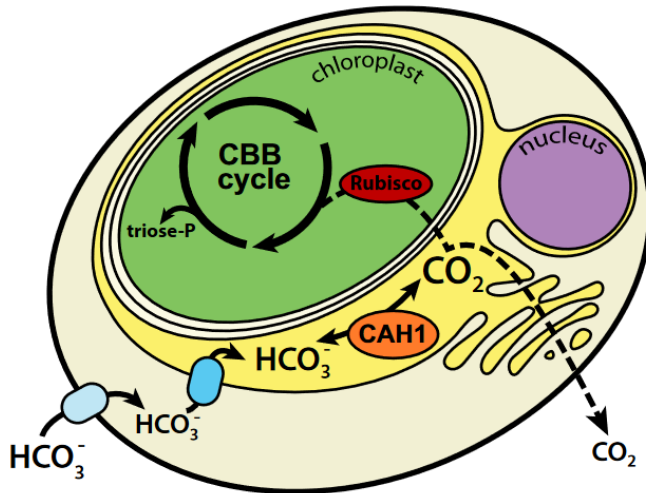


Figura 11: rappresentazione schematica del CCM presente in *N. oceanica*. I trasportatori pompano il bicarbonato nel citoplasma. All'interno della cellula, l'enzima CA genera la CO_2 , utilizzabile dall'enzima RUBISCO. immagine adattata da Gee and Niyogi, 2017

1.8 La Fotorespirazione

La fotorespirazione è un processo fondamentale negli organismi fotosintetici poiché, permette di metabolizzare il 2PG, una molecola tossica per la cellula. Questa molecola infatti, inibisce il trioso fosfato isomerasi, il sedoeptulosio 1,7-bifosfatasi (Li et al., 2019), entrambi enzimi coinvolti nell'ultima fase del ciclo di Calvin per la rigenerazione di RuBP e la fosfofruttochinasi (Hagemann et al., n.d.), proteina implicata nella glicolisi.

Complessivamente, le reazioni della fotorespirazione portano alla perdita di una molecola di CO_2 e di una molecola di NH_3 . Risulta essere un processo energeticamente dispendioso per la cellula, da cui consegue una perdita stimata del 25% dell'efficienza fotosintetica e del 30-50% della resa in biomassa (Ferne and Bauwe, 2020).

Alcune ipotesi suggeriscono che l'evoluzione non abbia selezionato un enzima RUBISCO in grado di distinguere CO_2 e O_2 , perché essa è avvenuta 2,5 miliardi di anni fa, prima della comparsa dei primi cianobatteri fotosintetici e prima che la

concentrazione ambientale di O₂ arrivasse a livelli tali per cui potesse esercitare una pressione selettiva sulla RUBISCO (Ieningher, p830). Successivamente, l'ossigenazione atmosferica ha innescato la comparsa di meccanismi metabolici fotorespiratori primitivi, necessari alla sopravvivenza degli organismi fotosintetici (Ferne and Bauwe, 2020).

La fotorespirazione è un processo complesso, che coinvolge un vasto numero di enzimi. Il processo qui descritto appartiene a piante terrestri, ad esempio *Arabidopsis thaliana*, ed è presente in alghe, come *Chlamydomonas*. Tuttavia, si è evoluto diversamente negli organismi e in alcuni, come in *N.gaditana*, non è stato caratterizzato. Questo processo implica il coinvolgimento di tre compartimenti subcellulari differenti: il cloroplasto, il perossisoma e il mitocondrio. Inizia nel primo di questi, con l'idrolisi del 2PG in glicolato ad opera dell'enzima 2PG fosfatasi (PGLP), che viene poi indirizzato verso il perossisoma, grazie al trasportatore BASS6 (Bile Acid Sodium Symporter 6). In questo compartimento il glicolato viene ossidato dall'enzima glicolato ossidasi (GOX), producendo gliossilato e perossido d'idrogeno, che viene decomposto dalla catalasi. Dopo il trasporto nel perossisoma, il gliossilato può venire transaminato a glicina tramite l'enzima serina:gliossilato aminotransferasi (SGAT) o dall'enzima glutammato:gliossilato aminotransferasi (GGAT). Da qui, la glicina viene trasportata nel mitocondrio per essere convertita in serina. In questo processo agisce dapprima il sistema di scissione della glicina (GSC), un complesso multiproteico in grado di convertire la glicina in N⁵,N¹⁰-metilentetraidrofolato (THF). In questa fase vengono perse una molecola di CO₂ e una di NH₃, per la cui ri-fissazione la cellula dovrà spendere risorse metaboliche. Infatti, l'Azoto così perso necessita di una molecola di ATP e di una molecola di NADPH per poter essere reintegrato nel ciclo della glutammina sintasi-glutammato sintasi (GS-GOGAT), enzimi che giocano un ruolo centrale nel metabolismo dell'Azoto negli organismi fotosintetici. A questo punto viene generata serina, ad opera dell'idrossimetiltransferasi (SHMT), deaminata a idrossipiruvato e ridotto a glicerato all'interno del perossisoma. Quest'ultimo rientra infine nel cloroplasto attraverso il trasportatore PLGG1 e viene trasformato in 3-PGA dal glicerato 3-chinasi (GLYK), che può rientrare nel ciclo di Calvin, completando il ciclo della fotorespirazione e restituendo 3 dei 4 atomi di Carbonio inizialmente generati dalla reazione ossigenasica dell'enzima RUBISCO.

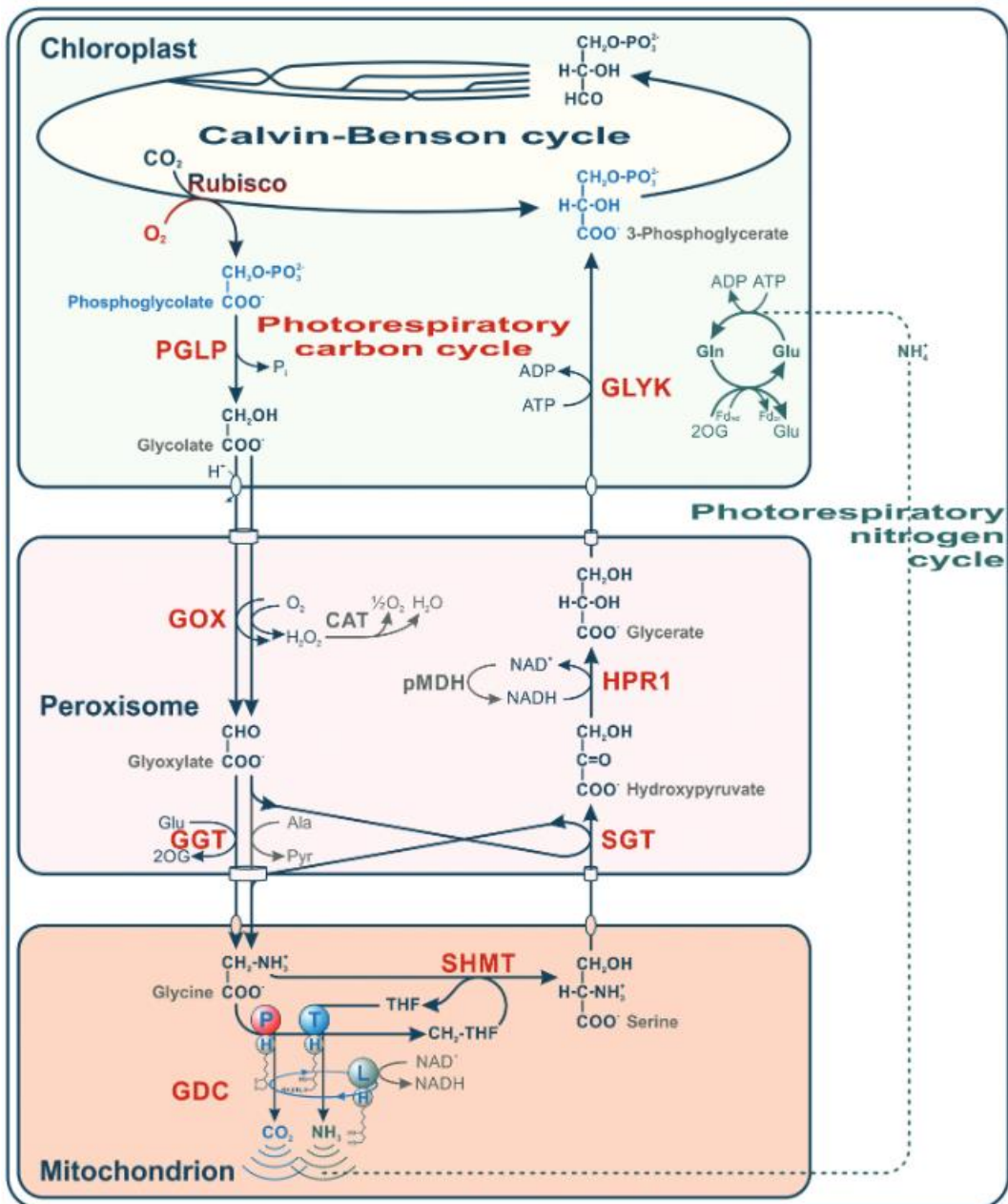


Figura 12: La figura riporta lo schema del flusso della fotorespirazione. (PGLP): fosfoglicolato fosfatasi; (BASS6): simportatore di sodio bile acido; (HPR1): idrossipiruvato redutasi 1; (GOX): glicolato ossidasi; (GAT): Gliossilato aminotrasferasi; (SHMT) idrossimetil trasferasi; (GLYK): Glicerato chinasi; (SGT) gliossilato aminotrasferasi, (HPR1) idrossipiruvato redutasi 1. Immagine riadattata da Hagemann et al, 2016

1.9 Bypass Fotorespiratori

Per incontrare i sempre crescenti bisogni energetici e alimentari dovuti alla crescita economica e demografica globale, sono in corso di studio molti approcci che hanno come scopo l'incremento della produttività agricola. Come citato in precedenza, la soluzione a questa problematica può ritrovarsi nel generare organismi vegetali in grado di convertire l'energia solare in biomassa più efficacemente. Le strategie a disposizione possono essere divise in 4 categorie(Bar-Even, 2018): 1) agire sulle reazioni luminose della fotosintesi, e.g. ottimizzare i complessi antenna per aumentare l'efficienza fotosintetica(Ort et al., 2011); 2) aumentare l'apporto di CO₂, e.g. perfezionare il sistema di CCM implementando componenti esogene di questo processo(Price et al., 2013); 3) operare sul RUBISCO(Wilson and Whitney, 2017). Tuttavia, questa strategia risulta infruttuosa, poiché questo enzima si è evoluto nel corso di milioni di anni, e ulteriori modifiche risultano futili; 4) agire sulla rigenerazione di RuBP, e.g. sostituendo il ciclo di Calvin-Benson con un processo sintetico alternativo, per ottenere un ciclo ottimizzato nella fissazione di CO₂ (Schwander et al., 2016).

Oltre alle metodologie elencate, un'ulteriore strategia per ottimizzare la produzione di biomassa è agire sulla fotorespirazione, ad esempio rimpiazzando il ciclo endogeno con un processo più performante, ad esempio che non implichi il rilascio di CO₂ nel corso delle reazioni enzimatiche del ciclo (bypass a "zero emissioni") o che addirittura sia in grado di assorbire CO₂ dall'ambiente (bypass *carbon positive*).

Un pathway sintetico per funzionare deve tenere in considerazione importanti aspetti, tra cui: valutare il costo energetico per la cellula, gli intermedi generati, per cui non devono essere tossici o generare effetti indesiderati come inibire enzimi coinvolti nel metabolismo centrale, ponderare l'influenza che il ciclo può avere su altri metabolismi endogeni, la termodinamica del processo e, in generale, come esso possa condizionare l'omeostasi dell'organismo(Bar-Even, 2018).

Lo scopo di indagare su processi alternativi alla fotorespirazione è evitare gli effetti negativi di questo pathway precedentemente discussi. Uno degli obiettivi chiave è eliminare gli step fisiologici altamente inefficienti, che costano alla cellula carbonio, azoto ed equivalenti riducenti. Il secondo aspetto importante è bloccare l'efflusso di metaboliti della fotorespirazione verso il perossisoma o il mitocondrio. Infatti, è possibile che gli intermedi generati nel pathway sintetico possano essere substrati di altri enzimi endogeni, generando competizione tra il ciclo di fotorespirazione e il bypass alternativo. Il confinamento del riciclo di 2PG

nel cloroplasto, senza coinvolgere tre compartimenti subcellulari diversi, permette di sfruttare a pieno il processo implementato, evitando il rischio di generare competizione tra i due pathway.

1.10 Ciclo del Beta-Idrossiaspartato

Il processo metabolico identificato come possibile bypass fotorespiratorio in questo lavoro di tesi è il ciclo del beta-Idrossiaspartato (BHAA) (Schada von Borzyskowski et al., 2019). Questo processo è presente in proteobatteri marini ubiquitari, permettendo loro di metabolizzare il glicolato, composto organico prodotto abbondantemente negli oceani dagli organismi autotrofi e presente nelle acque come acido organico disciolto. I 4 enzimi protagonisti di questo pathway (fig.13) sono stati ritrovati in un unico cluster genico nell'alfa-proteobatterio *Paraccoccus dentrificans*: il gene *bhacC* traduce il primo enzima del ciclo, la beta-idrossiaspartato aldolasi (BHAA), che condensa gliossilato e glicina in beta-idrossiaspartato. *BhaB* codifica per la beta-idrossiaspartato deidratasi, che togliendo una molecola dal beta-idrossiaspartato genera imminosuccinato, il quale poi viene ridotto dall'imminosuccinato riduttasi (IREC, gene *bhcD*), producendo L-aspartato. L'ultimo step prevede la formazione di ossalacetato attraverso la transaminazione del gliossilato in glicina ad opera dell'aspartato-gliossilato aminotransferasi (gene *bhcA*), molecola che termina il ciclo, utilizzabile per produrre biomassa ed energia.

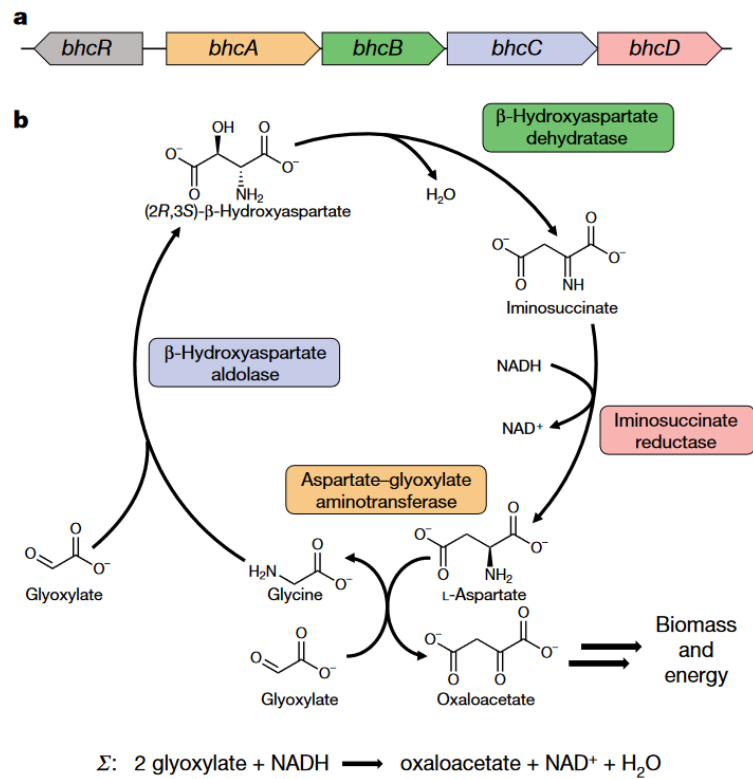


Figura 13: schema del ciclo del beta-idrossiaspartato presente in proteobatteri marini. Immagine adattata da Schada von Borzyskowski et al., 2019

2. SCOPO DELLA TESI

L'emergenza climatica attuale richiede un rapido cambiamento del sistema produttivo mondiale per quanto riguarda i beni alla base della nostra economia, tramite l'identificazione di alternative sostenibili agli attuali processi industriali basate sulle risorse fossili. Le microalghe hanno il potenziale di diventare importanti attori in questa trasformazione. Questi organismi fotosintetici hanno la capacità di sintetizzare e accumulare una grande varietà di molecole chiave per l'economia odierna, rappresentando un'importante fonte di biomassa, di biocarburanti, di biocommodities e di composti bioattivi, con applicazioni energetiche, alimentari, nutraceutiche. In particolare, *Nannochloropsis gaditana* è una alga eucariotica unicellulare che ha acquistato considerevole interesse dal punto di vista biotecnologico, vista la sua capacità di produrre in modo sostenibile una grande varietà di prodotti come carotenoidi, grassi omega-3, clorofille e triacilgliceroli, quest'ultimi convertibili in biodiesel per transesterificazione. Tuttavia, il suo sfruttamento su larga scala risulta ancora poco competitivo economicamente per rese di biomassa poco soddisfacenti e alti costi operativi. Questi aspetti possono essere affrontati e risolti applicando tecniche di ingegneria genetica al fine di ottenere ceppi con un metabolismo ottimizzato per aumentare la produzione di biomassa e di molecole di interesse.

L'oggetto di studio di questo lavoro di tesi è il processo della fotorespirazione, un ciclo metabolico fondamentale negli organismi fotosintetici, ma che tuttavia limita la produttività di biomassa. Questo processo è stato caratterizzato in molti organismi. Tuttavia, non sono presenti studi riguardo il ruolo di questo ciclo in *N.gaditana*.

Per approfondire le conoscenze riguardanti questo processo, il progetto propone di identificare geni potenzialmente coinvolti in meccanismi fotorespiratori in questa specie e di isolare ceppi che manchino dell'espressione delle relative proteine. Per bloccare questo metabolismo, sono stati scelti come oggetto del knock-out i primi tre geni coinvolti nel ciclo: la 2 fosfoglicolato fosfatasi (PGLP), la glicolato ossidasi (GOX) e il trasportatore di sodio bile acido (BASS6). L'obiettivo è trasformare le cellule di *N.gaditana* con il sistema d'ingegneria genetica CRISPR-Cpf1 e isolare i ceppi mutanti risultanti dal silenziamento genico tramite screening fenotipici e genomici.

Lo scopo ultimo del progetto, non risulta semplicemente nell'interruzione di questo ciclo, ma della sua sostituzione con uno più efficiente, con la prospettiva di generare dei ceppi più produttivi, utili allo scale up industriale. In merito a

questo aspetto, il secondo obiettivo dello studio è l'implementazione di un ciclo metabolico sintetico, che blocchi il processo endogeno e al contempo generi un flusso alternativo ottimizzato dei metaboliti della fotorespirazione. Esso deve essere validato ed espresso stabilmente all'interno di *N.gaditana*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Tecniche di biologia molecolare

3.1.1 Reazione polimerasica a catena (PCR)

a) Componenti dei costrutti di delezione genica

La tecnica di PCR è stata utilizzata per amplificare i componenti del costrutto:

- le regioni di omologia geniche (HR)
- i componenti della cassetta di resistenza (promotore *ubiquitina* + gene *Sh ble* + terminatore *fcpA*)

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
H ₂ O	A volume
5X Phusion HF Buffer	1x
dNTP 10 mM	200 µM
Primer 10µM (Fw + Rv)	0,5 µM
Templato DNA*	variabile
Phusion DNA Polymerase (Thermo Scientific™)	1 unità/50 µL

Tabella 1: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR

*Il templato di DNA utilizzato per i componenti della cassetta di resistenza deriva da DNA plasmidico, di cui si utilizzano 1-10 ng. Il templato di DNA per le regioni di omologia è DNA genomico, di cui si utilizzano 50-250 ng.

Parametri utilizzati per le reazioni di amplificazione:

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30s
- Denaturazione	98°C	10s
- Appaiamento	45-72°C *	30s
- Estensione	72°C	**
(35 cicli)		
Estensione finale (1 ciclo)	72°C	5 minuti
	4°C	-

Tabella 2: parametri utilizzati nelle reazioni di PRC 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.

Di seguito sono riportati i primer utilizzati per l'amplificazione delle sequenze di interesse. Le regioni sottolineate rappresentano le code dei primer che vengono utilizzate nella tecnica OE-PCR per unire i frammenti di DNA e generare il costrutto per la delezione genica.

HR 5'	BASS6 Fw	TACCTAAACACCTACGTGTAAACATGCGCGT
	BASS6 Rv	<u>TCGGGGCAGCAGCTTCCACTTTCCTAAT</u>
Cassetta Di Resistenza	ZeoR Fw	<u>ATTAGGAAAGTGGAAAGCTGCTGCCCCGA</u>
	ZeoR Rv	<u>CTTGTCGCTGCCCCTCGAGAAAACCTCA</u>
HR 3'	BASS6 Fw	<u>TGAGTTTTCTCGAGGGGCAGCGGACAAG</u>
	BASS6 Rv	GATTCGAGAAGATGTGCTCCGACACATCAA

Tabella 3: coppie di primer per amplificare le regioni di interesse. Le sequenze sono utilizzate per la generazione del costrutto di delezione per bass6

HR 5'	GOX Fw	ATACGCATGCCTGAGGAAGGGCGTTTGTGC
	GOX Rv	<u>TCGGGGCAGCAGCTCTGTCTCTCCGCT</u>
Cassetta Di Resistenza	ZeoR Fw	<u>AGCGGAAGAGACAGAGCTGCTGCCCCGA</u>
	ZeoR Rv	<u>CGTACTCCGCTGGCCTCGAGAAAACCTCA</u>
HR 3'	GOX Fw	<u>TGAGTTTTCTCGAGGCCAGCGGAGTACG</u>
	GOX Rv	GATTCGAGAAGATGTGCTCCGACACATCAA

Tabella 4: coppie di primer per amplificare le regioni di interesse. Le sequenze sono utilizzate per la generazione del costrutto di delezione per gox

b) Amplificazione delle sequenze di DNA per il protocollo di assemblaggio BASIC

La tecnica di PCR è stata utilizzata per amplificare i frammenti necessari per l'assemblaggio del costrutto per l'implementazione del bypass sintetico. Esso si compone di 11 frammenti di DNA, elencati in Tabella 5, con le relative coppie di primer per l'amplificazione. Le regioni sottolineate corrispondono alle code che

sono utilizzate:

- nel protocollo di assemblaggio BASIC (sequenze sottolineate in maiuscolo)
- nella tecnica di OE-PCR, nel caso delle cassette di espressione di GDH e BHAA

FRAMMENTI		PRIMER
Regione di omologia 5' (gox up)		Fw: <u>TCTGGTGGGTCTCTGTCCATACGCATGCCTGAGGAA</u>
		Rv: <u>CGATAGGTCTCCCGAGCCCTGTCTCTTCCGCTGCAC</u>
CASSETTA DI ESPRESSIONE	Promotore <i>lhcx1</i> + Peptide Segnale	Fw: <u>TCTGGTGGGTCTCTGTCCTACTTTTATTTCTTTA</u>
		Rv: <u>tggtgatggtgatg</u> ACGAGTGCGAGACC

(sequenze sottolineate in minuscolo)

DI GDH	GDH	Fw: <u>ggtctcgcaactcgt</u> CATCACCATCACCA	Tab ella 5: lista dei com pon enti del cost rutt o gene rato tram ite il prot ocoll o di asse	
		Rv: <u>ttttaaggaaggtt</u> TAGGCGGTTTTGG		
	Terminatore <i>fcpA</i>	Fw: <u>ccaaaaccgcctaa</u> ACCTTCCTTAAAAA		
		Rv: <u>CGATAGGTCTCCCGAGCCGAAAACTCATCCTGTGCC</u>		
CASSETTA DI ESPRESSIONE DI BHAA	Promotore <i>lhcx1</i> + Peptide Segnale	Fw: <u>TCTGGTGGGTCTCTGTCTACTTTTTATTTCTTTA</u>		
		Rv: <u>tggtgatggtgatg</u> ACGAGTGCGAGACC		
	BHAA	Fw: <u>ggtctcgcaactcgt</u> CATCACCATCACCA		
		Rv: <u>ttttaaggaaggt</u> TCAGTATCCCTTTC		
	Terminatore <i>fcpA</i>	Fw: <u>gaaagggataactga</u> ACCTTCCTTAAAAA		
		Rv: <u>CGATAGGTCTCCCGAGCCGAAAACTCATCCTGTGCC</u>		
	Regione di omologia 3' (gox down)			Fw: <u>TCTGGTGGGTCTCTGTCCGTAGTCTCGTACCAATCC</u>
				Rv: <u>CGATAGGTCTCCCGAGCCACCCATGTCATGGGCCAG</u>
Vettore pBluescript		Fw: <u>TCTGGTGGGTCTCTGTCCCCAGCTGCATTAATGAAT</u>		
		Rv: <u>CGATAGGTCTCCCGAGCCCGTCGTTTTACAACGTCG</u>		

mblogging BASIC e le relative coppie di primer utilizzate per l'amplificazione tramite PCR dei singoli frammenti.

In seguito, è riportata la miscela di reazione (Tabella 6). La polimerasi utilizzata è la Platinum SuperFi II PCR Master Mix (Invitrogen™). Questo enzima permette la produzione di ampliconi ad alta fedeltà.

