



Adaptative Laboratory Evolution Principles and Applications for Biotechnology

A cura di

Alessandro Giordano
Edoardo Rocchi
Fabio D'Onofrio

EVOLUZIONE ADATTATIVA IN LABORATORIO (ALE)

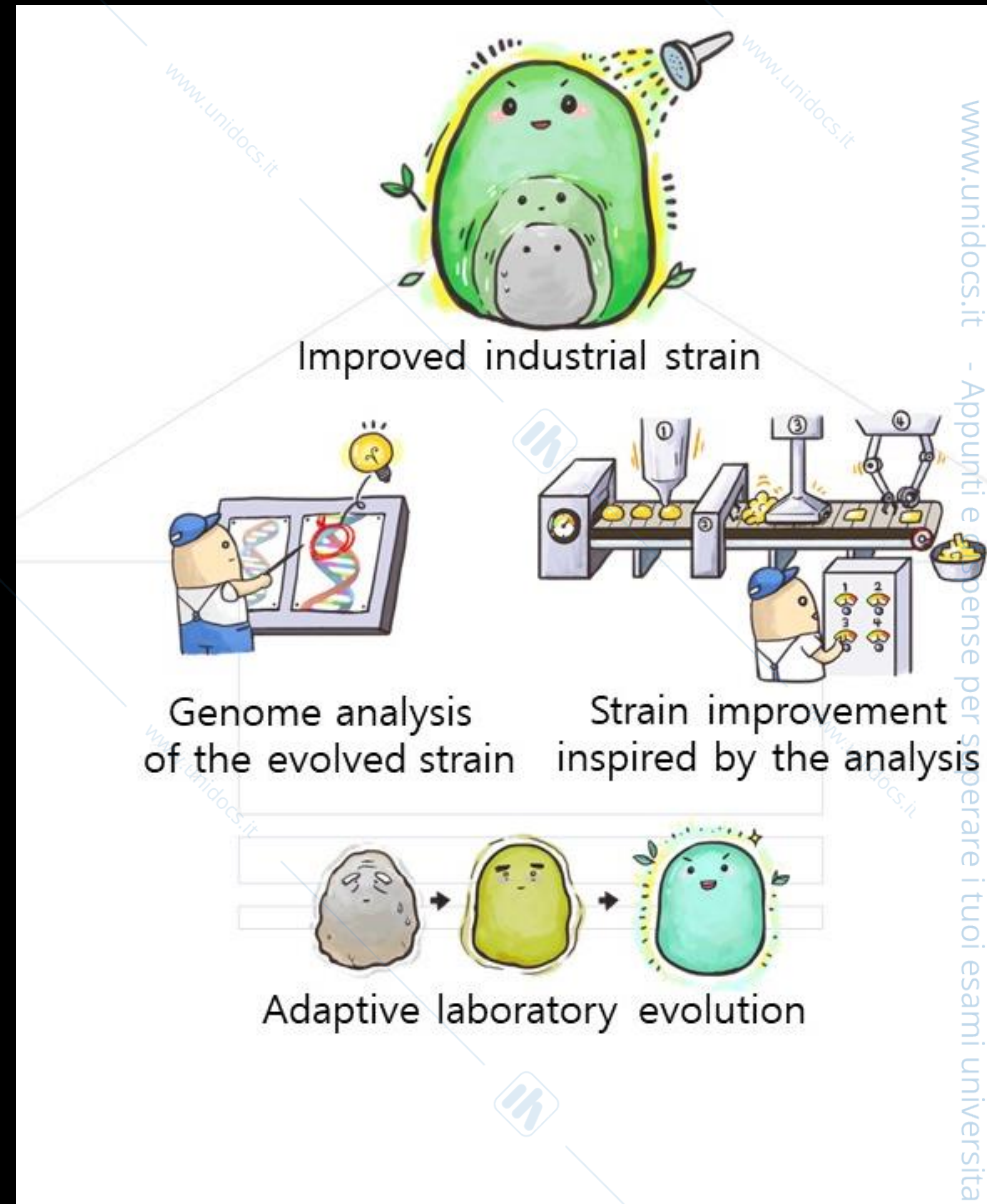
L'evoluzione adattativa in laboratorio è un approccio scientifico utilizzato per analizzare i fenomeni evolutivi all'interno di un ambiente di laboratorio.

Il primo approccio di evoluzione adattativa fu effettuato dallo scienziato William Dallinger che, tra il 1880 e il 1886, incubò alcuni microrganismi, che di norma crescevano ad una temperatura media di 18°C, ad alte temperature (70 °C circa).



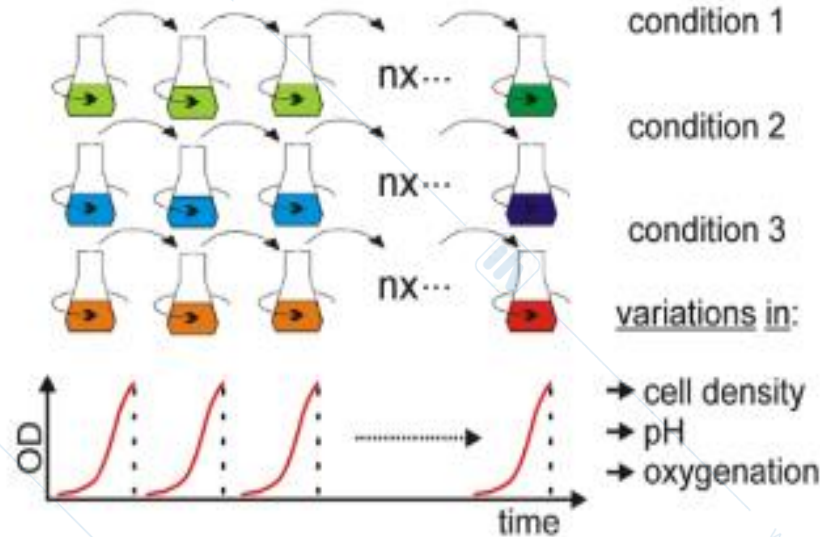
Basi dell'evoluzione adattativa in laboratorio

Durante un processo di questo tipo, il microrganismo è coltivato in condizioni definite e in un determinato periodo di tempo, permettendo di associare chiaramente un cambiamento fenotipico ad una specifica condizione ambientale.

