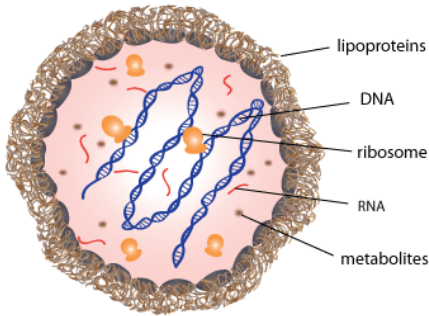


Micoplasmi,
“genoma minimo” e “organismo artificiale”



I micoplasmi (Mollicutes Mycoplasmatales)



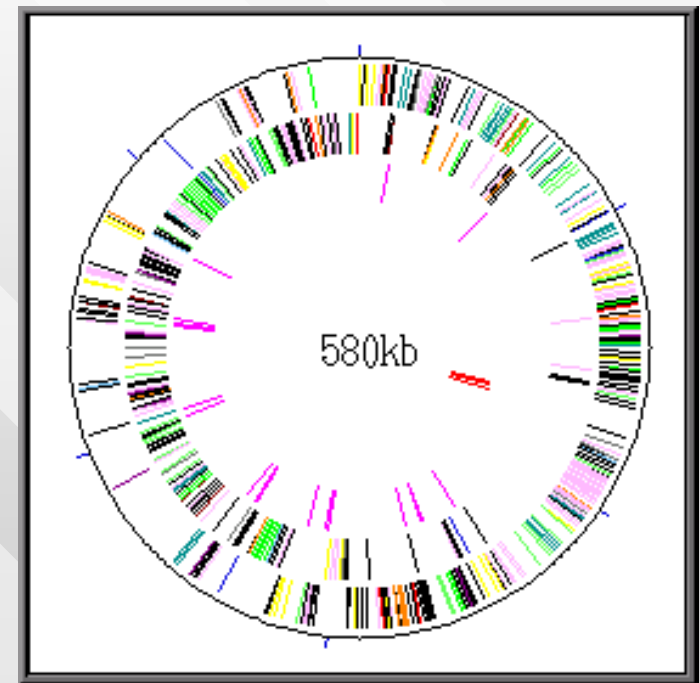
- Eubatteri a basso contenuto in G-C, appartenenti alla famiglia Mycoplasmatales, i più piccoli tra i Procarioti (0.1 μm di diametro)
- **Privi di parete cellulare**, quindi non classificabili tramite la colorazione di Gram (anche se inseriti tradizionalmente tra gli Eubatteri Gram-positivi)
- Hanno una membrana cellulare **trilaminare e ricca di steroli**
- Sono parassiti di vegetali, animali ed umani: *Mycoplasma pneumoniae* può causare gravi forme di polmonite in bambini e adulti (Bajantri et al. J. Clin. Med. Res. 10:535-544, 2018)
- *Mycoplasma genitalium* colonizza l'apparato genitale, causando uretriti e vaginosi (è un patogeno non grave, ma **molto fastidioso ed emergente**)

***Mycoplasma genitalium*:**

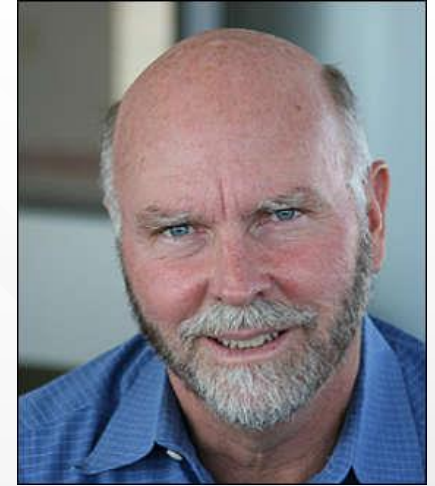
possiede il genoma più piccolo tra tutti gli organismi viventi **autonomi**



- *M. genitalium* è un patogeno del tratto genitale e respiratorio dei mammiferi
- Primo micoplasma interamente sequenziato nel 1995 (**580 Kb**, 521 geni, 482 proteine, 39 RNA strutturali)
- Protagonista del “**Progetto Genoma Minimo**”, iniziato da J. Craig Venter nel 2004, e **protagonista iniziale** del “**Progetto Organismo Artificiale**”, iniziato da Venter nel 2007 e tuttora in corso