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
H ₂ O	A volume
2X Platinum SuperFi II PCR Master Mix	1x
Primer 10μM (Fw + Rv)	0,5 μM
Templato DNA*	variabile

Tabella 6: Miscela di reazione per l'allestimento delle PCR

*0.1-10ng di templato plasmidico per l'amplificazione dei componenti delle cassette di espressione e per il vettore pBluescript. 5-100 ng di DNA genomico per l'amplificazione delle regioni di omologia del gene gox.

Parametri utilizzati per le reazioni di PCR (Tabella 7):

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30s
- Denaturazione	98°C	10s
- Appaiamento	60°C *	30s
- Estensione (35 cicli)	72°C	**
Estensione finale (1 ciclo)	72°C	5 minuti

Tabella 7: parametri utilizzati nelle reazioni di PRC condotte con la polimerasi Platinum SuperFi II

*La specifica composizione del buffer, stabilizza i duplex templatato-primer nella fase di appaiamento. Di conseguenza, la temperatura di accoppiamento è di 60°C per la maggior parte delle coppie di primer. Tuttavia, in alcuni casi risulta necessario ottimizzare la temperatura per evitare la generazione di ampliconi aspecifici: GDH: 56°C; gox up: 68°C; Plhcx1 (GDH): 42°C.

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

c) PCR per analisi delle colonie batteriche

Sono effettuate reazioni di PCR per verificare il clonaggio dei costrutti di delezione e dei componenti del costrutto del bypass sintetico (gox up, cassette di espressione di GDH e BHAA, gox down, pBluescript, ZeoR), nel vettore commerciale pJET1.2. Il vettore contiene una sequenza di DNA che conferisce la resistenza all'antibiotico ampicillina, permettendo la selezione delle colonie batteriche su terreno solido di LB addizionato con ampicillina in concentrazione 100 µg/mL. Le singole colonie vengono trasferite e risospese in 50µl di acqua sterile (acqua MilliQ). 9µl di sospensione batterica sono aggiunti direttamente alla miscela di reazione di PCR, usando la polimerasi Platinum SuperFi II (Invitrogen) o la polimerasi DreamTaq (Thermo Scientific) o la polimerasi OrangeTaq. La procedura prevede un trattamento iniziale di 10 minuti a 95°C per lisare le cellule batteriche e permettere la diffusione del DNA nella miscela di reazione.

La OrangeTaq mix è preparata in laboratorio e contiene: l'enzima Taq polimerasi, buffer contenente dNTPs, Orange G loading dye.

COMPONENTI	Quantità
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific) o mix OrangeTaq	1x (10µl)
Sospensione batterica	9 µL
Primer 10 mM(Fw + Rv)	0,5 µL

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
------	-------------	-------

Denaturazione iniziale (1 ciclo)	95°C	10 minuti
Denaturazione	95°C	10s
- Appaiamento	58°C	30s
- Estensione	72°C	**
(35 cicli)		
Estensione finale (1 ciclo)	72°C	5 minuti
	4°C	-

Tabella 9: parametri della reazione di PCR per l'amplificazione delle sequenze clonate all'interno del vettore commerciale pJET1.2

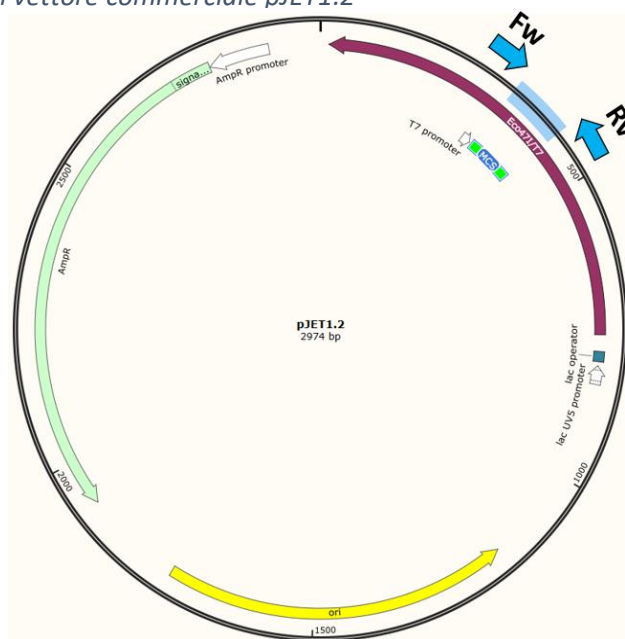


Figura 74: mappa del vettore commerciale pJET1.2. i primer appaiono nei punti indicati dalle frecce azzurre e amplificano la sequenza di DNA clonata all'interno del vettore

I primer utilizzati (Tabella 10) amplificano la regione del plasmide nella quale si inserisce la sequenza di interesse (figura 14), il Multiple Cloning Site (MCS).

PRIMER	SEQUENZA
Forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
Reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

Tabella 10: i primer utilizzati nelle reazioni di PCR su colonia.

d) Screening genomici dei ceppi KO di *N.gaditana*

Il DNA estratto dalle colonie di *N.gaditana* (Metodi 3.1.10) è utilizzato come template nelle reazioni di PCR per gli screening genomici. Le coppie di primer utilizzati amplificano la regione di omologia al 5': il primer forward si appaia al 5'

del locus genico di interesse e il primer reverse si appaia all'interno della cassetta di resistenza. Alternativamente, sono utilizzate le coppie che amplificano la regione di omologia al 3' del gene bersaglio, con le medesime caratteristiche. Di seguito sono riportate le sequenze dei primer:

PGLP2UP_F	CTCGTTTTCACGTGGCTGTCCG
PGLP2DOWN_R	GAGAATGGTGATTCAAGCAGACTC
BASS6UP_F	TTGGAAACTGCACGCAATGCAGC
BASS6DOWN_R	GTGCGAGTAGATGTCGAGTCC
GOXUP_F	TAGGTAACGACGAAGAGTACGAC
GOXDOWN_R	CGATAGTCCCTTTGCTGTCCC
ZEOUP_R	TGAGCACCGGAACGGCACT
ZEODOWN_F	GGAGGTCGTGTCCACGAACT

Tabella 11: i primer utilizzati nelle reazioni di PCR per gli screening genomici. I primer "UP" sono usati in combinazione con il primer "ZEOUP reverse"; i primer DOWN usati in combinazione con i primer "ZEODOWN forward"

È utilizzata la polimerasi DreamTaq (Tabella 8) o in alternativa la polimerasi Platinum SuperFi II (Tabella 6).

3.1.2 Overlap Extension PCR (OE-PCR):

Questa tecnica sfrutta la reazione polimerasica a catena (PCR) per unire diverse sequenze di DNA in un unico prodotto finale, senza la necessità di utilizzare metodologie che prevedono l'utilizzo di enzimi di restrizione o ligasi. Inoltre, l'impiego di polimerasi ad alta fedeltà permette di ottenere lunghi costrutti, limitando il numero di possibili mutazioni. La base del funzionamento di questa tecnica prevede l'utilizzo di primer specifici per l'amplificazione preliminare dei singoli frammenti da unire in un ciclo di PCR successivo. Essi contengono una zona complementare di appaiamento al filamento di interesse e una coda aggiuntiva che presenta complementarità per la regione terminale del frammento a cui si vuole legare quello amplificato (fig. da Nelson and Fitch, 2012).

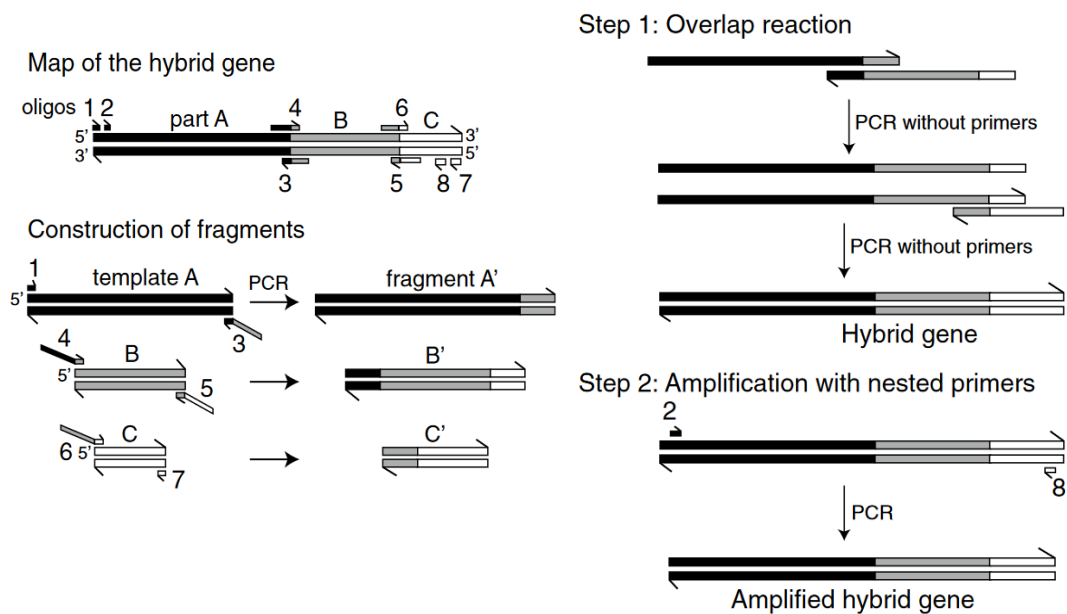


Figura 15: schema concettuale della tecnica OE-PCR. Le barre rappresentano i filamenti di DNA. Le differenti sfumature di grigio indicano le diverse sequenze da unire.

- Figura a sinistra: mappa che illustra l'esempio di un prodotto finale di OE-PCR, costituito dai frammenti A, B, C. Nel caso della generazione delle cassette di delezione dei geni *gox* e *bass6* e delle cassette di espressione di *GDH* e *BHAA*, la sequenza A corrisponde al promotore, B alla sequenza codificante e C al terminatore. I singoli frammenti vengono amplificati tramite PCR. I primer utilizzati si appaiano i frammenti di DNA nelle regioni al 3', mentre la coda al 5' genera la porzione di sequenza che permette la sovrapposizione e la formazione del costrutto finale.
- Figura a destra: schema delle due fasi della tecnica OE-PCR. Nella prima fase non vengono utilizzati primer. Le estremità al 3' dei singoli filamenti si appaiano generando il costrutto completo. Nella seconda fase viene amplificato il prodotto finale, usando i primer esterni.

Immagine riadattata da Nelson and Fitch, 2012

La reazione viene condotta in due fasi:

- 1) La prima fase comprende una reazione di PCR di 12-15 cicli, senza l'utilizzo di primer ed evitando la reazione di extension finale, onde evitare di utilizzare una quantità eccessiva di nucleotidi, che serviranno per la seconda fase del processo. I parametri di temperatura di appaiamento sono da calcolare in base alla polimerasi utilizzata, ai buffer della reazione, alla concentrazione molare di DNA e soprattutto sulla base alla temperatura di melting relativa alle sequenze nucleotidiche che si sovrappongono al 5' o/e al 3' dei vari frammenti, per permetterne l'unione. Il tempo di allungamento deve essere uguale o superiore alla lunghezza del frammento più lungo presente nella mix di reazione, relativamente alla processività della polimerasi utilizzata.

- 2) La seconda fase della OE-PCR si concentra sull'amplificazione del costrutto formato dall'unione dei singoli frammenti generati nella prima fase. Si procede con una reazione di 20-25 cicli, in presenza della coppia di primer esterni specifici per il costrutto totale. In questo caso, è necessario mantenere lo step di extension finale. La temperatura di annealing deve essere calcolata sulla base delle specifiche della polimerasi utilizzata, del buffer di reazione, della concentrazione molare dei primer e della temperatura di melting della coppia di primer. Il tempo di allungamento deve essere uguale o superiore alla lunghezza del costrutto totale, relativamente alla processività della polimerasi utilizzata.

a) OE-PCR per la generazione dei costrutti di delezione genica (GOX e BASS6)

Il template per le sequenze di omologia al 5' e al 3' del locus genico bersaglio è il DNA genomico estratto da *N.gaditana*; Il template per la cassetta di resistenza è il DNA plasmidico con le sequenze relative all'amplificazione dei tre componenti della cassetta di resistenza (*Promotore Ubiquitina – Sh ble – FcpA*). Per la reazione di OE-PCR servono 50-150 ng di acido nucleico a frammento. La miscela di reazione utilizzata viene riportata di Tabella 11. Al termine della prima fase (Tabella 13), viene allestita la seconda fase (Tabella 14), per l'amplificazione del costrutto totale. Le coppie di primer utilizzati corrispondono a quelli più esterni (primer Forward HR 5' + primer Reverse HR 3'), illustrati in Tabella 3 per BASS6 e in Tabella 4 per GOX.

In Tabella 13 sono riportati i parametri utilizzati nella prima fase dell'OE-PCR (come si può notare, non viene eseguito il ciclo di estensione finale) e in Tabella 14 i parametri della seconda fase. (come si può notare, non viene eseguita il ciclo di estensione finale).

Component	Final conc.
H ₂ O	
5X Phusion™ HF Buffer	1X
10 mM dNTPs	200 µM each
Forward primer	0.5 µM
Reverse primer	0.5 µM
Template DNA	
(DMSO , optional)	(3%)
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	0.02 U/µL

Tabella 12: miscela di reazione per la tecnica di OE-PCR. I primer vengono aggiunti al termine della prima fase. La polimerasi utilizzata per la generazione di questi ampliconi è la Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoScientific)

Cycle step	3-step protocol		Cycles
	Temp.	Time	
Initial Denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	5–10 s	12-15
Annealing	X°C	10–30 s	
Extension	72°C	15–30 s/kb	
Hold	4°C	Hold	Hold

Tabella 13: parametri utilizzati nella reazione della prima fase della tecnica di OE-PCR

Cycle step	3-step protocol		Cycles
	Temp.	Time	
Initial Denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	5–10 s	25–35
Annealing	X°C	10–30 s	
Extension	72°C	15–30 s/kb	
Final extension	72°C	5–10 min	1
Hold	4°C	Hold	Hold

Tabella 14: parametri utilizzati per la seconda fase di OE-PCR.

b) OE-PCR per la generazione della cassetta di espressione GDH

I frammenti di DNA per la reazione di OE-PCR (Promotore *lhcx*, sequenza codificante GDH e terminatore *fcpA*) sono amplificati come descritto in Metodi 1.1.1 b). Per la reazione di OE-PCR sono usati 10-150 ng di acido nucleico a frammento, in rapporto equimolare.

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
H ₂ O	A volume
5X Q5 Reaction Buffer	1X
dNTPs 10mM	200 µM
Primer (Fw + Rv)	0,5 µM
Templato DNA	variabile
5X GC Enhancer	1X
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	0.02 unità/µL

Tabella 15: miscela di reazione per la tecnica di OE-PCR per la generazione della cassetta di espressione di GDH. La polimerasi utilizzata è la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB).

In tabella 16 sono riportati i parametri utilizzati nella prima fase dell'OE-PCR. La temperatura di appaiamento è calcolata dal "NEB Tm calculator", (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>), sulla base delle sequenze di sovrapposizione.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30''
- Denaturazione	98°C	10''
- Appaiamento	69°C	30''
- Estensione	72°C	1'20''
(12-15 cicli)		

Tabella 16: parametri della reazione della prima fase di OE-PCR.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30''
- Denaturazione	98°C	10''
- Appaiamento	69°C(+0.2°C/s)	10''
- Estensione	72°C	2'10''
(25-35 cicli)		
- Estensione finale	72°C	2'
(1 ciclo)	4°C	-

Tabella 17: parametri della reazione della seconda fase di OE-PCR. La transizione tra la fase di appaiamento e la fase di estensione comprende un "ramp rate" di 0.2°C/s

Le coppie di primer utilizzati corrispondono a quelli più esterni della cassetta di espressione di GDH (Primer Forward *Plhcx1* (GDH) + primer Reverse terminatore *fcpA* (GDH)), mostrati in Tabella 5. In tabella 17 è mostrato il programma della seconda fase di OE-PCR. La fase di appaiamento comprende un “ramp rate”, ossia un ciclo in cui la temperatura, da una fase a un'altra della PCR, cambia nel tempo (in questo caso, aumenta di 0,2°C al secondo).

c) OE-PCR per la generazione della cassetta di espressione BHAA

I frammenti di DNA per la reazione di OE-PCR (Promotore *lhcx*, sequenza codificante GDH e terminatore *fcpA*) sono amplificati come descritto in Metodi 1.1.1 b). Per la reazione di OE-PCR sono usati 10-150 ng di acido nucleico a frammento, in rapporto equimolare. La miscela di reazione è mostrata in tabella 18 e i parametri in Tabella 19 e 20.

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
H ₂ O	A volume
2X Platinum SuperFi II PCR Master Mix	1x
Primer 10μM (Fw + Rv)	0,5 μM
Templato DNA	variabile

Tabella 18: miscela di reazione della tecnica di OE-PCR

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30''
- Denaturazione	98°C	10''
- Appaiamento	60°C	30''
- Estensione	72°C	50''
(12-15 cicli)		

Tabella 19: parametri della prima fase della tecnica di OE-PCR, usando la polimerasi Platinum SuperFi II (Invitrogen). I primer non sono utilizzati in questa fase. Non è effettuato il ciclo di estensione finale.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30''
- Denaturazione	98°C	10''
- Appaiamento	62°C	30''
- Estensione	72°C	1'45''
(25-35 cicli)		
Estensione finale	72°C	5'
	4°C	-

Tabella 20: parametri della seconda fase della tecnica di OE-PCR, usando la polimerasi Platinum SuperFi II (Invitrogen). I primer sono introdotti al termine della prima fase.

3.1.3 Elettroforesi su gel di agarosio

Questa tecnica analitica permette la separazione di sequenze di DNA sulla base del peso molecolare. È utilizzata per valutare i risultati di PCR, OE-PCR, restrizioni enzimatiche, purificazioni di DNA da miscela di PCR, purificazione di DNA da gel di agarosio e precipitazione di DNA in sodio acetato. Il gel d'agarosio allo 0,8-1% (w/v), è preparato con polvere di agarosio in TAE (40mM Tris pH 8, 20mM acido acetico, 1mM EDTA). La soluzione viene riscaldata fino a 85-95°C, dopodiché è aggiunta la soluzione di intercalante EuroSafe – Fluorescent Nucleic Acid Stain (Euroclone) 20.000X, ad una concentrazione finale 1X. Quest'ultimo permette la visualizzazione degli acidi nucleici tramite emissione di fluorescenza tramite irradiazione con raggi UV. L'applicazione di un campo elettrico a voltaggio costante (100-110 V) permette la migrazione degli acidi nucleici (molecole polianioniche) in direzione del polo positivo. La separazione delle sequenze avviene sulla base del diverso peso molecolare. Per riferimento è usata la soluzione GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher), costituita da frammenti di DNA di lunghezza e quantità note.

3.1.4 Purificazione di DNA

a) dalla miscela di reazione di PCR

Questa tecnica è utilizzata per purificare gli ampliconi generati tramite PCR dagli altri componenti presenti nella miscela di reazione, quali primer, dNTPs, enzimi, Sali e composti organici. È usato il Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit.

b) da gel di agarosio

La banda corrispondente alla sequenza di interesse viene esportata dal gel di agarosio (preparato allo 0,8% w/v) con l'aiuto di un bisturi, trasferita in una eppendorf e processata utilizzando Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit.

Questa metodologia è utilizzata specialmente nel caso in cui l'amplificazione tramite PCR o OE-PCR presenti ampliconi aspecifici o prodotti parziali.

c) tramite precipitazione con sodio acetato e isopropanolo

Questa tecnica è utilizzata per ottenere una soluzione concentrata di DNA puro, priva di contaminanti come carboidrati, fenolo e altri composti organici, proteine, enzimi, Sali. Questa procedura è utilizzata per purificare i prodotti delle reazioni di PCR e di OE-PCR, in particolare:

- i componenti del costrutto per la delezione genica di GOX e BASS6 (HR 5', cassetta di resistenza, HR 3')
- i componenti della cassetta di espressione del gene GDH amplificati tramite PCR (*Plhcx*, GDH e terminatore *fcpA*)

- i componenti della cassetta di espressione del gene BHAA (promotore *lhcx*, BHAA e terminatore *fcpA*)
- i frammenti del costrutto del bypass sintetico unire tramite protocollo di assemblaggio BASIC: regione di omologia 5' (gox up), regione di omologia 3'(gox down), cassetta di espressione GDH (prodotta tramite OE-PCR), cassetta di espressione BHAA (prodotta tramite OE-PCR), vettore pBluescript
- cassetta di resistenza alla zeocina (ZeoR)

Descrizione della procedura: si aggiungono 0.1 volumi di sodio acetato 3M a pH 5.2 e 0.7 volumi di isopropanolo. L'alta concentrazione di sale interagisce con le cariche del DNA, favorendone la precipitazione in isopropanolo. Segue centrifugazione a 4°C, 18000 g, 30 min. Il pellet formato da DNA è lavato con etanolo 70% ed è effettuato un secondo ciclo di centrifugazione. 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 Reazione di ligazione

Reazione utilizzata per clonare sequenze di DNA all'interno del vettore commerciale pJET1.2. Il protocollo utilizzato è quello del kit CloneJET™ PCR Cloning. La strategia prevede la ligazione di frammenti con estremità blunt, quindi i clonaggi non sono direzionati. Preparata la soluzione di reazione (Tabella 21), si miscela l'intero volume di ligazione e successivamente viene incubato per 12-16h a 16°C.

componente	volume
2X Reaction Buffer	5 µL
Prodotto di PCR BLUNT purificato	in rapporto 3:1 con vettore
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µL)	0.5µL
Acqua	Fino a 10µL
T4 DNA ligasi	1µL
Volume totale	10µL

Tabella 21: miscela di reazione per la ligazione di sequenze di DNA al plasmide commerciale pJET1.2, secondo il protocollo presente nel kit CloneJET™ PCR Cloning

3.1.6 Quantificazione di acidi nucleici

a) Spettrofotometro

La quantificazione è eseguita con lo spettrofotometro a doppio raggio Cary 100 UV-VIS (Agilent). Viene misurato contemporaneamente il valore di assorbanza del campione e del bianco (acqua deionizzata sterile) a lunghezza d'onda 260 nm (A260), in cuvetta di quarzo Suprasil (Hellman) (cammino ottico=1 cm). Ai fini dell'analisi, viene misurato e il valore di assorbanza a 320nm, per eliminare artefatti dovuti al rumore di fondo. Questa lunghezza d'onda non è assorbita né da acidi nucleici né da proteine e viene sottratto agli altri valori di assorbanza. La formula utilizzata per il calcolo della concentrazione di DNA (sapendo che una soluzione pura di DNA a doppio filamento 50 ng/μl presenta A260=1):

$$[\text{dsDNA}] \text{ (ng/}\mu\text{l)} = 50 \text{ ng/}\mu\text{l} * A_{260} * (\text{fattore di diluizione})$$

La formula utilizzata per la concentrazione di RNA (sapendo che una soluzione pura di RNA 40 ng/μl presenta A260=1):

$$[\text{RNA}] \text{ (ng/}\mu\text{l)} = 40 \text{ ng/}\mu\text{l} * A_{260} * (\text{fattore di diluizione})$$

b) Nanodrop

È stato utilizzato lo strumento NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Esso permette la quantificazione grazie a un sistema di fibre ottiche e a una lampada allo xenon come fonte di luce. Lo strumento è collegato a un software che in automatico calcola la concentrazione di acidi nucleici e la purezza del campione. Inizialmente occorre effettuare la misurazione del bianco (acqua deionizzata sterile), dopodiché si prosegue con la quantificazione degli acidi nucleici, caricando 1 μl di campione direttamente sulla apposita piattaforma.

Sia nella quantificazione con lo spettrofotometro, sia nella quantificazione con il Nanodrop, è possibile misurare le assorbanze dei campioni a lunghezze d'onda 230nm e 280nm. Il rapporto A260/230 ha un valore ottimale superiore al 2. Se inferiore, indica la presenza di contaminazioni da fenolo e carboidrati. Il rapporto ottimale A260/280 è ~ 1.8 per il DNA, ~ 2 per l'RNA. Se inferiore, indica contaminazioni da proteine.

3.1.7 Trasformazione delle cellule di *E.coli* DH5α

1) Induzione della termocompetenza

Le cellule di E.coli DH5α sono trattate utilizzando le soluzioni RF1 e RF2, riportate in Tabella 22.

RF1		RF2	
COMPONENTI	CONCENTRAZIONE	COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
RbCl	100mM	MOPS	100mM
MnCl ₂	50mM	RbCl ₂	50mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	10 mM
Ack	30 mM	Glicerolo	15%
Glicerolo	15%		

Tabella 22: componenti e concentrazioni delle soluzioni RF1 e RF2

La soluzione RF1 è portata a pH 5,8 con acido acetico 0,2M e la soluzione RF2 è portata a pH 6.8 con NaOH 1M. Le cellule DH5α sono coltivate in terreno liquido LB a 37°C in agitazione (180RPM), fino ad ottenere una densità ottica (OD600nm) di 0.3-0.4. La coltura viene raffreddata e centrifugata per 10 minuti, 1800 g a 4°C. Il pellet batterico è risospeso in RF1 (1/3 del volume della coltura) e posto in ghiaccio per 2h. Si ripete la centrifugazione, si risospende il pellet batterico in soluzione RF2 (1/12.5 del volume iniziale). Dopo 15 minuti in ghiaccio sono prodotte aliquote da 50-100 µL della soluzione di batteri, posti in azoto liquido e conservate a -80°C.