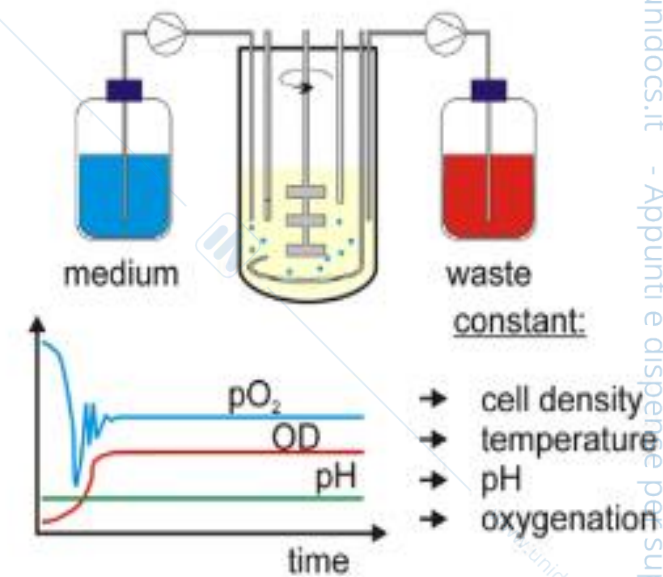


METODI DI SELEZIONE

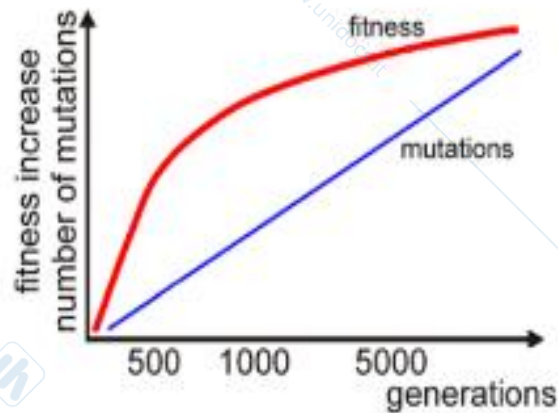
a serial dilution



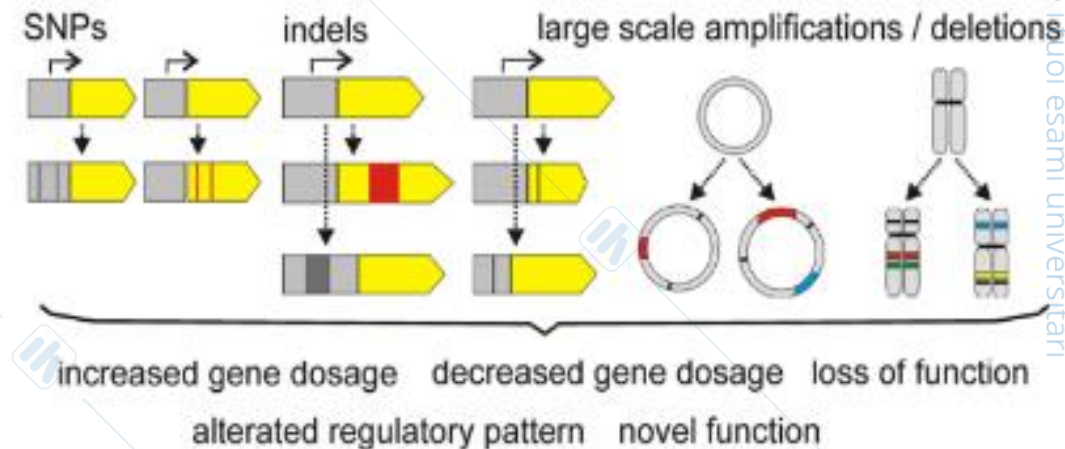
b chemostat



c fitness increase



d types of mutations



BATCH VS CONTINUO

PRO

- ECONOMICO
- MIGLIOR GESTIONE DELLE COLTURE IN PARALLELO

PRO

- CRESCITA E DENSITÀ DI POPOLAZIONE COSTANTI
- CONDIZIONI AMBIENTALI CONTROLLABILI
- PRESENZA DI UN SISTEMA DI ALIMENTAZIONE

CONTRO

- DENSITÀ DI POPOLAZIONE VARIABILE
- VELOCITÀ DI CRESCITA INSTABILE
- CONDIZIONI AMBIENTALI POCO CONTROLLABILI
- NESSUN SISTEMA DI ALIMENTAZIONE

CONTRO

- COSTI MOLTO ELEVATI



FITNESS

- **BET-HEDGING (DIVERSIFICAZIONE DEL RISCHIO):** proprietà con cui gli organismi riescono ad abbassare il loro grado di fitness alle condizioni in cui vivono normalmente, al fine di incrementarlo in condizioni selettive
- **INTERFERENZA CLONALE:** la competizione che si genera tra due mutazioni benefiche all'interno di una popolazione a sessuata, la quale porta spesso alla prevalenza di una di esse e la scomparsa delle altre
- **GENETIC HITCHHIKING:** è un processo in cui un allele neutrale o deleterio aumenta la sua frequenza nel pool genico non perché favorito dalla selezione naturale, ma perché in associazione genetica con un altro allele sottoposto a selezione naturale

A microscopic image showing a diverse population of bacteria. The bacteria are stained in various colors, including blue, purple, red, and orange. Some are rod-shaped, while others are spherical or more irregular in shape. The background is dark, making the colored cells stand out.

Studi dimostrano come ci vogliono in media dalle 100 alle 500 divisioni cellulari prima di ottenere un incremento della fitness del 50%, ma:

- **il massimo incremento di fitness ottenibile può variare nel tempo/numero di divisioni in base alla pressione selettiva applicata (come ad esempio l'adattamento al pH dell'ambiente di coltura, ambito nel quale i microrganismi presentano un basso potenziale adattativo per quanto riguarda la fitness)**
- **l'incremento di fitness (inteso come funzione legata al numero di mutazioni) non è lineare e tende a rallentare durante il corso dell'esperimento (circa 500 divisioni)**
- **è difficile mantenere un rapporto costi/benefici accettabile (legato al tempo necessario alla selezione del ceppo e agli obiettivi di fitness ricercati)**

MUTAZIONI E ROBUSTEZZA

Nonostante l'alto tasso di riparazione degli errori delle cellule microbiche (un errore ogni 10 miliardi di coppie di basi duplicate), la vastità della popolazione microbica consente la formazione di mutazioni

| MUTAZIONE | INCIDENZA PERCENTUALE |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Polimorfismi a singolo nucleotide | 61% |
| Delezioni | 29% |
| Inserzioni | 7% |
| Elementi trasponibili | 3% |

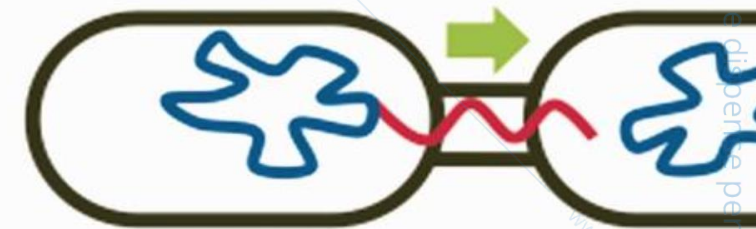
TOOLBOX MODEL

Questo modello afferma che la diffusione delle mutazioni all'interno delle popolazioni procariotiche avviene attraverso il trasferimento genico orizzontale (trasformazione, trasduzione o coniugazione) e che esse vengono rapidamente acquisite o perse in base alla disponibilità di nutrienti.

