



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED ECOLOGIA

CICLO XXXV

**Biosintesi dell'acido δ^1 -pirrolin-5-carbossilico e sua riduzione a prolina:
meccanismi di regolazione in specie vegetali modello e in altri eucarioti, e possibili
applicazioni**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Pierluigi Viaroli

Tutore:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Forlani

Dottorando:

Dott. Giuseppe Sabbioni



UNIVERSITÀ DI FERRARA



UNIVERSITÀ DI FIRENZE



UNIVERSITÀ DI PARMA

**Il dottorato in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia –
XXXV ciclo è in convenzione tra le Università di
Ferrara, Firenze e Parma (sede amministrativa)**

INDICE

ABBREVIAZIONI

RIASSUNTO

ABSTRACT

1.	INTRODUZIONE.....	1
1.1	Lo stress nelle piante.....	1
1.2	Il metabolismo della prolina nei procarioti	2
1.3	Il metabolismo della prolina in lievito.....	3
1.4	Il metabolismo della prolina negli animali	5
1.5	Il metabolismo della prolina nei vegetali	6
1.6	Il ciclo della prolina	7
1.6.1	Il ciclo della prolina negli animali	8
1.6.2	Il ciclo prolina-P5C nei vegetali	10
1.7	Le funzioni della prolina	12
1.7.1	Le funzioni nei vegetali.....	12
1.7.2	Prolina come osmolita compatibile.....	13
1.7.3	Prolina come stabilizzante di enzimi e membrane.....	13
1.7.4	Prolina come <i>scavanger</i> delle ROS e antiossidante	14
1.7.5	Prolina come regolatrice dell'equilibrio redox.....	15
1.7.6	Prolina nella risposta ai patogeni	16
1.8	La P5CS vegetale	17
1.9	La P5CR vegetale	20
1.10	SCOPO DELLA TESI.....	24
2.	Caratterizzazione funzionale della P5C reduttasi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , enzima al punto di convergenza del metabolismo di prolina e arginina	26
3.	Aminoetilbisfosfonati fenil-sostituiti inibiscono la P5C reduttasi umana e manifestano attività antiproliferativa nei confronti di cellule tumorali che sintetizzano prolina ad alte concentrazioni.....	44
4.	Caratterizzazione funzionale dell'enzima δ^1 -pirroline-5-carbossilato sintetasi 2 di <i>Oryza sativa</i>	56
5.	Caratterizzazione funzionale dell'enzima δ^1 -pirroline-5-carbossilato sintetasi 1 di <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
5.1	MATERIALI E METODI.....	72
5.1.1	Espressione ectopica della P5CS di <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
5.1.2	Amplificazione del plasmide nel ceppo TOP10 di <i>E. coli</i> e sua purificazione	73
5.1.3	Preparazione delle cellule competenti.....	74
5.1.4	Trasformazione delle cellule competenti mediante il metodo dello shock termico.....	75
5.1.5	Espressione eterologa nel ceppo SoluBL21 di <i>E. coli</i>	75
5.1.6	Purificazione della AtP5CS1 mediante cromatografia ad affinità	75
5.1.6.1	Lisi cellulare.....	75
5.1.6.2	Purificazione.....	76
5.1.7	Quantificazione proteica	76

5.1.8	Separazione delle proteine mediante elettroforesi in condizioni denaturanti.....	77
5.1.9	Determinazione del peso molecolare nativo di <i>AtP5CS1</i> mediante elettroforesi in condizioni non denaturanti.....	78
5.1.10	Saggio dell'attività <i>in vitro</i> della P5CS1 di <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
5.2	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	81
5.2.1	Purificazione della P5CS1 di <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
5.2.2	Quantificazione proteica	82
5.2.3	Analisi dell'attività enzimatica	83
5.2.4	Proprietà della <i>AtP5CS1</i>	84
5.2.5	Regolazione post-traduzionale da parte di prodotti finali e intermedi.....	85
5.2.6	Regolazione da parte di sali.....	87
5.2.7	Regolazione da parte di alcuni composti azotati	87
5.2.8	Determinazione del peso molecolare nativo	88
5.3	CONCLUSIONI.....	89
6.	L'emergente ruolo della prolina nell'instaurarsi e nel funzionamento della simbiosi tra leguminosa e <i>Rhizobium</i>	91
7.	DISCUSSIONE	100
8.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	106
9.	BIBLIOGRAFIA	107
9.1	SITOGRAFIA.....	118

