

## MAURO MARRA: CURRICULUM VITAE

-1981-Laurea in Chimica presso l'Università di Roma "La Sapienza"  
-1986-Dottorato di Ricerca in Biochimica presso L'Università di Roma "La Sapienza"  
-1987/89-Borsa di studio Enichem per lo studio strutturale di polisaccaridi da cianobatteri  
-1989/99-Ricercatore di Fisiologia Vegetale (BIO/04) presso L'università di Roma "Tor Vergata"  
-1999/01-Professore associato di Fisiologia Vegetale presso L'Università degli Studi del Sannio  
-2001/31-10-2005 - Professore ordinario di Fisiologia Vegetale presso L'Università degli Studi del Sannio di Benevento  
-1-11-2006-oggi - Professore ordinario di Fisiologia Vegetale presso L' Università di Roma "Tor Vergata"

### **L'attività scientifica di Mauro Marra ha riguardato i seguenti campi di ricerca:**

**Fitotossine:** Studio del meccanismo di azione delle fitotossine: della fusicoccina (FC), la fitotossina prodotta dal fungo *Fusicoccum amygdali* Del.; della tossina di *Cercospora beticola* (CBT) e delle fitotossine di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

**Polisaccaridi da alghe unicellulari (cianobatteri):** Nell'ambito di una ricerca volta all'individuazione e allo studio di nuovi idrocolloidi polimerici di interesse tecnologico, con caratteristiche di agenti chelanti e/o reologicamente attivi, si è occupato della determinazione della struttura del polisaccaride esocellulare di *Cyanospira capsulata*.

**Meccanismi di trasduzione del segnale nelle piante:** in particolare studio del meccanismo di regolazione della H<sup>+</sup>-ATPasi della membrana plasmatica e caratterizzazione delle proprietà biochimiche e regolative delle proteine 14-3-3.

### **Studio della biodiversità vegetale, mediante un approccio proteomico.**

**Regolazione della H<sup>+</sup>-ATPasi e proteine 14-3-3:** L'H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma è un enzima fondamentale nelle cellule vegetali; è la principale pompa ionica presente nella membrana plasmatica e svolge un ruolo centrale nella nutrizione e nella crescita della pianta. L'H<sup>+</sup>-ATPasi, estrudendo protoni dalla cellula, genera un potenziale elettrico e un gradiente di pH attraverso la membrana plasmatica; ciò rappresenta il meccanismo primario mediante il quale le cellule vegetali mantengono il pH intracellulare a valori compatibili con le attività enzimatiche. Inoltre, l'energia racchiusa nel gradiente elettrochimico costituisce la forza guida per sistema di trasporto di ioni e nutrienti, come zuccheri e amminoacidi, attraverso la membrana plasmatica. L'H<sup>+</sup>-ATPasi è anche coinvolta nella regolazione dell'apertura degli stomi, nella crescita per distensione della cellula e in numerose risposte di difesa della pianta a stress biotici e abiotici. Le numerose e importanti funzioni svolte dall'H<sup>+</sup>-ATPasi suggeriscono che la sua attività sia finemente controllata. Diversi stimoli, come ormoni, fitoregolatori, luce e fattori ambientali sono in grado di influenzare l'attività dell'enzima, anche se i meccanismi molecolari di regolazione non sono ancora pienamente chiariti. Negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi nella comprensione di tali meccanismi. E' stato dimostrato che il dominio C-terminale dell'H<sup>+</sup>-ATPasi svolge una funzione autoinibitrice sull'attività dell'enzima; inoltre, sulla base di diversi studi è stato anche proposto che eventi di fosforilazione/defosforilazione abbiano un ruolo nella regolazione dell'attività della pompa; in particolare è stato dimostrato che la H<sup>+</sup>-ATPasi è un enzima fosforilabile in vivo e in vitro e che il sito/i di fosforilazione è localizzato nel dominio autoinibitorio. Recentemente nel meccanismo di regolazione dell'H<sup>+</sup>-ATPasi è emerso il coinvolgimento delle proteine 14-3-3, una famiglia di proteine conservata negli organismi eucariotici in grado di regolare numerosi processi cellulari, come la divisione e il differenziamento cellulare, l'apoptosi e numerose vie di trasduzione del segnale. Nelle piante le proteine 14-3-3 sono coinvolte nella regolazione di enzimi del metabolismo dell'azoto e del carbonio, come la nitrato reductasi e la saccarosio-fosfato sintasi, nella regolazione della trascrizione di alcuni geni inducibili, nella senescenza, e nella risposta della pianta a condizioni di stress biotici e abiotici. Il coinvolgimento delle proteine 14-3-3 in questi processi fisiologici deriva dalla loro capacità di interagire con proteine

