

**Relazione scientifica relativa al soggiorno di studio della
Dottoressa Cristina Marzachi presso il Department of Plant &
Microbial Biology, College of Natural Resources, University of
California, Berkeley, CA, USA, nell'ambito del Progetto Short
Term Mobility 2007.**

Durante il soggiorno effettuato presso il laboratorio di Microbiologia del Department of Plant & Microbial Biology, College of Natural Resources, University of California, Berkeley, CA (USA), diretto dal Dott. Steven Lindow, la sottoscritta ha svolto un programma relativo alla "Ricerca di geni implicati nei fenomeni di comunicazione tra cellule nel genoma dei fitoplasmi".

L'attività ha previsto una fase iniziale di ampia discussione in merito alle basi molecolari del fenomeno della comunicazione tra cellule in batteri diversi e di raccolta di bibliografia, una seconda fase di analisi critica della bibliografia e di reperimento di dati di sequenza relativi alle diverse classi di geni coinvolti nei processi di comunicazione intercellulare in batteri gram positivi, ed una terza fase di ricerca *in silico* di eventuali omologie nel genoma di due fitoplasmi appartenenti alla specie "*Candidatus phytoplasma asteris*".

Il processo di comunicazione chimica che i batteri utilizzano per monitorare la densità delle cellule nella popolazione e per sincronizzare l'espressione genica della comunità prende il nome di quorum sensing (QS). Il QS richiede la produzione, il rilascio ed il riconoscimento di molecole segnale note come autoinduttori (AI). I comportamenti che tipicamente sono regolati con un meccanismo di QS sono quelli che diventano produttivi se effettuati all'unisono da un gruppo di cellule, tra questi, lo scambio di DNA, la produzione di biofilm, di antibiotici, di fattori di virulenza, la sporulazione, la bioluminescenza.

Esistono due tipi fondamentali di AI: quelli costituiti da acil-omoserina lattoni (AHL) e quelli costituiti da oligopeptidi modificati. I primi sono utilizzati dai batteri gram negativi, mentre i secondi sono appannaggio dei batteri gram positivi. Poiché i fitoplasmi derivano da batteri gram positivi, la ricerca è stata principalmente diretta verso lo studio del sistema di QS in questi batteri. Gli AI oligopeptidici sono generalmente costituiti da 5 fino a 17 aminoacidi e sono spesso modificati dopo la traduzione con l'incorporazione di anelli lattonici e tiolattionici, lattionine e gruppi isoprenilici. Questo tipo di AI viene riconosciuto da proteine di segnale a due componenti, localizzate sulla membrana cellulare. La traduzione del segnale avviene mediante una cascata di fosforilazioni. Nella maggior parte dei sistemi di QS analizzati, il peptide segnale è sintetizzato come peptide precursore che viene modificato successivamente. La specificità del segnale viene quindi determinata da sottili modificazioni dell'oligopeptide e riconosciuta dalla capacità discriminatoria del corrispondente recettore di membrana. Il peptide segnale maturo viene secreto tramite un complesso di escrezione di tipo ABC (ATP-binding cassette). Con il crescere della densità della popolazione batterica, l'oligopeptide si accumula nel mezzo esterno. Il riconoscimento del segnale ed il passaggio della corretta informazione all'interno della cellula sono mediati da sistemi di traduzione del segnale a due componenti. La traduzione del segnale avviene mediante una cascata di fosforilazioni che

coinvolge chinasi di senso (sensor kinase), caratterizzate dalla presenza di un residuo di istidina conservato e da regolatori di risposta, caratterizzati dalla presenza di un residuo conservato di aspartato. Alcuni batteri sono in grado di produrre e riconoscere oligopeptidi multipli per la regolazione di set genici diversi. Recentemente, sono stati identificati altri sistemi di regolazione. Quello noto come Pseudomonas quinone sensor (PQS), che si basa sulla molecola segnale 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone in *Pseudomonas aeruginosa* e quello che si basa sulla molecola segnale AI-2 nel genere *Vibrio*.

