

Papel del segundo mensajero c-di-GMP en bacterias que interaccionan con plantas

Daniel Pérez-Mendoza, Lorena Romero-Jiménez, M^a José Lorite, M^a Trini Gallegos y Juan Sanjuán

Grupo de Interacciones planta-bacteria. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Granada

www.eez.csic.es/?q=es/node/29



Foto de grupo. Grupo de interacciones planta-bacteria. Daniel Pérez-Mendoza, Antonia Felipe, M^a Trini Gallegos, Lorena Romero-Jiménez, David Rodríguez, M^a José Lorite, Gabriela A. Farias, M^a Dolores Ferreiro, Joaquina Nogales, Socorro Muñoz, Juan Sanjuán (de izquierda a derecha).

Desde su descubrimiento en 1987 como regulador alostérico de la celulosa sintasa de *Gluconoacetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1991), el diguanilato cíclico o c-di-GMP ha resultado ser el más común e importante segundo mensajero en bacterias, ya que controla numerosas funciones: virulencia, motilidad, agregación, adhesión y formación de biopelículas, muchas de ellas implicadas en la interacción con organismos eucariotas (Römling *et al.*, 2013). En general, los altos niveles de c-di-GMP promueven la transición de un modo de vida mótil e individual a otro sésil y colectivo, proceso favorecido por la producción de una matriz extracelular de naturaleza polisacáridica y proteica. El c-di-GMP se sintetiza gracias a la acción de unas enzimas denominadas diguanilato ciclasas (DGC), que se caracterizan por portar dominios GGDEF que condensan dos moléculas de GTP, y es hidrolizado por fosfodiesteras

específicas (PDE) portadoras de dominios EAL ó HD-GYP (Römling *et al.*, 2013). Los niveles intracelulares de este segundo mensajero son, por tanto, el resultado de estas actividades antagónicas (DGC y PDE) en la célula. Estas enzimas que sintetizan y degradan el c-di-GMP están frecuentemente asociadas a diferentes dominios sensores, por lo que los niveles de este segundo mensajero son un reflejo de los cambios que tienen lugar en el ambiente intra- y extra-celular (primeros mensajeros) y que son percibidos por los sistemas sensoriales bacterianos. Por tanto, el c-di-GMP transduce las señales de entrada en comportamientos celulares mediante su unión a diversas moléculas efectoras: proteínas con dominios específicos de unión al c-di-GMP como los dominios PilZ ó GIL, dominios GGDEF o EAL degenerados, factores transcripcionales y motivos no codificantes del ARNm o *riboswitches* (Amikam & Galperin,

2006, Fang *et al.*, 2014, Mills *et al.*, 2011, Römling *et al.*, 2013, Ryjenkov *et al.*, 2006, Krasteva *et al.*, 2012).

Desde hace 7 años nuestro grupo de investigación está interesado en el estudio del papel que desempeña este segundo mensajero en la interacción microbio-planta, usando como modelo bacterias fitopatógenas del género *Pseudomonas* y diferentes bacterias simbióticas de leguminosas, comúnmente conocidas como rizobios. Las bacterias que interaccionan con plantas, ya sean simbióticas o patogénicas, ejercen un estricto control sobre las funciones implicadas en dicha interacción, lo cual les permite pasar de un modo de vida libre a otro en estrecha relación con su hospedador eucariota. Por tanto, no es extraño que el papel de este segundo mensajero sea crucial en nuestros modelos de estudio bacterianos y, de hecho, tanto bacterias fitopatógenas como simbióticas presentan en sus genomas una gran cantidad de genes que potencialmente codifican proteínas implicadas en la síntesis y degradación del c-di-GMP.

Desde el comienzo de esta línea de investigación, nuestro grupo ha demostrado que el c-di-GMP juega un papel crucial en la fisiología de estas bacterias, tanto en vida libre como en asociación con su planta hospedadora. Hemos demostrado que el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de una DGC heteróloga (PleD* de *Caulobacter crescentus*), aumenta la producción de diferentes expolisacáridos (EPS) bacterianos, como la celulosa y el alginato, lo que provoca a su vez un aumento de la floculación y de la formación de biopelículas en diferentes rizobios y patovares del complejo *Pseudomonas syringae*. Por el contrario, los altos niveles intracelulares de c-di-GMP generan una disminución de la motilidad dependiente de flagelo (*swarming* y *swimming*) en todas las bacterias que hasta la fecha hemos ensayado (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014a). Con respecto a la interacción con la planta hospedadora, los altos niveles intracelulares de este segundo mensajero parecen favorecer etapas tempranas de la interacción, p. ej. generando un incremento en la adhesión de *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum* a las raíces de sus respectivas plantas leguminosas, pero afectan negativamente etapas más tardías de la interacción, generando por ejemplo, una reducción de su eficiencia simbiótica (reducción de peso de la parte aérea (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014a). Estos resultados ponen de manifiesto que para el establecimiento de una interacción provechosa con la planta hospedadora es necesario un control estricto de los niveles de c-di-GMP.

