

Biotecnologie Microbiche per la produzione di molecole di interesse industriale

Collaboratori:

Giulia Barbieri (assegnista)

Paolo Gabrieli (assegnista)

Elisabetta Andreoli (tecnico)

Giuliano Gasperi (professore a contratto)

Linee di ricerca

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NELL'ORGANISMO MODELLO *Bacillus subtilis*

A. Albertini; in collaborazione con A.L. Sonenshein e B.R. Belitsky del Department of Molecular Biology and Microbiology, Tufts University of Boston MA, USA

Tra gli interessi dell'attività di ricerca del gruppo rientra lo studio della regolazione dell'espressione genica in *Bacillus subtilis*. Quando si trovano a crescere in ambienti poveri, o in seguito all'esaurimento dei nutrienti nel terreno di crescita, i batteri sono in grado di mettere in atto diverse strategie per sopravvivere. Queste includono lo sviluppo della capacità di muoversi, la sintesi di enzimi degradativi e di trasportatori in grado di importare i prodotti di degradazione, la produzione di antibiotici. *Bacillus subtilis* è inoltre in grado di andare incontro a particolari processi differenziativi come lo sviluppo di competenza (la capacità di acquisire DNA dall'ambiente esterno), ed il differenziamento in una forma metabolicamente dormiente ed altamente resistente agli stress: la spora. Il nostro gruppo è interessato allo studio dei processi di regolazione dell'espressione genica che sono attivati all'inizio della fase di crescita stazionaria e che sono quindi alla base di queste diverse risposte differenziate. In particolare, in collaborazione con i professori A.L. Sonenshein e B. Belitsky della Tufts University di Boston, abbiamo recentemente dimostrato come il fattore trascrizionale CodY, uno dei principali regolatori della risposta allo stress nutrizionale, sia coinvolto nella regolazione dell'espressione di quattro proteasi extracellulari di *B. subtilis*.

Pubblicazioni sul tema

1. Barbieri G, Albertini AM, Ferrari E, Sonenshein AL, Belitsky BR. Interplay of CodY and ScoC in the Regulation of Major Extracellular Protease Genes of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. Jan 4;198(6):907-20. doi: 10.1128/JB.00894-15, 2016
2. Belitsky BR, Barbieri G, Albertini AM, Ferrari E, Strauch MA, Sonenshein AL. Interactive regulation by the *Bacillus subtilis* global regulators CodY and ScoC. Mol Microbiol., Aug;97(4):698-716. doi: 10.1111/mmi.13056 4.419, 2015
3. Barbieri G, Voigt B, Albrecht D, Hecker M, Albertini AM, Sonenshein AL, Ferrari E, Belitsky BR. CodY regulates expression of the *Bacillus subtilis* extracellular proteases Vpr and Mpr. J Bacteriol. Apr;197(8):1423-32. doi: 10.1128/JB.02588-14. 2.808, 2015

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI INSETTICIDI BIOLOGICI DA BATTERI PER IL CONTROLLO DI *Aedes albopictus* (ZANZARA TIGRE)

A. Albertini, G. Gasperi

Il progetto, finanziato dalla Fondazione Bussolera Branca, coinvolge il Laboratorio di Genetica e Biotecnologie Microbiche e quello di Genomica e Biotecnologie di insetti di importanza agraria e sanitaria del Dip.to di Biologia e Biotecnologie dell'Univ. di Pavia, grazie alle competenze complementari con cui si cerca di identificare nuovi ceppi batterici in grado di produrre molecole ad attività insetticida per il controllo specifico di *Aedes albopictus*. Per tale scopo, vengono ricercati in natura (suolo, acqua stagnante, etc.) batteri con attività larvicida validata su un ceppo standard di zanzara tigre di origine italiana, disponibile in laboratorio. Successivamente, i ceppi batterici e i composti ad attività bioinsetticida da essi isolati verranno saggiati su popolazioni naturali di *Aedes albopictus* per una loro validazione in funzione di una possibile utilizzazione in campo, oltre che per la loro non tossicità nei confronti di vertebrati, altri insetti e specie animali e vegetali di interesse agronomico.

Sono impiegati approcci genomici e metagenomici per identificare i geni coinvolti nella produzione dei bioinsetticidi; clonaggio ed approcci di "genome shuffling" saranno messi a punto per caratterizzare e migliorare il livello di espressione dei nuovi insetticidi nel batterio più idoneo alla produzione su scala commerciale di questi metaboliti, quale il *B. subtilis*.

CLONAGGIO ED IPERESPRESSIONE DI NUOVI CATALIZZATORI ENZIMATICI.