2) Trasformazione delle cellule batteriche termocompetenti

Le aliquote di E.coli DH5α sono scongelate in ghiaccio (15-20min). 10 µL della reazione di ligazione sono aggiunti alla sospensione batterica, e si effettuano 30 min di incubazione in ghiaccio. Lo shock termico è eseguito esponendo i batteri per 90'' alla temperatura di 42°C. Questo causa la formazione di pori nelle membrane, per l'ingresso del materiale genetico all'interno delle cellule. Successivamente, l'aliquota è trasferita in ghiaccio per 2'. Al termine di questa fase, sono aggiunti 900-950µL di terreno LB sterile e si prosegue con incubazione a 37°C, con agitazione a 180 rpm, per 1h. Infine, la coltura batterica è trasferita su piastre di LB solido addizionato con ampicillina 100 µg/ml per la selezione delle cellule trasformate. Le colture sono lasciate crescere in incubatore a 37°C per circa 18h.

3.1.8 Estrazione di DNA plasmidico dalle cellule batteriche

Le colonie batteriche contenenti il costrutto di interesse sono incubate in 6 mL di terreno liquido LB addizionato con ampicillina 100 µg/mL in agitazione (180 RPM) a 37°C. Il pellet di batteri è ottenuto tramite un passaggio di centrifugazione a 14'000 g, 3 minuti; il DNA plasmidico è estratto con GeneJet Plasmid Miniprep kit (ThermoFisher). Per ottenere una maggiore quantità di materiale genetico (ne

servono 2,5-5µg per la trasformazione delle cellule di *N.gaditana*), le cellule batteriche sono incubate per circa 18h in un volume di 50-100 mL. Una volta centrifugate le cellule a 5000 g per 5 minuti, è utilizzato il GeneJet Plasmid Midiprep kit (ThermoFisher) per estrarre il DNA plasmidico.

3.1.9 Restrizione enzimatica

Le restrizioni enzimatiche del DNA si basano sulla capacità delle endonucleasi di riconoscere e tagliare specifiche sequenze del DNA, detti siti di restrizione. Esistono diverse classi di enzimi di restrizione. In particolare, le endonucleasi di tipo II, individuano sequenze palindromiche e possono creare estremità coesive o estremità piatte. Ogni enzima è specifico per un determinato sito di restrizione, di conseguenza è possibile scegliere il tipo di endonucleasi in base al taglio desiderato.

I componenti della miscela di reazione sono: Buffer 1X (ogni enzima di restrizione possiede un buffer specifico), acqua deionizzata sterile (fino a volume), DNA ed enzima di restrizione. Il volume di campione di DNA e di enzima vanno calcolate tenendo conto che 1 Unità enzimatica permette la restrizione di 1 µg di DNA in 1h.

Questo metodo è utilizzato per validare l'inserzione dei costrutti all'interno del vettore d'espressione e per separare dal vettore l'inserto linearizzato per il processo di trasformazione di *N. gaditana*. In quest'ultimo caso, sono digeriti 3-6 µg di materiale genetico. La reazione è condotta a temperatura controllata, in base alle specifiche dell'enzima.

Il protocollo di assemblaggio BASIC prevede una fase di restrizione enzimatica, utilizzando l'enzima BsaI-HF®v2 (NEB). Questa endonucleasi riconosce la sequenza 5'GGTCTC 3', ed effettua il taglio producendo estremità coesive.

3.1.10 Estrazione di DNA genomico di *N.gaditana*

Il DNA è separato dai componenti cellulari utilizzando la resina Chelex-100 (BioRad), un copolimero di stirene e divinilbenzene contenente gruppi imminodiacetato. L'attività chelante permette di inibire le DNasi. Le colonie di *N.gaditana* prelevate da terreno solido (per campioni in terreno liquido è eseguito un passaggio di centrifugazione 10000 g, 5' per formare il pellet cellulare) sono stemperate in 200 µl di soluzione di Chelex al 5%. Segue un ciclo di shock termico: 95°C 20', 4°C 20'. Le cellule lisate sono mescolate (vortex, 2') e centrifugate (14000 g, 2'). Questo passaggio permette la precipitazione della resina e la formazione di una fase acquosa in cui è presente il DNA. Il surnatante

formato è aggiunto direttamente nella miscela di reazione di PCR per gli screening genomici dei ceppi KO di *N.gaditana*.

3.1.11 Estrazione di RNA da *N. gaditana* e retrotrascrizione

L'RNA estratto viene retrotrascritto in cDNA e usato come template in una reazione di PCR, per verificare l'assenza del trascritto relativo ai geni di interesse. Viene prelevata una aliquota di 20 µl di sospensione cellulare per effettuare la conta delle cellule utilizzando lo strumento Cellometer (Nexcelom Bioscience). 50 milioni di cellule sono trasferite in provetta e centrifugate a temperatura ambiente per 10' a 18000 g. Viene eliminato il surnatante e il pellet può essere trasferito in azoto liquido e conservato a -80°C. Ottenuto il pellet, di seguito sono elencati i passaggi successivi:

1. Si aggiungono Glass Beads (SIGMA) del diametro di 150-200nm, a ricoprire il pellet cellulare, e 50 µL di soluzione TRIZOL.
2. Seguono 3 cicli di 30'' allo strumento BeadsBeater (Biospec) a velocità massima, alternati a 1' di raffreddamento a T ambiente.
3. Si aggiungono 950 µL di TRIZOL per arrivare a 1mL di volume e si effettua 1 ulteriore ciclo al BeadsBeater.
4. Vortex 15' seguito da 5' di riposo a T ambiente, per permettere ai complessi ribonucleoproteici di dissociarsi.
5. Si aggiungono 200 µL di cloroformio, si mescola e si lascia riposare 10' a T ambiente.
6. Centrifuga 12000 g, 15' a 4°C. Questo passaggio separa la soluzione in tre fasi: la fase organica contenente proteine, un'interfase di DNA e una fase acquosa contenente RNA.
7. Si trasferisce la fase acquosa superiore in un nuova eppendorf e si aggiungono 0,5 mL di isopropanolo (in ghiaccio), si mescola la soluzione e si lascia riposare 10' a T ambiente.
8. Centrifuga 12000 g, 10' a 4°C. L'RNA precipita formando un pellet.
9. A seguito della rimozione del surnatante, si effettuano lavaggi con etanolo 75% (1mL). Segue un rapido mescolamento con il Vortex e si centrifuga nuovamente a 12000 g, 5' a 4°C. I campioni possono essere conservati fino a un anno a -20°C.
10. In questo passaggio viene fatto evaporare l'etanolo per 10-20 minuti e si risospende il pellet in 30-50 µL di acqua DEPC trattata: vortex 15'', 5' 65°C e 15'' vortex.
11. L'RNA estratto è quantificato, come descritto in Metodi 1.1.6.

Per effettuare la retrotrascrizione, viene eseguito un trattamento per rimuovere le contaminazioni di DNA genomico, allestendo la reazione riportata in Tabella 23.

componente	Quantità
RNA	1 μ
Buffer di reazione 10X con MgCl	1
DNasi 1u, libera da RNasi	1
Acqua trattata DEPC	a volume finale di 10 μ l

Tabella 23: miscela di reazione per la rimozione di DNA dai campioni di RNA estratto

La miscela di reazione è incubata a temperatura ambiente per 30'. Segue l'aggiunta di Stop Solution e incubazione per 10' a 65°C per bloccare l'attività della DNasi. Successivamente, viene allestita la reazione in Tabella 24.

COMPONENTI	Quantità
RNA templato	1 μ g
Primer olio(dT)	0,5 μ g
Acqua DEPC	a volume

Tabella 24: miscela di reazione per la retrotrascrizione. Il volume finale di reazione è di 12,5 μ L

Dopo un'incubazione di 5' a 65°C, vengono aggiunti i componenti elencati in Tabella 25.

COMPONENTI	Quantità
H ₂ O DEPC	A volume
5X Buffer per la retrotrascrizione	4 μ L
Inibitore di RNasi RiboLock (Thermo Scientific)	20 U
dNTPs 10mM	2 μ L
Trascrittasi Inversa RevertAid	1 μ L

Tabella 25: miscela di reazione per la retrotrascrizione. Il volume finale di reazione è di 20 μ L

Dopo l'aggiunta di tutti i componenti, si incuba la reazione per 60' a 42°C. L'ultima fase prevede di riscaldare la miscela per 10' a 70°C per inattivare l'enzima. Il cDNA generato viene quantificato e amplificato tramite reazione di PCR.

3.1.12 Preparazione e assemblaggio delle ribonucleoproteine per la trasformazione di *N.gaditana*

Per ognuno dei tre geni (GOX, PGLP, BASS6), sono disegnate tre guide a RNA a singolo filamento (sgRNA).

Tabella con le sequenze sgRNA per il gene PGLP:

sgRNA	Sequenza nucleotidica
I	TTTACTACGTGCATCATCAAGCCCGAT
II	GACAAAGTGCCATCTGTGCTGGAGAAA
III	AGTACGCTCAATTGGCCATCAATGAAAA

Tabella 26: Sequenze sgRNA per indurre danni a doppio filamento sulle gene *pglp*

Tabella con le sequenze sgRNA per il gene BASS6:

sgRNA	Sequenza nucleotidica
I	AGCGCAGCAGACATGGCCCCCAAGAAA
II	TTTCATCTTCTGCTACTTGTTTCATGCC
III	TTTCTGAGACGGACTCCCGGACTATGG

Tabella 27: Sequenze sgRNA per indurre danni a doppio filamento sulle gene *bass6*

Tabella con le sequenze sgRNA per il gene GOX:

sgRNA	Sequenza nucleotidica
I	GCCTACGCGAAAGCGACCCTCCCCAAA
II	TGGAAGACGGGAAGCAGATGTTTCGAAA
III	TTTCGGATATCCAGCGGTCTATGGTCA

Tabella 28: Sequenze sgRNA per indurre danni a doppio filamento sulle gene *gox*

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

componente	quantità
sgRNA	1 μ M
NEBuffer 3.1	1 μ M
H ₂ O milliQ	30 μ M

Tabella 29: mix per la preparazione delle ribonucleoproteine *in vitro*

La mix di reazione viene impostata secondo queste concentrazioni. Segue mescolamento e incubazione 15', 37°C, per assemblare le sgRNA e le Cpf1. Alle RNP assemblate sono poi aggiunti 100 ng di DNA template e incubati a 37°C per 1 h.

3.1.13 Trasformazione delle cellule di *N.gaditana*

Per effettuare la trasformazione è utilizzata la tecnologia dell'elettroporazione per inserire il materiale genetico esogeno nelle cellule di *N. gaditana*. Lo

strumento utilizzato è l'elettroporatore ECM 630 Electro Cell Manipulator (BTX[®]). Le cellule per la trasformazione sono prelevate da coltura in piastra e stemperate in F/2. Le cellule in liquido sono coltivate in beuta in agitazione a 100 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Quando la coltura raggiunge la fase esponenziale, essa è spostata in bottiglia per permettere il rifornimento di CO_2 ed è aggiunto nitrato di sodio (NaNO_3) a concentrazione finale 12 mM. Quattro giorni prima della trasformazione, è allestita una curva di crescita con una concentrazione iniziale di 7×10^6 cellule/ml. Considerando che per ogni trasformazione sono richiesti 500×10^6 cells/ml, il volume di coltura necessario è prelevato e centrifugato a 3500 g per 10' a temperatura ambiente. Viene eliminato il surnatante e le cellule sono risospese in 5 mL di D-sorbitolo Plant Cell Tested 375 mM pre-raffreddato a 4°C; seguono tre ulteriori cicli di centrifuga a 3500g per 5' e lavaggi in D-sorbitolo. Dopo l'ultimo lavaggio, le cellule sono risospese per ottenere 100 μl per ogni trasformazione. I lavaggi in D-sorbitolo sono necessari per eliminare i sali, che interferiscono con l'elettroporazione, e al contempo mantenere l'osmolarità. Al volume di coltura per la trasformazione è aggiunto il DNA 2.5-11 μg (il volume di DNA aggiunto non dovrebbe eccedere 1/10 del volume finale).

Cellule, materiale genetico e ribonucleoproteine sono lasciate in ghiaccio per 15'. In seguito, sono poste in cuvette da 2 mm (BTX[®]) pre-raffreddate ed è eseguita l'elettroporazione a 12000 V/cm, con i seguenti parametri: voltaggio 2400V; Resistenza: 500 Ω ; Capacità: 50 μF . Il *time-constant* è il valore che indica il tempo impiegato dalla corrente per raggiungere l'estremità della cuvetta. Si ritiene ottimale un *time-constant* di 20-25 ms.

Infine, le cellule sono trasferite in 10 mL di Recovery medium (F/2 con tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris) Plant Cell Tested (SIGMA) 40mM e bicarbonato 40mM) a bassa luce (20 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Dopo circa 48 h Le colonie vengono lasciate crescere 30-35 giorni in camera termostata a 22°C in condizione di CO_2 arricchita (1%) o alternativamente con bicarbonato 40 mM disciolto nel terreno.

3.2 Coltura di cellule di E.coli

Escherichia coli è coltivato in incubatore a 37°C in terreno LB liquido in agitazione o in terreno LB solido su piastra. Il terreno selettivo è addizionato con ampicillina alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/mL}$. In Tabella 30 è riportata la composizione del terreno LB (pH=7)

componente	concentrazione
NaCl	10 g/l
Estratto di lievito	5 g/l

Tryptone	10 g/l
Agar (per il terreno solido)	15 g/l

Tabella 30: Composizione del terreno di coltura per *E. coli*

3.3 Coltura di cellule di *N.gaditana*

N. gaditana, acquistata dal CCAP (*Culture Collection of Algae and Protozoa*), ceppo 849/5, è coltivata in terreno F/2 minimo. Questo è preparato per filtrazione tramite pompa a vuoto (KNF Lab) di acqua di mare con filtri di nitrocellulosa da 0.45 µm. Questi trattengono il particolato e permettono il passaggio dei sali. La salinità dell'acqua filtrata è stimata utilizzando un rifrattometro e portata a concentrazione finale di 32 g/l. Sono quindi aggiunti il bicarbonato ad una concentrazione finale di 40mM e il Tris (Trizma – SIGMA) ad una concentrazione finale di 40 mM. Infine, il pH è portato ad un valore di 8 aggiungendo HCl 6N. Nel caso il terreno debba essere solido, sono aggiunti 10 g/l di Plant Agar (Duchefa Biochimie). Il terreno è sterilizzato in autoclave. È poi aggiunto il *Guillard's (F/2) Marin Water Enrichment Solution* (SIGMA, 50X). L'enrichment fornisce le vitamine e i microelementi necessari alla crescita della microalga.

Nel caso del terreno liquido, le colture sono mantenute in beuta, in bottiglia o in fiaschette in celle termostate a 22 ± 2 °C. La luce può essere continua o in regime di fotoperiodo (16 ore di luce e 8 ore di buio). Per assicurare lo scambio gassoso è mantenuta l'agitazione continua (100 rpm); nelle bottiglie l'aria addizionata di CO₂ al 5% viene insufflata con un flusso di 1 L/ora.

3.4 Conta cellulare

Per misurare la concentrazione di cellule in terreno liquido è utilizzato lo strumento Cellometer Auto X4 della Nexcellom Bioscience. Sono prelevati 20 µl dalla coltura liquida, caricati su appositi supporti e inseriti all'interno della camera di lettura dopo 10'. Lo strumento effettua sia misure in *brightfield*, che riporta il numero di cellule presenti, sia misure di fluorescenza sulla lunghezza d'onda delle clorofille, in modo da contare il numero di cellule vitali presenti nel campione.

3.5 Misure di fluorescenza dei mutanti fotorespiratori

Per effettuare gli screening fenotipici è usato il FluorCam (Photon Systems Instruments). Questo strumento permette di studiare la fotosintesi in maniera non invasiva, effettuando misure di fluorescenza sul PSII. Quando la clorofilla viene colpita da un fotone, l'energia assorbita viene usata dalla molecola per passare ad uno stato energetico superiore. Nella transizione ad uno stato energetico inferiore, l'energia precedentemente assorbita può essere usata per la fotosintesi, dissipata come calore oppure emessa come fluorescenza a una lunghezza d'onda superiore, che può essere rilevata dallo strumento. Più la fotosintesi è efficiente, minore sarà in rapporto l'emissione di fluorescenza e viceversa (Björn et al., 2009)

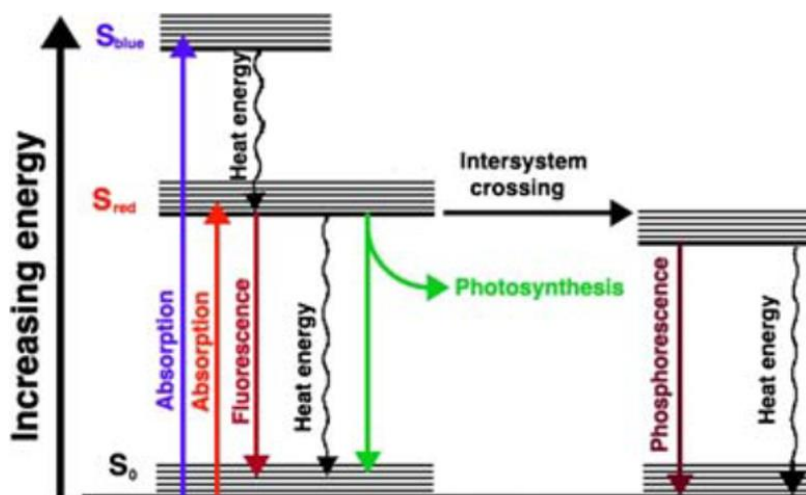


Figura 15: Rappresentazione di un Diagramma di Jablonski dei livelli energetici della molecola di clorofilla. La luce assorbita porta la molecola ad uno stato energetico superiore. L'energia assorbita può essere usata per la fotosintesi, dissipata come calore, emessa come fluorescenza o usata per la conversione intersistema. Immagine riadattata da (Björn et al., 2009)

In un organismo fotosintetico, adattato al buio, la capacità fotosintetica è sfruttabile al massimo, perché il chinone A (Q_A), accettore degli elettroni del PSII, si trova nel suo stato ossidato. In questo caso la fluorescenza massima viene registrata come valore F_0 . Lo strumento FluorCam invia un impulso luminoso che satura la catena elettronica, riduce completamente il chinone Q_A e riduce a zero la capacità fotosintetica. Il dato rilevato in questa fase corrisponde alla fluorescenza massima, indicata come F_m .

È dimostrato che mutanti fotorespiratori in *A.thaliana* possono essere isolati eseguendo misure di fluorescenza F_v/F_m (Badger et al., n.d.). I mutanti fotorespiratori sono incapaci di crescere a concentrazione di CO_2 atmosferica,

perché presentano un metabolismo non funzionale nell'eliminare il 2PG che si genera dalla reazione di ossigenazione del RuBP, da parte del RUBISCO. Ciò inibisce la crescita e altera la condizione fisiologica delle cellule interessate, risultando in fotoinibizione, ossia stress che influisce sulla dinamica di fotosintesi, in particolare alterando la funzionalità del PSII.

Il dato calcolato come F_v/F_m (il valore F_v è uguale a $F_m - F_0$) viene utilizzato nella ricerca dei ceppi KO, poiché i mutanti fotorespiratori cresciuti in condizioni di 1% CO_2 presentano un valore F_v/F_m superiore al valore F_v/F_m delle colonie cresciute in concentrazione atmosferica di CO_2 . In particolare, le differenze di F_v/F_m ($\Delta(F_v/F_m)$) dei KO tra la condizione arricchita in CO_2 e atmosferica, risultano superiori rispetto alle differenze tra le due condizioni nei ceppi *wt*, dato che in questi ultimi non si aspettano influenze significative sulla crescita tra le due differenti condizioni.

$$\Delta(F_v/F_m) = F_v/F_m_{[CO_2]1\%} - F_v/F_m_{[CO_2]atm}$$

Lo strumento permette di regolare l'impulso saturante in percentuale rispetto all'intensità massima ($4600 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), ed è stato impostato al 70%. Inoltre, è possibile impostare i parametri di "shutter" e sensibilità della camera CCD. Lo *shutter* determina il quantitativo di luce che passa attraverso l'obiettivo e la sensibilità della camera alla fluorescenza. I parametri impostati sono: shutter = 1, sensibilità = 15.5

3.6 Protocollo di assemblaggio BASIC

il metodo BASIC è basato sull'utilizzo di adattatori che determinano la sequenza di assemblaggio dei componenti. Ai frammenti di DNA vengono aggiunti alle estremità dei prefissi (iP) e suffissi (iS) standardizzati:

iP: 5'-TCTGGTGGGTCTCTGTCC-3'

iS; 5'-GGCTCGGGAGACCTATCG-3'

Queste sequenze contengono un sito di taglio per l'enzima BsaI. La restrizione enzimatica genera delle estremità coesive che si appaiano con le sequenze degli adattatori. Gli adattatori sono parzialmente a doppio filamento e parzialmente a singolo filamento, per facilitare la ligazione delle estremità dei frammenti.

1) Preparazione degli oligonucleotidi adattatori

La prima fase del protocollo consiste nella generazione di soluzioni di oligonucleotidi adattatori, unendo le coppie di oligonucleotidi S-L (*linker*) e S-A

(*adapter*) e le coppie P-L e P-A (le sequenze sono riportate in Tabella 33), in una soluzione di Annealing Buffer (pH=7.9).

componente	concentrazione
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
TRIS	10 mM
Acqua milliQ	A volume (volume finale = 50mL)

Tabella 31: Composizione dell'Annealing Buffer

Componente	Volume da aggiungere	Concentrazione soluzione madre	Concentrazione finale
Oligonucleotide linker (L)	0,5 g/l	100 µM	1 µM
Oligonucleotide adapter (A)	0,5 g/l	100 µM	1 µM
Annealing buffer	49 µl		

Tabella

32: miscela di reazione per la preparazione degli oligonucleotidi adattatori

Primer	Sequenza
L1S-L	CTCGttacttacgacactccgagacagtcagagggtta
L1S-A	tgtcgttaagtaa
L1P-L	GGACtagttcaataaataccctctgactgtctcggag
L1P-A	tttattgaacta
L2S-L	CTCGatcgggtgtgaaaagtcagtatccagtcgtgtag
L2S-A	tttcacaccgat
L2P-L	GGACaggtaataagaactacacgactggatactgact
L2P-A	ttcttattacct
L3S-L	CTCGatcacggcactacactcgttgctttatcgggtat
L3S-A	tagtgccgtgat
L3P-L	GGACtctgttaataacaataaccgataaagcaacgagtg
L3P-A	tgttattacaga
L4S-L	CTCGaccacgactattgactgctctgagaaagtga
L4S-A	atagtcgtgggt
L4P-L	GGACtaatcgtaacaatcaactttctcagagcagtc
L4P-A	ttgttacgatta
L5S-L	CTCGagaagtagtgccacagacagtattgcttacgag
L5S-A	ggcactacttct
L5P-L	GGACaggataaatcaactcgtaagcaataactgtctgt
L5P-A	ttgattatcct

Tabella 33: sequenze delle coppie di oligonucleotidi usate per preparare gli adattatori.

La miscela di oligonucleotidi è riscaldata per 1' a 95°C e lasciata raffreddare a T ambiente.

2) Reazione di digestione/ligazione

Per ogni frammento di DNA del costrutto (HR5', HR3', cassette di espressione di GDH e BHAA, pBluescript), è scelta una coppia di adattatori: un oligonucleotide di tipo S e uno di tipo P. Ogni frammento di DNA è unito a una coppia di adattatori, componendo il mix mostrato in Tabella 34. La soluzione viene mescolata e posta in termociclatore per PCR, con le seguenti impostazioni: 37°C per 60', 20°C per 20' e infine 65°C per 25'. Conservare a 4°C.

Componente	Volume da aggiungere (volume finale = 30 µL)	Concentrazione finale
Adattatore iP (1 µM)	5 µL	100 µM
Adattatore iS (1 µM)	5 µL	100 µM
Frammento di DNA	Variabile (massimo 9,5 µl)	~2.5nM (50ng/kb)
ATP 10mM (NEB)	3 µl	1 mM
NEB4 10X (NEB)	3 µl	1X
BSA 10X (NEB)	3 µl	1X
BsaI-HF (NEB)	1 µl	0,66 U/µl
Ligasi T4 (NEB)	0,5 µl	6,6U/µl
Acqua milliQ sterile	A volume	

Tabella 34: miscela di reazione per l'appaiamento degli adattatori ai frammenti di DNA, tramite digestione (con BsaI-HF) e ligazione (con Ligasi T4). Il volume da utilizzare per i componenti di DNA del costrutto è calcolato in maniera da inserire nel mix di reazione 50 ng/kb.