ABBREVIAZIONI

$O_2^{-1} \cdot$: ione superossido	<i>O. sativa</i> , <i>Os</i> : <i>Oryza sativa</i>
6xHis-tag: tag di sei istidine	OPPP: via ossidativa dei pentosi fosfati
<i>A. thaliana</i> , <i>At</i> : <i>Arabidopsis thaliana</i>	P2C: pirroline-2-carbossilato
ATP: adenosina trifosfato	P2CR: P2C riduttasi
Br ₂ PAMBPA: acido 3.5-dibromofenil-aminometilene bisfosfonico	P5C: pirroline-5-carbossilato
BSA: albumina sierica bovina	P5CDH: P5C deidrogenasi
ddH ₂ O: acqua bidistillata	P5CR: P5C riduttasi
e ⁻ : elettrone/i	P5CS: P5C sintetasi
fw: peso fresco	PAGE: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
GFP: green fluorescent protein	P _i : fosfato inorganico
GK: γ-glutamil chinasi	PM: peso molecolare
GPR: γ-glutamil fosfato riduttasi	Pro3: P5CR di lievito
GSA: glutammato semialdeide	PRODH: prolina deidrogenasi
<i>Hs</i> : <i>Homo sapiens</i>	PSI: fotosistema I
IC ₅₀ : concentrazione inibente al 50%	Put1: PRODH di lievito
IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside	Put2: P5CDH di lievito
Kat: katal (mol s ⁻¹)	PutA: proline utilization A
K _r : coefficiente di rallentamento	PYCR: P5CR umana
LB: Lauria Bertani	R _f : indice di ritenzione
<i>M. truncatula</i> , <i>Mt</i> : <i>Medicago truncatula</i>	ROS: specie reattive dell'ossigeno
NAD(P)H: Nicotinammide adenina dinucleotide (fosfato)	SDS: sodio dodecil solfato
OAT: ornitina aminotransferasi	SE: errore standard
OD: densità ottica	TAIR: <i>The Arabidopsis Information Resource</i>
$OH \cdot$: radicale ossidrilico	WT: wild-type

RIASSUNTO

Lo stress è un fattore che può influire negativamente sulle funzioni delle piante, alterandone crescita e produttività. A causa della loro natura sessile, i vegetali non sono in grado di sfuggire a tale situazione. Per questo l'evoluzione ha condotto verso lo sviluppo di alcuni meccanismi di difesa al fine di limitare i danni causati da stress biotici e abiotici.

Tra queste strategie, molte piante accumulano osmoliti compatibili all'interno delle loro cellule, come ad esempio la prolina, un iminoacido molto solubile implicato nella sintesi proteica.

Il metabolismo della prolina è un processo piuttosto conservato all'interno di quasi tutti gli organismi, sia procarioti che eucarioti, e utilizza come precursori glutammato o ornitina. Nella maggior parte degli eucarioti superiori la principale via è quella del glutammato che viene ridotto nel citosol prima a pirrolin-5-carbossilato (P5C) e poi a prolina dagli enzimi P5C sintetasi (P5CS) e P5C reductasi (P5CR). Il processo catabolico si compie invece nei mitocondri e consiste nell'azione, in sequenza, di prolina deidrogenasi (PRODH) e di P5C deidrogenasi (P5CDH), le quali ossidano la prolina a P5C ed il P5C a glutammato. Gli enzimi del metabolismo della prolina utilizzano una serie di cofattori quali NAD(P)⁺, NAD(P)H e FAD necessari per cedere o acquisire gli elettroni durante le reazioni di ossidoriduzione. È quindi facile intuire come questi processi possano avere importanti ripercussioni sull'equilibrio redox e sullo stato energetico delle cellule. Inoltre, negli animali e con grande probabilità anche nei vegetali si instaura un ciclo tra mitocondri e citosol in cui partecipano PRODH e P5CR per convertire la prolina a P5C e viceversa. Questo ciclo apparentemente futile in realtà permette di regolare i livelli di nucleotidi piridinici, la sintesi di ATP, la produzione di ROS e lo scambio di equivalenti riducenti tra i due compartimenti, risultando molto vantaggioso per l'economia cellulare.