J. Craig Venter, controverso scienziato e imprenditore

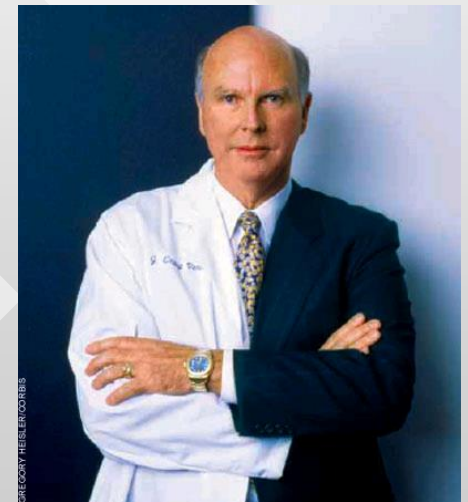


- Biotecnologo e genetista, è stato il fondatore del **TIGR** (The Institute for Genomic Research), in seguito confluito nel J. Craig Venter Institute

- Ha dato un contributo scientifico fondamentale al sequenziamento completo del DNA del primo eubatterio (*Haemophilus influenzae*, 1996) e del genoma umano (HGP - Celera Genomics, 2001): **uno dei primi cinque genomi umani sequenziati era il suo**

- Non ha mai nascosto le sue convinzioni secondo le quali la scienza, oltre ad un avanzamento di conoscenza, deve rappresentare anche **una consistente fonte di guadagno, tramite il rilascio di brevetti**

- Dopo il Progetto Genoma Minimo, dal 2007 al 2018 ha diretto un progetto di ricerca il cui scopo è stato la costruzione in laboratorio del **primo organismo vivente artificiale** (e l'ottenimento dei relativi brevetti)



“Genoma Minimo” e “Organismo Artificiale”

Per “**genoma minimo**” si intende il **numero minimo di geni indispensabili per la sopravvivenza dell'organismo** (“geni essenziali”)

Essential genes of a minimal bacterium

John I. Glass, Nancy Assad-Garcia, Nina Alperovich, Shibu Yooseph, Matthew R. Lewis, Mahir Maruf, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith*, and J. Craig Venter

Synthetic Biology Group, J. Craig Venter Institute, 9704 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850

Contributed by Hamilton O. Smith, November 18, 2005

Mycoplasma genitalium has the smallest genome of any organism that can be grown in pure culture. It has a minimal metabolism and little genomic redundancy. Consequently, its genome is expected to be a close approximation to the minimal set of genes needed to sustain bacterial life. Using global transposon mutagenesis, we isolated and characterized gene disruption mutants for 100 different nonessential protein-coding genes. None of the 43 RNA-coding genes were disrupted. Herein, we identify 382 of the 482 *M. genitalium* protein-coding genes as essential, plus five sets of disrupted genes that encode proteins with potentially redundant essential functions, such as phosphate transport. Genes encoding proteins of unknown function constitute 28% of the essential protein-coding genes set. Disruption of some genes accelerated *M. genitalium* growth.

urogenital pathogen, is the extreme manifestation of this genomic parsimony, having only 482 protein-coding genes and the smallest genome, at ≈ 580 kb, of any known free-living organism capable of being grown in axenic culture (13). Although more conventional bacteria with larger genomes used in gene essentiality studies have on average 26% of their genes in paralogous gene families, *M. genitalium* has only 6% (Table 1, which is published as supporting information on the PNAS web site). Thus, with its lack of genomic redundancy and contingencies for different environmental conditions, *M. genitalium* is already close to being a minimal bacterial cell.