Transformation



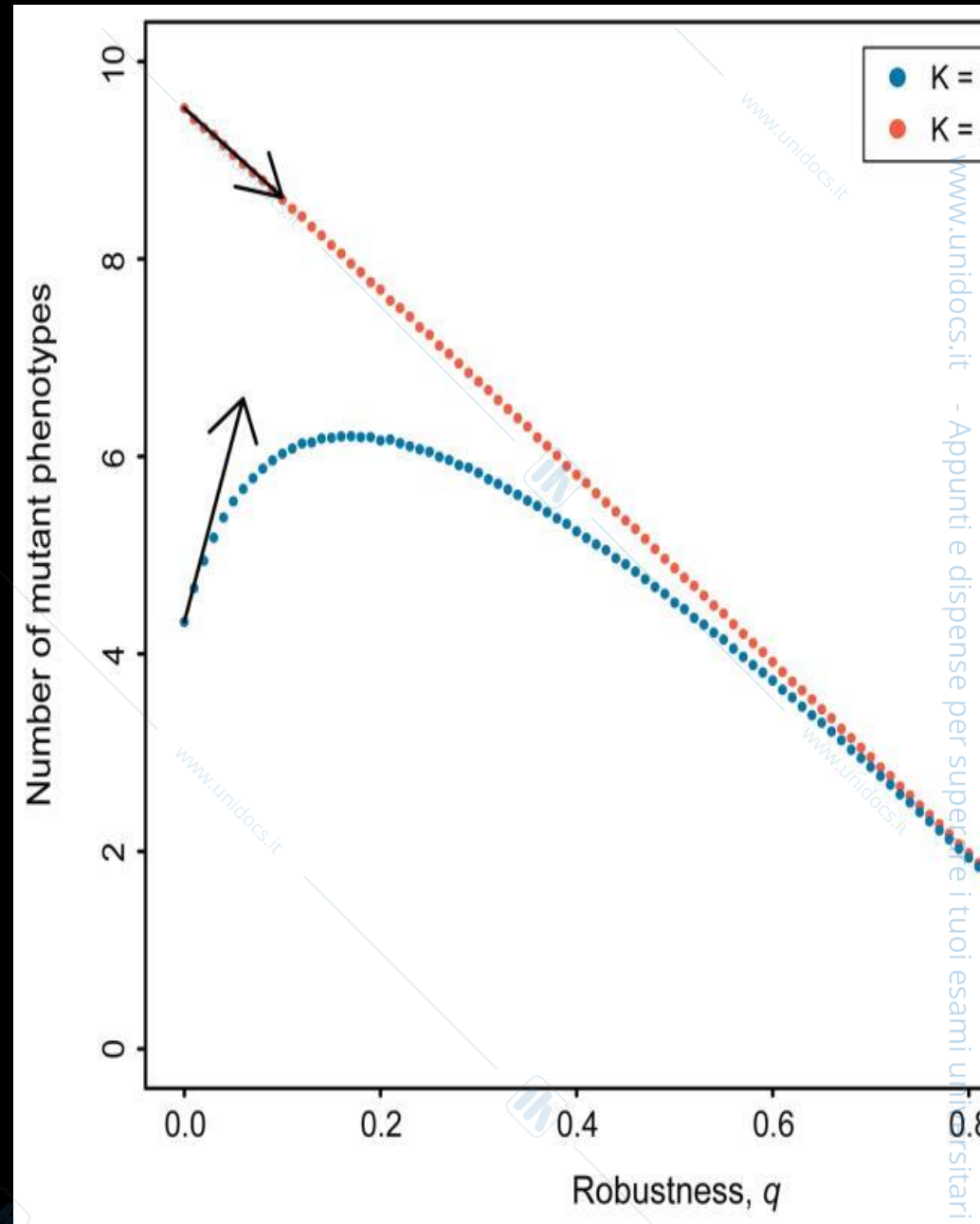
Conjugation



Transduction

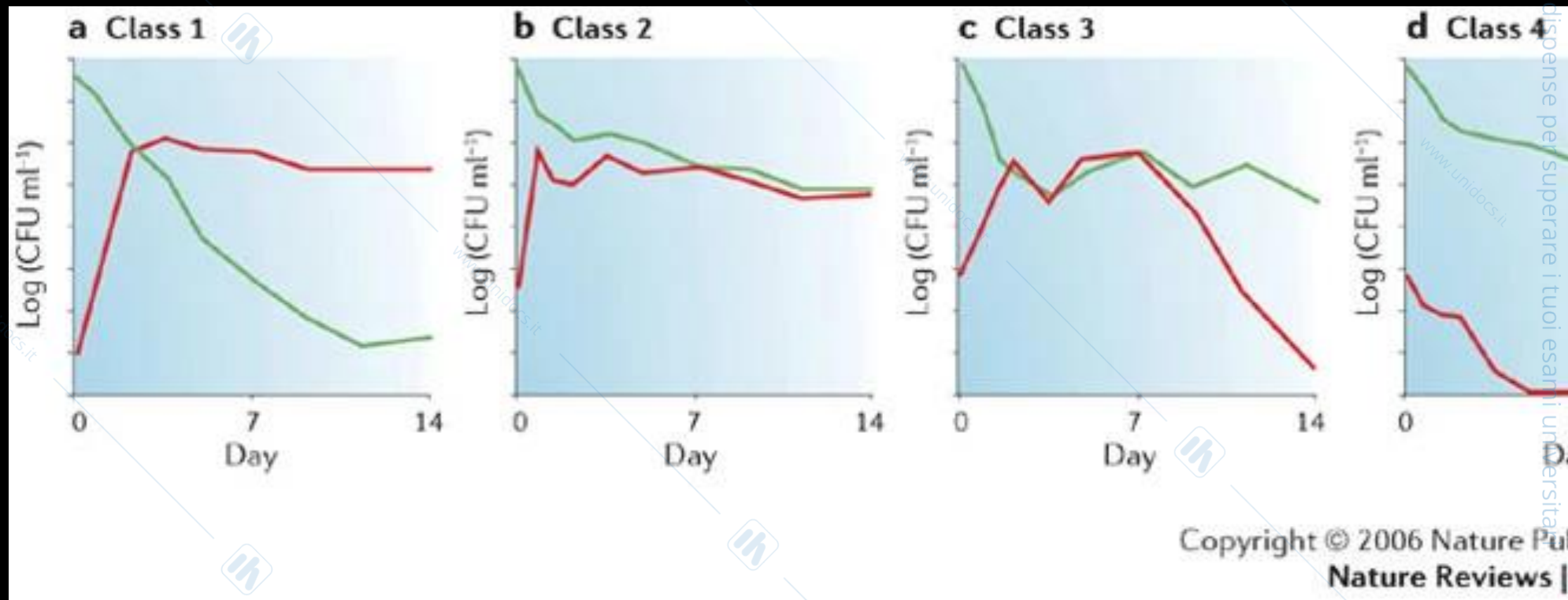


La robustezza mutazionale è un parametro che misura il grado di insensibilità di un organismo, o di una sua caratteristica fenotipica, alle variazioni intrinseche (mutazioni) ed estrinseche (cambiamenti dell'ambiente). Nonostante sembri controintuitivo, è stato dimostrato che il grado di robustezza può avere un effetto positivo sull'evoluzione dei microrganismi



FATTORE GASP

Un altro fattore che influenza l'evoluzione dei microrganismi è la crescita prolungata in fase stazionaria. Cellule microbiche cresciute in questa condizione hanno presentato un tasso di dinamicità genetica molto elevata, consentendo loro di avere un grado di fitness migliore rispetto ad altre cellule microbiche coltivate in competizione.



Pressione selettiva nei processi

Per sopravvivere, in natura come durante i processi biotecnologici, i microrganismi devono affrontare condizioni ambientali mutevoli:

- temperatura
- pH
- ossigenazione
- pressione atmosferica o idrostatica
- disponibilità di acqua e nutrienti

In natura, le cellule microbiche hanno sviluppato meccanismi per far fronte a condizioni di stress così da mantenere l'omeostasi cellulare.

Nei processi industriali, però, queste potrebbero essere sottoposte a condizioni non naturali che possono comportare prestazioni del processo scarse e poco competitive.

Le tipologie di stress a cui può essere sottoposto un microrganismo, in come in laboratorio, sono raggruppabili in due categorie:

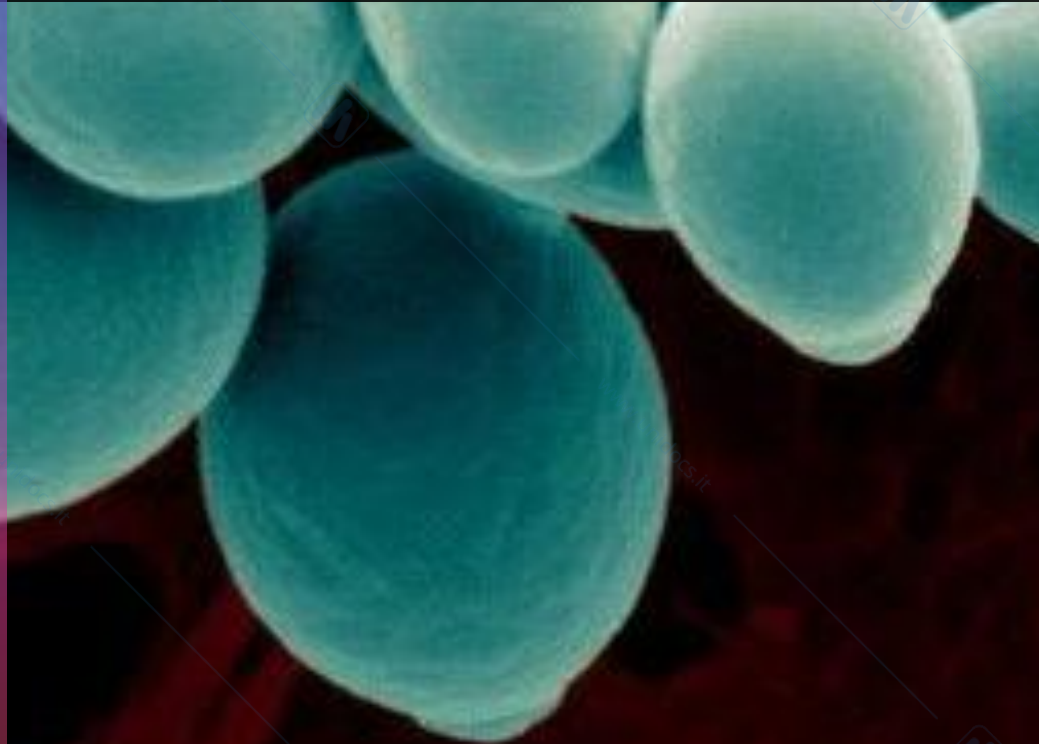
- Stress dovuto alla disponibilità di nutrienti
- Stress ambientale

Molti studi **ALE** hanno analizzato l'impatto e l'adattamento molecolare v entrambi i tipi di stress portando a importanti risultati e fornendo possibili applicazioni nella microbiologia industriale per le cellule così evolute.

I principali studi sono stati effettuati sugli organismi modello *Saccharom cerevisiae* e *Escherichia coli*. I risultati sono qui riportati, organizzati in t secondo la tipologia di stress e l'organismo su cui è stata applicata.

ALE in organismi modello

- Pressione selettiva da stress nutrizionale
- Pressione selettiva da stress ambientale



Saccharomyces cerevisiae



Pressione selettiva da stress nutrizionale

L'assenza o la presenza di determinati tipi di nutrienti nel substrato di crescita genera pressione selettiva che gli studi ALE utilizzano per guidare l'evoluzione delle popolazioni microbiche.