bersaglio modulandone l'attività. Fino ad oggi sono state identificate sia negli animali che nelle piante numerose proteine capaci di interagire con le 14-3-3 ed in molti casi è stato anche individuato il sito di legame; in base all'analisi dei siti identificati sono state proposte delle sequenze consenso contenenti serine o treonine fosforilate. Un utile strumento per la comprensione del meccanismo molecolare di regolazione dell'H<sup>+</sup>-ATPasi si è rivelato lo studio del meccanismo di azione della fusicoccina, una fitotossina fungina in grado di attivare fortemente ed in maniera irreversibile la pompa protonica. Infatti si è compreso che la fusicoccina induce il legame delle proteine 14-3-3 sul dominio C-terminale autoinibitorio dell'H<sup>+</sup>-ATPasi, provocando in questo modo il suo spiazzamento e la conseguente attivazione dell'enzima. Dato che, come si è detto, le funzioni delle proteine 14-3-3 nella cellula vegetale sono generalmente ascrivibili alla loro capacità di modulare l'attività di diversi enzimi legandosi a particolari sequenze fosforilate, abbiamo voluto verificare se le 14-3-3 potessero interagire con la pompa protonica non solo in maniera fusicoccina-dipendente ma anche in una maniera dipendente da fosforilazione e se tale interazione possa rappresentare il meccanismo fisiologico con cui l'attività dell'enzima viene regolata in vivo. L'attività di ricerca svolta nel nostro laboratorio ha permesso di dimostrare che le proteine 14-3-3 si associano all'H<sup>+</sup>-ATPasi anche in assenza di fusicoccina e che tale interazione è dipendente dallo stato di fosforilazione del dominio C-terminale dell'enzima. Inoltre è stata purificata da radici di mais una protein fosfatasi in grado di defosforilare l'H<sup>+</sup>-ATPasi e quindi di impedire la sua interazione con le proteine 14-3-3. La caratterizzazione biochimica della protein fosfatasi ha permesso di classificarla come una protein fosfatasi di tipo 2A. La ricerca di altri fattori in grado di regolare l'interazione tra l'H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma e le proteine 14-3-3 ha portato all'identificazione dell'adenosina 5'-monofosfato (5'-AMP). Abbiamo potuto infatti dimostrare che tale composto è in grado di legarsi alle proteine 14-3-3 e che tale legame determina una diminuita capacità delle 14-3-3 di interagire con l'H<sup>+</sup>-ATPasi e quindi di attivarla. Dato che i livelli di 5'-AMP nella cellula vegetale variano in risposta a determinati stress, come ad esempio l'anossia e lo stress idrico, l'effetto del 5'-AMP sull'attività dell'H<sup>+</sup>-ATPasi potrebbe rappresentare il meccanismo fisiologico con cui l'attività della pompa protonica viene regolata in risposta a tali stress. Il sito di legame dell'H<sup>+</sup>-ATPasi per le proteine 14-3-3 è stato identificato sul dominio C-terminale dell'enzima e contiene una treonina che deve essere fosforilata affinché l'interazione abbia luogo. La sequenza consenso -YpTV (pT, fosfotreonina) non presenta alcuna omologia con le altre sequenze di legame per le proteine 14-3-3 finora identificate in animali e piante. Al fine di chiarire nel dettaglio molecolare la modalità di interazione tra le proteine 14-3-3 e l'H<sup>+</sup>-ATPasi, sono stati prodotti una serie di mutanti sito-specifici delle proteine 14-3-3 e ne è stata studiata la capacità di associarsi con la pompa protonica. Al fine di comprendere il ruolo della fusicoccina in tale interazione, sono stati prodotti e analizzati anche una serie di mutanti del dominio C-terminale dell'H<sup>+</sup>-ATPasi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le mutazioni dei residui Lys 56 e Val 185 situati all'interno del solco anfitipico delle 14-3-3, ne aboliscono la capacità di associarsi alla H<sup>+</sup>-ATPasi e di stimolare l'attività fosfoidrolitica dell'enzima. Inoltre è stato dimostrato che la presenza di specifici residui carichi negativamente (Asp938; Asp940) è fondamentale per l'interazione con le proteine 14-3-3 indotta da FC. Fino ad oggi sono state descritte più di 100 proteine in grado di interagire con le 14-3-3 e tale numero è in costante aumento. L'identificazione di nuovi bersagli molecolari per le 14-3-3 fornisce un contributo importante per la comprensione del ruolo complessivo che tali proteine svolgono nelle cellule eucariotiche. Rispetto a questa tematica, è stata identificata e caratterizzata una nuova protein kinasi (ZmMPK6) di mais appartenente alla famiglia delle MAPK chinasi. La sequenza primaria ha rivelato un elevato grado di identità con membri del gruppo D di MAP chinasi vegetali. la proteina è stata espressa in E. coli e si è dimostrata in grado di autofosforilarsi e di fosforilare substrati come la myelin basic protein o gli istoni. Inoltre è stato dimostrato che tale proteina si associa in vitro alla GF14-6, una isoforma di 14-3-3 di mais e che l'interazione è dipendente da fosforilazione e non determina una variazione nella attività della chinasi. I risultati di tale lavoro rappresentano la prima evidenza di interazione nei vegetali, tra MAPK chinasi e 14-3-3. Sempre riguardo alla regolazione della pompa protonica è stato stabilito che l'H<sup>+</sup>-ATPasi nella risposta a stress da carenza di glucosio è regolata da un meccanismo di "sugar sensing" che coinvolge la fosforilazione della