Gli esperimenti condotti nell'ambito di questo progetto di dottorato sono stati eseguiti su sistemi modello, sia vegetali che animali. Per meglio comprendere funzioni ed implicazioni della prolina, infatti, è importante mettere a confronto tra loro sistemi differenti individuandone tutte le eventuali analogie e differenze. Per esempio, il lievito rappresenta un'eccezione rispetto alla maggior parte degli organismi poiché non accumula prolina in seguito a situazioni di stress e, ad oggi, non sono riportate evidenze relative all'esistenza del ciclo prolina-P5C in questo organismo. È stata pertanto effettuata la caratterizzazione biochimica della P5CR di *S. cerevisiae*, con particolare attenzione

verso la sua regolazione post-traduzionale. Le analisi hanno messo in evidenza il fatto che l'enzima sembra prediligere l'utilizzo di NADH come donatore di elettroni, a differenza della P5CR di *Arabidopsis* e riso, e che in presenza di concentrazioni millimolari di prolina l'attività catalitica risulta inibita. Inoltre, la mancata stimolazione da parte dei sali concorda con il fatto che in lievito lo stress osmotico non induce l'accumulo di prolina.

Ulteriori aspetti sono stati indagati per la P5CR umana. In questo caso, oltre alla caratterizzazione biochimica, si è infatti valutata la capacità di molecole di natura fosfonica di inibire l'enzima. Tali sostanze erano già state testate risultando attive nei confronti delle P5CR vegetale e batterica. La scelta di estendere l'indagine all'enzima umano deriva dal fatto che in molti tipi di tumore si riscontra un incremento nell'espressione della P5CR, che comporta un aumento di attività del ciclo P5C-prolina, favorendo lo sviluppo delle neoplasie. Quindi, attraverso questa strategia inibitoria, è stato possibile osservare le ripercussioni conseguenti all'interferenza con il ciclo e l'importanza che quest'ultimo ricopre. Testando l'inibitore su alcune linee tumorali umane è stata infatti riscontrata una riduzione della proliferazione e della vitalità cellulare.

Per la sintesi di prolina a partire da glutammato, lo step anabolico limitante è quello catalizzato dall'enzima P5CS. In molte specie vegetali superiori, tra cui *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, il gene codificante per questo enzima ha subito un processo di duplicazione, dando origine agli isoenzimi P5CS1 e P5CS2. Fino ad oggi gli studi in cui si cerca di comprendere quali siano le differenze tra i due si sono principalmente soffermati sull'analisi della loro regolazione trascrizionale. È però opportuno indagare anche le caratteristiche biochimiche di queste due isoforme, perciò nel corso di questo progetto gli enzimi P5CS1 di *Arabidopsis thaliana* (*At*) e P5CS2 di riso sono stati clonati, espressi in cellule batteriche e caratterizzati. Attraverso saggi enzimatici condotti *in vitro* è stato possibile determinare le proprietà cinetiche di entrambi gli enzimi, e la loro regolazione post-traduzionale. Le indagini sulla seconda isoforma di riso sono state portate a termine evidenziando che la prolina esogena, anche a basse concentrazioni, inibisce l'enzima, mentre la presenza di cloruri manifesta un effetto positivo sull'attività. Si ipotizza infatti che entrambi gli isoenzimi di riso siano coinvolti nell'accumulo di prolina durante lo stress osmotico, mentre in *Arabidopsis* la distinzione funzionale dovrebbe essere più netta. Per questo motivo si è deciso di proseguire gli esperimenti sugli enzimi *AtP5CS1* e *AtP5CS2*. I risultati relativi ad *AtP5CS1*, pur ancora preliminari, mostrano alcuni particolari rilevanti. Anche questa isoforma, come atteso, viene positivamente modulata dalla presenza di sali. Quel che suscita maggiore interesse però consiste nel fatto che la prolina non

esercita inibizione a feed-back, supportando l'ipotesi secondo cui questo isoenzima permetta alla pianta di continuare ad accumulare l'aminoacido durante l'esposizione a stress osmotico.