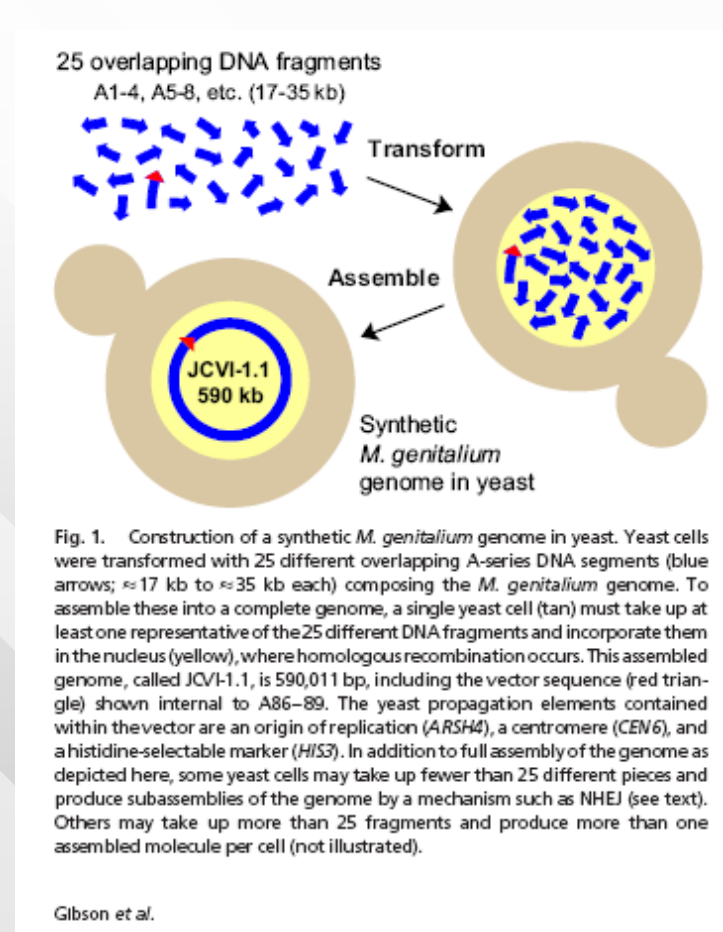
In our 1999 report (4) on the essential microbial gene for *M. genitalium* and its closest relative *Mycoplasma pneumoniae*, we mapped $\approx 2,200$ transposon insertion sites in these two species, and identified 120 essential genes in *M. genitalium* and 100 in *M. pneumoniae*.

Dopo una serie di esperimenti di mutagenesi, J. Craig Venter e collaboratori formularono l'ipotesi che tra tutti i geni codificati dal genoma naturale di *M. genitalium* **solo 381** fossero necessari per la crescita dell'organismo in laboratorio

Da questi studi sul “genoma minimo” si originò nel 2007 un altro progetto di Venter: la **costruzione di un genoma artificiale** che contenesse **tutti i geni necessari per la vita** (Progetto “**Organismo Artificiale**”)

JCVI-1.0, organismo “sintetico” ma non ancora “artificiale” (2008)

- Nel 2007 il gruppo di ricerca diretto da J. Craig Venter e Hamilton Smith (Premio Nobel per la Medicina nel 1978 per la scoperta del primo enzima di restrizione, HindII) annunciò che avrebbe tentato di **costruire in laboratorio una forma di vita artificiale**
- Riunendo tratti di DNA, il gruppo di ricerca iniziò a costruire un “**genoma sintetico**”, per inserirlo nella specie naturale *M. genitalium*
- In caso di successo, la nuova specie “artificiale” sarebbe stata chiamata ***Mycoplasma laboratorium*, o *Mycoplasma JCVI-1.0***, dal nome dell’istituto di ricerca (J. Craig Venter Institute, Rockville, MD)
- Nel 2008 il gruppo pubblicò la sequenza del genoma sintetico di *M. laboratorium*, costituito da 582 coppie di basi estratte da *M. genitalium*, **eliminando i geni che rendono la specie patogena e aggiungendo alcuni “geni segnale”**