regione C-terminale dell'enzima e il legame delle proteine 14-3-3. Inoltre è stato possibile dimostrare che le proteine 14-3-3 sono coinvolte nella regolazione del canale per il potassio KAT1, un altro elemento fondamentale, insieme alla H<sup>+</sup>-ATPasi, per la regolazione del trasporto ionico di membrana nelle cellule vegetali. Infine, mediante studi di caratterizzazione biochimica, è stato possibile stabilire che la regione C-terminale delle proteine 14-3-3, la quale costituisce la zona di maggiore variabilità tra differenti isoforme, è in grado di modulare l'affinità di queste proteine per l'H<sup>+</sup>-ATPasi.

**Studio della biodiversità vegetale, mediante un approccio proteomico:**

In particolare è stata presa in esame la caratterizzazione dei profili di espressione proteica, mediante elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa, di un ecotipo di elevate qualità organolettiche di pomodoro (S. Marzano) in confronto ad una varietà di riferimento durante il processo di maturazione (lavoro 1). Il Pomodoro, arrivato in Europa circa 500 anni fa, e' ancora considerato una coltura simbolo dell'Italia, in particolare della Campania. Dopo il periodo di grande crescita grazie anche alla scoperta delle tecniche di trasformazione ed inscatolamento delle industrie conserviere Italiane, come la CIRIO, negli ultimi anni la sua coltivazione in Italia sta subendo un periodo di crisi, dovuto a diversi fattori. In aggiunta, nel panorama mondiale, ditte sementiere multinazionali stanno diffondendo nuove varietà migliorate, più resistenti ai principali patogeni, adatte alla raccolta meccanizzata ed alla coltivazione moderna, ma che spesso presentano scadente qualità organolettica. Questo processo di globalizzazione rischia di perdere di vista il grande patrimonio genetico di ecotipi selezionati negli anni dagli stessi agricoltori, come ad esempio quelli campani, che presentano rinomate qualità organolettiche ma che mal si adattano ai sistemi moderni di coltivazione e sono poco resistenti alle malattie. Oggi, grazie alle nuove tecnologie in campo molecolare, genetico e biochimico e' possibile studiare, oltre la resistenza alle malattie, i processi di maturazione del frutto e capire i fattori che influenzano la qualità organolettica in senso lato. Un importante progetto per il futuro potrà essere quello di valutare l'enorme variabilità genetica presente in natura e di individuare quei geni che codificano per specifici caratteri migliorativi della qualità, allo scopo di trasferirli in varietà commerciali, mediante tecniche moderne di breeding e trasferimento genico. I risultati ottenuti hanno consentito di identificare numerose proteine, i cui livelli variano durante la maturazione in maniera specifica per l'ecotipo S.Marzano, associabili a importanti processi fisiologici e potenzialmente ad alcuni tratti nutrizionali ed organolettici. Inoltre, con un approccio metodologicamente simile è stata intrapresa la caratterizzazione delle proteine solubili presenti nella polpa di una varietà locale tipica di mela (Annurca). Anche in questo caso, per la prima volta, sono state identificate numerose proteine associabili a diverse funzioni; in particolare sono stati identificati diversi allergeni, potenziali responsabili di allergie alimentari. Infine è stato dimostrato che l'espressione in piante transgeniche di pomodoro, trasformate con un gene di difesa da patogeni di tabacco (prosystemina) è in grado di alterare in maniera significativa l'espressione proteica complessiva della pianta, risultati che confermano la necessità di un approccio proteomico nell'analisi di tessuti vegetali da piante transgeniche, nel caso di trasformazioni con proteine di signaling, per la verifica della loro "equivalenza sostanziale" rispetto a tessuti di piante non trasformate.

**MAURO MARRA: CURRICULUM VITAE**

- 1981-Degree in Chemistry– University of Rome “La Sapienza”
- 1986-Ph.D. in Biochemistry -University of Rome “La Sapienza”
- 1987/89-Fellowship from “Enichem” concernig polysaccharides from cyanobacteria.
- 1989/99-Associate Research in Plant Physiology – University of Rome “Tor Vergata”.
- 1999/01-Associate Professor of Plant Physiology -University of Sannio (Benevento).
- 2001/31-10-2005-Full Professor of Plant Physiology -University of Sannio (Benevento)
- 1-11-2006-Full Professor of Plant Physiology - University of Rome “Tor Vergata”.

Prof. Marra has been involved in the following research topics:

### **Study of the mechanism of action of Fusicoccin: regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by 14-3-3 proteins.**