3) Purificazione

Segue una fase di purificazione delle sequenze oligonucleotidiche non legate e dei componenti del mix di reazione. Fasi del processo:

1. Si aggiungono in ogni miscela di reazione 54 µl di *Agencourt Ampure XP magnetic beads*, e si attendono 5' a T ambiente per permettere al DNA di legarsi alle biglie magnetiche.
2. Successivamente, si posizionano le eppendorf nell'apposita piattaforma magnetica Ambion (Thermo Scientific). Le biglie magnetiche, a cui si è legato il DNA, risultano adese alla parete dopo circa 2'.
3. Si rimuove la fase liquida, senza disturbare le biglie magnetiche
4. Seguono fasi di lavaggio con etanolo: aggiungere 190 µl di etanolo 70 %, attendere 30'' e rimuovere l'etanolo aggiunto. Si completano due cicli di lavaggio e infine si lascia evaporare l'etanolo per 5-10 minuti.
5. Si rimuovono le eppendorf dalla piattaforma magnetica Ambion, si aggiungono 40 µl di acqua milliQ e si attende 1'.

6. Si riposizionano le eppendorf nella piattaforma magnetica Ambion e si attendono 2' fino a quando le biglie magnetiche aderiscono alla parete. In questo passaggio, il DNA purificato legato agli adattatori si trova nella fase acquosa. Quindi viene prelevato e conservato a -20°C.

4) Assemblaggio del costrutto

In questa fase, vengono uniti i frammenti di DNA legati agli oligonucleotidi adattatori. Si genera una miscela di reazione di 10µl, aggiungendo: 1 µl di ogni soluzione purificata di DNA legato agli adattatori, 1 µl di NEB4 10X (NEB), 1 µl di BSA 10X (NEB) e acqua milliQ a volume. La miscela creata viene riscaldata a 50°C per 60'. Per trasformare le cellule di E.coli DH5α termocompetenti, si aggiunge direttamente la miscela di assemblaggio del costrutto alla sospensione batterica. I passaggi successivi sono descritti in Metodi 3.1.7.

4. RISULTATI

4.1 Geni della fotorespirazione

Da uno studio precedente, effettuato nel laboratorio dove è stato effettuato questo lavoro di tesi, è stata effettuata una ricerca bioinformatica riguardante i geni coinvolti nel processo di fotorespirazione presenti in *N. gaditana*. Storicamente, gli studi effettuati sulla fotorespirazione sono per la maggior parte avvenuti nell'organismo vegetale modello *Arabidopsis thaliana*. Le proteine coinvolte nella fotorespirazione in questo organismo sono state prese come modello nella ricerca di geni della fotorespirazione nella microalga. La ricerca ha evidenziato omologie con molte proteine presenti anche in *Arabidopsis*, nonostante la loro distanza evolutiva. In particolare, sono presenti i geni per i primi 3 elementi coinvolti nel pathway che corrispondono alle proteine: 2-fosfoglicolato fosfatasi (PGLP), simportatore sodio bile acido 6 (BASS6) e glicolato ossidasi (GOX). Le prime due proteine sono presenti nel cloroplasto, e l'ultima nel perossisoma.

ID Proteina	ID gene in <i>N. gaditana</i>
PGLP	Naga100005g112 (Cytosol), Naga_100006g87 (Chloroplastic)
BASS6	Naga_100015g45 (Chloroplastic)
PLGG	/
GOX	Naga100003g174 (Peroxisomal), Naga100519g3
GGAT	Naga_100020g17
SHMT	Naga_100007g45, Naga_100039g2 (Mitochondrial)
SGAT	/
HPR1	/
GLYK	Naga100119g11

Tabella 35: sono riportate i codici identificativi delle proteine in *N. gaditana* e i relativi codici identificativi dei geni

Sono inoltre state effettuate ricerche riguardo l'omologia delle sequenze proteiche dei geni di interesse, al fine di verificare che la funzione di essi corrisponda a quella attesa in differenti organismi fotosintetici, quali *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Physcomitrella patens*. Il risultato di questo studio conferma che le proteine della fotorespirazione sono conservate nei vari organismi fotoautotrofi e anche in *N.gaditana*.

4.2 Ottenimento dei costrutti per la delezione dei geni bersaglio

L'obiettivo del progetto è la generazione di ceppi mutanti di *N.gaditana* che presentino la delezione dei primi tre geni coinvolti nel processo fotosintetico, che sono PGLP, BASS6 e GOX e verificare il loro impatto sulla crescita. Il primo step in questo procedimento riguarda il disegno di un costrutto che si inserisca all'interno dei loci genici prescelti, per permettere sia il KO di essi e al contempo introdurre nel genoma ospite un marker di selezione, che consenta l'isolamento dei ceppi correttamente trasformati. Questo procedimento si basa sulla tecnica di editing genomico CRISPR-Cpf1 e parallelamente sul meccanismo fisiologico di riparazione omologa (HDR). Questo sistema è stato sfruttato in studi di ingegneria genetica in *N.gaditana* per dimostrarne l'efficacia, generando con successo dei KO relativi al gene per l'enzima nitrato reduttasi (Naduthodi et al., 2019).

Perché possa avvenire l'evento di ricombinazione desiderato, occorrono principalmente due elementi:

- 1) un taglio a doppio filamento (DSB, double strand break) nella regione genica di interesse
- 2) una sequenza omologa al sito in cui si intende inserire la cassetta di resistenza.

Per il punto 1) è necessario costruire delle sequenze di RNA a singolo filamento (sg RNA) che interagiscano con l'endonucleasi Cpf1 e indirizzino il taglio in maniera precisa (Metodi 3.1.12).

Riguardo l'aspetto 2), occorre inserire al 5' e al 3' del costrutto delle sequenze omologhe a quelle di PGLP, BASS6 e GOX, affinché il meccanismo di ricombinazione omologa garantisca l'inserzione della cassetta di resistenza specificamente nel locus di interesse, interrompendo così la sequenza codificante del gene bersaglio.

La cassetta di resistenza include la sequenza di espressione del gene *Sh ble*, il quale codifica per una proteina in grado detossificare l'antibiotico zeocina (Smider et al., 2019).

Per permettere l'espressione del gene di interesse (in questo caso *Sh ble*) è necessaria l'introduzione di elementi regolatori, quali un promotore e un terminatore. In questo caso, il promotore scelto è quello dell'ubiquitina. Il terminatore è quello del complesso antenna *fcpA* (fucoxantin-chlorophyll-

proteins), componenti maggioritari dei LHC nelle diatomee, presente nell'alga unicellulare *Phaeodactylum tricornutum* (Joshi-Deo et al., 2010).

Gli altri elementi da includere nel costrutto, al fine di renderlo compatibile con l'evento di ricombinazione omologa, sono le regioni di omologia al 3' e al 5'.

In uno studio che precede questo lavoro di tesi, è stata effettuata l'estrazione del DNA genomico di *N.gaditana* e amplificate tramite PCR le sequenze dei 3 geni fotorespiratori, al fine di effettuare il sequenziamento di esse. Sulla base di queste, sono state disegnate tre guide a RNA per ciascun gene, le cui sequenze sono presenti in Metodi. Il costrutto per il KO del gene PGLP è stato ottenuto per via sintetica da Twist bioscience (<https://www.twistbioscience.com/>). Per i geni BASS6 e GOX invece è stata utilizzata la tecnica dell'OE-PCR (metodi).

Per prima cosa è stata amplificata la cassetta di resistenza alla zeocina tramite amplificazione del prodotto di OE-PCR (Metodi 3.1.2), che ha permesso l'unione delle tre sequenze che formano il costrutto, ossia *HR 5'*, *ZeoR*, *HR 3'*, come si può vedere in figura 16. Queste tre sequenze di DNA sono state amplificate separatamente, utilizzando come templati plasmidi utilizzati quotidianamente in laboratorio, purificate tramite PCR purification kit (metodi) e impiegate nella reazione di OE-PCR. Questa tecnica permette la sovrapposizione delle regioni di appaiamento create al 5' e 3' dei singoli frammenti, tramite l'utilizzo di primer forniti di specifiche code.

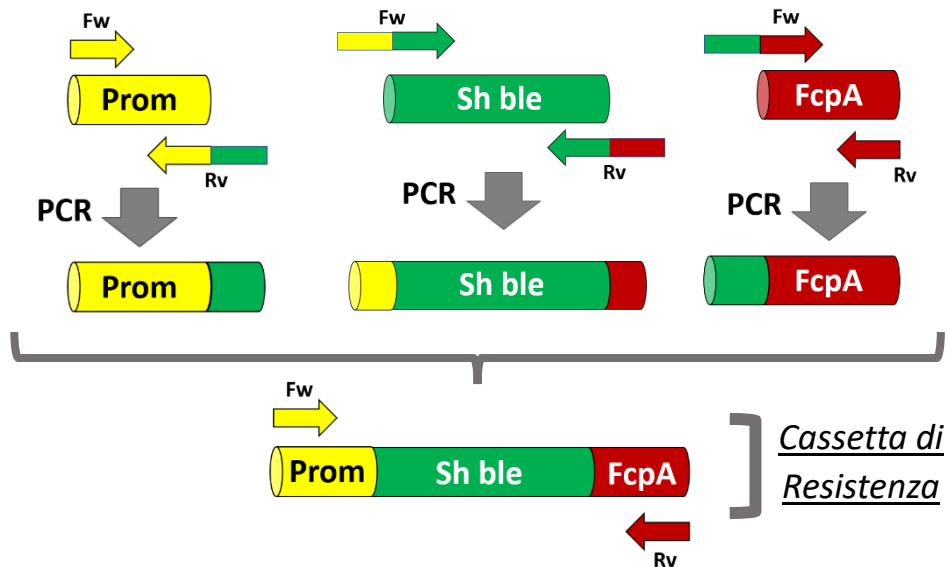


Figura 16: rappresentazione schematica della tecnica di OE-PCR per la generazione della sequenza per l'espressione del gene *Sh ble* che conferisce la resistenza alla zeocina. Nella prima fase, le tre sequenze che andranno a comporre il prodotto finale, vengono amplificate separatamente con l'utilizzo di specifici primer. Nella seconda fase, le tre sequenze iniziali vengono unite, generando la cassetta di resistenza

La prossima fase consiste nell'amplificare le due regioni di omologia geniche al 5' e al 3', utilizzando come template il DNA genomico di *N. gaditana*. La tecnica di OE-PCR viene applicata nuovamente unire la cassetta di resistenza alla zeocina precedentemente ottenuta alle regioni di omologia (fig. 17).

La tecnica di OE-PCR produce spesso sequenze frammentate, bande aspecifiche e costrutti parziali che non hanno generato il costrutto completo. Per questo motivo, è necessario trovare sperimentalmente la polimerasi adeguata alla generazione del prodotto di interesse. In questo caso l'enzima più adatto all'amplificazione delle sequenze di interesse è la polimerasi Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). Inoltre, occorre purificare la banda di interesse direttamente dal gel (metodi 3.1.4), in maniera da ottenere una soluzione pura, contenente esclusivamente la sequenza del prodotto di interesse.

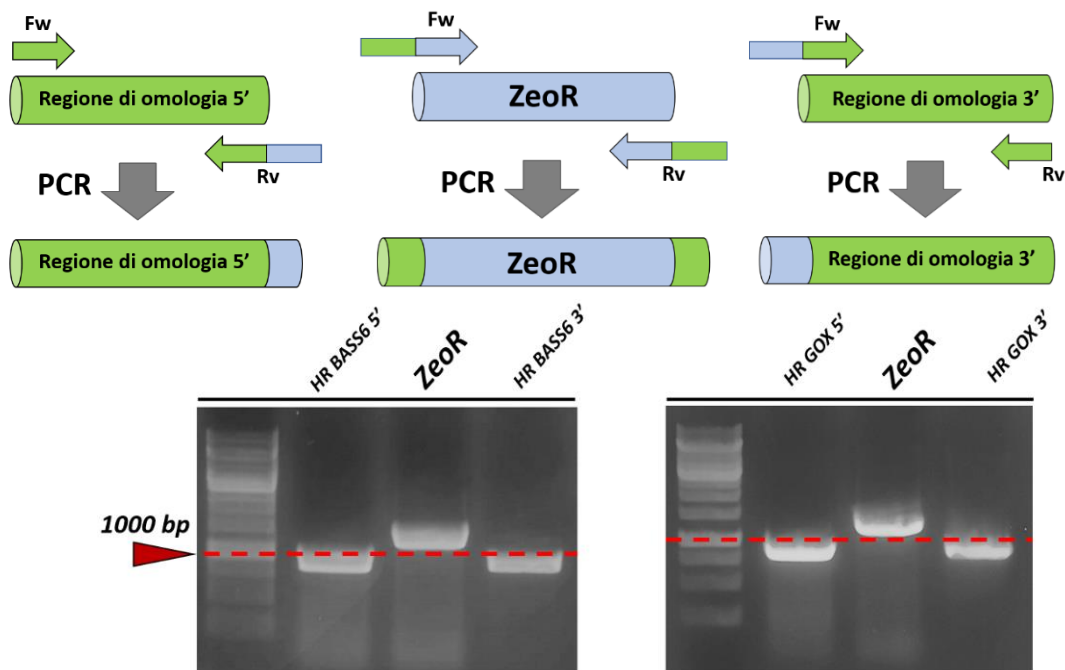


Figura 17: schema riassuntivo della tecnica OE-PCR applicata alla generazione del costrutto per la delezione dei geni bersaglio. Nella prima fase i frammenti vengono uniti grazie alle sequenze di sovrapposizione. Il loro appaiamento permette l'amplificazione del costrutto totale nella seconda fase. In figura sono presenti anche le elettroforesi su gel di agarosio dei tre frammenti di DNA utilizzati come template nell'OE-PCR per il costrutto di delezione del gene BASS6 (a sinistra) e del gene gox (a destra). le lunghezze attese dei frammenti sono di 900bp per le regioni di omologia e di 1200bp per la cassetta di resistenza.

Come mostrato in fig. 18, l'elettroforesi su gel di agarosio dimostra la riuscita della purificazione. I prodotti dell'OE-PCR per la delezione del gene di GOX e BASS6 (HR 5' del gene BASS6/GOX + ZeoR + HR 3' del gene BASS6/GOX) sono di 3100 bp.

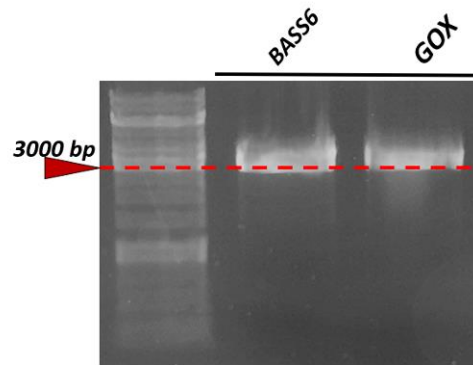


Figura 18: elettroforesi su gel di agarosio dei costrutti di delezione completi per il gene BASS6 (a sinistra) e GOX (a destra). la lunghezza attesa è di 3100bp

Al fine di trasformare *N.gaditana*, è necessario ottenere 2,5-5 µg di materiale. Per ottenere questa quantità di materiale, il costrutto per la delezione del gene BASS6 è stato subclonato nel vettore commerciale Pjet1.2 (metodi 3.1.5) e trasformato nelle cellule batteriche E.coli DH5α termocompetenti, come descritto nel paragrafo Metodi 3.1.9. Il vettore ottenuto è stato quindi validato tramite taglio enzimatico (Metodi 3.1.7), come mostrato in figura.

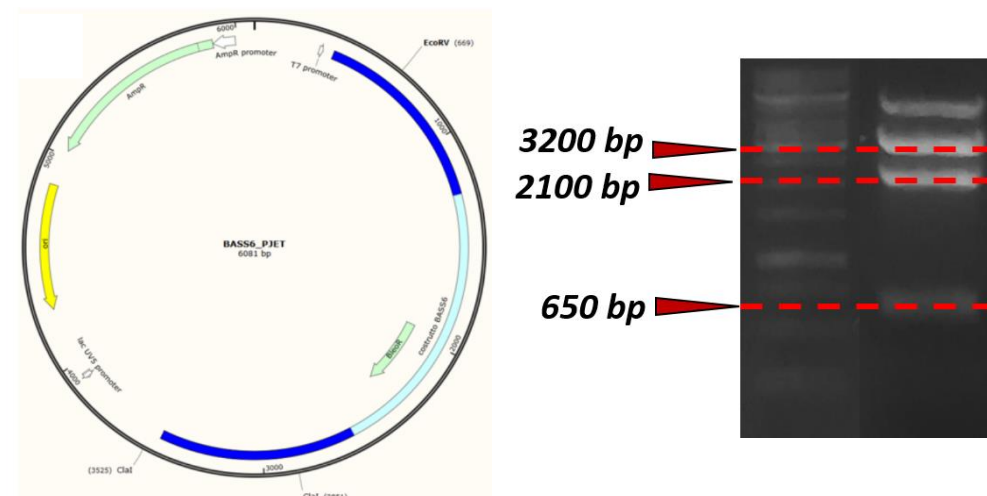


Figura 19: Schema costruito di inserzione BASS6 clonato in Pjet1.2 le regioni blu corrispondono alle regioni di omologia, porzione azzurra corrisponde alla cassetta di resistenza alla zeocina. Sono indicate anche le sequenze regolatorie per il mantenimento e la selezione del vettore in E. coli. B) elettroforesi su gel d'agarosio di restrizione di controllo su BASS6 clonato in PJET. Bande attese a 674bp, 2183bp e 3224bp

La corsa elettroforetica eseguita per il vettore in cui è inserito il costrutto di delezione di BASS6 mostra che i frammenti generati sono quelli attesi: 650 bp, 2100 bp e 3200 bp. Il vettore Pjet 1.2 ha una lunghezza di 2974 bp, che sommato ai 3100 bp del costrutto di inserzione genera un vettore totale di circa 6000 bp che appare come banda alta, corrispondente a prodotto non digerito.

Per quanto riguarda il costrutto per la delezione del gene GOX, i tentativi di clonaggio e di trasformazione delle cellule batteriche non hanno mostrato risultati ricercati. Di conseguenza, il costrutto è stato amplificato tramite PCR, fino al raggiungimento di circa 2,5 µg di costrutto.

In entrambi i casi, il materiale per le trasformazioni è stato concentrato e purificato tramite il protocollo di precipitazione del DNA con sodio acetato, come descritto in Metodi 3.1.4.

4.3 Generazione dei Knock-Out di *N. gaditana*

Le procedure effettuate per trasformare le cellule di *N.gaditana* sono descritte in Metodi. Le ribonucleoproteine (RNP) una volta associate in vitro alle sgRNA, devono essere veicolate all'interno delle cellule per poter effettuare il DSB nel gene target, come previsto dalla tecnica CRISPR-Cpf1. L'approccio scelto è l'elettroporazione. Questa tecnica permette di introdurre all'interno della cellula di *N.gaditana* il materiale genetico e le proteine Cpf1 necessarie per la trasformazione tramite la formazione di pori transienti nelle membrane cellulari, come descritto in Metodi. In figura sono presenti le piastre con terreno F/2 addizionato con zeocina da cui sono prese le colonie cresciute a seguito della trasformazione.

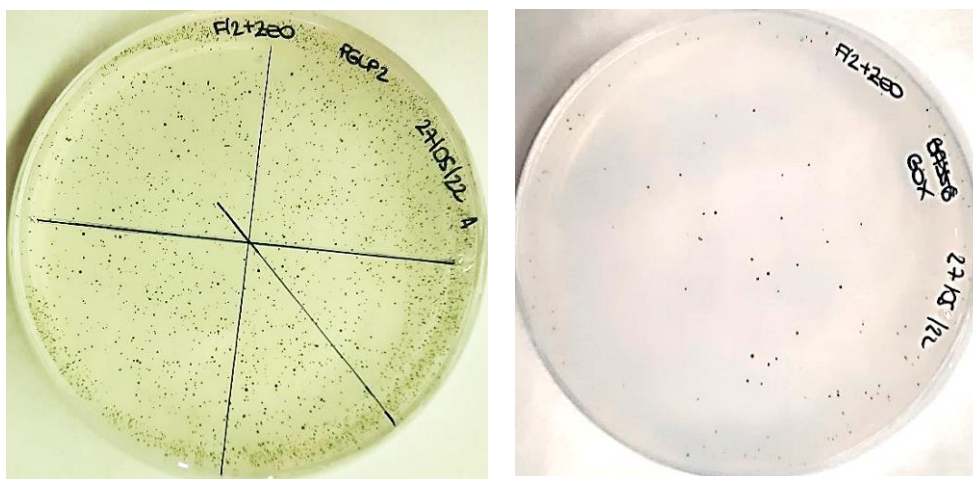


Figura 20: piastra di crescita con terreno selettivo di F/2 + zeocina 3,5 µg per mutanti fotorespiratori. Foto effettuate 45 giorni dopo la trasformazione per il KO di PGLP (sinistra) e GOX (destra)

4.4 Studio preliminare in *Nannochloropsis oceanica*

Sono stati eseguiti dei test preliminari per identificare le condizioni di screening ottimali per isolare gli eventuali mutanti con fenotipo fotorespiratorio in *N. gaditana*. Le analisi in questione sono eseguite su un ceppo mutante di *N. oceanica*, in cui il gene per l'anidrasi carbonica (CA) è stato deleto. Le alghe del genere *Nannochloropsis* utilizzano questo enzima per convertire gli ioni HCO_3^- in CO_2 , dopo che questi sono stati veicolati tramite i trasportatori del bicarbonato dall'esterno della cellula al cloroplasto. Un mutante in cui il gene per la CA è assente, presenta un fenotipo di crescita ridotta in condizioni di CO_2 atmosferica. È stata predisposta la crescita di *N. oceanica* wt e di *N. oceanica* mutante KO per la CA, alle stesse condizioni di quelle dei mutanti di PGLP, BASS6, GOX. Ossia, concentrazione atmosferica di CO_2 e condizione arricchita di CO_2 . Vengono effettuate misure di fluorescenza nel tempo, in maniera da individuare le tempistiche che corrispondono alla maggior differenza tra i valori di Fv/Fm.

Le piastre sono in triplicato e ogni piastra contiene tre diluizioni delle sospensioni cellulari con cui sono stati effettuati gli spot, che corrispondono a 1 milione di cellule, 2 milioni di cellule, e 5 milioni di cellule. Queste sono state fatte per osservare a quali concentrazioni cellulari è apprezzabile maggiormente una differenza dei valori di fluorescenza e se le diverse concentrazioni influiscono sul valore di Fv/Fm.

Le piastre sono poste in camera termostata a 22°C a CO_2 1%. Il test ha evidenziato una differenza significativa tra il valore di Fv/Fm del wt e quello mutante KO al giorno 10. Queste condizioni sono quindi utilizzate per gli screening fenotipici effettuati successivamente sulle cellule trasformate di *N. gaditana*, per individuare i putativi mutanti fotorespiratori. I grafici del test con le misurazioni di Fv/Fm nel tempo sono riportati in figura 21.

Gli screening fenotipici sui ceppi trasformati con il costrutto di delezione per geni PGLP e GOX sono quindi effettuati dopo 10 giorni di crescita. Le colonie risultanti dalla trasformazione sono poste in piastre in duplicato in condizioni di CO_2 atmosferica e in condizioni di CO_2 =1%.