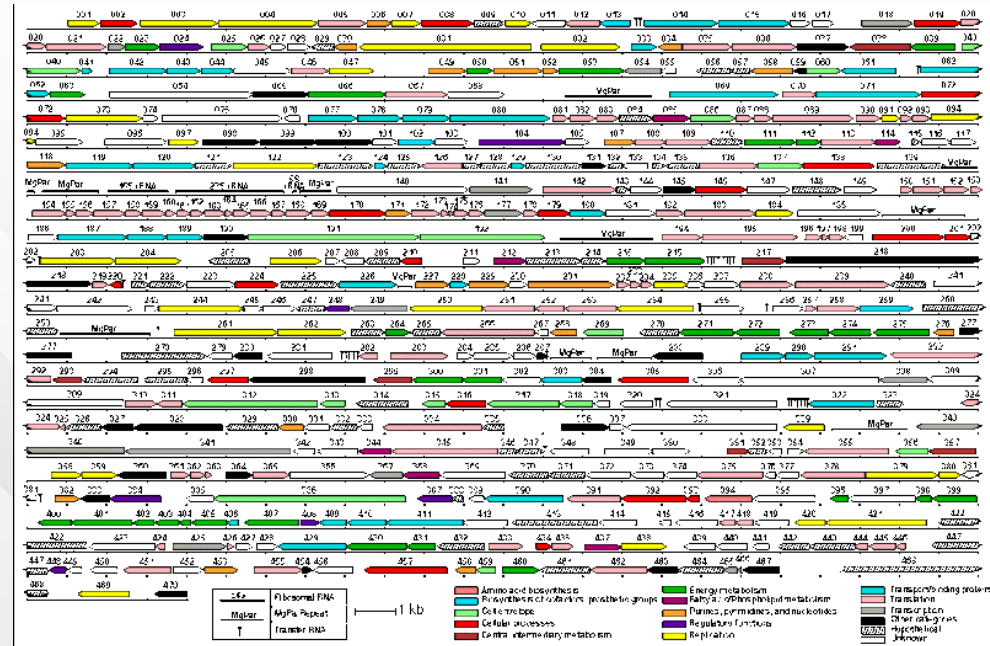


Genoma sintetico di *Mycoplasma laboratorium* JCVI-1.0 (Gibson et al., 2008)

Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome

Daniel G. Gibson, Gwynedd A. Benders, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Evgeniya A. Denisova, Holly Baden-Tillson, Jayshree Zaveri, Timothy B. Stockwell, Anushka Brownley, David W. Thomas, Mikkel A. Algire, Chuck Merryman, Lei Young, Vladimir N. Noskov, John I. Glass, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith*

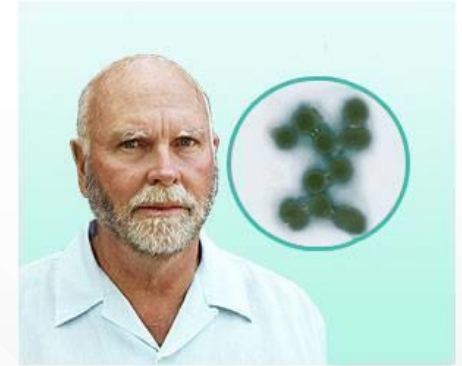
We have synthesized a 582,970–base pair *Mycoplasma genitalium* genome. This synthetic genome, named *M. genitalium* JCVI-1.0, contains all the genes of wild-type *M. genitalium* G37 except MG408, which was disrupted by an antibiotic marker to block pathogenicity and to allow for selection. To identify the genome as synthetic, we inserted “watermarks” at intergenic sites known to tolerate transposon insertions. Overlapping “cassettes” of 5 to 7 kilobases (kb), assembled from chemically synthesized oligonucleotides, were joined by in vitro recombination to produce intermediate assemblies of approximately 24 kb, 72 kb (“1/8 genome”), and 144 kb (“1/4



Tuttavia il genoma sintetico inserito nel citoplasma di *M. genitalium*
non sembrava in grado di funzionare...

Fonte: Gibson et al., Science 319: 1215-1220, 2008

Come costruire un “organismo artificiale”



- La prova principale dell'integrazione funzionale tra genoma sintetico e citoplasma (cioè il pieno controllo esercitato dal genoma sintetico sulla cellula ospite) sarebbe stata la **divisione** del “nuovo” organismo
- L'ostacolo principale all'integrazione funzionale era però il ritmo lentissimo di crescita di *M. genitalium*
- Per risolvere questo problema, Venter e i suoi collaboratori hanno eseguito nel 2010 esperimenti su due altri micoplasmi, *M. mycoides subspecies capri* (come donatore) e *M. capricolum subspecies capricolum* (come ospite), a crescita **veloce**
- Le due specie naturali provocano **malattie respiratorie nelle capre** ed hanno caratteristiche genomiche e biochimiche molto simili