A. Albertini and C. Calvio; in collaborazione con D. Ubiali e T. Bavaro del Dipartimento di Scienze del Farmaco (Università di Pavia) e G. Speranza e C. Morelli del Dipartimento di Chimica (Università Statale di Milano)

La conoscenza del corredo genico e quindi enzimatico di oltre un migliaio di specie batteriche, per le quali è stata determinata la sequenza dell'intero genoma, consente di accedere ad una collezione naturale di attività enzimatiche utile nel campo delle biotecnologie farmaceutiche. In particolare ci siamo interessati al clonaggio di geni per acilasi, enzimi impiegati per la reazione inversa di semi-sintesi di antibiotici Beta-lattamici, da diverse fonti microbiche (Gram+ e Gram-). Inoltre sono state studiate le caratteristiche di enzimi derivati da clonaggio ed iperespressione in *E. coli*, dei geni di *Bacillus* e *Lactobacillus* coinvolti nella modificazione di basi, puriniche e pirimidiniche e dei nucleosidi di-e tri-fosfati, quali purine e pirimidine fosforilasi, ribonucleotide reductasi. Scopo di questi progetti è la produzione di nuovi catalizzatori immobilizzabili attraverso la ricerca di nuovi enzimi provenienti da diverse fonti procariotiche, e l'accoppiamento di strategie di mutagenesi sito specifica ed immobilizzazione per la progettazione razionale di biocatalizzatori più efficienti.

Recentemente, in collaborazione con C. Morelli (Dipartimento di Chimica, Università Statale di Milano), grazie ad un finanziamento di ricerca CARIPLO si stanno conducendo studi sulle reazioni di trans-peptidazione catalizzate da γ -glutamyl trans-peptidasi (GGT) di origine microbica per migliorare, attraverso la mutagenesi, le proprietà catalitiche di questi enzimi così da produrre nuovi derivati γ -glutamilici di interesse nell'industria alimentare e farmaceutica. La mutagenesi e la selezione di GGT ricombinanti permetteranno l'immobilizzazione per lo sviluppo di processi in grande scala.

Pubblicazioni sul tema

1. Biagiotti M, Borghese G, Francescato P, Morelli C F, Albertini AM, Bavaro T, Ubiali D, Mendichi R and Speranza G. Esterification of poly(γ -glutamic acid) (γ -PGA) mediated by its tetrabutylammonium salt. RSC Adv., 6, 43954-43958. doi: 10.1039/C6RA08567A, 2016
2. Ubiali D., Morelli C.F., Rabuffetti M., Cattaneo G., Serra I., Bavaro T., Albertini A.M. and Speranza G. Substrate Specificity of a Purine Nucleoside Phosphorylase from *Aeromonas hydrophila* Toward 6-Substituted Purines and its Use as a Biocatalyst in the Synthesis of the Corresponding Ribonucleosides, Curr. Org. Chem. 19 (22): 2220 – 2225, 2.157, 2015
3. Serra I., Ubiali D., Cecchini D.A., Calleri E., Albertini A.M., Terreni M., Temporini C. Assessment of immobilized PGA orientation via the LC-MS analysis of tryptic digests of the wild type and its 3K-PGA mutant assists in the rational design of a high-performance biocatalyst. Anal Bioanal Chem. Jan; 405(2-3):745-53. doi: 10.1007/s00216-012-6143-z, 2013
4. Serra I., Bavaro T., Cecchini D. A., Daly S., Albertini A.M., Terreni M., Ubiali D., A Comparison between Immobilized Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase from *Bacillus subtilis* and Thymidine Phosphorylase from *Escherichia coli* in the Synthesis of 5-Substituted Pyrimidine 2'-Deoxyribonucleosides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 95, 16-22, DOI information: 10.1016/j.molcatb.2013.05.007, 2013
5. Serra I., Ubiali D., Piskur J., Christoffersen S., Lewkowicz E., Iribarren A. M., Albertini A. M, Terreni M., Developing a Collection of Immobilized Nucleoside Phosphorylases for the preparation of Nucleoside Analogues: Enzymatic Synthesis of Arabinosyladenine and 2',3'-Dideoxyinosine, Chem Plus Chem, 78 (2), 157-165. DOI: 10.1002/cplu.201200278, 2013
6. Serra I., Ubiali D., Cecchini D.A., Calleri E., Albertini A.M., Terreni M., Temporini C. Assessment of immobilized PGA orientation via the LC-MS analysis of tryptic digests of the wild type and its 3K-PGA mutant assists in the rational design of a high-performance biocatalyst. Anal Bioanal Chem., 405(2-3):745-53, DOI: 10.1007/s00216-012-6143-z, 2012
7. Ubiali D., Serra C.D., Serra I., Morelli C.F., Terreni M., Albertini A.M., Manitto P. and Speranza G. Production, characterization and synthetic application of a purine nucleoside phosphorylase from *Aeromonas hydrophila*. Adv Synth. Catal. 354, 96-1041, 2012
8. Serra I, Cecchini DA, Ubiali D, Manazza EM, Albertini AM, Terreni M. Coupling of site-directed mutagenesis and immobilization for the rational design of more efficient biocatalysts. The case of immobilized 3G3K PGA from *E. coli*. Eur. J. Org. Chem., 9:1384 -1389, 2009
9. Cecchini DA, Serra I, Ubiali D, Terreni M and Albertini AM. New active site oriented glyoxyl-agarose derivatives of *Escherichia coli* penicillin G acylase. BMC Biotechnol.7: 54, 2007.