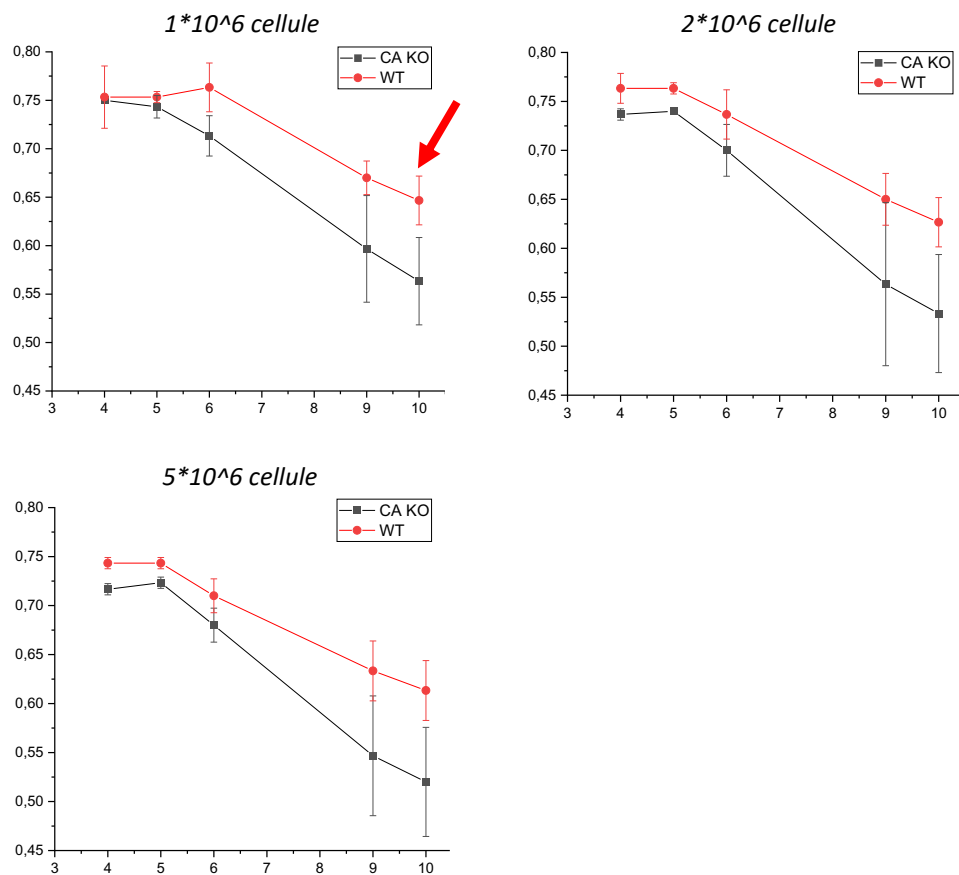


Figura 21: I valori mostrati nel grafico corrispondono alle medie dei valori di F_v/F_m dei triplicati su cui è stato applicato il test statistico Anova, con un P value di 0,05. %. Il test ha evidenziato una differenza significativa tra il wt e il mutante al giorno 10, per quanto riguarda gli spot con 1 milione di cellule (segnato con la freccia rossa)

4.5 Analisi fenotipiche e genomiche

Gli screening fenotipici dei mutanti vengono effettuati sulle cellule di *N.gaditana* trasformate e selezionate dalla crescita in terreno con zeocina. Infatti, i putativi mutanti che hanno correttamente integrato il gene che conferisce la resistenza all'antibiotico sono in grado di sopravvivere in terreno selettivo, al contrario delle cellule che non hanno subito il KO e integrato la cassetta di resistenza. Le singole colonie vengono prelevate, trasferite su terreno addizionato con antibiotico e fatte crescere in duplicato in condizione di CO₂ atmosferica e in condizione di CO₂ = 1%. In seguito, viene misurata la fluorescenza della clorofilla *in vivo* tramite fluorimetro PAM (FluorCam), per il monitoraggio dei valori di F_v/F_m , come indicato in Metodi 3.5.

È stato scelto questo tipo di screening poiché studi effettuati su *A. thaliana*, dimostrano che è possibile isolare i mutanti fotorespiratori facendo riferimento ai valori di fluorescenza di Fv/Fm, poiché si osserva un calo di questo parametro nei KO rispetto al *wt*, se fatti crescere in condizioni di CO₂ atmosferica (Badger et al., n.d.). Infatti, il valore di Fv/Fm riflette un declino dell'efficienza fotosintetica. Il KO di geni della fotorespirazione implica che il 2PG non venga metabolizzato. Questa molecola inibisce alcuni enzimi coinvolti nel ciclo di Calvin Benson. Per questo motivo, viene ridotto il consumo di potere riducente e si favorisce la formazione di specie radicaliche. L'accumulo di ROS inibisce la sintesi *de novo* delle proteine D1, subunità fondamentali nel PSII (Li et al., 2020; Takahashi et al., 2007). Per questo motivo, si assiste a un calo di efficienza della fotosintesi, che si riflette nelle misure di fluorescenza del PSII.

4.5.1 Screening fenotipici dei mutanti gox

Dopo il periodo di crescita, vengono prelevate 250 colonie per ogni trasformazione che sono risultate in grado di crescere su terreno selettivo e vengono trasferite su nuove piastre in duplicato, in cui è sempre presente l'antibiotico zeocina e poste sia a CO₂ = 1% sia in condizione di CO₂ atmosferica. Dopo 10 giorni di crescita, le colture vengono adattate al buio per 30-35 minuti per effettuare le misure di fluorescenza Fv/Fm. In figura sono presenti le scansioni di alcune piastre come esempio del procedimento eseguito. Esse sono state utilizzate per effettuare i test fenotipici di trasformazioni per il KO dei geni GOX e i relativi grafici in cui viene riportato il valore $\Delta(Fv/Fm)$ che si ottiene confrontando i dati di fluorescenza Fv/Fm delle colonie a CO₂ = 1% e atmosferica. In alcuni casi non è stato possibile rilevare questo dato, poiché la crescita delle cellule non è sufficiente a generare un'intensità di fluorescenza rilevabile con accuratezza dallo strumento, per tanto non vengono presi in considerazione nella valutazione dei mutanti.

Vengono reputati positivi allo screening le colonie che presentano un dato di $\Delta(Fv/Fm)$ maggiore di zero e che contemporaneamente risulti sufficientemente distante dal valore medio. In particolare, viene scelta una soglia che corrisponde alla somma della media e di 1.5 volte la deviazione standard della popolazione, come riportato in figura dall'area verde. Dalle misure effettuate sono stati osservati 40 ceppi che si discostano dalla media. Tuttavia, occorre validare l'ipotesi che i dati riscontrati siano dovuti a un fenotipo fotorespiratorio. Lo studio prosegue con test genomici dei ceppi positivi, che confermino

l'inserimento della cassetta di delezione genica all'interno del locus del gene bersaglio.

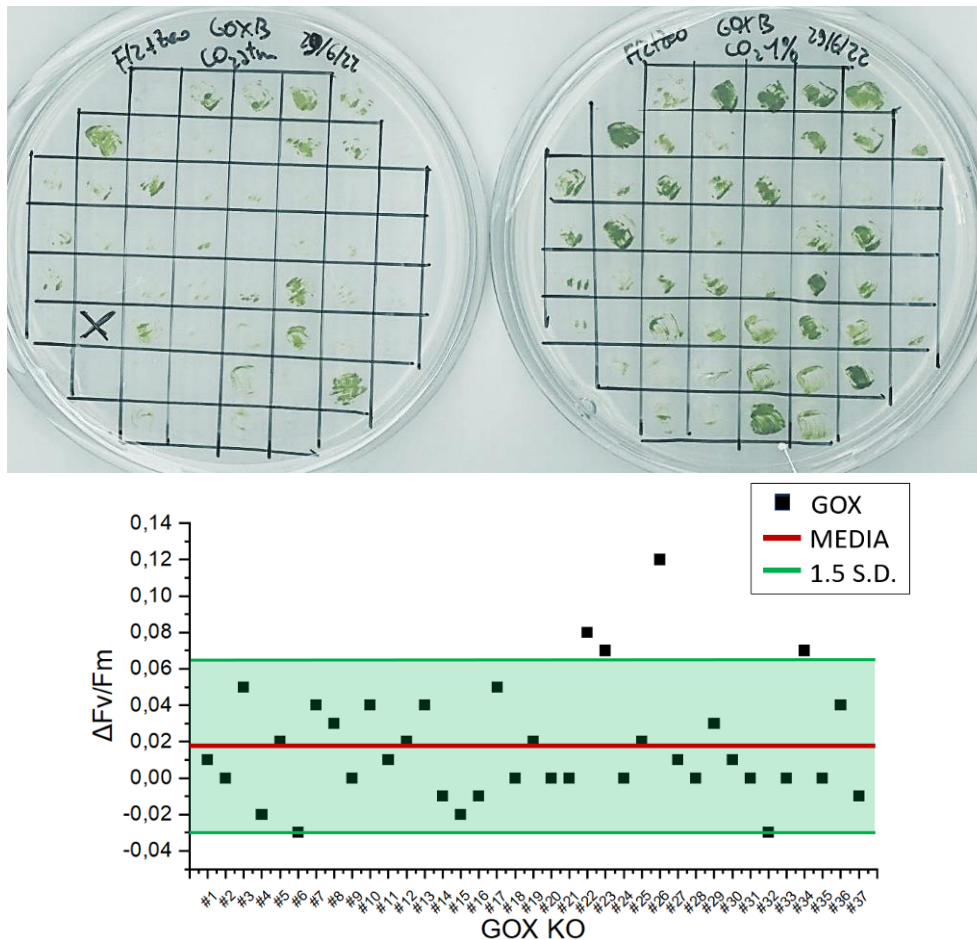


Figura 22: in alto: esempio di scansioni di piastre di crescita in duplicato, con terreno selettivo (F/2 + zeo 3,5 μ g) dei mutanti KO del gene GOX. A destra: piastra tenuta in condizioni di CO₂ = 1%; a sinistra: piastra tenuta in condizioni di CO₂ atmosferica. In basso: il grafico riporta i valori di $\Delta Fv/Fm$ relativi alle due piastre rappresentate. La media delle misure dei ceppi trasformati è rappresentata con la retta rossa. Sono stati selezionati i mutanti con valori di $\Delta Fv/Fm$ maggiori di 1.5 volte la deviazione standard, rappresentata con il riquadro verde.

4.5.2 Screening genomico dei mutanti gox

Gli screening genomici dei ceppi KO si basano sull'amplificazione tramite PCR di specifiche regioni che confermino l'interruzione del gene endogeno e l'inserzione della cassetta di resistenza per ricombinazione omologa. Il template utilizzato è il DNA genomico estratto dalle colonie di *N.gaditana* resistenti alla zeocina (metodi). I primer utilizzati permettono l'amplificazione delle due regioni evidenziate in figura 23. Gli ampliconi sono generati solo nei ceppi in cui la cassetta di resistenza si è integrata correttamente nel locus del gene bersaglio.

Nella prima fase viene unito il materiale genetico di più ceppi trasformati. Questa fase preliminare permette di ridurre il numero di PCR da eseguire. Successivamente, vengono analizzate le singole colonie appartenenti ai gruppi positivi allo screening iniziale.

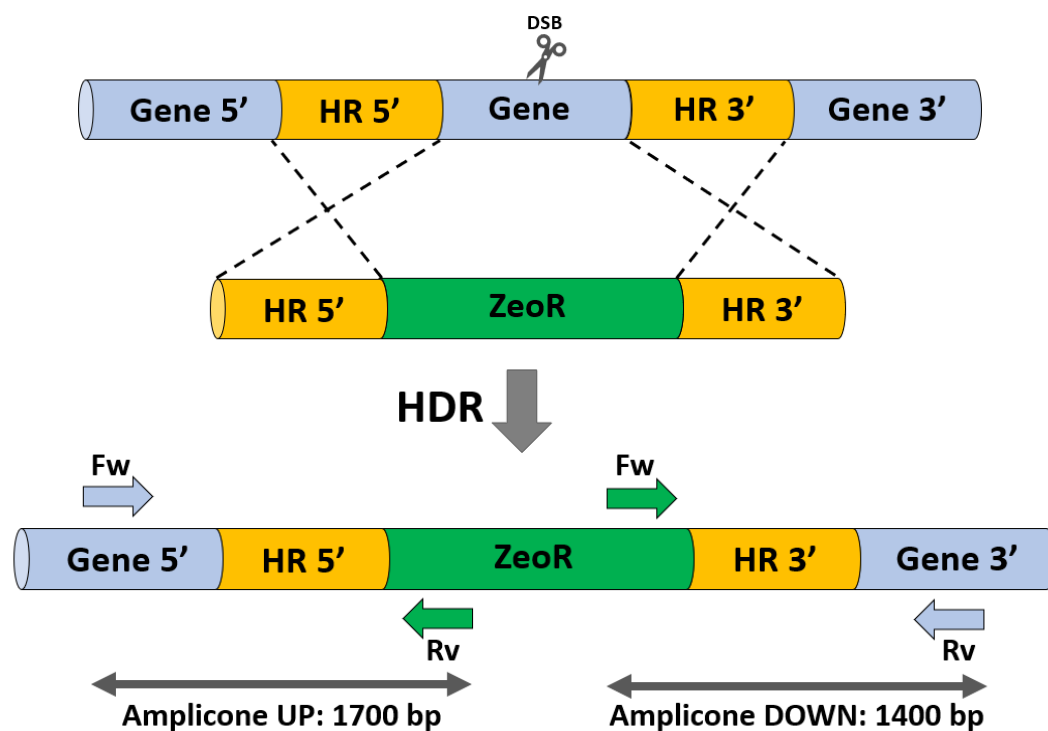


Figura 23: schema dell'inserimento della cassetta di resistenza nel locus del gene bersaglio e delle regioni di omologia 5' e 3' amplificate

La prima analisi è stata effettuata unendo il materiale genetico in gruppi di putativi mutanti e utilizzando i primer che amplificano sia la regione di omologia al 5', sia la regione di omologia al 3', come è mostrato in figura 24 (Metodi 3.1.1).

La prima ha una lunghezza di 1700 bp, la seconda di 1400 bp. Tutti i gruppi testati presentano l'amplicone di interesse, ma alcuni presentano anche bande aspecifiche, tra cui i gruppi A, D, F per la regione a monte della cassetta e i gruppi A, E, F per la regione a valle.

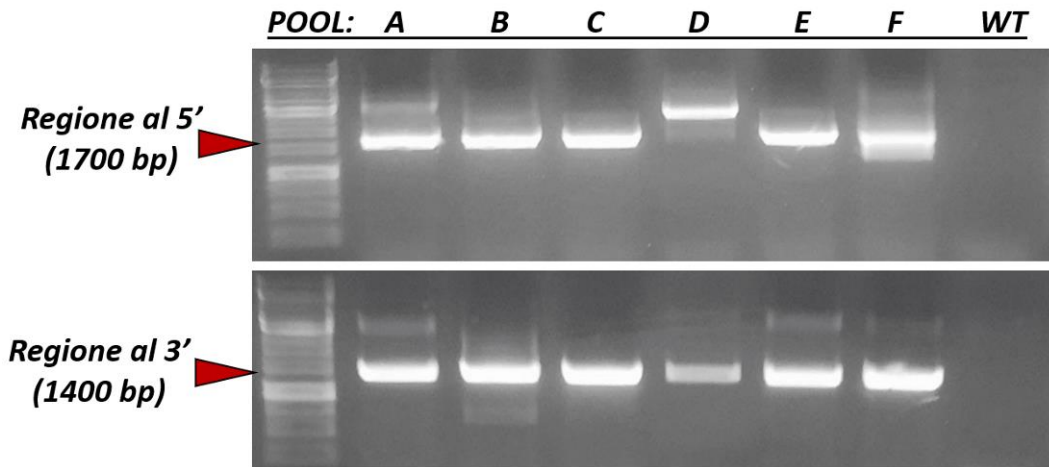


Figura 24: elettroforesi su gel d'agarosio di PCR su gruppo di campioni. La lunghezza attesa dell'amplicone della regione al 5' è di 1700 bp, della regione al 3' di 1400 bp.

La seconda fase dello screening genomico prevede l'analisi delle colonie singole appartenenti ai gruppi positivi alla prima selezione. Come si vede in figura 25, alcuni dei singoli mutanti putativi presentano correttamente gli ampliconi sia per la regione al 5' (1700 bp) sia per la regione al 3' (1400 bp). Questo risultato conferma la presenza di mutanti che hanno correttamente integrato la cassetta di resistenza all'interno del locus che codifica per la proteina GOX. I ceppi che presentano ampliconi aspecifici non vengono presi in considerazione per i test che seguono.

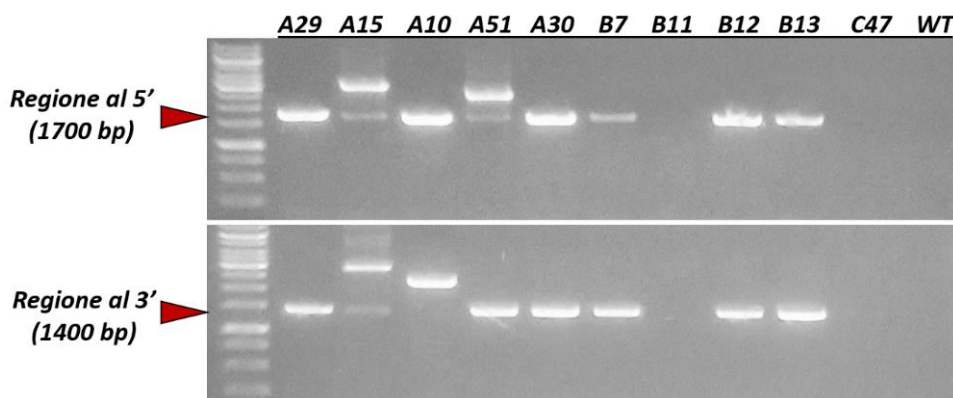


Figura 25: elettroforesi su gel d'agarosio di PCR su singole colonie per le regioni al 5'(1700bp) e al 3' (1400bp).

Inoltre, è stata eseguita una reazione di PCR utilizzando i primer più esterni, ossia il forward che si appaia sulla regione del gene al 5' e il reverse che si appaia al 3', per amplificare l'intero locus. Il risultato atteso per il wt è di circa 2800 bp, mentre per i mutanti che hanno integrato la cassetta di resistenza ed interrotto la sequenza del gene bersaglio in modo atteso, ci si aspetta un amplicone di circa 3300 bp. Dal risultato non è apprezzabile nessuna differenza significativa tra le altezze delle bande; tuttavia, è interessante che i ceppi B7, B12 e B13 presentino un amplicone di circa 6000 bp, lunghezza che corrisponde alla somma del gene wt e della cassetta di inserzione (figura 26).

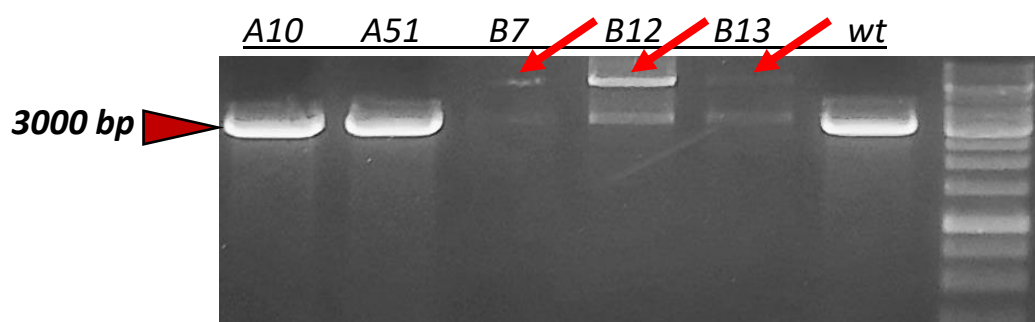


Figura 26: elettroforesi su gel di agarosio di PCR effettuate su colonie singole. Sono stati utilizzati i primer esterni che amplificano l'intero locus. La lunghezza attesa per l'amplicone nei ceppi wt è di 2800 bp. La lunghezza dell'amplicone atteso per i ceppi che hanno integrato la cassetta per HR è di 3300 bp. Le frecce rosse relative ai ceppi B7, B12, B13 indicano la presenza di una banda relativa a un amplicone di 6000 bp.

La fase successiva dello screening prevede l'estrazione totale dell'RNA (metodi 3.1.11) dalle colonie risultate positive ai test sul DNA genomico precedenti effettuati. Questa analisi serve a dimostrare che i mutanti che hanno integrato il costrutto di inserzione hanno la sequenza genica di GOX interrotta. Infatti, ci si aspetta che i ceppi KO non possiedano l'mRNA per il trascritto del gene bersaglio.

L'RNA estratto viene purificato e retrotrascritto a opera di una trascrittasi inversa, che sintetizza il DNA complementare (cDNA). Quest'ultimo viene amplificato tramite PCR con primer specifici per il trascritto del gene GOX (metodi 3.1.1).

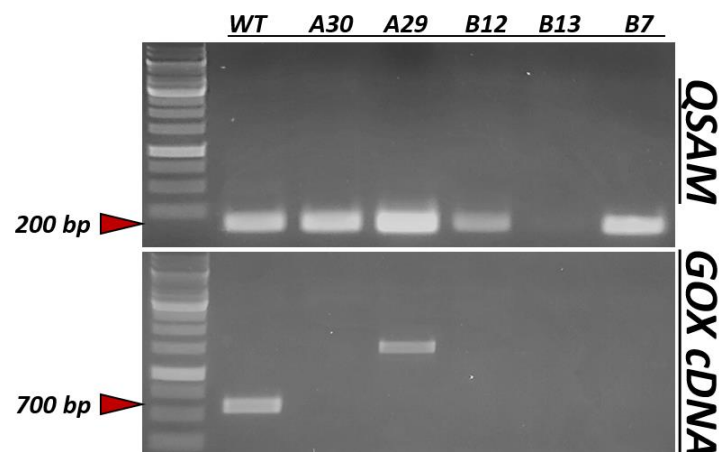


Figura 27: elettroforesi su gel di agarosio di PCR effettuata su mRNA retrotrascritto. In alto: gene housekeeping *Qsam* (lunghezza attesa dell'amplicone 200 bp); in basso: gene *GOX* (ampiezza dell'amplicone attesa 700bp)

Come si evince dalla figura, i ceppi A30, B12, B7 risultano essere KO poiché in essi manca l'mRNA corrispondente al gene *GOX*. *Qsam* è un gene housekeeping che è stato utilizzato per confermare che le procedure di purificazione e retrotrascrizione dell'RNA siano avvenute correttamente. Il ceppo A29 presenta una banda aspecifica, per cui non è ritenuto positivo al test. Per il ceppo B13 la banda relativa all'amplicone del gene housekeeping risulta poco visibile. Questo può essere dovuto a problemi nel protocollo di estrazione dell'RNA o nella retrotrascrizione in cDNA. Data la mancanza dell'amplicone relativo al gene housekeeping, non si può concludere se la mancanza del trascritto del gene di interesse sia dovuto a un test invalido o alla sua effettiva assenza. Pertanto, anch'esso non è ritenuto positivo allo screening.

Il progetto avanzerà con ulteriori ricerche sulla caratterizzazione dei 3 mutanti KO ottenuti, tramite curve di crescita, analisi dei metaboliti, estrazione di pigmenti, per approfondire la funzione del gene codificante la proteina *GOX* e il suo ruolo nella fotorespirazione.

4.5.3 Screening fenotipico dei ceppi KO del gene *pglp*

Analogamente alle analisi fenotipiche effettuate sui ceppi KO del gene *GOX*, a seguito della trasformazione (Metodi 3.1.13), vengono prelevate 250 colonie cresciute su terreno selettivo, trasferite su nuove piastre in duplicato e poste sia

a $\text{CO}_2 = 1\%$ sia in CO_2 atmosferica. Dopo 10 giorni di crescita, sono effettuate le misure di fluorescenza F_v/F_m (Metodi 3.5). In figura 28 sono riportate le scansioni di alcune piastre e i relativi grafici dei dati $\Delta(F_v/F_m)$ come esempio del procedimento eseguito. Sono reputati positivi all'analisi le colonie con valore $\Delta(F_v/F_m)$ superiore al valore soglia, rappresentato dall'area verde. L'analisi ha permesso l'isolamento di 52 mutanti putativi. Questi sono sottoposti a screening genomici per verificare l'inserimento della cassetta di resistenza nel locus del gene di PGLP.

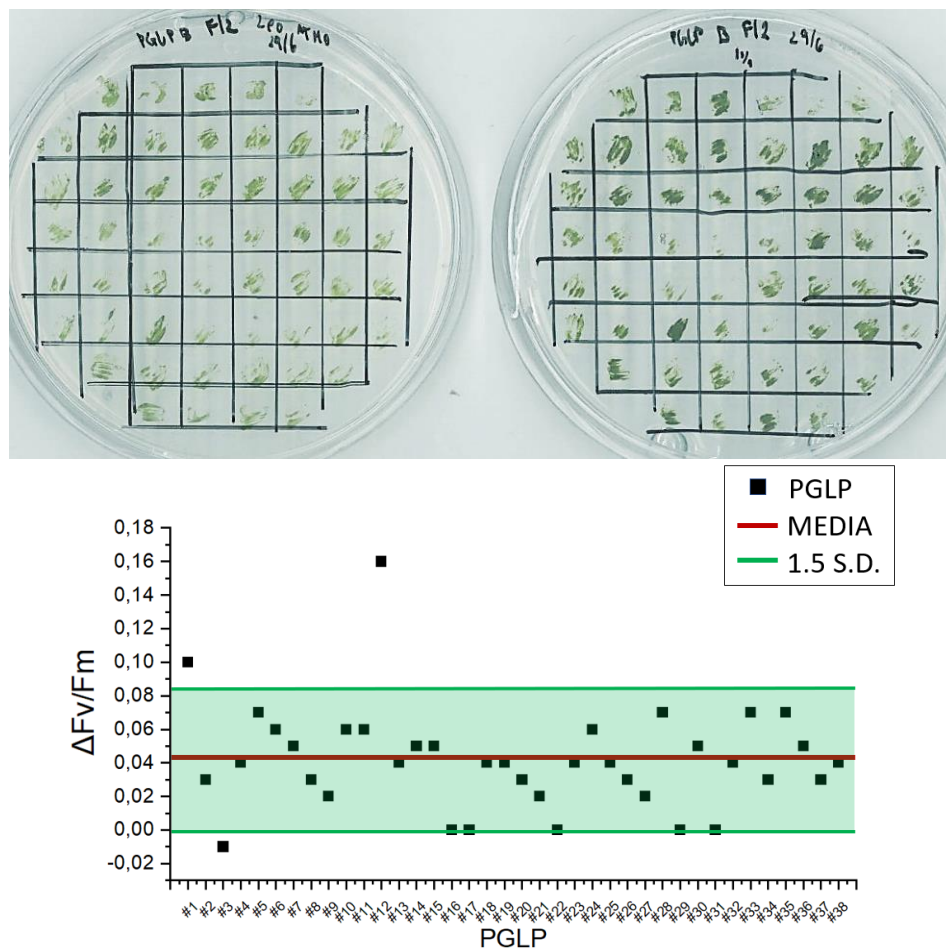


Figura 28: in alto: esempio di scansioni di piastre di crescita in duplicato, con terreno selettivo (F/2 + zeo 3,5 µg) dei mutanti KO del gene PGLP. A destra: piastra tenuta in condizioni di $\text{CO}_2 = 1\%$; a sinistra: piastra tenuta in condizioni di CO_2 atmosferica. In basso: il grafico riporta i valori di $\Delta F_v/F_m$ relativi alle due piastre rappresentate. La media delle misure dei ceppi trasformati è rappresentata con la retta rossa. Sono stati selezionati i mutanti con valori di $\Delta F_v/F_m$ maggiori di 1.5 volte la deviazione standard, rappresentata con il riquadro verde.