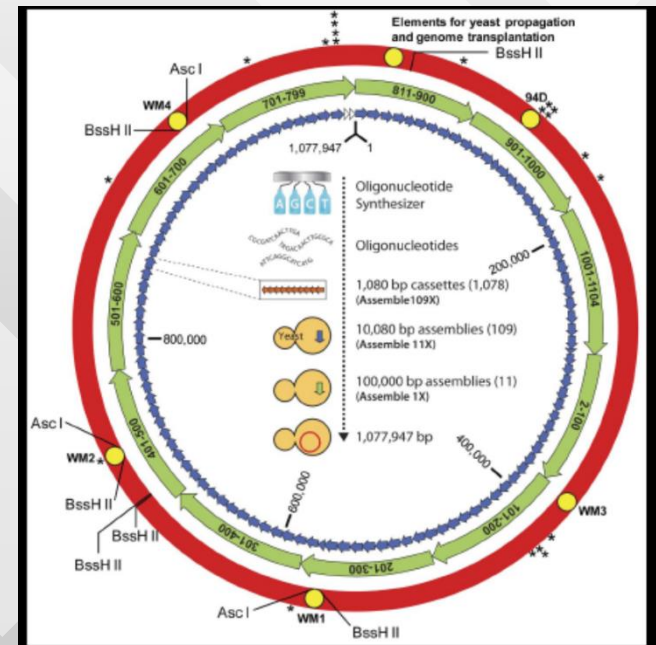
Il genoma sintetico di *M. mycoides* JCVI-syn1.0 si è rivelato in grado di controllare le “nuove” cellule

- E' stato quindi costruito quindi un genoma sintetico di 1.08 Mb, derivato da *M. mycoides* e denominato *Mycoplasma mycoides* JCV1-syn1.0
- Questo genoma sintetico è stato inserito in una cellula ospite di *M. capricolum* private del proprio genoma, per ottenere **cellule** di *M. mycoides* **controllate esclusivamente dal genoma sintetico**
- Le nuove cellule si sono infatti divise attivamente, hanno mostrato un aspetto del tutto simile alle cellule naturali di *M. mycoides* ed hanno **espresso il genoma sintetico** (Gibson et al., Science 2010)

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

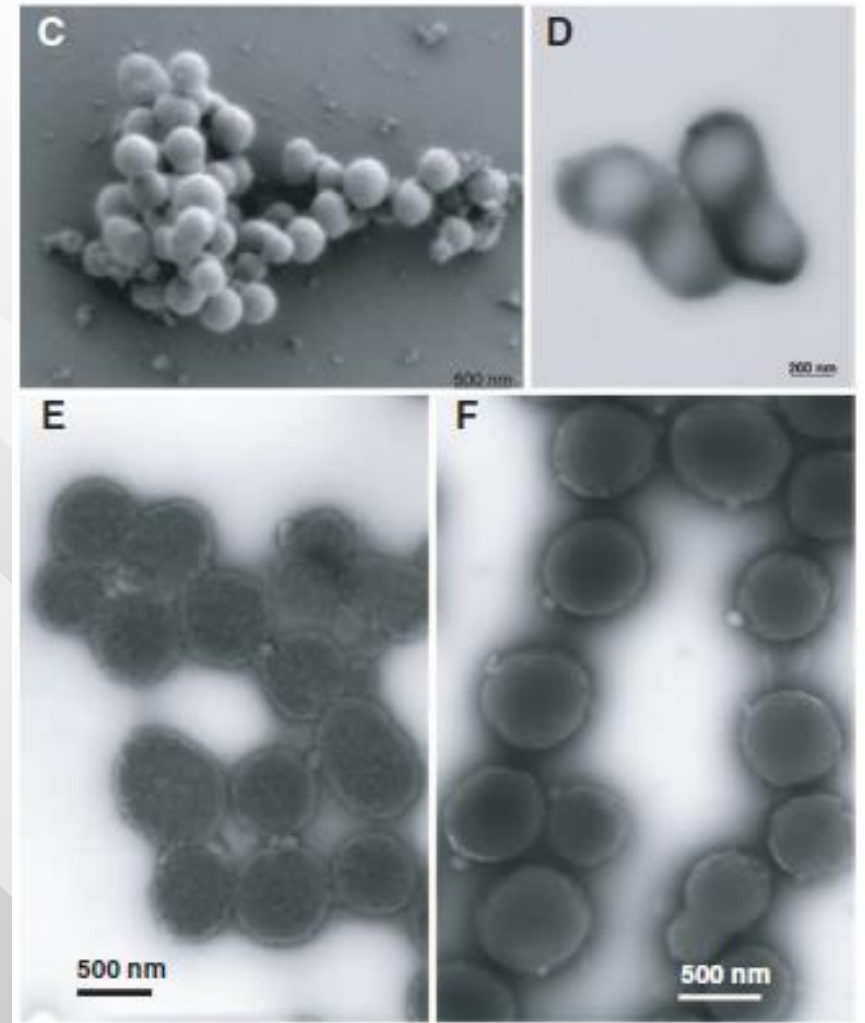
Daniel G. Gibson,¹ John I. Glass,¹ Carole Lartigue,¹ Vladimir N. Noskov,¹ Ray-Yuan Chuang,¹ Mikkel A. Algire,¹ Gwynedd A. Benders,² Michael G. Montague,¹ Li Ma,¹ Monzia M. Moodie,¹ Chuck Merryman,¹ Sanjay Vashee,¹ Radha Krishnakumar,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Cynthia Andrews-Pfannkoch,² Evgeniya A. Denisova,¹ Lei Young,¹ Zhi-Qing Qi,¹ Thomas H. Segall-Shapiro,¹ Christopher H. Calvey,¹ Prashanth P. Parmar,¹ Clyde A. Hutchison III,² Hamilton O. Smith,² J. Craig Venter^{1,2*}