Nei processi industriali spesso vengono utilizzati terreni particolari per abbattere i costi e migliorare la produzione, il loro utilizzo efficiente sarà fondamentale per trarre il massimo dalle produzioni.

Stress da nutrienti in *E. coli*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|-----------------------------------|---|---|
| <i>E. coli</i> REL 606 | Batch. Crescita su glucosio. 12 colture replicate. | Dimensioni cellulari più grandi e densità cellulare finale inferiore; cambiamento dei profili di espressione genica. Il WGS delle popolazioni parallele ha rivelato che la maggior parte delle culture ha acquisito mutazioni nel regolatore della trascrizione <i>nadR</i> , nella piruvato chinasi <i>pykF</i> , nell'operone <i>rbs</i> , nel regolatore della trascrizione <i>malT</i> e nel regolatore stringente della risposta <i>spoT</i> . Inoltre, i cambiamenti nella topologia del DNA hanno contribuito a cambiamenti trascrizionali globali mediante la superelicità alterata del DNA, mediata da mutazioni trovate in geni come <i>fis</i> , <i>topAB</i> , <i>gyrAB</i> e <i>dusB</i> . |
| <i>E. coli</i> | Chemostato aerobico con limitazione del glucosio. Colture parallele | Le mutazioni nella glicoporina LamB e nel regolatore MalT sono state identificate come la causa dell'adattamento a lungo termine. Inoltre, all'interno di una singola coltura chemostatica, gli autori hanno osservato molteplici mutazioni MalT coesistenti stabilmente |
| <i>E. coli</i> MG1655Δ <i>pgi</i> | Ceppo carente di fosfoglucoisomerasi (<i>pgi</i>) in glucosio | I tassi di crescita e i tassi di assorbimento del glucosio aumentati fino a 3,6 e fino a 2,6 volte. Frequenti mutazioni puntiformi in <i>rpoS</i> , <i>udhA</i> , <i>pntAB</i> e una delezione profagica. Mutazioni non osservate nel ceppo selvatico adattato al glucosio; altre mutazioni regolatorie (incluso <i>rpoABC</i>) si sono verificate in entrambi i contesti. |
| <i>E. coli</i> MG1655 | Colture chemostatiche per selezionare una migliore crescita su glicerolo. | La resa della biomassa è aumentata fino al 40%, il traboccamento di acetato è stato ridotto. Mentre il tasso metabolico è aumentato e le cellule evolute hanno mostrato una ridotta o totale perdita di motilità. |

Stress da nutrienti in *E. coli*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|----------------------|---|--|
| <i>E.coli</i> MG1655 | M9 Terreno minimo, lattosio (strettamente regolato) | E' stato dimostrato che i livelli di espressione di <i>lacZ</i> erano ottimizzati dal punto di vista evolutivo in base alla concentrazione di lattosio nell'ambiente, al fine di bilanciare il costo dell'espressione di <i>lacZ</i> e l'aumento della fitness. |
| <i>E.coli</i> B | LB xilosio, produzione di lattato | Mediante trasferimenti seriali gli autori sono stati in grado di migliorare la crescita anaerobica sullo xilosio, sebbene la base genetica rimanga ancora da determinare. |
| <i>E.coli</i> MG1655 | M9 terreno minimo, L-lattato | La crescita su altre fonti di carbonio come il lattato porta anche a fenotipi alterati, come una diminuzione del traboccamento di acetato per regolare il metabolismo energetico cellulare. |
| <i>E.coli</i> | Terreno minimo chemostato limitazione dei fosfati | Gli esperimenti di limitazione del fosfato hanno prodotto una divergenza genotipica e fenotipica di attraverso mutazioni in <i>rpoS</i> , <i>spoT</i> e <i>hfq</i> , che hanno portato alla deregolazione dei geni <i>pho</i> e all'aumento del trasporto di fosfato |

Stress da nutrienti in *S. cerevisiae*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|---|--|--|
| <i>S. cerevisiae</i> | Chemostato con glucosio limitato. | Aumento della resa della biomassa e diminuzione della capacità fermentativa. Ridotta attività degli enzimi legati alla glicolisi ma anche cambiamenti correlati nei livelli di espressione di geni come <i>ENO1</i> , <i>ENO2</i> , <i>TDH1</i> e <i>PYK1</i> e una sottoregolazione della risposta allo stress (<i>MSN2/4</i>). È stata osservata anche una morfologia cellulare alterata, nonché una maggiore affinità verso il glucosio, sebbene non sia stato osservato alcun cambiamento nell'espressione dei principali trasportatori del glucosio a bassa affinità <i>HXT</i> . |
| <i>S. cerevisiae</i> , ingegnerizzato, <i>scfa</i> ⁺ , <i>Pyc</i> ⁻ | Batch e chemostato con limitazione di azoto, glucosio anaerobico. | Mutazione puntiforme nel gene ricombinante <i>sfcA</i> , che ha spostato la preferenza del cofattore da NADH a NADPH. |
| <i>S. cerevisiae</i> CEN. PK Δ <i>PDC1, 5, 6</i> | Chemostato, fiasche agitate, terreno sintetico, indipendenza da C2 | Attività carente della piruvato decarbossilasi per un'elevata tolleranza al glucosio. Successivamente, si è scoperto che questo fenotipo tollerante era dovuto a una delezione in-frame nel regolatore del glucosio <i>MTH1</i> , che portava a un'alterata stabilità della proteina codificata. |
| <i>S. cerevisiae</i> | Aumento della fermentazione dello xilosio | Tassi di crescita e rese di etanolo più elevate. In questo caso, i processi metabolici del trealosio e del glicogeno erano significativamente sottoregolati, la segnalazione dei nutrienti e dello stress era influenzata dalla sottoregolazione di <i>YAK1</i> e accompagnata anche dalla sottoregolazione di <i>CWP1</i> e di conseguenza da importanti cambiamenti della parete cellulare. |

Stress da nutrienti in *S. cerevisiae*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|---|---|---|
| <i>S. cerevisiae</i> CEN-PK | Terreno minimo per galattosio | Aumento del 24% di μ_{max} . Tassi di assorbimento del galattosio e produzione di etanolo aumentati. Sovraregolazione del metabolismo del trealosio e del glicogeno, mentre non sono state identificate mutazioni nei geni correlati al galattosio o ai carboidrati di stoccaggio. Identificate mutazioni nella segnalazione RAS/PKA come fonte di aumento della fitness nel mezzo di galattosio. |
| <i>S. cerevisiae</i> TMB3061 | Chemostato terreno sintetico, crescita su xilosio e arabinosio | Aumento del numero di copie dei geni eterologhi del metabolismo dei pentosi può emergere durante l'ingegneria evolutiva e contribuire ad una maggiore crescita in condizioni anaerobiche. |
| <i>S. cerevisiae</i> ingegnerizzato | Colture batch e chemostatiche, utilizzo dello xilosio e produzione di etanolo | Gli autori non hanno identificato cambiamenti di espressione nei geni <i>HXT</i> , sebbene altri studi sul miglioramento dell'utilizzo dello xilosio e dell'arabinosio abbiano indicato che i geni <i>HXT</i> potrebbero anche essere coinvolti nell'aumento dei tassi di assorbimento dello xilosio. Inoltre, esperimenti sull'utilizzo del pentoso hanno evidenziato che un aumento del numero di copie dei geni eterologhi nel <i>S. cerevisiae</i> ricombinante può emergere durante l'ingegneria evolutiva e contribuire ad una maggiore crescita in condizioni anaerobiche. |
| <i>S. cerevisiae</i> DBY11331 | Chemostato limitato ai solfati | Infine, un altro esempio di selezione dello stress nutrizionale in <i>S. cerevisiae</i> ha dimostrato che la limitazione del solfato ha portato a mutazioni che influenzano la segnalazione TOR tramite una mutazione <i>RRN3</i> e un'amplificazione genomica del trasportatore del solfato ad alta affinità <i>SUL1</i> . |

Pressione selettiva da stress ambientale

L'ALE utilizza gli stress ambientali per selezionare mutazioni che rendano l'organismo capace di resistere a quella determinata pressione selettiva e ottenere ceppi industriali con le caratteristiche fenotipiche desiderate.

Le caratteristiche desiderate potrebbero essere la resistenza alla presenza di determinate molecole o composti (alcoli, estratti lignocellulosici, ioni metallici etc.), a fluttuazioni di temperatura e variazioni di pH e pressione osmotica.