4.5.4 Screening genomico dei ceppi KO del gene PGLP

Le prime analisi tramite PCR (Metodi 3.3.1) effettuate per la regione al 5' confermano la presenza degli ampliconi di interesse di lunghezza corretta nei gruppi genici D, F, G, H, e per la regione al 3' nei gruppi C, D, E, F, G, come mostrato in figura 29.

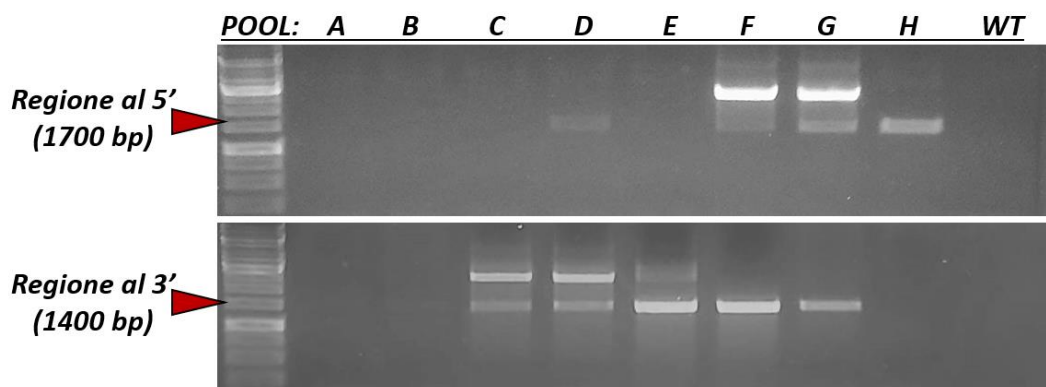


Figura 29: elettroforesi su gel di agarosio di PCR effettuata su gruppi di campioni. La lunghezza attesa dell'amplicone della regione al 5' è di 1700 bp, della regione al 3' di 1400 bp

Il progetto proseguirà con l'analisi dei singoli mutanti dei gruppi più promettenti, quali il gruppo D, F e G, che presentano sia l'amplicone relativo alla regione 5', sia l'amplicone relativo alla regione 3'. Inoltre, dovrà essere estratto e analizzato l'RNA totale dei ceppi selezionati per confermare l'interruzione del gene endogeno.

4.6 Screening genomici dei ceppi KO del gene BASS6

Il fenotipo risultante dai mutanti KO di BASS6 in pianta presenta un fenotipo fotorespiratorio più blando rispetto a quello risultante dalla delezione di altri geni come PGLP e GOX. Questo perché le informazioni ricavate dalla ricerca bioinformatica riguardo questa proteina, la categorizzano all'interno di una classe di trasportatori implicati nel trasporto di vari composti organici. Inoltre, in letteratura viene indicata la presenza di un secondo trasportatore, PLGG1/2, in grado anch'esso di trasportare la stessa molecola di BASS6, il glicolato. Per

questo fatto, non c'è evidenza che dimostri che i mutanti KO per questa proteina possiedano una fotorespirazione completamente interrotta, ma si ipotizza che ne causi il rallentamento.

Non sono presenti studi in letteratura che dimostrino che questo gene in *N.gaditana* sia effettivamente coinvolto nella fotorespirazione e quale sia la sua importanza in questo processo. Per le motivazioni addotte, le cellule trasformate di *N.gaditana* per il KO di BASS6 sono sottoposte direttamente allo screening genomico, senza effettuare step preliminari di indagine fenotipica, in quanto quest'ultima potrebbe non risultare efficace nell'individuazione di mutanti fotorespiratori.

Durante la procedura di trasformazione, la fase di elettroporazione è risultata eccessivamente stressante per le cellule, per cui poche colonie sono risultate in grado di crescere in terreno selettivo. Per questo motivo è stato possibile analizzare un numero ridotto di putativi mutanti (27 colonie).

Il materiale genetico estratto dalle colonie trasformate, unito in gruppi e analizzato tramite PCR è mostrato nella figura 30. Il gruppo E presenta l'amplicone relativo alla regione di omologia al 5'.

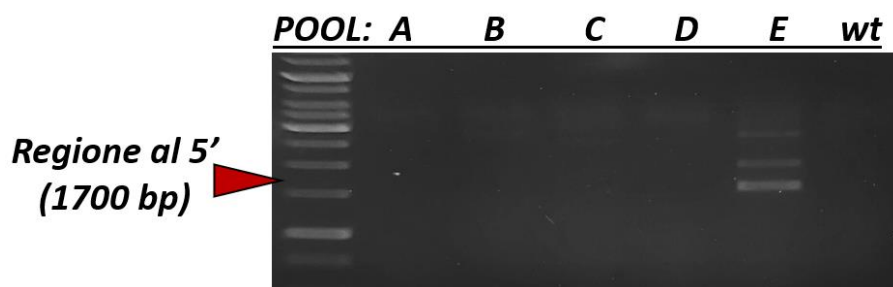


Figura 30: elettroforesi su gel d'agarosio di PCR su gruppo di campioni. La lunghezza attesa dell'amplicone è di 1700 bp

L'analisi di PCR successiva eseguita sul gruppo E, mostra quattro ceppi positivi all'amplicone relativo alla regione di omologia al 3', i ceppi 2, 4, 5, 7 (figura 31).

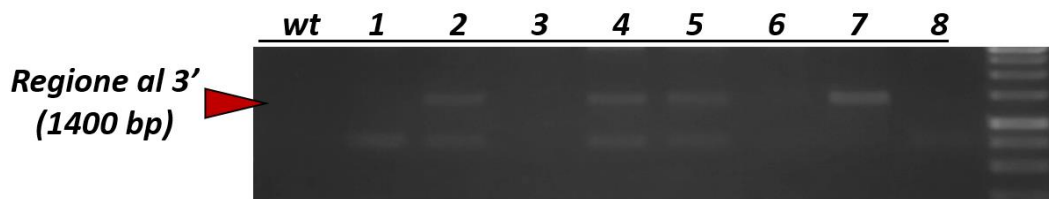


Figura 31: elettroforesi su gel d'agarosio di PCR su colonie singole per la regione che fiancheggia la cassetta di resistenza al 3'. La lunghezza attesa dell'amplicone è di 1400 bp

Il progetto proseguirà con ulteriori screening genomici, per verificare la presenza di ampliconi relativi alla regione al 5'. In particolare, il mutante 7, dal risultato della PCR mostrato in figura, non presenta sequenze aspecifiche, ma solo quella di interesse. Di conseguenza, verrà preso in considerazione per i test successivi e per verificare l'assenza dell'mRNA relativo alla proteina BASS6.

4.7 Protocollo BASIC e Bypass Fotorespiratorio

La seconda parte del lavoro di tesi, si concentra sulla produzione di ceppi che abbiano al loro interno un processo metabolico sintetico (bypass), che permetta di metabolizzare in maniera alternativa i prodotti della fotorespirazione, riducendo la perdita energetica dovuta a tale processo. Il pathway individuato a tale scopo è il ciclo del beta-idrossiaspartato.

Il primo enzima coinvolto nel ciclo è il BHAA, che catalizza la formazione di beta-idrossiaspartato a partire da glicina e gliossilato. Pertanto, perché questo ciclo possa essere sfruttato all'interno del cloroplasto, è necessario lo sviluppo di

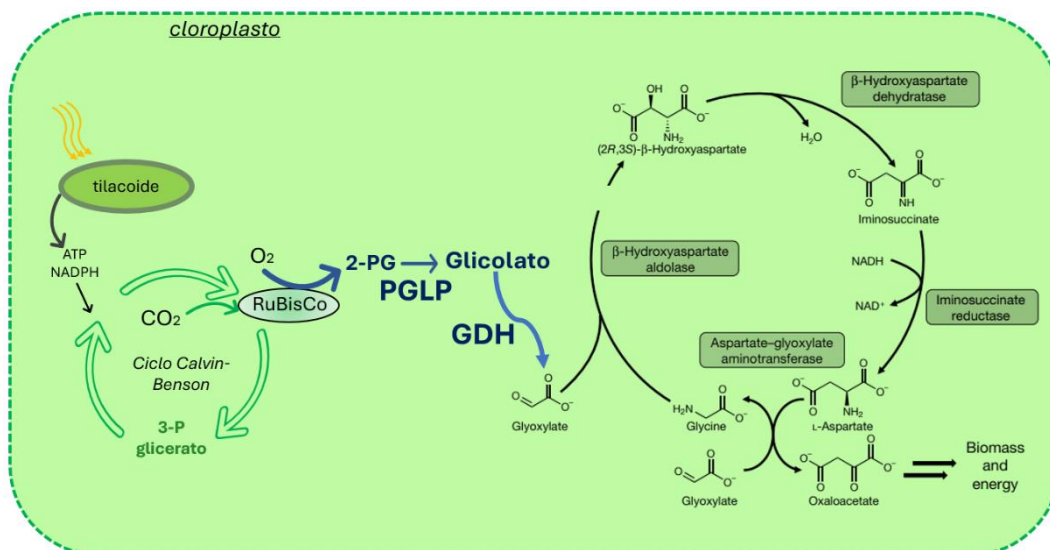


Figura 32: schema del bypass sintetico. La reazione ossigenasica dell'enzima RUBISCO genera 2PG, che viene convertito in glicolato da PGLP endogeno. La strategia prevede l'espressione dell'enzima GDH (frecche blu) per poter generare il gliossilato, substrato del ciclo del beta-idrossiaspartato (frecche nere).

gliossilato in questo organello. Normalmente la fotorespirazione produce questa molecola a livello del perossisoma a opera dell'enzima GOX, utilizzando ossigeno come cofattore e generando perossido d'idrogeno, che però non può essere metabolizzato nel cloroplasto. Per questo motivo, l'implementazione del bypass sintetico prevede l'utilizzo dell'enzima Glicolato Deidrogenasi (GDH), una proteina composta da tre subunità che non necessita O_2 e non genera H_2O_2 (Kebeish et al., 2007). Lo schema del processo è mostrato in figura 32.

I primi due geni che fanno parte della strategia di implementazione del bypass (GDH e BHAA) vengono inseriti simultaneamente all'interno del genoma tramite un costrutto generato grazie alla tecnica del BASIC assembly. Questo sistema deve garantire una espressione stabile all'interno del genoma di *N.gaditana* e simultaneamente generare il KO di un gene coinvolto nella fotorespirazione. È necessario che il processo endogeno fotorespiratorio sia bloccato nelle prime fasi, per poter circoscrivere il flusso di metaboliti della fotorespirazione all'interno cloroplasto. Di conseguenza, occorre selezionare come candidati gli enzimi che implicati nelle prime reazioni, in modo da bloccare il flusso degli intermedi della fotorespirazione.

La prima proteina che interviene nel ciclo della fotorespirazione è l'enzima cloroplastidiale PGLP, specifico per il 2PG, catalizza la sua defosforilazione a glicolato. Il silenziamento di questo gene è interessante dal punto di vista dello studio della fotorespirazione e porterebbe al blocco del flusso di metaboliti fotorespiratori nella primissima fase. Tuttavia, il bypass sintetico richiede il glicolato come substrato nella prima reazione. Infatti, la strategia prevede l'impiego di un enzima accessorio: la proteina GDH della microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Essa catalizza l'ossidazione del glicolato in gliossilato, che può entrare nel ciclo del beta-idrossiaspartato. Pertanto, è necessario che venga mantenuta l'attività dell'enzima PGLP. Motivo per cui, non può essere utilizzato per il KO.

Il trasportatore BASS6, localizzato nella membrana cloroplastidiale, non si identifica come un candidato ideale, poiché in *Arabidopsis* è presente un trasportatore alternativo del glicolato, ossia il trasportatore plastidico del glicolato/glicerato (PLGG1/2) (Pick et al., 2013). È coinvolto nel penultimo step della fotorespirazione, traslocando il glicerato nel cloroplasto, ma è anche in grado di garantire il trasporto di 2PG nel perossisoma. Questi due trasportatori lavorano in concerto per mantenere la fotorespirazione efficiente (South et al., 2017). Pertanto, per bloccare il flusso di metaboliti, risulta potenzialmente insufficiente il blocco della sola proteina BASS6, ma sarebbe necessaria la generazione di un doppio KO, per entrambi i geni coinvolti. Inoltre, BASS6 è

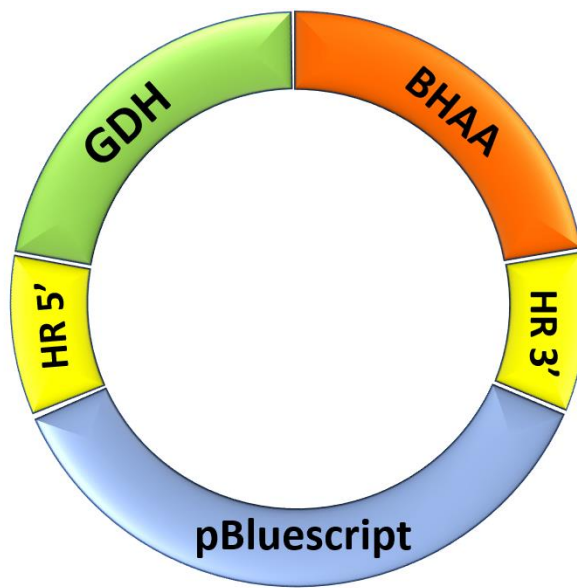
coinvolto nel trasporto di numerose molecole(Huang et al., 2018). Quindi, il suo blocco potrebbe generare problemi severi al metabolismo centrale della cellula.

Il gene *gox* codifica per l'ossidasi che converte il glicolato in gliossilato sfruttando ossigeno, con localizzazione perissosomiale. Questa proteina è stata caratterizzata nelle foglie di spinacio e fa parte della famiglia delle ossidasi FMN-dipendenti. I perossisomi sono organelli specializzati nella riduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali il perossido di idrogeno che si genera nella reazione catalizzata da GOX. Questa molecola è estremamente tossica e viene metabolizzata da un enzima specifico, la catalasi. Questa proteina sfrutta dei substrati in grado di reagire con H_2O_2 , ad esempio alcoli, in maniera da proteggere la cellula dalla formazione di specie radicaliche(Francisco, 2001).

Questo enzima, tenendo conto delle possibili problematiche precedentemente elencate legate al KO dei geni *PGLP* e *BASS6*, risulta la proteina immediatamente successiva nel flusso di reazioni della fotorespirazione e quindi il miglior candidato per bloccare il ciclo endogeno nelle prime fasi ed al contempo garantire la presenza del substrato necessario al corretto funzionamento del bypass metabolico da validare.

Il bypass metabolico viene essere integrato nel genoma dell'ospite per essere espresso in maniera stabile e al contempo eseguire il KO del gene *GOX*. In particolare, la strategia del progetto di tesi propone l'espressione dei primi 2 geni del processo (*GDH* e *BHAA*) tramite integrazione nel genoma ospite tramite sistema di editing genomico CRISPR-Cpf1 in posizione del locus genico del gene *GOX*.

Questo presuppone la generazione di un costrutto complesso da utilizzare per la trasformazione delle cellule di *N. gaditana*, che deve inserirsi sfruttando il meccanismo di ricombinazione omologa. Per questo scopo, il sistema individuato per la generazione del costrutto è il protocollo BASIC (Biopart Assembly Standard for Idempotent Cloning). Questo metodo rappresenta una tecnica robusta e efficiente, che permette l'unione di frammenti di DNA in un'unica sequenza, nell'ordine desiderato (Storch, 2015). Inoltre, la strategia prevede l'inserimento del costrutto all'interno del vettore commerciale pBluescript, come mostrato in figura 31. Quest'ultimo permette la selezione delle cellule batteriche trasformate con il costrutto.



*Figura 33: rappresentazione schematica dei principali elementi che compongono il costrutto assemblato con il protocollo BASIC. Esso si compone delle cassette di espressione dei geni GDH e BHAA, dalle regioni di omologia del gene *gox* e dal vettore commerciale pBluescript per la selezione*

4.7.1 Principio del metodo

Per ottenere il costrutto completo del pathway sintetico con cui poter trasformare le cellule di *N.gaditana*, occorre ottenere tutti i singoli componenti del costrutto (Metodi 3.3.1, Metodi 3.3.2) e legarli tra di loro nell'ordine prestabilito (Metodi 3.6).

La strategia contempla l'utilizzo di oligonucleotidi adattatori che facciano da collegamento tra le vari parti del costrutto. Perché questo avvenga, occorre generare i singoli componenti del costrutto in maniera tale per cui presentino alle loro estremità, un suffisso e un prefisso (iP, iS), che sia complementare alle sequenze dei linker. Questo aspetto è fondamentale per permettere la ligazione e il corretto assemblaggio del costrutto completo finale.

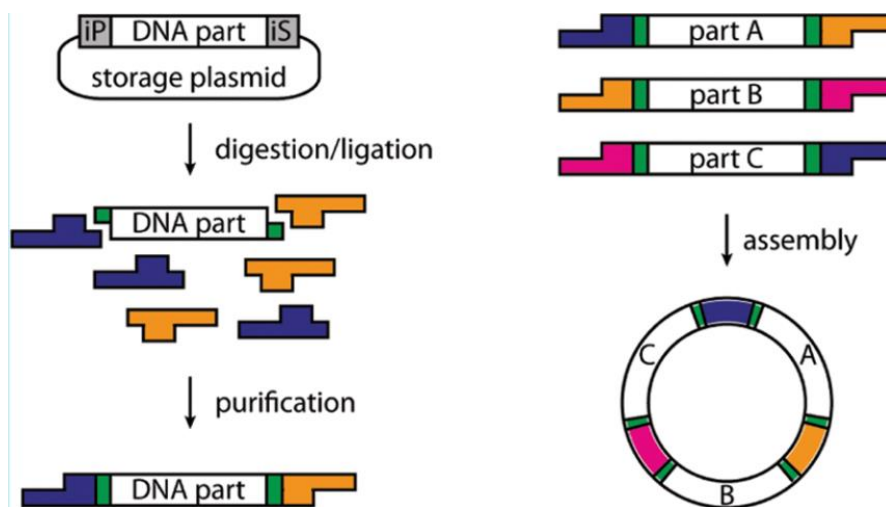


Figura 34: schema dei passaggi del metodo BASIC. Nella prima fase gli adattatori sono accoppiati alle estremità delle parti di DNA attraverso passaggi di digestione e ligazione. Gli adattatori non legati vengono purificati. La fase finale prevede la generazione del costrutto finale tramite l'unione dei frammenti purificati. Immagine riadattata da Storch, 2015

Rappresentazione del costrutto:

regione di omologia al 5' del gene GOX – cassetta di espressione del gene GDH (promotore *lhcx* – peptide segnale – GDH – terminatore *fcpA*) – cassetta di espressione del gene BHAA (promotore *lhcx* – peptide segnale – BHAA – terminatore *fcpA*) – regione di omologia al 3' del gene GOX

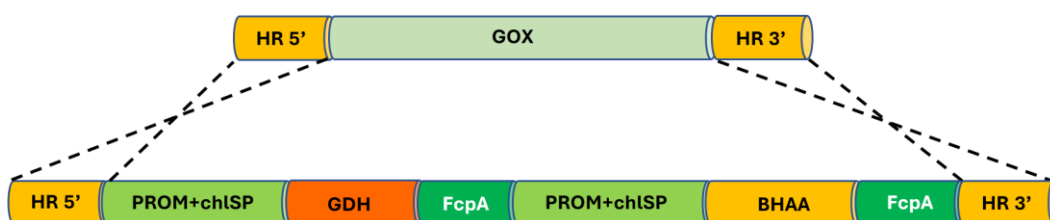


Figura 35: schema del costrutto di inserzione generato tramite protocollo BASIC assembly

Le regioni alle estremità delle parti di DNA, iP e iS, contengono dei siti di riconoscimento per l'enzima di restrizione Bsal. Si tratta di una endonucleasi sito-specifica di tipo II che riconosce la sequenza 5' GGTCTC 3' presente nei suffissi e nei prefissi. Questo enzima taglia il DNA in questi punti, lasciando delle estremità coesive di 4 nucleotidi nei prefissi e di 6 nucleotidi nei suffissi. Le estremità coesive generate si appaiano con quelle dei nucleotidi adattatori. In questo modo è possibile unire i componenti del costrutto del bypass nell'ordine prestabilito.

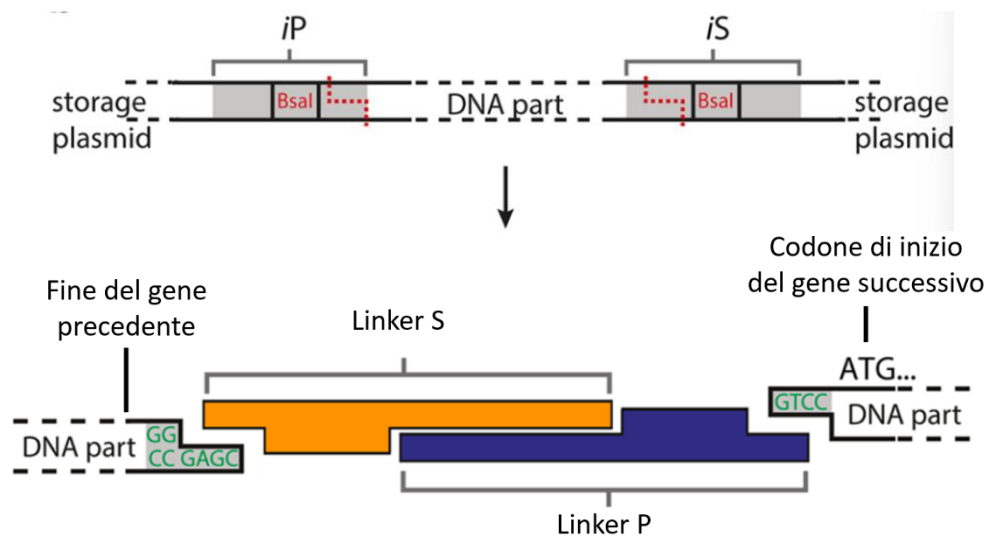


Figura 36: schema della metodica del protocollo BASIC assembly. Nell'assemblaggio del costrutto, le regioni iP e iS vengono tagliate per produrre le estremità coesive. Questo permette l'unione dei frammenti tramite gli adattatori, nell'ordine desiderato

4.7.2 Generazione del costrutti del Bypass

Il primo step nel processo di implementazione del bypass metabolico riguarda l'ottenimento dei singoli frammenti che vanno a costituire la cassetta di espressione che consenta ai geni BHAA e GDH di poter essere correttamente espressi in *N.gaditana*.

Il gene individuato per il knock-in (KI) è il gene GOX che, come discusso precedentemente, è un enzima perissosomiale. Poiché risulta fondamentale ai fini del progetto che il bypass sintetico avvenga nel cloroplasto, le proteine del bypass devono essere espresse in quest'ultimo compartimento subcellulare. La soluzione attuata è inserire a monte della sequenza codificante dei geni da

sovraesprimere la sequenza di un peptide segnale che consenta il trasferimento delle proteine nel cloroplasto.

La sequenza promotrice utilizzata, *Plchx*, proviene dalle proteine *lhcx* di *N.gaditana*. I complessi *lhcx* sono componenti fondamentali nella fotosintesi, implicati nella dissipazione termica dell'energia luminosa nei meccanismi di fotoprotezione, in caso di esposizione ad alta luce (Buck et al., 2019).

La sequenza utilizzata come terminatore è quella del gene esogeno *fcpA*, il medesimo utilizzato per regolare l'espressione della cassetta di resistenza all'antibiotico zeocina nei costrutti per il knock out di PGLP, BASS6 e GOX. Queste due sequenze vengono quindi poste rispettivamente al 5' e al 3' della sequenza sia di BHAA che di GDH.

4.7.3 Casette di espressione dei geni GDH e BHAA

Il metodo designato per la generazione della cassetta di espressione dei geni GDH e BHAA è l'OE-PCR (Metodi 3.1.2). Per applicare questa tecnica è necessario amplificare separatamente i frammenti di DNA che compongono la cassetta: promotore *lhcx*, sequenza genica e terminatore *fcpA*. I primer utilizzati in queste reazioni di PCR sono specificamente disegnati per consentire la sovrapposizione delle sequenze adiacenti e formare la cassetta di espressione completa. In particolare, i due primer esterni alla sequenza totale, che corrispondono al primer *forward* del promotore *lhcx* e al primer *reverse* del terminatore *fcpA*, presentano una coda con un sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione BsaI. Questo aspetto risulta fondamentale nella fase di digestione del protocollo di assemblaggio BASIC. Infatti, i nucleotidi esposti in seguito alla restrizione enzimatica sono complementari alla sequenza degli adattatori che servono per legare la cassetta di espressione di GDH al resto del costrutto completo del bypass (Metodi 3.6).