We report the design, synthesis, and assembly of the 1.08-mega-base pair *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 genome starting from digitized genome sequence information and its transplantation into a *M. capricolum* recipient cell to create new *M. mycoides* cells that are controlled only by the synthetic chromosome. The only DNA in the cells is the designed synthetic DNA sequence, including "watermark" sequences and other designed gene deletions and polymorphisms, and mutations acquired during the building process. The new cells have expected phenotypic properties and are capable of continuous self-replication.



Immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) ed a trasmissione (TEM) di cellule di *M. mycoides* JCVI-syn1.0 e di *M. mycoides* WT (“wild type”, il micoplasma naturale)

- *M. mycoides* JCVI-syn1.0 al SEM (C) e in divisione (D)
- Immagini al TEM di *M. mycoides* JCVI-syn1.0 (E) e di *M. mycoides* WT (F)

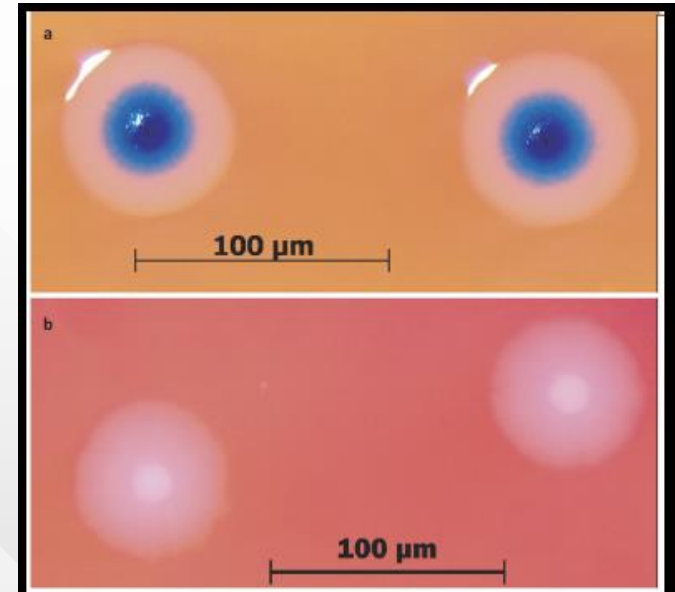


Dal punto di vista morfologico, i due tipi di micoplasmi (quello “**artificiale**”, controllato dal genoma sintetico, e quello **naturale**)
appaiono del tutto simili

Fonti: Gibson et al., 2010

Confronto tra colture di *M. mycoides* JCVI-syn1.0 e *M. mycoides* WT (“wild type”, naturale)

- I micoplasmata sono stati coltivati su un terreno di agar contenente **X-galattosio**, uno zucchero modificato
- Le colonie hanno tutte il **tipico aspetto a “uovo fritto” (“fried egg”)** caratteristico delle colonie di micoplasmata
- Le colonie del micoplasma governato dal genoma sintetico **appaiono blu** perché vi è stato inserito il gene **lacZ**, che esprime l'enzima β -galattosidasi e **metabolizza l'X-galattosio ad un composto blu**
- Le colonie del micoplasma naturale (WT) non hanno il gene lacZ e quindi **restano bianche**
- I dati confermano che **il genoma sintetico di *M. mycoides* JCV-syn 1.0 è in grado di controllare la crescita e il metabolismo delle proprie cellule**



J. Craig Venter ha fondato insieme ad Hamilton Smith la società **Synthetic Genomics Inc.** per commercializzare le tecnologie del genoma sintetico