Fusicoccin (FC) is a phytotoxic diterpene glucoside produced by the fungus *Fusicoccum amygdali*. This compound stimulates a number of physiological and cellular processes in different plant tissues, such as growth, seed germination, aperture of stomata, ion and nutrient uptake and hyperpolarization of transmembrane potential. Phytotoxicity results from the irreversible aperture of stomata that brings about leaf wilting. After the discovery of these effects it was hypothesized that FC action was dependent on the stimulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity, and evidence was obtained that toxin bound to plasma membrane high affinity receptors. Nevertheless the molecular mechanism of action and signalling have remained for many years unknown. The H<sup>+</sup>-ATPase is the master enzyme for the control of ion fluxes across the plasma membrane of plant cells. A number of central physiological and cellular processes such as stomata opening, phloem loading, ion and nutrient uptake, hyperpolarization of plasma membrane potential, depend on regulation of its activity. The C-terminal region of H<sup>+</sup>-ATPase protrudes in the cytosol and exerts an inhibitory effect on enzyme phosphohydrolytic activity. 14-3-3s are a family of dimeric, highly conserved, regulatory proteins, originally discovered in the bovine brain and today known to be widespread in eukaryotic organisms. A number of fundamental cellular processes are regulated by 14-3-3s, including control of cell cycle, differentiation, apoptosis, signaling and protein targeting. In plants they are involved in the regulation of carbon and nitrogen metabolism enzymes, such as nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase, in the regulation of senescence, ion transport, and plant response to environmental and pathogen stresses. The common property of 14-3-3 proteins is the ability to bind to target proteins and this accounts for their diverse regulatory functions. Most of 14-3-3-interacting proteins contain consensus sequences phosphorylated at threonine or serine residues. Results obtained by our as well other groups allowed to clarify the FC mechanism of action, the molecular bases of H<sup>+</sup>-ATPase regulation and to discover a new regulatory function of 14-3-3s in the plant cell. In fact it has been ascertained that FC induces the irreversible binding of stimulatory 14-3-3 proteins to the C-terminal autoinhibitory region of H<sup>+</sup>-ATPase, bringing about its displacement and stimulation of enzyme activity. Regulation by 14-3-3 association is a general mechanism operating also under physiological conditions, namely in the absence of FC. In this case association of 14-3-3 is reversible and regulated by the phosphorylation/dephosphorylation of a binding sequence located in the C terminus of the H<sup>+</sup>-ATPase. The binding site has been identified, it is completely unrelated to known consensus sequences and it is constituted by the last three amino acids of the C terminus where a phosphorylatable threonine is occurring. The "FC receptor" is actually the complex H<sup>+</sup>-ATPase/14-3-3 dimer. To investigate the binding properties of the 14-3-3 to the H<sup>+</sup>-ATPase, different mutants of the GF14-6, 14-3-3 isoform from maize (K56E, K56Q, K56R, V185E) have been produced and used in in vitro protein/protein interaction studies. Key residues for binding and stimulatory activity