En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Cayo Ramos de la universidad de Málaga y mediante esta aproximación, hemos identificado diferentes proteínas implicadas en los sistemas de transducción de señales mediados por c-di-GMP. Entre ellas, BifA (PDE) y DgcP (DGC) han demostrado jugar un papel crucial en la patogénesis de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 en plantas de olivo, afectando tanto a la adaptación de la bacteria a la planta como a su virulencia y al desarrollo de la infección (Aragón *et al.*, 2015, Aragón *et al.*, 2014). Otra colaboración con el Dr. Salmond de la Universidad de Cambridge puso de manifiesto otras DGC y PDE que han

resultado ser igualmente claves para la adhesión y patogénesis de *Pectobacterium atrosepticum* en su interacción con patata (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b, Pérez-Mendoza *et al.*, 2011a).

El estudio del papel biológico que desempeña este segundo mensajero en bacterias que interaccionan con plantas ha permitido además a nuestro grupo de investigación desarrollar proyectos científicos más aplicados. Los biopolímeros bacterianos han suscitado un interés creciente en la industria alimentaria, química, farmacéutica, sanitaria o medioambiental debido a su pureza, sus particulares características físico-químicas y la facilidad con que se obtienen con respecto a otras fuentes, como las plantas. Actualmente, estamos trabajando en estrategias biotecnológicas que permitan utilizar la regulación por c-di-GMP para incrementar la producción de biopolímeros bacterianos, tanto de origen conocido, como la celulosa (Pérez-Mendoza *et al.*, 2012), como de otros nuevos con propiedades físico-químicas novedosas e interesantes para la industria. Recientemente hemos puesto de manifiesto que altos niveles de c-di-GMP activan la producción de un EPS en *Sinorhizobium meliloti* cuya presencia no había sido previamente descrita en bacterias. Es un β -glucano de enlaces mixtos (MLG, (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015), de composición parecida a los β -glucanos presentes en cereales y ciertos líquenes, los cuales actualmente tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014b).

Las bacterias producen una amplia gama de EPS de muy variada estructura y composición, dependiendo de la cepa, el modo de vida o las condiciones ambientales en las que se encuentre. Hasta la fecha, la producción de muchos de estos EPS (celulosa, curdlan, MLG, poli N-acetilglucosamina (PNAG), alginato, Pel, Psl, así como diversos EPSs de *Vibrio* (VPS) y *Listeria*) ha demostrado ser dependiente de c-di-GMP, lo que pone de manifiesto el potencial de esta nueva línea de investigación. En este sentido, hemos puesto a disposición de la comunidad científica un conjunto de vectores para generar inserciones cromosómicas estables de una DGC con el fin de incrementar de forma controlada los niveles intracelulares de este segundo mensajero en bacterias Gram-negativas (Romero-Jiménez *et al.*, 2015).

BIBLIOGRAFÍA

- Amikam D, Galperin MY. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22: 3-6.
- Aragón IM, Pérez-Mendoza D, Gallegos MT, Ramos C. (2014). The c-di-GMP phosphodiesterase BifA is involved in the virulence of bacteria from the *Pseudomonas syringae* complex. *Mol Plant Pathol* 16: 604-15.
- Aragón IM, Pérez-Mendoza D, Moscoso JA, Faure E, Guery B, Gallegos MT, Filloux A Ramos C. (2015). Diguanylate cyclase DgcP is involved in plant and human *Pseudomonas* spp. infections. *Environ Microbiol* (en prensa).
- Fang X, Ahmad I, Blanka A, Schottkowski M, Cimdins A, Galperin MY, Römling U Gomelsky M. (2014). GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Mol Microbiol* 93: 439-52.

- Krasteva PV, Giglio KM, Sondermann H.** (2012). Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci* 21: 929-48.
- Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI.** (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol.* 13:1122-9.
- Pérez-Mendoza D, Aragón IM, Prada-Ramírez HA, Romero-Jiménez L, Ramos C, Gallegos MT, Sanjuán J.** (2014a). Responses to Elevated c-di-GMP Levels in Mutualistic and Pathogenic Plant-Interacting Bacteria. *PLoS ONE* 9: e91645.
- Pérez-Mendoza D, Coulthurst SJ, Humphris S, Campbell E, Welch M, Toth IK, Salmond GP.** (2011a). A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. *Mol Microbiol* 82: 719-33.
- Pérez-Mendoza D, Coulthurst SJ, Sanjuán J, Salmond GPC.** (2011b). N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels. *Microbiology* 157: 3340-8.
- Pérez-Mendoza D, Gallegos MT, Soto MJ, Prada-Ramírez HA, Olmedilla A., Sanjuán J.** (2012). Hiperproducción de celulosa bacteriana. In. CSIC (ed). Spain, pp.
- Pérez-Mendoza D, Rodríguez-Carvajal MA, Romero-Jiménez L, Fariás GA, Lloret J, Gallegos MT, Sanjuan J.** (2015). Novel mixed-linkage beta-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E757-65.
- Pérez-Mendoza D, Romero Jiménez L, Rodríguez Carbonell D, Rodríguez Carvajal MA, Gallegos Fernández MT, Sanjuán J.** (2014b) Método para la producción de poli-β1,3-β1,4-D-glucano. In. CSIC & U.d. Sevilla (eds). Spain, pp.
- Romero-Jiménez L, Rodríguez-Carbonell D, Gallegos MT, Sanjuán J, Pérez-Mendoza D.** (2015). Mini-Tn7 vectors for stable expression of diguanylate cyclase PleD* in Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* 15: 190.
- Römling U, Galperin MY, Gomelsky M.** (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 1-52.
- Ross P, Mayer R, Benziman M.** (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55: 35-58.
- Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, Gomelsky M.** (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281: 30310-4.