Programma

Short Term Mobility

Nome dell'Usufruitore

Sabina Lucia, IBF, Area Ricerca di Pisa

Titolo del Programma

Signal transduction in extreme halophilic bacteria

Obiettivi

Legare proteine fluorescenti ai fotorecettori di *Halobacterium salinarum* che permettendo di visualizzarne la distribuzione spaziale all'interno della membrana consentirebbe di chiarire il meccanismo di trasduzione del segnale in archæbacteria.

Introduzione

Nei batteri il meccanismo di trasduzione dei segnali provenienti dall'ambiente, quali composti chimici, luce, temperatura ect. è argomento di studio da molti decenni benchè non ancora del tutto chiarito. Studi recenti su *E. coli* [1,2] hanno evidenziato che i chemorecettori sono strutturati in clusters e che ci sono delle interazioni tra recettori. E' stato, quindi, ipotizzato che la trasduzione del segnale sia una complessa rete di interazioni che modulano la capacità di percepire l'ambiente da parte del batterio. Nell'archeonte *H. salinarum* la presenza di almeno 13 chemorecettori, circa il doppio di quelli presenti in *E. coli*, e di quattro fotorecettori, di cui due pompe ioniche, rende lo studio della loro distribuzione e della possibile interazione particolarmente interessante per la comprensione della fisiologia dei batteri. Nostri risultati [3,4] ottenuti misurando le risposte motorie (fotorisposte) di *H. salinarum* a diverse combinazioni di stimoli luminosi suggeriscono che la fototrasduzione segua un meccanismo simile a quello della chemotrasduzione degli eubatteri. Legare delle proteine fluorescenti (FPs) a questi fotorecettori poteva permettere di visualizzare la loro distribuzione e organizzazione spaziale. Con il programma di mobilità breve ho iniziato l'attività di ricerca per ottenere dei fotorecettori fluorescenti *via* FPs.

Attività svolta

H. salinarum è un estremofilo che vive nelle saline e mantiene anche nella porzione citoplasmatica una salinità paragonabile a quella esterna, quindi per il progetto era necessario avere una proteina fluorescente che mantenesse l'attività in condizioni di

alta salinità. Un plasmide di *E. coli* codificante per una "green fluorescent protein" (GFP20) resistente all'alta salinità a disposizione del gruppo del Prof. Spudich al "Center for Membrane Biology of the University of Texas Medical School" in Houston ha permesso di superare questa criticità.

Il primo obiettivo del progetto era ottenere, usando la PCR, 2 costrutti genici che codificassero rispettivamente per il fotorecettore denominato SRI legato alla GFP20 e per quello denominato SRII legato sempre alla stessa GFP20. I costrutti erano costitutiti dalla sequenza genica del fotorecettore (HsSop1, HsSop2), dalla sequenza genica della GFP20 e da un frammento di DNA (linker) che separando le due sequenze permettesse di mantenere inalterata la funzionalità sia dei recettori che della GFP a loro legata. Dovevamo ottenere quindi un segmento di DNA codificante per HsSop1-linker-GFP20 e un altro codificante per HsSop2-linker-GFP20.

Per ottenere questi segmenti di DNA sono state eseguite su differenti plasmidi una serie di reazioni di PCR che hanno permesso di:

a) avere una sequenza di HsSop1 mancante della regione terminale

b) legare a HsSop1 così modificata la sequenza linker

c) avere una sequenza di GFP20 mancante della regione terminale

d) legare a GFP20 modificata la sequenza linker complementare

e) legare insieme queste due sequenze in modo da ottenere un unico segmento di DNA codificante per l'intera sequenza HsSop1-linker-GFP20.

La stessa procedura è stata utilizzata per ottenere la sequenza HsSop2-linker-GFP20.

Sono state provate varie sequenze per il linker, con differente numero di basi. La sequenza che ci era sembrata più adatta e che è presente nei costrutti finali codifica i seguenti 9 residui amminoacidici ASASNGASA.

Nonostante il prolungamento del periodo di permanenza in Houston non è stato da me possibile effettuare le procedure di trasferimento delle sequenze ottenute prima in *E. coli* e successivamente in *H. salinarum*.

Il progetto di ricerca comunque prosegue e ringrazio la Dr. E. Neri Spudich e il Prof. J. Spudich che hanno creduto nella validità generale del progetto di ricerca e hanno continuato a lavorarci esprimendo i costrutti in *E. coli* e in *H.salinarum*.

Referenze bibliografiche

1) Vaknin A. and Berg H.C., (2007), Physical responses of bacterial chemoreceptors. *Journal of Molecular Biology*, vol. 366

2) Kentner D., Thiem S., Hildenbeutel M. And Sourjik V., (2006), Determinants of chemoreceptor cluster formation in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, vol. 61(2)

3) N. Deiana, G. Cercignani, S. Lucia, (2007), A puzzling photobehaviour in two different strains of *Halobacterium salinarum.* "*6th European Biophysics Congress*",. *European Biophysical J.*, vol.36

4) Cercignani G., Frediani A., Lucia S. and Petracchi D., (2000), Competition-Integration of blue and orange stimuli in *Halobacterium salinarum* cannot occur solely in SRI photoreceptor. *Biophysical Journal* vol. 79

Proponente	**Usufruitore**
Giuliano Colombetti	Sabina Lucia
Giuliano Colombetti	Sabina Lucia .....