Stress ambientale in *E.coli*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|------------------------------------|---|--|
| <i>E.coli</i> | Alta temperatura (41,5°C) | I geni inducibili dal calore, inclusi <i>hsIT</i> , <i>fkpA</i> e <i>gapA</i> , hanno mostrato cambiamenti di espressione adattativa durante l'esposizione prolungata all'aumento della temperatura. Mutazioni in <i>acrAB</i> e <i>marC</i> . |
| <i>E.coli</i> | LB stress termico medio 48,5°C | L'adattamento alle temperature estreme si basa sull'espressione costitutiva di <i>GroEL/ES</i> in <i>E. coli</i> . Mutazioni in <i>acrAB</i> e <i>marC</i> . |
| <i>E.coli</i> MG1655 | LB stress a media temperatura (fino a 48°C) | Mutazioni in <i>glpF</i> e <i>fabA</i> per un aumento della saturazione degli acidi grassi di membrana e per un aumento della termotolleranza. Presenza di mutazioni correlate all'enterobactina. Inoltre, una maggiore resistenza allo stress ossidativo in <i>E. coli</i> può essere collegata a mutazioni nel sistema riducente <i>soxR</i> e a livelli aumentati di catalasi/perossidasi cellulare (<i>katG</i>). Mutazioni in <i>acrAB</i> e <i>marC</i> ; mutazioni del metabolismo del carbonio e dell'azoto tramite <i>gatY</i> e <i>tnaA</i> , alla sintesi di enterobactina. |
| <i>E.coli</i> Δ <i>rpoS</i> | Stress osmotico | L'aumento della crescita durante lo stress osmotico è stato collegato a mutazioni che hanno portato ad una maggiore espressione dei geni della biosintesi dell'enterobactina (<i>fepA</i> ed <i>entD</i> tra gli altri). Inoltre, è noto che <i>rpoS</i> svolge un ruolo cruciale per la sopravvivenza in condizioni osmotiche elevate. È stato dimostrato che un <i>E. coli</i> con una delezione di <i>rpoS</i> può ancora sviluppare una maggiore tolleranza al sale durante l'evoluzione di laboratorio disaccoppiando l'espressione dipendente da <i>rpoS</i> dell'operone <i>otsBA</i> , che è importante per la sintesi del trealosio. |

Stress ambientale in *E.coli*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|----------------------|---|---|
| <i>E.coli</i> MG1655 | Terreno ricco, 7 % (v/v) etanolo | I cambiamenti adattativi verso la tolleranza all'etanolo sono stati collegati alla sovraregolazione di <i>oxyR</i> e <i>nrdR</i> , indicando importanti cambiamenti nel sistema respiratorio cellulare ma anche cambiamenti nel metabolismo degli amminoacidi. Inoltre, sono stati osservati anche cambiamenti nei processi biosintetici dell'enterobactina (geni <i>ent</i>). L'aumento della tolleranza all'etanolo in <i>E. coli</i> può anche essere mediato da un aumento del catabolismo dell'etanolo attraverso il ciclo TCA. |
| <i>E.Coli</i> | LB medio 4-8 g/L isobutanolo | Mutazioni in <i>acrAB</i> e <i>marC</i> ; ulteriori cambiamenti sono stati collegati al metabolismo del carbonio e dell'azoto tramite <i>gatY</i> e <i>tnaA</i> e alla sintesi di enterobactina. |
| <i>E.coli</i> EcNR1 | M9 terreno minimo, 0,75%(v/v) isobutanolo | Mutazioni in <i>acrAB</i> e <i>marC</i> ; ulteriori cambiamenti sono stati collegati al metabolismo del carbonio e dell'azoto tramite <i>gatY</i> e <i>tnaA</i> all'attività attenuata di <i>rpoS</i> tramite mutazioni <i>hfq</i> . Alto grado di epistasi. |

Stress ambientali in *S.cerevisiae*

| Specie/ceppo | Condizioni di evoluzione/selezione | Caratteristiche dei ceppi evoluti |
|--------------------------------------|--|--|
| <i>S.cerevisiae</i> BY4741 | Mezzo di galattosio YP NaCl 0,5 M; Chemostato con glucosio limitato. | L'adattamento alla tolleranza al sale ha portato ad un aumento delle dimensioni delle cellule e a un aumento della ploidia. Inoltre, sono stati osservati cambiamenti nell'espressione genica in <i>CTT1</i> e <i>MSN4</i> , nonché un SNP ad alta frequenza nel regolatore trascrizionale <i>MOT2</i> . |
| <i>S.cerevisiae</i> W303 | Mezzo YP, 6 – 8 % di etanolo | L'aumento della tolleranza all'etanolo è stato mediato da mutazioni nel regolatore traslazionale <i>SSD1</i> e <i>UTH1</i> , una proteina dalla funzione sconosciuta e ha indicato che la stabilità della parete cellulare è un fattore importante nella tolleranza all'etanolo di <i>S.cerevisiae</i> . |
| <i>S.cerevisiae</i> BLT | YP medio, 0-2,5% g/L CuSO ₄ | L'aumento della tolleranza al rame è mediato da un'amplificazione genomica di <i>CUP1</i> , dalla diminuzione dei livelli basali dei trasportatori del rame <i>CTR2</i> e <i>CCC2</i> e dalla diminuzione dell'attività degli enzimi antiossidanti. |
| <i>S. cerevisiae</i> | Tolleranza al VERT, YNB, idrolizzato lignocellulosico | La maggiore tolleranza verso idrolizzati lignocellulosici come acido acetico e furfurale è stata correlata con i cambiamenti adattativi della risposta allo stress ossidativo. |

Microrganismi e SPANC

I microrganismi hanno la capacità innata di bilanciare la propria sopravvivenza e le competenze nutrizionali (SPANC da Self Preservation And Nutritional Competence).

Questo avviene attraverso quelli che vengono chiamati compromessi evolutivi (**evolutionary trade-off**). Infatti l'aumento di fitness per alcune caratteristiche potrebbe portare a un decremento in altre caratteristiche. Studi evolutivisti hanno evidenziato che questo avviene attraverso cambiamenti trascrizionali che riescono a trasformare processi costosi in gratuiti e viceversa.

Allo stesso modo la comparsa di nuove specializzazioni può portare all'ottenimento di vantaggi incrociati (**cross-protection**), cosicché, in lievito, l'ottenimento della resistenza alle alte temperature ha portato a maggiore resistenza verso lo stress ossidativo.

Lo studio di questi meccanismi può portare a maggiore comprensione dei fenomeni di interazione interni alle cellule.

Compromessi evolutivi

Popolazioni di *E.coli*, coltivate in batch esclusivamente su glucosio per un periodo, hanno mostrato rapida perdita delle funzioni metaboliche non utili come la capacità di sfruttare **D-ribosio** e **L-glutamina**. Altre popolazioni che avevano ottenuto aumentata resistenza all'etanolo erano diventate più sensibili alle condizioni acide. Alcuni studi hanno evidenziato che la tolleranza all'n-butanolo è scarsamente compatibile con la resistenza allo stress ossidativo portando sensibilità a esano e cloramfenicolo. Altri, che la vitalità a basse concentrazioni di P_i è negativamente collegata alla resistenza a stress ossidativo e ad alte concentrazioni di NaCl.

Popolazioni di *S. cerevisiae* evolute in chemostati con limitazione del glucosio e dell'acetato mostravano diminuzioni di fitness in colture limitate dall'azoto. Analogamente, popolazioni evolute per efficiente utilizzo di galattosio hanno mostrato capacità di crescita ridotte su glucosio.

Vantaggi incrociati

In *E.coli* evoluto su glicerolo è stata riscontrata una maggiore capacità di sopravvivenza in terreni con limitazione generale di nutrienti e maggiore resistenza agli stress osmotici e al calore.