Una volta ottenuti i singoli frammenti, essi vengono purificati tramite Kit per purificazione PCR GeneJET (Thermo Scientific™) e viene eseguita una precipitazione del DNA in sodio acetato (Metodi 3.1.4). Quest'ultima procedura serve per eliminare contaminazioni da composti organici, proteine o altre impurità che influiscono negativamente sulla tecnica di OE-PCR. I frammenti purificati sono mostrati in figura 38. Essi sono usati come template nell'OE-PCR per generare le due cassette di espressione, secondo le procedure e i parametri descritti nel paragrafo Metodi 3.1.2. I prodotti sono mostrati in figura 38.

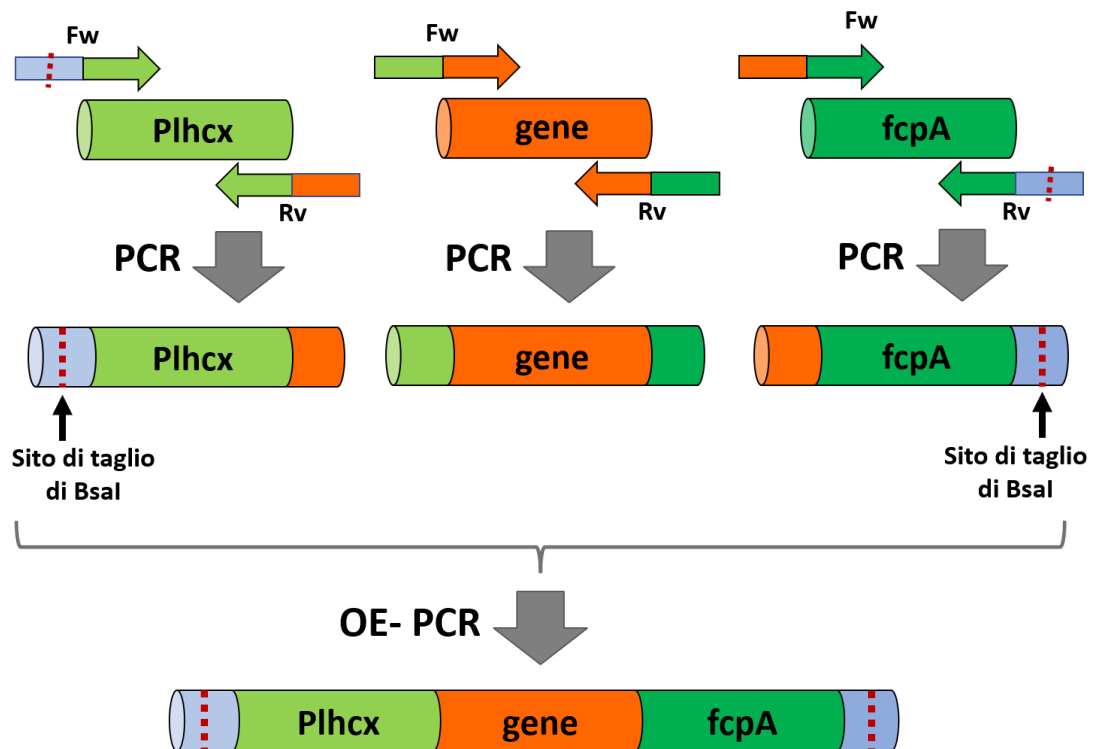


Figura 37: schema riassuntivo del metodo utilizzato per ottenere le cassette di espressione geniche. Le sequenze relative a promotore, gene e terminatore vengono amplificate tramite PCR. I primer utilizzati aggiungono sequenze di sovrapposizione tra i tre frammenti. Inoltre, i primer esterni alla cassetta, aggiungono un sito di taglio per BsaI (linea tratteggiata rossa). La tecnica di OE-PCR permette l'unione dei tre componenti, generando la cassetta di espressione completa.

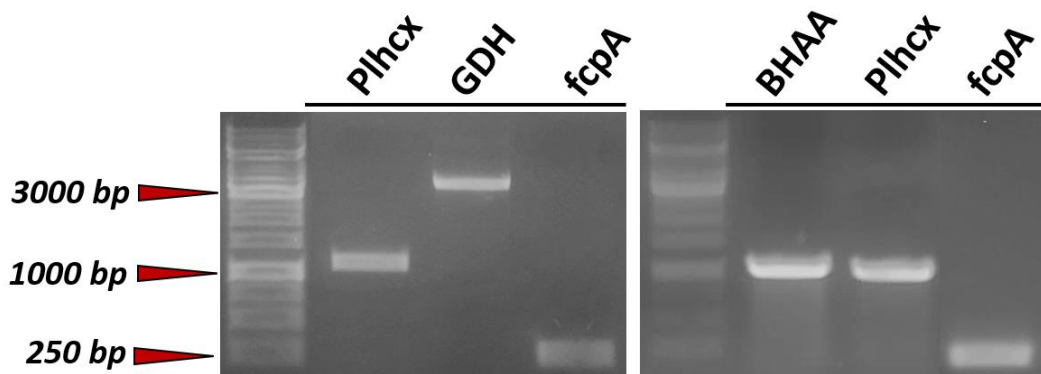


Figura 38: elettroforesi su gel di agarosio. La figura mostra i risultati delle PCR delle amplificazioni dei frammenti di DNA che compongono le cassette di espressione per il gene GDH (a sinistra) e per il gene BHAA (a destra). Sono stati utilizzati primer specifici dotati di code che permettono la generazione della cassetta completa tramite OE-PCR. Lunghezza attesa degli ampliconi: Plhcx 1100bp; terminatore fcpA 230bp; GDH 3300 bp; BHAA: 1100bp

Come discusso in precedenza, l'OE-PCR può portare alla produzione di bande aspecifiche e costrutti parziali. Per questo, è necessario purificare la banda contenente la cassetta di espressione corretta tramite estrazione da gel (metodi

3.1.4). In seguito, viene eseguita una precipitazione del DNA. I prodotti sono mostrati in figura 39.

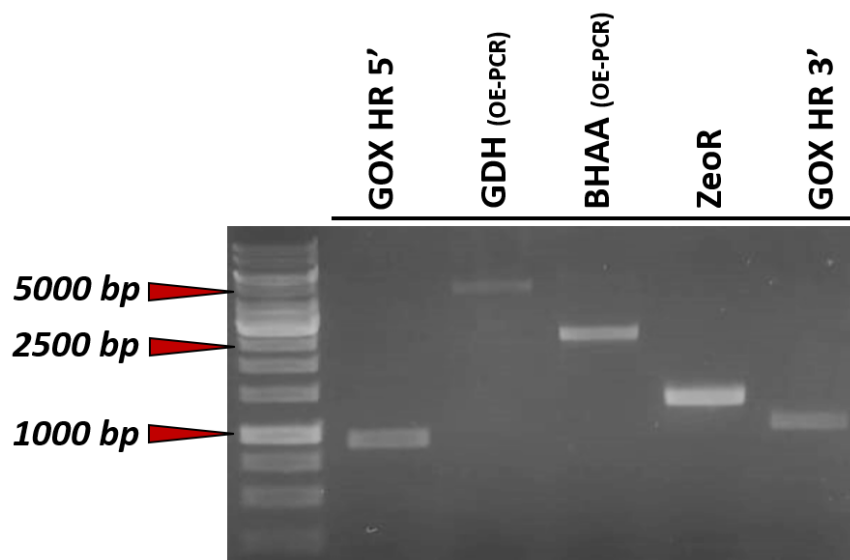


Figura 39: elettroforesi su gel di agarosio. In figura sono mostrati i singoli componenti del costrutto di inserzione finale, tra cui le cassette di espressione dei geni BHAA e GDH ottenute tramite OE-PCR. Le sequenze di DNA riportate in figura sono state purificate tramite protocollo di precipitazione in sodio acetato. La lunghezza attesa delle sequenze: HR 5' di GOX 900bp; cassetta di espressione di GDH 4600bp; cassetta di espressione di BHAA 2600bp; ZeoR 1200bp; HR 3' di GOX 900bp

L'integrazione del costrutto del bypass sintetico all'interno del locus del gene GOX tramite ricombinazione omologa necessita la presenza delle regioni di omologia al 3' e al 5'. Queste due sequenze vengono amplificate tramite PCR (Metodi 3.1.1), utilizzando come template il DNA genomico estratto da *N.gaditana*. I primer utilizzati, come nel caso delle cassette di espressione, sono dotati di specifiche code che introducono alle estremità le sequenze di riconoscimento per l'enzima BsaI. Come nel caso precedente, questi siti servono per dotare i frammenti di DNA amplificati di regioni di appaiamento per gli adattatori del protocollo BASIC (Metodi 3.6).

Anche queste porzioni del costrutto del bypass vengono purificate, in questo caso direttamente dalla miscela di reazione della PCR, e precipitate con sodio acetato (metodi 3.1.4). Il prodotto risultante è presente in figura 39.

Una volta creato il costrutto completo del bypass, occorre un elemento che permetta la selezione delle cellule di *N.gaditana* trasformanti. Per questo motivo è stato scelto di amplificare la sequenza per la resistenza all'antibiotico zeocina (ZeoR), mostrata in figura 40. La strategia prevede la co-trasformazione del costrutto totale del bypass e della sequenza ZeoR, tramite elettroporazione.

Studi in letteratura confermano che è possibile eseguire questa tecnica in microalghe con un'efficienza di co-trasformazione tra il 60-90%(Chungjatupornchai et al., 2016). Inoltre, ricerche su *Nannochloropsis limnetica*, una specie evolutivamente correlata a *N.gaditana*, confermano un'efficienza maggiore del 50% (Chen and Hu, 2019).

Per le due regioni di omologia di GOX e per la resistenza alla zeocina è stato possibile clonare le sequenze all'interno del vettore commerciale Pjet1.2 seguendo il protocollo presente in metodi. 3.1.5 Il vettore è stato utilizzato per trasformare le cellule di E.coli DH5α (Metodi 3.1.7). Le colonie che presentano correttamente le sequenze di interesse sono state valutate tramite colony-PCR (Metodi 3.1.1) e successivamente con restrizioni di controllo dei vettori purificati (Metodi 3.1.9). Il taglio enzimatico deve produrre un'impronta molecolare specifica, come quelle rappresentate in figura 40 e 41, che confermi che l'inserto corrisponde alla sequenza di interesse. Le colonie che risultano positive sono state congelate a -80°C per poter avere a disposizione grandi quantità di materiale da utilizzare per il protocollo BASIC, senza dover necessariamente eseguire numerose PCR per amplificare le quantità di DNA richieste.

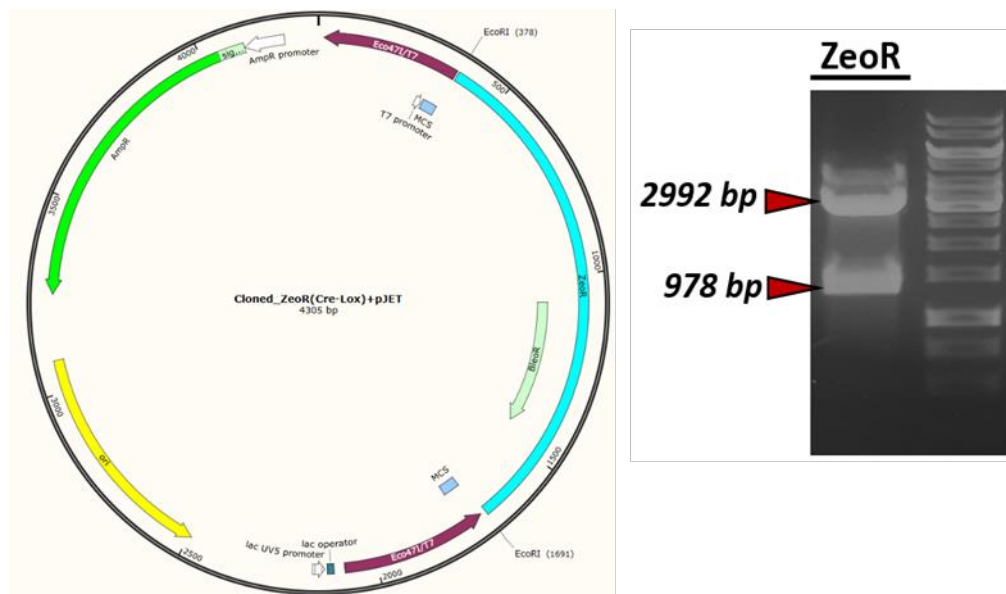


Figura 40: a sinistra: schema della sequenza per la resistenza all'antibiotico zeocina clonata all'interno del vettore pJET1.2. la regione azzurra corrisponde alla sequenza ZeoR, sono indicate anche le sequenze del vettore per l'origine di replicazione (in giallo) e per la resistenza all'antibiotico ampicillina in E.coli (in verde). A destra: elettroforesi su gel di agarosio della restrizione di controllo sulla sequenza ZeoR clonata nel vettore pJET1.2. le bande attese sono di lunghezza 978bp e 2992bp. La banda presente di lunghezza 4300pb corrisponde alla porzione di vettore non tagliato dall'enzima.

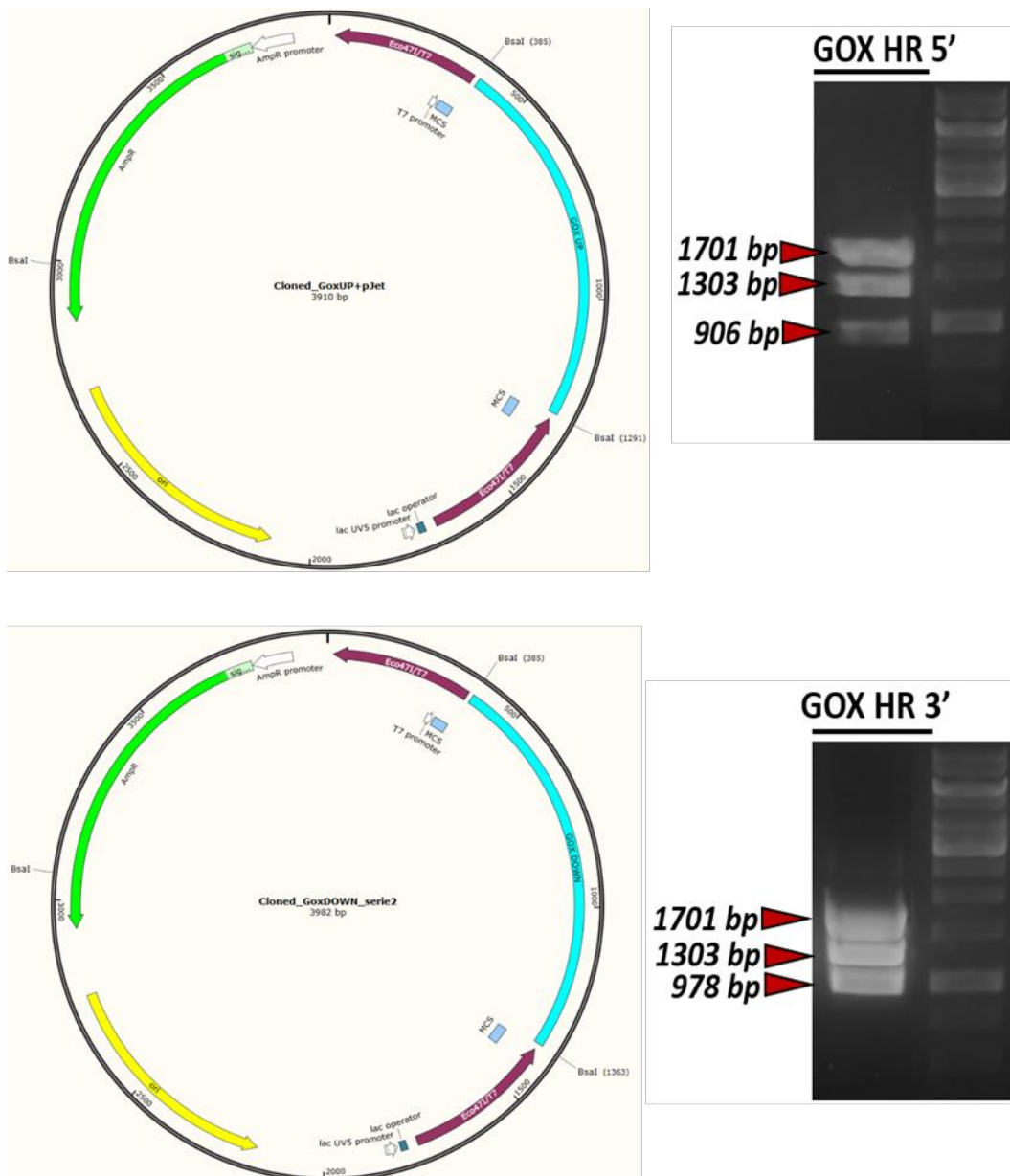


Figura 41: a sinistra: schema della due sequenze di omologie per il gene GOX clonate all'interno del vettore pJET1.2. Le regioni azzurre corrispondono alle sequenze di omologia al 5'(in alto) e al 3'(in basso). Sono indicate anche le sequenze del vettore per l'origine di replicazione (in giallo) e per la resistenza all'antibiotico ampicillina in E.coli (in verde). A destra: elettroforesi su gel di agarosio della restrizione di controllo sulle sequenze clonate nel vettore pJET1.2. Le bande attese in entrambi i casi sono di lunghezza 978bp, 1303bp e 1701bp.

Infine, la strategia del protocollo BASIC (3.6) prevede l'inserimento del costrutto del bypass sintetico all'interno del plasmide commerciale pBluescript. Questo vettore contiene principalmente una sequenza polylinker, un'origine di replicazione di E.coli e una per la resistenza all'antibiotico ampicillina. In questo modo, è possibile trasformare le cellule batteriche (3.1.7) e selezionare su

terreno di coltura selettivo (3.2) le colonie che integrano il costrutto legato al plasmide pBluescript (3.1.1).

Così come per le altre parti di DNA necessarie alla tecnica, il vettore è stato amplificato tramite PCR (3.1.1) utilizzando dei primer specifici che aggiungono i siti di riconoscimento per gli oligonucleotidi adattatori alle estremità della sequenza. Segue purificazione della miscela di PCR e precipitazione del DNA (3.1.3). La sequenza amplificata dal vettore è di 2600 pb. Il risultato della purificazione è mostrato nell'elettroforesi su gel di agarosio in figura 42.

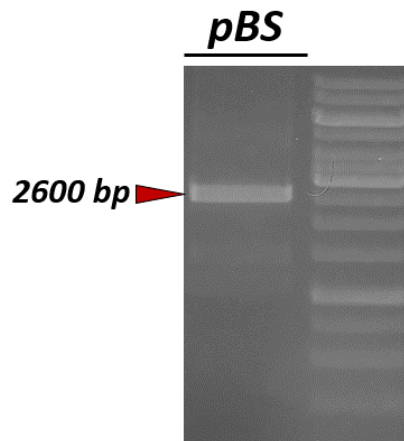


Figura 42: elettroforesi su gel di agarosio della sequenza amplificata tramite PCR e purificata tramite precipitazione in sodio acetato del vettore commerciale pJET1.2. la lunghezza attesa della sequenza è di 2600 bp

In conclusione, è stato possibile ottenere tutti i componenti necessari all'implementazione del bypass sintetico per il protocollo BASIC. I procedimenti nel dettaglio per i passaggi di restrizione/ligazione che permettono il completamento del costrutto completo sono descritti nel capitolo Metodi 3.6. Tuttavia, non è stato possibile ottenere colonie batteriche in cui il costrutto è stato generato correttamente. Il progetto continuerà quindi con ulteriori sforzi per ottimizzare le procedure di assemblaggio degli elementi del bypass, per permettere infine, l'integrazione del processo metabolico alternativo alla fotorespirazione in *N. gaditana*.

5. DISCUSSIONE

In questo studio, viene utilizzato l'organismo *N.gaditana*, una microalga che nel corso degli anni ha acquistato interesse crescente per le sue potenzialità in ambito biotecnologico nella produzione di biomassa. Questa specie è ritenuta particolarmente rilevante per la capacità di sintetizzare una vasta gamma di composti, soprattutto lipidi polinsaturi e TGA per la produzione di biocarburanti.

I limiti relativi all'impiego in scala industriale sono legati all'efficienza di conversione della fotosintesi. Ad oggi, le tecniche di ingegneria genetica si sono rivelate fondamentali per ottenere ceppi capaci di maggiore produttività. Queste procedure richiedono un sistema per introdurre il materiale genetico, come l'elettroporazione, e un sistema che permetta l'espressione stabile dei geni di interesse. Tra le tecnologie più utili per la manipolazione genetica, il sistema CRISPR-Cas è stato utilizzato con successo in microalghe (Naduthodi et al., 2019). Tuttavia, il meccanismo di ricombinazione omologa non sempre è funzionale in tutte le specie. In letteratura sono presenti studi che confermano la possibilità ottenere mutanti usando CRISPR-Cas e approcci basati sulla ricombinazione omologa, in organismi come *Chlamydomonas reinhardtii* (Angstenberger et al., 2020) e nella specie *Nannochloropsis oceanica* (Naduthodi et al., 2019), più vicina evolutivamente alla microalga *N.gaditana*. Tuttavia, ad oggi questa tecnica non è ancora stata implementata in questo organismo e questo lavoro di tesi propone il suo utilizzo per effettuare dei KO di geni fotorespiratori.

L'oggetto centrale del progetto è la fotorespirazione. Per quanto sia un processo fondamentale negli organismi fotosintetici, richiede energia e limita l'accumulo di biomassa. Poiché non sono presenti ricerche riguardanti questo processo metabolico in *N.gaditana*, il ruolo di questo processo è incerto in questo organismo. Approfondire la conoscenza in merito, permetterebbe di mettere a punto strategie mirate per l'ingegneria genetica e potrebbe aprire nuove strade per rendere l'uso industriale di questo organismo più competitivo. Una possibile applicazione potrebbe riguardare l'implementazione di bypass sintetici che possano aumentare la produttività di questa microalga. In letteratura è possibile trovare diverse strategie studiate per aumentare la capacità di fissazione del carbonio e le rese produttive tramite l'implementazione di modifiche metaboliche (Bar-Even, 2018). L'obiettivo del progetto propone di sfruttare il ciclo del beta-idrossiaspartato presente in proteobatteri marini (Schada von Borzyskowski et al., 2019), come processo alternativo alla fotorespirazione, capace di riconvertire il glicolato in modo più efficiente, senza perdite di C e N.

Nel progetto di tesi, è stata utilizzata la tecnica CRISPR-Cpf1 per modificare il genoma di *N.gaditana* e inserire una sequenza esogena, sfruttando il meccanismo di ricombinazione omologa diretta. Le ribonucleoproteine associate alle sgRNA sono state veicolate direttamente all'interno delle cellule, sfruttando il metodo dell'elettroporazione. Altri metodi di ingegneria genetica messi a punto in specie simili a *N.gaditana*, come il sistema CRISPR-Cas9 utilizzato in studi riguardanti *N.oceanica*, prevedono l'inserimento di plasmidi per l'espressione sia della proteina Cas9 sia delle sgRNA (Naduthodi et al., 2019). Tuttavia, essi richiedono la costruzione di un vettore apposito, che contenga le sequenze ottimizzate secondo il codon usage dell'organismo di interesse, risultando in un metodo più dispendioso in termini di costi e tempo. La tecnica utilizzata in questo studio invece, prevede l'uso della proteina Cpf1 commerciale purificata e assemblata direttamente in vitro con le sgRNA. Di conseguenza, non è necessaria la costruzione di vettori episomiali. Inoltre, il metodo limita azioni indesiderate e tagli aspecifici da parte della ribonucleoproteina.

5.1 Isolamento di mutanti fotorespiratori tramite screening fenotipici

L'isolamento dei mutanti di *N.gaditana* viene condotto sulla base dell'ipotesi che in questo organismo la fotorespirazione abbia funzioni simili ad altre specie fotoautotrofe in cui questo processo è stato caratterizzato in maniera più precisa, come *A.thaliana*. È noto che l'esposizione a concentrazioni atmosferiche di CO₂ implica un netto declino dei valori di Fv/Fm in mutanti di questa specie. Il fenotipo fotorespiratorio viene soppresso invece in atmosfera arricchita in CO₂ (>0.2%)(“Photorespiration,” n.d.). In questi casi, è stata dimostrata l'utilità di screening effettuati esponendo i mutanti in condizioni di alta e bassa CO₂, basandosi sulle misure di fluorescenza del PSII(Badger et al., n.d.). Di conseguenza, si ipotizza che l'interruzione di un gene che possa essere legato a questo metabolismo, implichi difetti nel meccanismo di fotorespirazione, generando ceppi con un fenotipo che abbia difficoltà a crescere in condizioni atmosferiche, portando a un declino del valore di Fv/Fm significativo, tale da permettere l'isolamento dei mutanti in *N.gaditana*.

