

Metagenomica

La varietà di organismi viventi presenti sul nostro pianeta è molto più grande di quella che conosciamo. Si è stimato che in 1g di terreno si trovano fino a 4000 specie microbiche diverse, di cui solo l'1% sono coltivabili e caratterizzabili.

Gli organismi attualmente utilizzati appartengono ad un numero ristrettissimo di specie.

Tra i vari fattori implicati, importante è il fatto che molti dei microorganismi esistenti non possono essere coltivati. Da questi non si possono quindi ottenere colture pure, da espandere ed usare come fonti di molecole biotecnologicamente interessanti, anche perché molti microorganismi vivono in comunità, quindi non possono essere coltivati in maniera isolata.

Ci sono quindi una grande quantità di microorganismi, definiti non coltivabili. Questi sono potenziali fonti di enzimi di interesse rilevante.

Per poter utilizzare queste risorse si è sviluppata la **metagenomica**. Questa disciplina si occupa dello studio e dell'analisi genomica di comunità microbiche senza necessità di doverle coltivare. A questo scopo il DNA di un campione di microorganismi viene isolato, senza una approfondita purificazione e spesso senza amplificazione, e trattato. Questo approccio ha consentito di avere accesso a nuove sequenze e enzimi con nuove funzioni.

I campioni possono essere prelevati da tutti gli ambienti naturali, quali suolo, acque, ambienti estremi o microbiomi presenti nella bocca o nel tratto gastrointestinale di vari organismi.

Metodo classico

All'inizio non si sa da quale organismo specifico il DNA sia stato estratto, ed in genere non è rilevante. Se alla fine del processo interessa conoscere i microorganismi presenti nel campione, è possibile sequenziare il loro RNA 16S.

Si estrae quindi il DNA dal campione, possibilmente in frammenti abbastanza grandi. Il DNA viene successivamente clonato in un vettore. Si crea così una libreria genomica.

A noi interessa la funzione, indipendentemente dalla sua origine. Abbiamo due possibilità diverse:

- Approccio **function driven**

Si fanno esprimere le sequenze ottenute ai vettori per produrre enzimi, che poi verranno testati per identificarne la funzione.

- Approccio **sequence driven**

Si sequenziano i campioni di DNA e si controlla se la sequenza coincide con qualche sequenza di interesse depositata nelle banche dati.

Un problema frequente in questo tipo di studi è che le specie presenti nel campione non sono presenti in quantità omogenea. Le specie sottorappresentate rischiano quindi di fornire poco materiale genetico da studiare.

Si possono utilizzare tecniche di arricchimento per aumentare il numero di cellule che ci interessano rispetto alle altre. Abbiamo diversi metodi: (*leggere review Biotechnological prospects from metagenomics. Schloss e Handelsman*). Vogliamo isolare da un campione ambientale degli enzimi implicati nel metabolismo del PCB (policlorobifenili).

- Abbiamo un campione misto, lo mettiamo in un terreno di coltura che contiene il substrato. Ci mettiamo anche una molecola marcatore, in questo caso la *bromodeossiuridina* (BrdU).

Le cellule in grado di utilizzare il substrato di interesse cresceranno più in fretta rispetto alle altre, condurranno le loro attività di biosintesi in maniera più efficiente, ed incorporeranno la BrdU nel loro DNA.

Il DNA viene quindi estratto dal campione, e si possono facilmente selezionare le molecole marcate con BrdU.

Si farà quindi una successiva libreria genomica che contiene solo queste molecole. Le molecole che ho isolato appartengono a quei batteri che sono in grado di metabolizzare il substrato di interesse. Marchiamo il substrato stesso con una molecola radioattiva. Le cellule che crescono incorporano il composto marcatore.

- Marchiamo il substrato con una molecola radioattiva. Le cellule man mano che crescono incorporano il composto marcato all'interno delle loro macromolecole. Si può quindi isolare in modo selettivo il DNA di interesse grazie al marcatore.
- Coltivo i miei microorganismi vettori, contenenti la sequenza di DNA, in un terreno ricco del substrato di interesse. Gli organismi che riescono a metabolizzare il substrato precedentemente inserito avranno un vantaggio rispetto alla crescita di altri microorganismi.
- Con l'innovazione nelle tecniche di sequenziamento del DNA si può utilizzare la tecnologia shotgun sequencing.

In questa tecnica si estrae il campione di DNA dalla comunità e successivamente si analizza tutto. Lo shotgun sequencing permette di ricostruire genomi *de novo*, cioè assemblare genomi di microorganismi non identificati precedentemente.

Negli ultimi anni si è lavorato molto sulla metagenomica degli estremofili. Anche negli ambienti estremi ci sono organismi non coltivabili o che non ci interessa coltivare.

Sono stati studiati enzimi dallo stomaco delle termiti per trovare nuovi enzimi in grado di attaccare a lignocellulosa.

Interessanti ambienti da studiare con la metagenomica sono gli ambienti inquinati. In questi ambienti si possono trovare microorganismi che si sono evoluti in ambienti inquinati e possono quindi essere in grado di degradare l'inquinante.

Inoltre non è detto che una singola specie batterica possa degradare un inquinante, ma enzimi prodotti da una comunità di microorganismi potrebbero contribuire alla degradazione.

Molto interessante è lo studio del microbioma, specialmente in relazione alla salute umana.