have been identified. Different endogenous factors regulating the association of the 14-3-3 to the H<sup>+</sup>-ATPase under physiological conditions have been discovered and regulation mechanism characterized, such as 5'-AMP, a protein phosphatase 2A, and starvation, through a sugar- induced transduction pathway. The role of the highly variable C-terminal region of 14-3-3 in the association with the H<sup>+</sup>-ATPase has been investigated. Results allowed to ascertain that this region exerts an autoinhibitory action on the binding of 14-3-3 to the enzyme and very likely it is a determinant of isoform specificity. Finally, it has been demonstrated that 14-3-3 are able to bind and activate the potassium channel KAT1 thus pointing to a pivotal role of this class of proteins in the regulation of ion transport in the plant cell.

### **Aspects of plant biodiversity investigated by a proteomic approach.**

Although tomato, owing also to its importance as a crop species, is actually a model system to the study of development and maturation of fleshy fruits, a detailed biochemical profiling of tomato ripening is still unaccomplished. New technologies, such as extensive EST collections, microarrays and proteomics, are allowing a global scale-gene expression analysis of plant species. In the next future, they will provide a more comprehensive view of the physiological processes associated to fruit development. A deeper understanding of these cellular events in tomato is highly desirable also in view of possible manipulations, aimed to improve organoleptic, nutritional and shelf life features. During the last years a 2-D electrophoresis and mass spectrometry procedure has been set up and applied to comparative proteomic investigation of tomato fruits from regional and commercial elite ecotypes during maturation. Several hundreds protein components were resolved on 2-DE gels. A number of proteins were recognized in each ecotype as differentially expressed during ripening and many of them were unambiguously identified by MALDI-TOF-MS and  $\mu$ LC-ESI-IT-MS/MS approaches. Identified proteins have been associated to important physiological processes such as

redox status control, stress response, energy production and signaling. Protein components differentially expressed by specific ecotypes were also identified and, in some cases, potentially related to the peculiar taste characteristics of the regional variety investigated. A systematic proteomic analysis of the protein repertoire of the mesocarp of Annurca apple, a regional variety cultivated in the South of Italy and possessing peculiar flavour and aromas characteristics has been carried out. A number of proteins related to different biochemical pathways have been identified, as well as various allergens causative of widespread food allergy syndromes. Leaves of transgenic tobacco plants expressing the defensive gene prosystemin from tomato have been characterized by a proteomic investigation. Results allowed to ascertain that the host proteomic repertoire was profoundly affected by expression of the transgene, resulting in the increased synthesis of defence-related proteins; thus suggesting that components responsible for prosystemin processing are present also in tobacco and that in the case of transformation with signaling proteins the principle of substantial equivalence of transgenic organisms must be carefully verified.