Tuttavia, così come in letteratura sono assenti evidenze riguardo la fotorespirazione in *N.gaditana*, non sono presenti studi che caratterizzino il comportamento dei mutanti fotorespiratori in questa microalga. Nonostante questa premessa, tre ceppi KO del gene *gox*, dei quali è stata dimostrata l'assenza del trascritto del gene, hanno mostrato un fenotipo assimilabile a

quello fotorespiratorio assimilabile a quello studiato in *Arabidopsis* o in altre microalghe come in *Chlamydomonas* (Hagemann et al., 2013). Alcuni putativi mutanti esposti a concentrazione arricchita di CO₂ hanno mostrato significative differenze dei valori di Fv/Fm rispetto a quelli cresciuti in condizioni di CO₂ atmosferica, considerando la soglia equivalente a 1.5 volte il valore della deviazione standard dei valori di fluorescenza.

I risultati degli screening fenotipici hanno portato, specialmente nel caso della delezione del gene GOX, all'isolamento di 3 ceppi KO mancanti dell'espressione del gene. Questo è stato dimostrato tramite screening genomici e con la conferma dell'assenza dell'mRNA relativo alla proteina GOX.

Questi dati permettono di ipotizzare la presenza di meccanismo fotorespiratorio in *N.gaditana* e che, specialmente il gene GOX, possa avere un ruolo analogo a quello caratterizzato in altre piante o microalghe, risultando in un fenotipo fotorespiratorio simile a quello evidenziato ad esempio in *Arabidopsis* o *Chlamydomonas*. I mutanti KO mancanti del gene GOX devono essere sottoposti ad ulteriori studi per caratterizzarne il fenotipo e validare questa ipotesi. Per valutarne l'effettivo coinvolgimento nella fotorespirazione bisogna verificare se l'assenza di questo gene sia correlato con l'accumulo di metaboliti fotorespiratori, come è stato visto ad esempio in *A. thaliana* (South et al., 2017).

5.2 Screening genomici dei mutanti fotorespiratori

Le reazioni di PCR effettuate per amplificare le regioni di omologia presenti al 3' o al 5' rispetto alla cassetta di resistenza, sono state utili per verificare l'avvenuta inserzione della sequenza esogena nel locus del gene di interesse. Tuttavia, le PCR effettuate per amplificare il locus totale del gene GOX, comprendendo l'intera cassetta di inserzione, non mostrano la differenza attesa tra gli ampliconi di lunghezza ricercata per i mutanti (3300 bp) e quella dei ceppi parentali (2800 bp). Si suppone che questo possa essere dovuto a contaminazioni di ceppi parentali di *N.gaditana*. In particolare, nelle piastre con terreno solido di F/2 e zeocina, è possibile che le colonie di mutanti, che possiedono la cassetta di resistenza, creino uno strato a diretto contatto con il terreno selettivo e schermino le cellule wt dall'antibiotico. Per questo motivo, sono risultate idonee le amplificazioni di PCR effettuate sulle regioni *flanking* (regioni di omologia al 5' e al 3'), che non sono influenzate dalle contaminazioni da ceppi wt, ma si sono rivelate inefficaci le PCR sul locus totale del gene bersaglio nell'individuazione di ceppi KO. Inoltre, la presenza di contaminazioni di cellule parentali di *N.gaditana*, può condizionare anche l'analisi del cDNA del trascritto relativo gene di interesse. Per questo motivo, prima di eseguire l'estrazione di RNA, le colture dei

mutanti sono state trasferite in fiasche con terreno liquido addizionato con zeocina. In questa maniera, vengono eliminate le cellule di *N.gatidana* wt che potrebbero contaminare le colture di ceppi KO e influenzare i risultati degli screening.

Un altro aspetto di rilievo sulle amplificazioni di PCR eseguite sul locus totale, riguarda gli screening genomici dei mutanti del gene GOX. I ceppi B7, B12, B13, mostrano delle bande di circa 6000 bp. Questa lunghezza corrisponde alla somma della del locus wt e dell'intera cassetta di inserzione. La presenza di questo amplicone, potrebbe significare che in questi mutanti la cassetta di resistenza si sia inserita in blocco nel locus genico di GOX, senza l'evento di ricombinazione omologa. Questa ipotesi deve essere validata tramite il sequenziamento del locus in cui si è inserita la cassetta di resistenza.

5.4 Implementazione del bypass sintetico

La strategia scelta per generare il costrutto di inserzione del bypass sintetico è il metodo BASIC. Questa tecnica rappresenta un metodo efficace e robusto per l'assemblaggio di multiple sequenze di DNA, attraverso l'utilizzo di specifici adattatori. Rispetto ad altre tecniche di clonaggio tradizionale, il protocollo BASIC rappresenta una tecnica più modulabile e flessibile. Questo metodo permette la generazione di costrutti in cui le parti di DNA possono essere inserite nell'ordine desiderato, attraverso reazioni di ligazione e restrizione, ed eventualmente modificato semplicemente cambiando l'ordine degli adattatori. Infatti, esso si basa sull'utilizzo di sequenze standardizzate, che possono essere riutilizzate a piacimento, senza necessità di complessi passaggi di clonaggio e riducendo la dipendenza da amplificazioni di PCR (Storch, 2015).

In conclusione, il metodo BASIC facilita il riutilizzo delle parti di DNA generate per la formazione di altri costrutti. Inoltre, il metodo è robusto e riproducibile. Questo permette di riciclare frammenti di DNA per altri eventuali altri scopi. Tuttavia, l'efficienza dell'assemblaggio del costrutto finale dipende dal numero di singoli frammenti da cui esso è costituito. In particolare, la probabilità di ottenere il prodotto corretto decresce esponenzialmente con l'aumentare del numero di parti da unire. Nel progetto di tesi i frammenti di DNA da unire sono dieci, più il vettore pBluescript. Il numero elevato di elementi implica la diminuzione di precisione del metodo e l'aumento, in proporzione, dei prodotti

di fusione incorretti. Per questo motivo, è necessario ricercare i parametri ottimali da implementare nel metodo, per ottenere il costrutto completo.

Il prodotto finale dell'assemblaggio viene utilizzato direttamente per trasformare le cellule di *E.coli* termocompetenti. In particolare, il vettore pBluescript utilizzato conferisce la resistenza all'antibiotico ampicillina. Tuttavia, i tentativi effettuati negli esperimenti durante questo lavoro di tesi, non hanno evidenziato colonie batteriche in grado di crescere in terreno selettivo. Il progetto procederà quindi, nella ricerca di una procedura ottimizzata per il costrutto in considerazione.

La generazione delle cassette di espressione dei geni BHAA e GDH che vanno a comporre il costrutto, così come la formazione delle cassette di delezione per i KO, è stata eseguita tramite la tecnica di OE-PCR. Questo metodo permette di evitare soluzioni di clonaggio più laboriose. Tuttavia, è stato necessario, specialmente per la sequenza relativa al gene GDH, ottimizzare i parametri da implementare nel processo, per poter ottenere la cassetta di espressione completa. La sequenza di DNA del gene GDH (3301 bp) risulta relativamente più lunga delle altre due da unire (*Plhcx* e *fcpA*) e con un contenuto in GC particolarmente alto. Questi aspetti rendono necessaria una peculiare attenzione nelle procedure di OE-PCR e nelle scelte dei parametri.

L'amplificazione tramite PCR di geni ad alto contenuto in GC risulta talvolta problematico. Le sequenze in questione possono ostacolare l'attività della polimerasi tramite la formazione di strutture secondarie e rendendo problematica la fase di denaturazione (Hubé et al., 2005). Per far fronte a queste complicazioni è stato utilizzato un buffer aggiuntivo nella miscela di reazione, contenente dimetil solfossido (DMSO). Questa molecola interferisce con la formazione di legami a ponte di idrogeno, prevenendo la formazione di dimeri e l'accoppiamento aspecifico intrafilamento o tra filamenti diversi. Inoltre, è stata utilizzata la polimerasi Q5 (NEB), consigliata in letteratura come affidabile nella generazione ad alta fedeltà di ampliconi lunghi e problematici, come quelli ricchi in GC. Questa polimerasi inoltre presenta una processività maggiore rispetto alla polimerasi Phusion (Hilgarth and Lanigan, 2020), utilizzata ad esempio per l'amplificazione tramite OE-PCR del costrutto di espressione del gene BHAA.

Un aspetto chiave nell'OE-PCR è risultato mantenere un rapporto equimolare tra i templati utilizzati (Shevchuk, 2004), poiché mantenere un rapporto di equo volume tra i frammenti non risulta sempre efficace, generando prodotti aspecifici e sequenze incomplete. La presenza di questi ampliconi riduce il pool di nucleotidi disponibili alla generazione del prodotto di interesse e contemporaneamente impegna la polimerasi nella catalisi di ampliconi indesiderati. In queste circostanze il prodotto di interesse può essere presente, ma in quantità insoddisfacenti.

In conclusione, il protocollo di assemblaggio BASIC presenta molteplici vantaggi, come riproducibilità e modulabilità. Tuttavia, è un metodo complesso, che implica molti passaggi e componenti nelle miscele di reazione. Per cui, ogni fase del processo presenta delle criticità. Ad esempio, impurezze nei campioni di partenza possono influenzare negativamente l'attività degli enzimi di restrizione e ligazione. In questo caso, il processo è stato perfezionato implementando delle procedure di purificazione, quali la precipitazione di DNA in sodio acetato, per eliminare carboidrati, fenolo e proteine. Nel periodo di svolgimento del lavoro di tesi, non sono stati ottenuti risultati significativi nell'assemblaggio del costrutto completo. Risulta quindi necessario proseguire nella ricerca di procedure ottimizzate, come l'utilizzo di buffer o enzimi alternativi, l'estensione del tempo di incubazione a 37°C, per aumentare l'efficienza della restrizione, o la titolazione degli enzimi, per assicurare una digestione completa delle sequenze.

6. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è lo studio della fotorespirazione in *N.gaditana*, per valutare il ruolo di questo processo nella generazione di biomassa. L'approfondimento delle conoscenze riguardo questo metabolismo può gettare le basi per progetti futuri, volti a aumentare la produttività di questa microalga e per ampliare il suo utilizzo in applicazioni industriali.

Nonostante non siano presenti studi che confermino la presenza di questo processo in *N.gaditana*, si ipotizza che la fotorespirazione possa essere conservata anche in questa microalga. Per validare questa teoria è stata pianificata una strategia di delezione genica basata sul sistema CRISPR-Cpf1 per i geni che codificano per le proteine PGLP, GOX e BASS6, potenzialmente coinvolte nella fotorespirazione. Per trasformare le cellule di *N.gaditana*, sono state introdotte delle sequenze esogene per ricombinazione omologa, nei *locus* dei geni bersaglio.

L'utilizzo di screening fenotipici e genomici ha portato all'isolamento di 3 ceppi KO per il gene codificante la proteina GOX. Questo risultato è stato validato dall'assenza dell'mRNA della proteina di interesse. Il progetto continuerà con studi di caratterizzazione del fenotipo, per verificare il coinvolgimento di questo gene all'interno del meccanismo di fotorespirazione, valutando l'eventuale accumulo di metaboliti del processo in esame.

Le analisi mostrano che altri mutanti KO per il gene codificante l'enzima PGLP, presentano un fenotipo potenzialmente fotorespiratorio. Tuttavia, questa ipotesi andrà validata sperimentalmente, per confermare l'assenza del trascritto relativo a questo gene.

I test genomici effettuati sui ceppi KO del gene che codifica per il trasportatore BASS6 sono promettenti. Anche in questo caso dovranno essere eseguite ulteriori analisi per confermare la presenza di mutanti fotorespiratori.

La fotorespirazione è un processo essenziale, ma limita la produzione di biomassa. Per questo motivo, è oggetto di studi biotecnologici atti a sostituire questo metabolismo con processi alternativi (*bypass*), meno dispendiosi dal punto di vista energetico, ma che conservino la capacità di detossificare i metaboliti della fotorespirazione. In questa tesi, viene sviluppata l'implementazione di un *bypass* sintetico in *N.gaditana*, il ciclo del beta-idrossiaspartato. L'approccio scelto prevede la generazione di un costrutto per effettuare il knock in (KI) dei primi due geni della strategia proposta (codificanti per le proteine GDH e BHAA), all'interno del *locus* che codifica per la proteina

GOX. Durante il lavoro di tesi svolto, sono stati amplificati e purificati tutti gli elementi che compongono il costrutto. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per ottimizzare il protocollo di assemblaggio. Raggiunto questo obiettivo, si procederà con il KI dei due geni di interesse in *N.gaditana*. In conclusione, il progetto di tesi ha ottenuto risultati positivi che necessitano ulteriori validazioni e ha gettato le basi per l'introduzione di processi metabolici alternativi.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, I., 2018. Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. *Front. Biosci.* 10, 197–216. <https://doi.org/10.2741/s509>
- Angstenberger, M., de Signori, F., Vecchi, V., Dall'Osto, L., Bassi, R., 2020. Cell Synchronization Enhances Nuclear Transformation and Genome Editing via Cas9 Enabling Homologous Recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth. Biol.* 9, 2840–2850. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00390>
- Badger, M.R., Fallahi, H., Kaines, S., Takahashi, S., n.d. Chlorophyll fluorescence screening of *Arabidopsis thaliana* for CO₂ sensitive photorespiration and photoinhibition mutants 8.
- Bar-Even, A., 2018. Daring metabolic designs for enhanced plant carbon fixation. *Plant Sci.* 273, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.12.007>
- Björn, L.O., Papageorgiou, G.C., Blankenship, R.E., Govindjee, 2009. A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynth. Res.* 99, 85–98. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>
- Blankenship, R.E., 2021. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. John Wiley & Sons.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, "Biologia Molecolare della Cellula"; Quinta Edizione, Zanichelli Editore, 2009; p.320-332
- Buck, J.M., Sherman, J., Bártulos, C.R., Serif, M., Halder, M., Henkel, J., Falciatore, A., Lavaud, J., Gorbunov, M.Y., Kroth, P.G., Falkowski, P.G., Lepetit, B., 2019. Lhcx proteins provide photoprotection via thermal dissipation of absorbed light in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nat. Commun.* 10, 4167. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12043-6>
- Busch, F.A., 2020. Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO₂ diffusion and metabolism. *Plant J.* 101, 919–939. <https://doi.org/10.1111/tpj.14674>
- Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2015. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresour. Technol.* 184, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.026>
- Chen, Y., Hu, H., 2019. High efficiency transformation by electroporation of the freshwater alga *Nannochloropsis limnetica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 119. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2695-9>
- Chungjatupornchai, W., Kitraksa, P., Fa-aaroonsawat, S., 2016. Stable nuclear transformation of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by electroporation. *J. Appl. Phycol.* 28, 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0594-5>
- Comparison of palm oil, *Jatropha curcas* and *Calophyllum inophyllum* for biodiesel: A review | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document], n.d. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.05.005>
- Cummins, P.L., Kannappan, B., Gready, J.E., 2018. Directions for Optimization of Photosynthetic Carbon Fixation: RuBisCO's Efficiency May Not Be So Constrained After All. *Front. Plant Sci.* 9, 183. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00183>
- Datta, A., Hossain, A., Roy, S., 2019. An Overview on Biofuels and Their Advantages and Disadvantages. *Asian J. Chem.* 31, 1851–1858. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22098>

- de Vree, J.H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2015. Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnol. Biofuels* 8, 215. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0400-2>
- Environment, U.N., 2021. Emissions Gap Report 2021 [WWW Document]. UNEP - UN Environ. Programme. URL <http://www.unep.org/resources/emissions-gap-report-2021> (accessed 8.1.22).
- Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels [WWW Document], n.d. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604600103>
- Fernie, A.R., Bauwe, H., 2020. Wasteful, essential, evolutionary stepping stone? The multiple personalities of the photorespiratory pathway. *Plant J.* 102, 666–677. <https://doi.org/10.1111/tpj.14669>
- Gee, C.W., Niyogi, K.K., 2017. The carbonic anhydrase CAH1 is an essential component of the carbon-concentrating mechanism in *Nannochloropsis oceanica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 4537–4542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700139114>
- Gong, Y., Jiang, M., 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol. Lett.* 33, 1269–1284. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0574-z>
- Haberl, H., Erb, K.-H., Krausmann, F., 2014. Human Appropriation of Net Primary Production: Patterns, Trends, and Planetary Boundaries. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 39, 363–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-121912-094620>
- Hagemann, M., Fernie, A.R., Espie, G.S., Kern, R., Eisenhut, M., Reumann, S., Bauwe, H., Weber, A.P.M., 2013. Evolution of the biochemistry of the photorespiratory C2 cycle. *Plant Biol.* 15, 639–647. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00677.x>
- Hagemann, M., Kern, R., Maurino, V.G., Hanson, D.T., Weber, A.P.M., Sage, R.F., Bauwe, H., n.d. Evolution of photorespiration from cyanobacteria to land plants, considering protein phylogenies and acquisition of carbon concentrating mechanisms 14.
- Hilgarth, R.S., Lanigan, T.M., 2020. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX* 7, 100759. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>
- Huang, L., Pyc, M., Alseekh, S., McCarty, D.R., de Crécy-Lagard, V., Gregory, J.F., III, Henry, C.S., Fernie, A.R., Mullen, R.T., Hanson, A.D., 2018. A plastidial pantoate transporter with a potential role in pantothenate synthesis. *Biochem. J.* 475, 813–825. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170883>
- Hubé, F., Reverdiau, P., Iochmann, S., Gruel, Y., 2005. Improved PCR Method for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *Mol. Biotechnol.* 31, 081–084. <https://doi.org/10.1385/MB:31:1:081>
- Jackson, H.O., n.d. Biotechnological development of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana* 280.
- Joshi-Deo, J., Schmidt, M., Gruber, A., Weisheit, W., Mittag, M., Kroth, P.G., Buchel, C., 2010. Characterization of a trimeric light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* built of FcpA and FcpE proteins. *J. Exp. Bot.* 61, 3079–3087. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq136>
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H.-J., Rosenkranz, R., Stäbler, N., Schönfeld, B., Kreuzaler, F., Peterhänsel, C., 2007. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 25, 593–599. <https://doi.org/10.1038/nbt1299>
- Li, J., Weraduwa, S.M., Preiser, A.L., Tietz, S., Weise, S.E., Strand, D.D., Froehlich, J.E., Kramer, D.M., Hu, J., Sharkey, T.D., 2019. A Cytosolic Bypass and G6P Shunt in

- Plants Lacking Peroxisomal Hydroxypyruvate Reductase. *Plant Physiol.* 180, 783–792. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00256>
- Li, Y.-T., Liu, M.-J., Li, Y., Liu, P., Zhao, S.-J., Gao, H.-Y., Zhang, Z.-S., 2020. Photoprotection by mitochondrial alternative pathway is enhanced at heat but disabled at chilling. *Plant J.* 104, 403–415. <https://doi.org/10.1111/tpj.14931>
- Liu, H., Blankenship, R.E., 2019. On the interface of light-harvesting antenna complexes and reaction centers in oxygenic photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1860, 148079. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148079>
- Morgese, M.G., Mhillaj, E., Francavilla, M., Bove, M., Morgano, L., Tucci, P., Trabace, L., Schiavone, S., 2016. Chlorella sorokiniana Extract Improves Short-Term Memory in Rats 17.
- Mutanda, T., Naidoo, D., Bwapwa, J.K., Anandraj, A., 2020. Biotechnological Applications of Microalgal Oleaginous Compounds: Current Trends on Microalgal Bioprocessing of Products. *Front. Energy Res.* 8, 598803. <https://doi.org/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. *Biotechnol. Biofuels* 12, 66. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1401-3>
- Nelson, M.D., Fitch, D.H.A., 2012. Overlap Extension PCR: An Efficient Method for Transgene Construction, in: Orgogozo, V., Rockman, M.V. (Eds.), *Molecular Methods for Evolutionary Genetics, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 459–470. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_27
- of the United Nations, F. and A.O., 2013. *The State of the World’s Land and Water Resources for Food and Agriculture*, 0 ed. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203142837>
- Ort, D.R., Zhu, (朱新广), X., Melis, A., 2011. Optimizing Antenna Size to Maximize Photosynthetic Efficiency[W]. *Plant Physiol.* 155, 79–85. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165886>
- Perin, G., Morosinotto, T., 2019. Potential of Microalgae Biomass for the Sustainable Production of Bio-commodities, in: Cánovas, F.M., Lüttge, U., Leuschner, C., Risueño, M.-C. (Eds.), *Progress in Botany Vol. 81, Progress in Botany*. Springer International Publishing, Cham, pp. 243–276. https://doi.org/10.1007/124_2019_30
- Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection [WWW Document], n.d. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0712>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3185–3190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215142110>
- PII: S1360-1385(01)01898-2 | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document], n.d. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01898-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01898-2)
- Poore, J., Nemecek, T., 2018. Reducing food’s environmental impacts through producers and consumers. *Science* 360, 987–992. <https://doi.org/10.1126/science.aag0216>
- Price, G.D., Pengelly, J.J.L., Forster, B., Du, J., Whitney, S.M., von Caemmerer, S., Badger, M.R., Howitt, S.M., Evans, J.R., 2013. The cyanobacterial CCM as a source of genes for improving photosynthetic CO₂ fixation in crop species. *J. Exp. Bot.* 64, 753–768. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers257>

- Puccinelli, E., Sardenne, F., Pecquerie, L., Fawcett, S.E., Machu, E., Soudant, P., 2021. Omega-3 Pathways in Upwelling Systems: The Link to Nitrogen Supply. *Front. Mar. Sci.* 8.
- Ray, D., 2021. Lazard's Levelized Cost of Energy Analysis—Version 15.0 21.
- Raymond, J., Blankenship, R., 2008. The origin of the oxygen-evolving complex. *Coord. Chem. Rev.* 252, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.026>
- Renewable energy generation [WWW Document], n.d. . Our World Data. URL <https://ourworldindata.org/grapher/renewable-energy-gen> (accessed 7.28.22).
- Ritchie, H., Roser, M., Rosado, P., 2020. CO₂ and Greenhouse Gas Emissions. Our World Data.
- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C., Henriques, M.H.F., 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol. Eng.* 6.
- Schada von Borzyskowski, L., Severi, F., Krüger, K., Hermann, L., Gilardet, A., Sippel, F., Pommerenke, B., Claus, P., Cortina, N.S., Glatte, T., Zauner, S., Zarzycki, J., Fuchs, B.M., Bremer, E., Maier, U.G., Amann, R.L., Erb, T.J., 2019. Marine Proteobacteria metabolize glycolate via the β -hydroxyaspartate cycle. *Nature* 575, 500–504. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1748-4>
- Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Burgener, S., Cortina, N.S., Erb, T.J., 2016. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science* 354, 900–904. <https://doi.org/10.1126/science.aah5237>
- Shevchuk, N.A., 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* 32, 19e–119. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh014>
- 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. *Eukaryot. Cell* 12, 665–676. <https://doi.org/10.1128/EC.00363-12>
- Smider, B.A., Gil, J., Smider, V.V., 2019. A selectable system to evaluate synthetic gene optimization features. <https://doi.org/10.1101/825976>
- South, P.F., Walker, B.J., Cavanagh, A.P., Rolland, V., Badger, M., Ort, D.R., 2017. Bile Acid Sodium Symporter BASS6 Can Transport Glycolate and Is Involved in Photorespiratory Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 29, 808–823. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00775>
- Stephenson, P.G., Moore, C.M., Terry, M.J., Zubkov, M.V., Bibby, T.S., 2011. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. *Trends Biotechnol.* 29, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.005>
- Takahashi, S., Bauwe, H., Badger, M., 2007. Impairment of the Photorespiratory Pathway Accelerates Photoinhibition of Photosystem II by Suppression of Repair But Not Acceleration of Damage Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144, 487–494. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097253>
- The influence of cultivation period on growth and biodiesel properties of microalga *Nannochloropsis gaditana* 1049 | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document], n.d. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.106>
- Voet, D., Voet, J.G., 2010. Biochemistry. John Wiley & Sons.
- 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 Res.* 58, 102385. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102385>
- Wei, L., El Hajjaji, M., Shen, C., You, W., Lu, Y., Li, J., Jing, X., Hu, Q., Zhou, W., Poetsch, A., Xu, J., 2019. Transcriptomic and proteomic responses to very low CO₂ suggest multiple carbon concentrating mechanisms in *Nannochloropsis*

- oceanica. *Biotechnol. Biofuels* 12, 168. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1506-8>
- Wilson, R.H., Whitney, S.M., 2017. Improving CO₂ Fixation by Enhancing Rubisco Performance, in: Alcalde, M. (Ed.), *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*. Springer International Publishing, Cham, pp. 101–126. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1_4
- World Population Prospects - Population Division - United Nations [WWW Document], n.d. URL <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/900> (accessed 8.1.22).
- Zaidi, S.S.-A., Mahfouz, M.M., Mansoor, S., 2017. CRISPR-Cpf1: A New Tool for Plant Genome Editing. *Trends Plant Sci.* 22, 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, 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>