Design and synthesis of a minimal bacterial genome

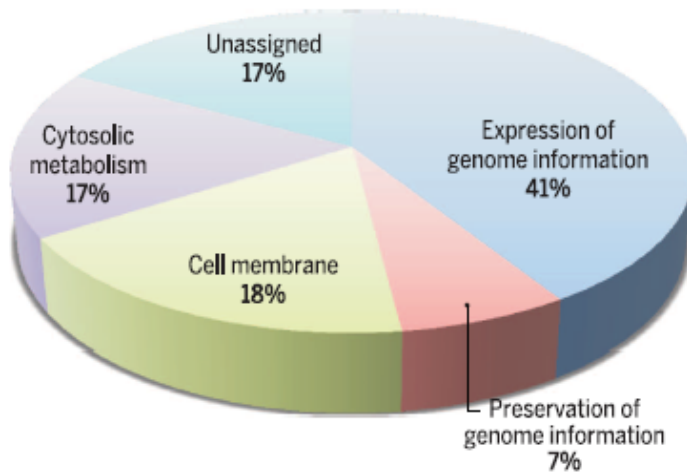
Clyde A. Hutchison III,^{1*} Ray-Yuan Chang,^{1†} Vladimir N. Noskov, Nacra Assad-Garcia, Thomas J. Deerhock, Mark H. Ellisman, John Gill, Krishna Kaman, Bogumil J. Karas, Li Ma, James F. Pelletier, Zhi-Qing Qi, R. Alexander Richter, Elizabeth A. Strychalski, Lijie Sun, Yo Suzuki, Bilyana Tsvetanova, Kim S. Wise, Hamilton O. Smith, John I. Glass, Chuck Merryman, Daniel G. Gibson, J. Craig Venter²

Nel 2016 Venter e il suo gruppo di ricerca hanno annunciato di avere ottenuto un nuovo ceppo di *M. mycoides*, **JCVI-syn3.0**, che cresce e si riproduce con **un genoma di soli 473 geni** (531 Kb)

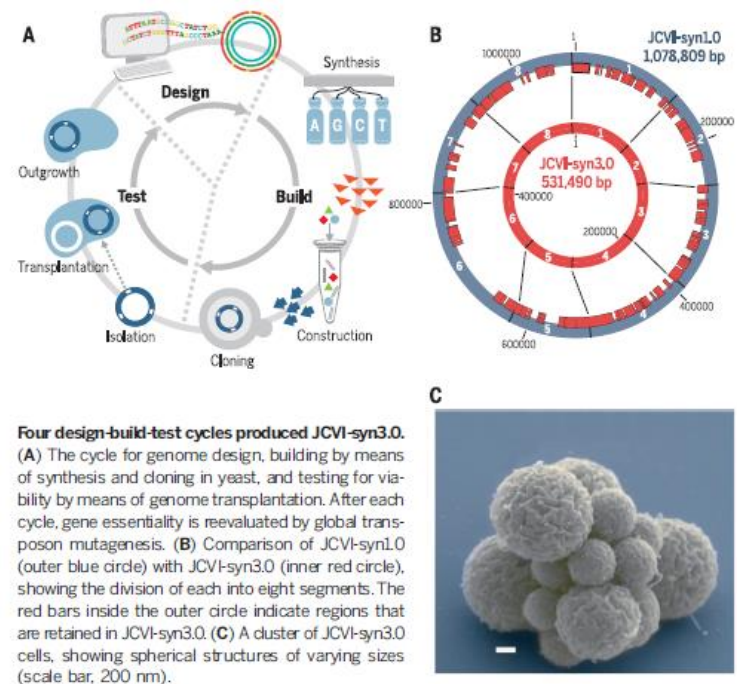
Questo genoma “**super-minimo**” è più piccolo di quello di qualsiasi organismo vivente autonomo in natura (Hutchison et al., Science 2016)

Fig. 6. Partition of genes into four major functional groups.

Syn3.0 has 473 genes. Of these, 79 have no assigned functional category (Table 1). The remainder can be assigned to four major functional groups: (i) expression of genome information (195 genes); (ii) preservation of genome information (34 genes); (iii) cell membrane structure and function (84 genes); and (iv) cytosolic metabolism (81 genes). The percentage of genes in each group is indicated.



sciencemag.org **SCIENCE**



Sorprendentemente, questo minimo genoma artificiale possiede ancora **140 geni a funzione sconosciuta**, ma evidentemente **indispensabili per il suo funzionamento...**