Nel corso del progetto, sono stati presi in considerazione i sistemi di QS relativi a diversi comportamenti di numerosi batteri gram positivi, tra cui: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Sinorhizobium meliloti* ed *Escherichia coli*. I geni (AI peptide, QS sensor kinase, signal transducer, response regulator, transmembrane peptidase) implicati nel QS dei diversi sistemi regolati in questo modo nei batteri sopraelencati sono stati identificati e raggruppati. L'allineamento delle sequenze omologhe nei diversi batteri ha permesso di evidenziare negli allineamenti relativi alle sensor kinases, signal transducers e transmembrane peptidases zone con minore variabilità genetica e quindi con un potenziale interesse per la ricerca di omologie di sequenza e di funzione nel genoma dei fitoplasmi. Per questa ricerca, dato lo scarso tempo a disposizione, si è deciso di concentrare la propria analisi sulla classe delle sensor kinases. L'analisi è stata effettuata tramite il programma BLAST, attraverso il sito del National Center of Biotechnology Information. La ricerca con nBLAST non ha prodotto alcun risultato nei genomi dei due isolati (aster yellows witches'broom e onion yellows) di "*Ca. P. asteris*". La ricerca con tBLASTx ha invece evidenziato alcune sequenze nel genoma di entrambi gli isolati di "*Ca. P. asteris*" con valori di $E < 0$. In particolare, la sequenza del gene *agrC* di *S. aureus* (gi|151220212:2152252-2153544) ha prodotto un risultato con un expected value (E) pari a 0.017, corrispondente ad una hypothetical protein nel genoma dell'isolato onion yellows. Si è poi ritenuto necessario effettuare uno studio analogo relativo al sistema di QS che prevede l'autoinduttore noto come AI-2. La molecola AI-2 regola numerose funzioni in batteri diversi, tra cui il trasporto e la degradazione di se stessa nei batteri enterici. La sintesi di questa molecola è un prodotto del ciclo del metile attivato, in cui, in seguito alla donazione di metile da parte di S-adenosilmetionina a diversi substrati, si forma un intermedio tossico (S-adenosilomocisteina, SAH). Negli eucarioti ed in alcuni batteri, SAH è degradato in un singolo passaggio biochimico ad adenosina ed omocisteina. Gli organismi che contengono il gene omologo a *luxS*, invece, metabolizzano SAH in due passaggi, di cui il secondo è responsabile della sintesi, catalizzata da LuxS, del precursore di AI-2. Il precursore di AI-2, secreto dalla cellula con un meccanismo ancora oggetto di studio, subisce una ciclizzazione spontanea per trasformarsi in AI-2 definitivo. In *V. harveyi*, l'aggiunta di boro a questa molecola genera un segnale utilizzato nella comunicazione interspecifica. AI-2, nei batteri enterici, viene importato nella cellula dal trasportatore Lsr. Nel corso del progetto, è stata valutata la percentuale di identità tra i geni *luxS* di diversi batteri mediante un allineamento Clustal delle sequenze corrispondenti, che variava tra 56 e 72 % tra membri dello stesso genere, ma presentava valori analoghi anche nel confronto tra *V. harveyi* e *S. aureus*, mentre raggiungeva il 70 % nel confronto tra *V. harveyi* e *Y. pestis*. La percentuale di identità tra i geni *luxS* di generi diversi era inferiore a 8 %. La percentuale di identità del gene omologo annotato nel genoma dell'isolato onion yellows di "*Ca. P. asteris*" non era mai superiore a 8 %.

Dai risultati esposti risulta che effettivamente alcuni geni del "Ca. P. asteris" codificanti per prodotti genici annotati come hypothetical protein presentano domini di sequenza con scarsi valori di omologia con geni di altri batteri gram positivi implicati nell'acquisizione di segnali di tipo QS. Inoltre lo stesso isolato onion yellows codifica per il gene *luxS*, responsabile in altri organismi, della sintesi del precursore della molecola di comunicazione AI-2.

I fitoplasmi non possono essere coltivati in coltura axenica, pertanto lo studio funzionale del loro genoma è molto difficile, se non impossibile con i metodi convenzionali. La collaborazione con il Dott. Lindow ha permesso di elaborare una serie di esperimenti *in vivo* indispensabili per fornire l'indicazione sperimentale che un probabile fenomeno di QS sia effettivamente presente in questi fitopatogeni. Gli esperimenti in questione, discussi nel dettaglio durante il soggiorno presso il Department of Plant & Microbial Biology, saranno effettuati presso l'IVV-CNR nei prossimi mesi. Dall'esito di questi esperimenti dipenderà l'istaurarsi di una collaborazione più continuativa tra i due laboratori, per l'approfondimento del fenomeno.

Torino, 05/09/2007

Cristina Marzachi