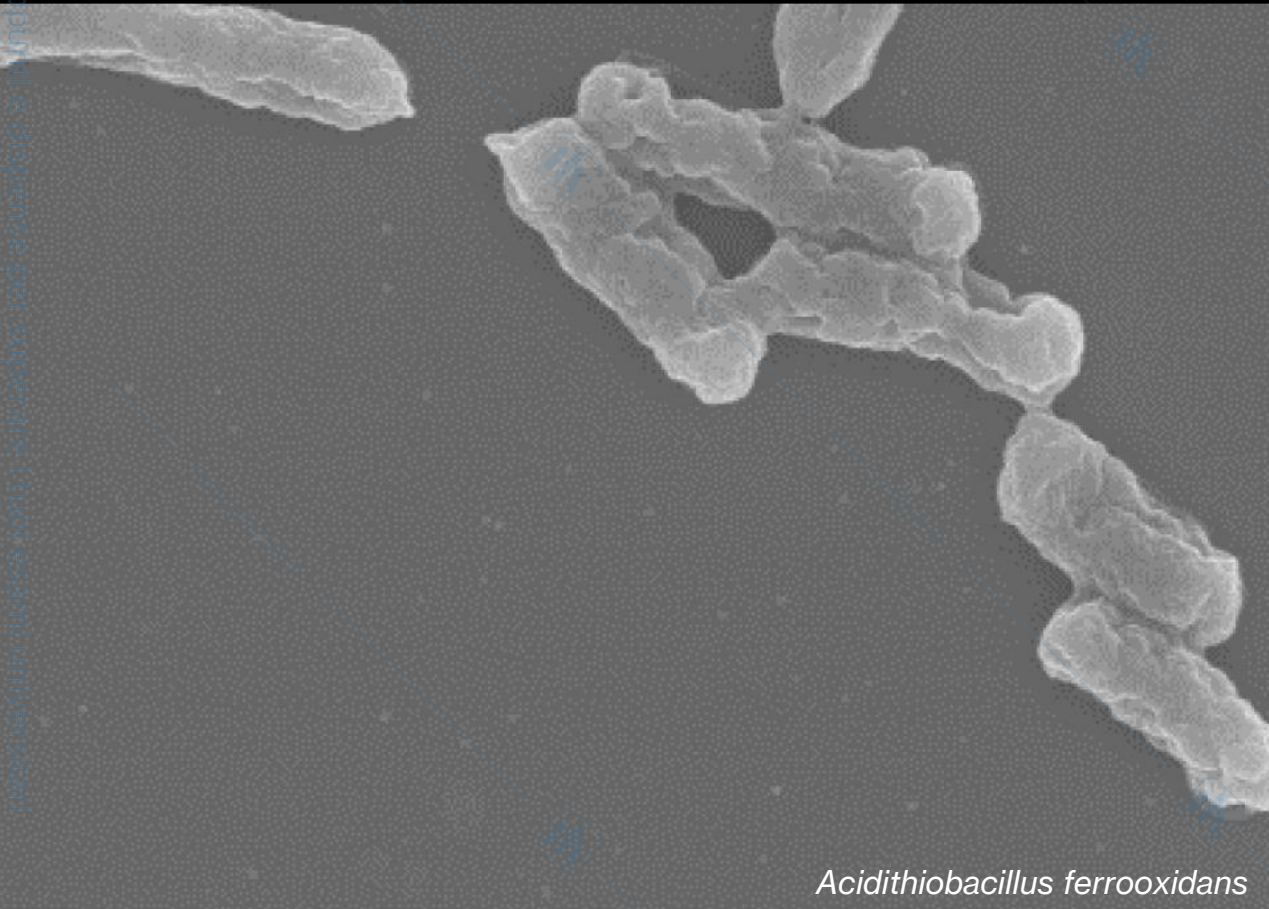
In *S.cerevisiae* la resistenza al cobalto ha aumentato anche la resistenza ad altri ioni metallici e il trattamento con cobalto pulsato ha aumentato la resistenza a stress termico e ossidativo.

La selezione in batch di *S.cerevisiae* tramite congelamento e scongelamento ha selezionato anche le resistenze allo stress termico, ossidativo e all'etanolo.

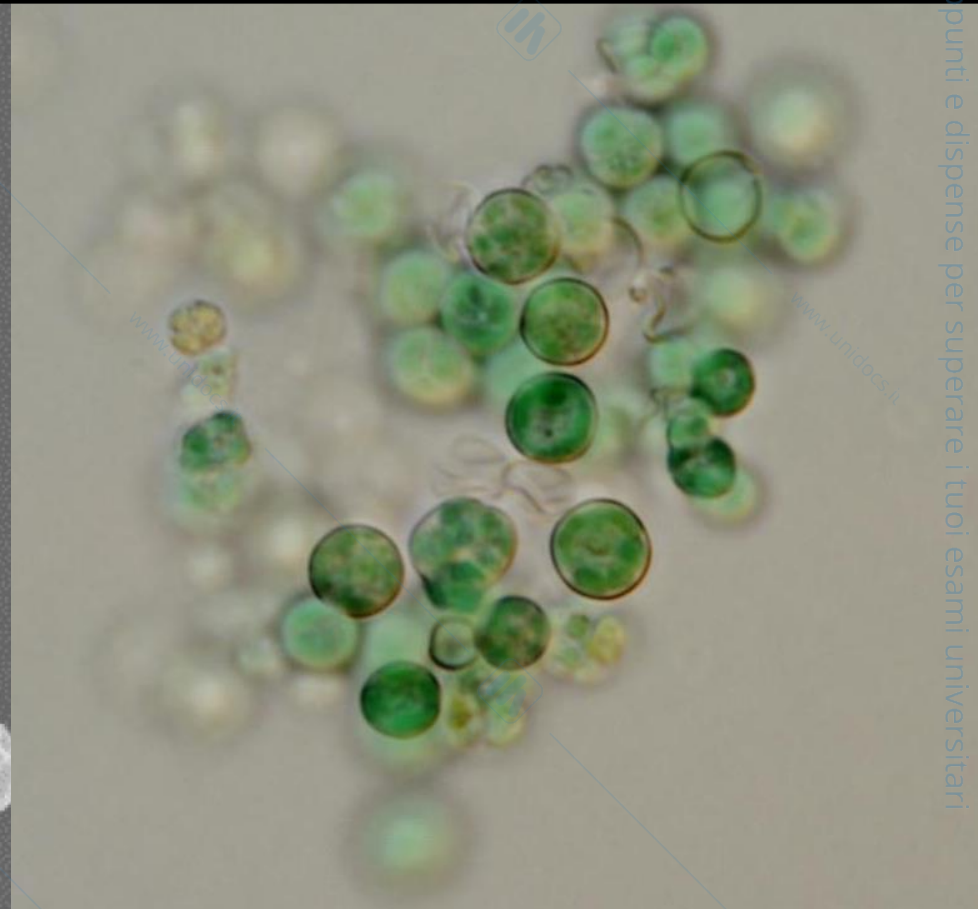
È interessante notare come sia possibile determinare la misura in cui si verificano i fenomeni evolutivi anche e soprattutto tramite le modalità di selezione e di applicazione delle pressioni selettive.

Ospiti non convenzionali

Implicazioni delle nicchie ecologiche e dell'architettura della struttura genetica



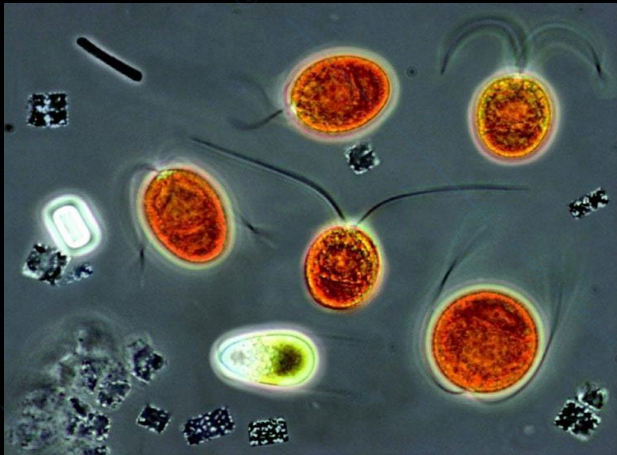
Acidithiobacillus ferrooxidans



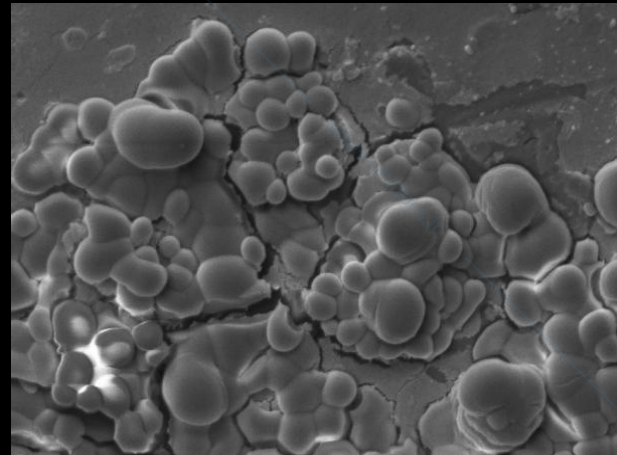
Ospiti non convenzionali

Gli organismi mesofili hanno delle limitazioni intrinseche per il loro utilizzo in specifiche applicazioni biotecnologiche.

In questi casi intervengono ospiti non convenzionali, come:



Halobacterium salinarum



Metallosphaera sedula



Thermus aqua

Ospiti non convenzionali



Di grande interesse nelle applicazioni industriali per le loro peculiari caratteristiche



Differenze specie specifiche di resistenza allo stress



Scarsa conoscenza della loro fisiologia, conseguenza di una scarsa ricerca di base



La limitata quantità di dati frena l'approccio ingegneristico

Ospiti non convenzionali

Sebbene le principali reti biologiche e pathways biosintetici siano molto conservati, sono numerose le differenze che intercedono tra organismi appartenenti a specie differenti.

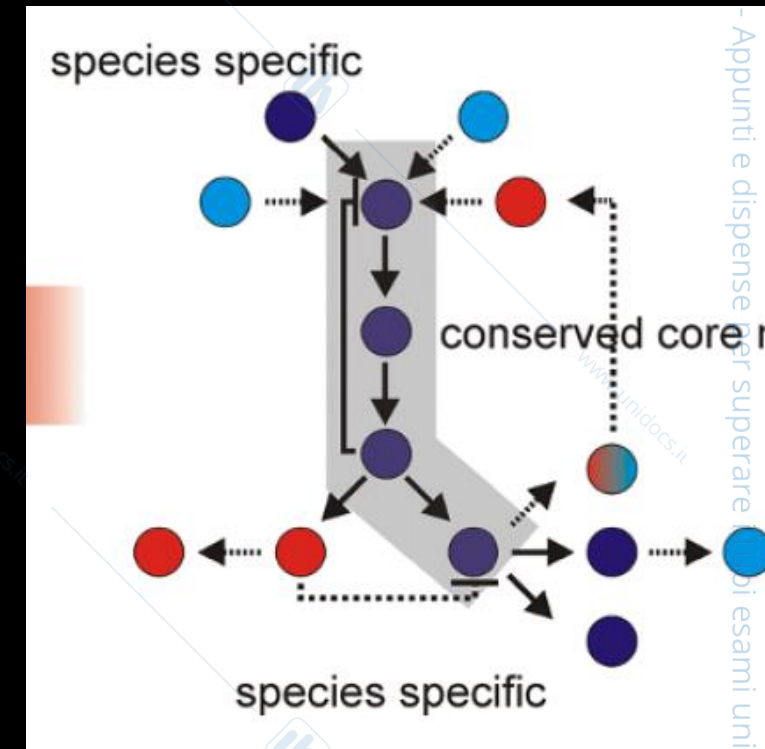
Queste danno vita a fenomeni come:



- Vantaggi incrociati

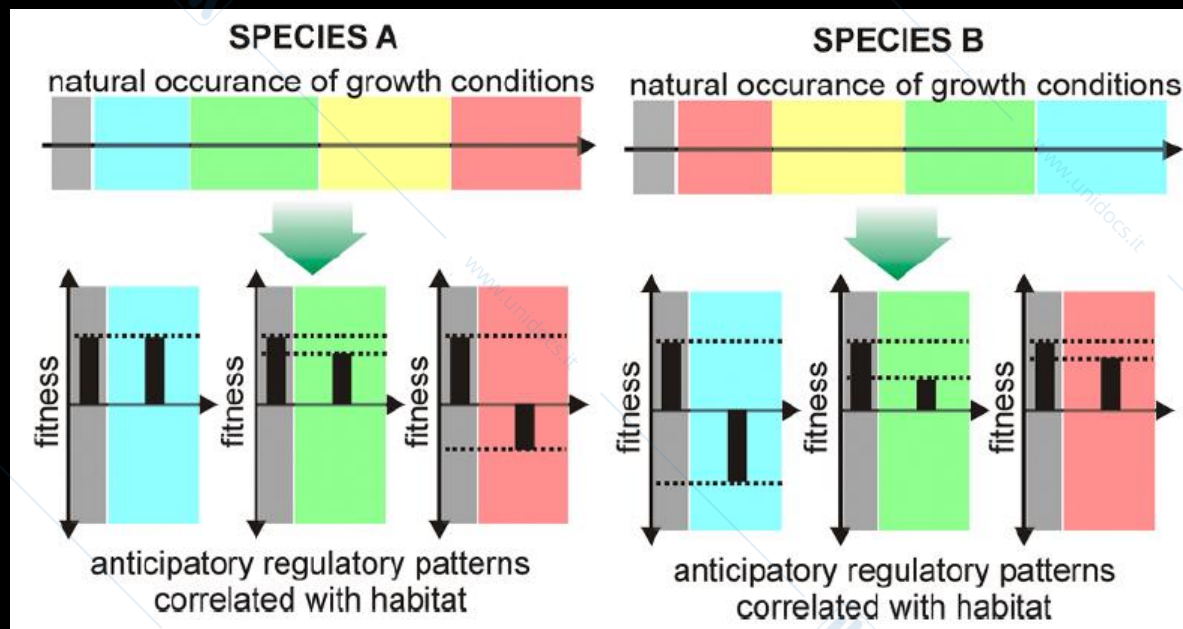


- Comportamenti anticipatori



Ospiti non convenzionali

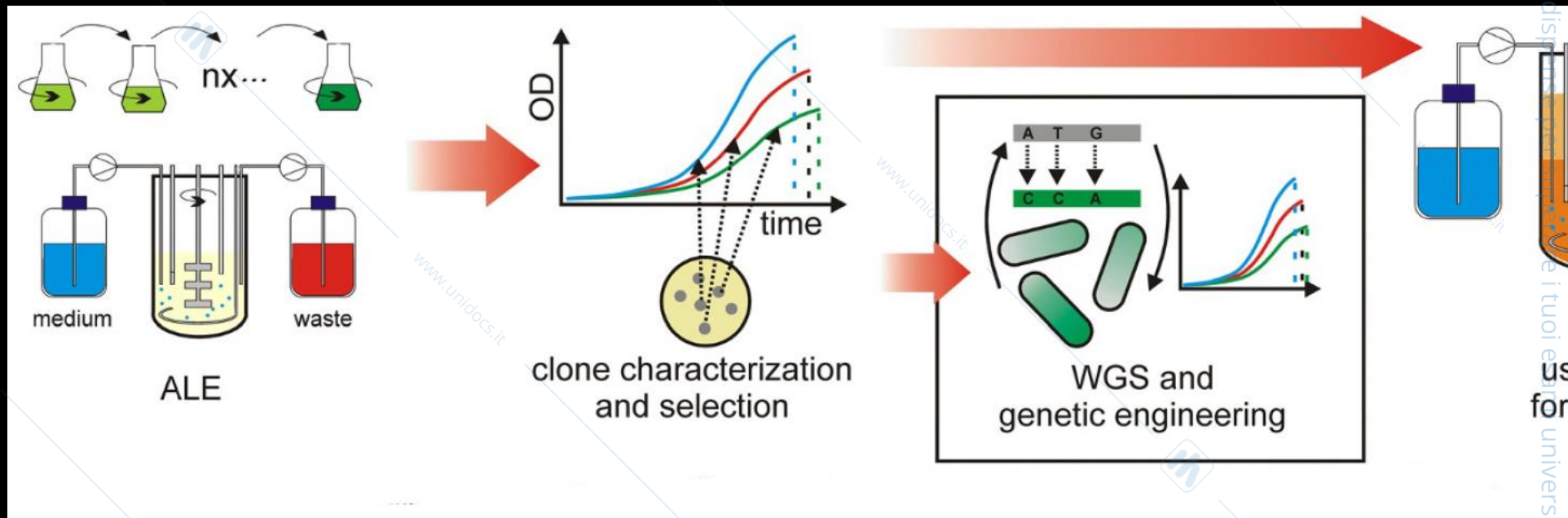
Il lavoro del biotecnologo è reso significativamente più difficile da ospiti differenzialmente evoluti, che sono pronti a mostrare diversi compromessi evolutivi durante le fasi di stress a cui sono sottoposti nell'ALE.



La fitness varia in funzione degli stress ambientali a cui sono sottoposti gli organismi e in virtù di comportamenti anticipatori messi in atto

Direzioni future

Strain ottenuti con ALE possono essere direttamente usati per processi biotecnologici?



Direzioni future

Strain ottenuti con ALE possono essere direttamente usati per processi biotecnologici?

Esistono alcuni inconvenienti:



- Il genotipo sconosciuto impedisce il classico approccio di ingegneria

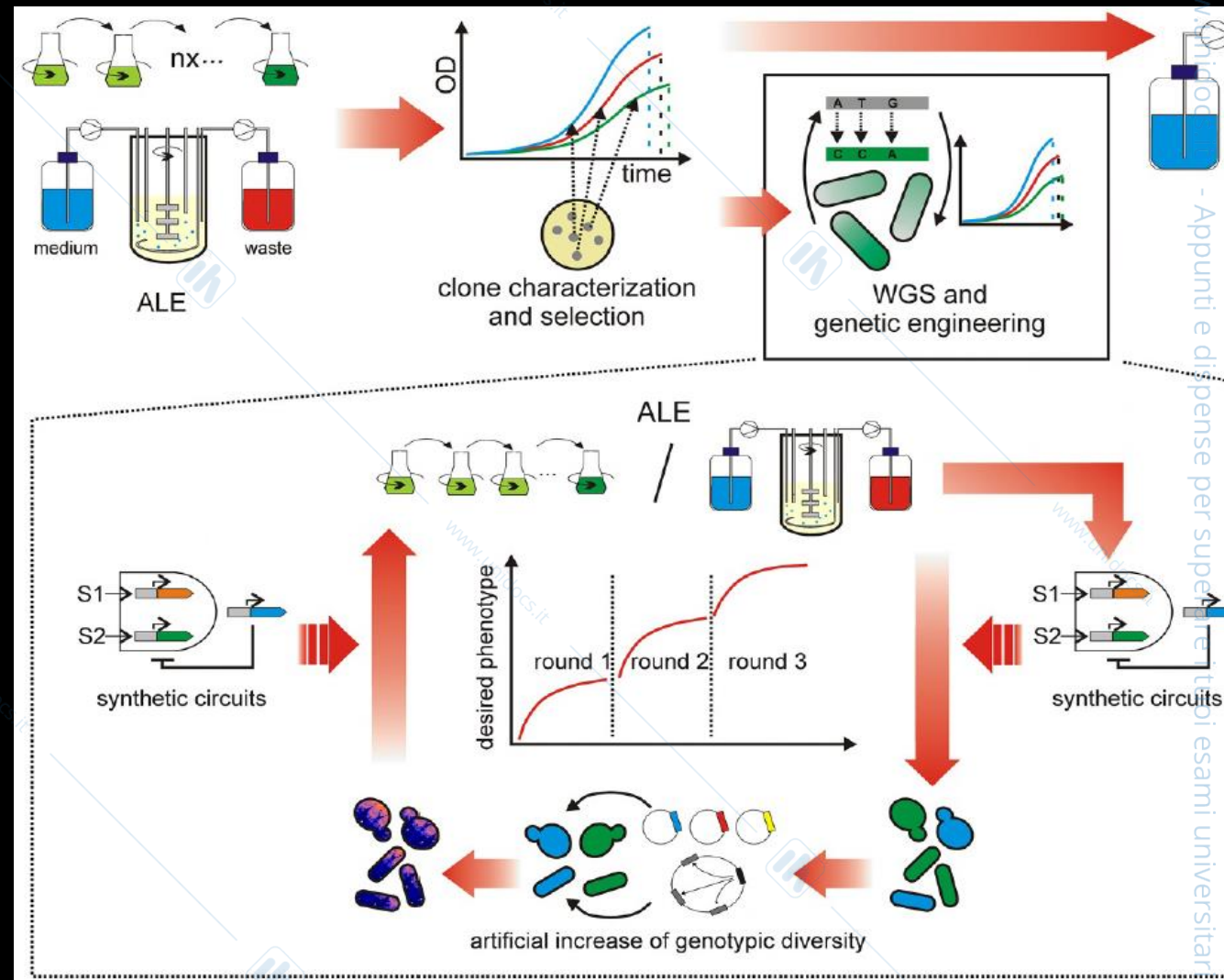


- Rischio di incappare in mutazioni sfavorevoli durante l'esposizione a stress ambientale

Come implementare efficientemente questa tecnica?

Direzioni future

Attraverso approcci altamente integrati, che utilizzino la tecnica ALE in combinazione con altre metodiche di laboratorio:



Direzioni future

Attraverso approcci altamente integrati, che utilizzino la tecnica in combinazione con altre metodiche di laboratorio:



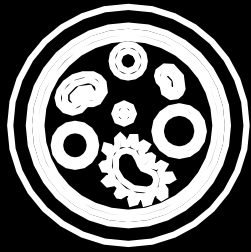
- MAGE (multiplex automated genetic engineering)



- Biologia computazionale



- Biologia sintetica



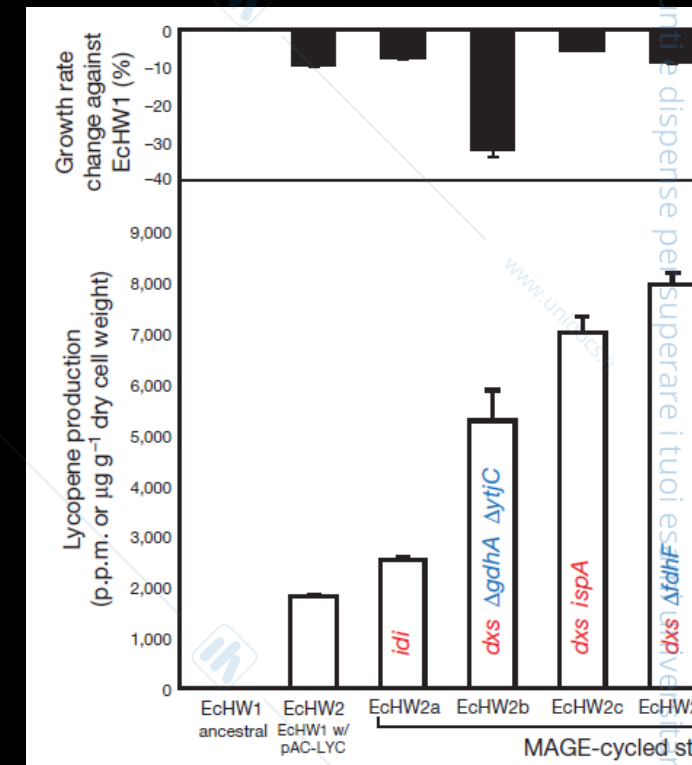
M.A.G.E.

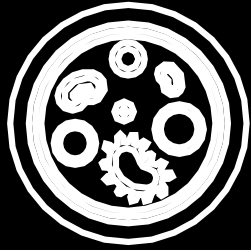
multiplex automated genetic engineering

Tecnica di modifica del genoma che consente di modificare rapidamente il DNA di un organismo per produrre cambiamenti multipli.

Il massivo aumento di diversità genetica favorisce la possibilità di ottenere un fenotipo di interesse.

Esempio sulla destra:
MAGE + ALE per la costruzione di una linea di *E. coli* ad alta produzione di licopene





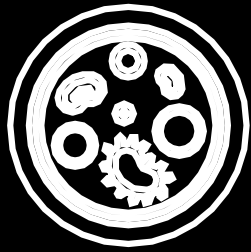
Biologia computazionale

Materia interdisciplinare che combina principi e metodi della biologia e dell'informatica per affrontare questioni biologiche complesse.

I modelli computazionali sono adatti per lo studio della variazione evolutiva a livello della popolazione,

MA

- la potenza di calcolo richiesta è enorme
- la conoscenza delle precise interazioni e del funzionamento di tutti i geni ancora parziale.



Biologia sintetica

Emersa nell'ultimo decennio, questa disciplina combina i principi della biologia, dell'ingegneria e delle scienze computazionali per progettare e costruire nuovi sistemi biologici o per modificare quelli esistenti.

In contrasto con gli approcci tradizionali, la metodica è altamente strutturata e suddivide le reti biologiche in moduli funzionali più piccoli, riducendo il grado di complessità

MA

nuovamente limitata dalla ridotta conoscenza dei singoli fenomeni biologici.



***“Evolution is a tinkerer,
not an engineer”***

Francois Jacob

VS

Nuove tecnologie per la sintesi
di modelli biologici ex novo



Conclusioni

Come favorire lo sviluppo di future applicazioni biotecnologiche?

Attraverso:

- Maggiore conoscenza della fisiologia degli organismi per costruire modelli computazionali più affidabili
- Estendere la ricerca di base verso organismi non convenzionali, per facilitare la loro possibile integrazione in processi industriali
- Aggiunta dell'evoluzione adattativa in laboratorio nell'ingegneria metabolica per offrire la possibilità di modellare finemente i processi industriali