L'ultimo aspetto preso in considerazione riguarda il ruolo della prolina all'interno del processo simbiotico tra leguminose e rizobi. In alcuni casi, infatti, è stato riportato che i livelli di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina aumentano all'interno dei noduli durante la simbiosi. Con l'intento di fornire una spiegazione a questo fenomeno sono state formulate alcune ipotesi sulle implicazioni che la prolina può avere nel processo, durante il quale potrebbe per esempio fungere da substrato energetico, supportare la simbiosi in situazioni di stress o giocare un ruolo nel differenziamento dei batteroidi. Nessuna di queste teorie è stata provata in maniera definitiva, ma la comprensione di questi meccanismi potrebbe rivelarsi fondamentale per massimizzare le rese ottenibili dal processo simbiotico. Per questo motivo le informazioni riguardanti l'argomento sono state raccolte e rielaborate all'interno di una mini-review, dove sono state trattate anche le informazioni relative ad una terza isoforma di P5CS identificata in *Medicago truncatula*, la quale potrebbe rappresentare una variante leguminosa-specifica implicata nel processo simbiotico.

Nell'ambito di questo progetto di dottorato, dunque, sono state portate avanti alcune linee di ricerca al fine di ampliare le conoscenze relative ai ruoli della prolina ed alla regolazione degli enzimi coinvolti nel suo metabolismo, con l'ambizione di fornire spunti per l'elaborazione di nuove strategie utili ad ottenere varietà di piante più capaci di fronteggiare le situazioni di stress.

ABSTRACT

Stress is a factor that can negatively affect plants' functions, altering their growth and productivity. Due to their sessile nature, plants are unable to escape this situation. For this reason, evolution has led to the development of some defense mechanisms to limit the damage caused by biotic and abiotic stress conditions.

Among these strategies, many plants accumulate in the cell high concentrations of the so-called compatible osmolytes, such as proline, a very soluble imino acid involved in protein synthesis.

Proline metabolism is a conserved process within almost all organisms, both prokaryotes and eukaryotes, which uses glutamate or ornithine as precursors. In most higher eukaryotes, biosynthesis proceeds mainly from glutamate that is reduced in the cytosol to pyrroline-5-carboxylate (P5C) by P5C synthetase (P5CS); P5C is then reduced in turn to proline by P5C reductase (P5CR). The catabolic process takes place in the mitochondrion by the action, in order, of proline dehydrogenase (PRODH) and P5C dehydrogenase (P5CDH), which oxidize proline to P5C and P5C to glutamate. Proline metabolism enzymes use a series of cofactors such as NAD(P)^+ , NAD(P)H and FAD needed to provide or acquire electrons during redox reactions. It is therefore easy to understand how these processes can reflect on the redox balance and the energy state of the cells. Furthermore, in animals and very probably also in plants, a cycle is established between mitochondria and cytosol in which PRODH and P5CR catalyse the interconversion of proline to P5C. This apparently futile cycle allows for the regulation of the levels of pyridine nucleotides, the synthesis of ATP, the production of ROS, and the exchange of reducing equivalents between the two compartments, resulting very advantageous for the cellular economy.

The experiments performed in the frame of this Ph.D. project were carried out on both plant and animal model systems. To better understand the functions and implications of proline, in fact, it is important to compare different systems, identifying all possible similarities and differences. For example, yeast represents an exception compared to most other organisms since it does not accumulate proline following the exposure to stress and, to date, there is no evidence related to the existence of the proline-P5C cycle in this species. Therefore, the biochemical characterization of the P5CR of *Saccharomyces cerevisiae* was performed, with particular attention to its post-translational regulation. The analysis highlighted the fact that the enzyme seems to prefer the use of NADH as the electron donor, unlike the P5CR from *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) and rice, and that in the presence of millimolar concentrations of exogenous proline, the catalytic activity is inhibited.

Furthermore, the lack of stimulation by salts is consistent with the fact that osmotic stress does not induce proline accumulation in yeast.

Further aspects have been investigated for human P5CR. In this case, in addition to the biochemical characterization, the ability of molecules of phosphonic nature to inhibit the enzyme was evaluated. These substances had already been tested and proved to be active against plant and bacterial P5CRs. The decision to extend the investigation to the human enzyme derives from the fact that in many types of cancers, there is an increase in the expression of P5CR, which leads to an increase in the activity of the cycle between proline and P5C, favoring the development of neoplasia. Therefore, through this inhibitory strategy, it was possible to observe the repercussions resulting from the interference with the cycle and the importance that the latter covers. Testing the inhibitor on some human tumor cell lines showed in fact a reduction in cell proliferation and viability.

In the synthesis of proline from glutamate, the limiting step is the one catalyzed by the P5CS enzyme. In many higher plant species, including *A. thaliana* and *Oryza sativa* (*O. sativa*), the gene coding for this enzyme has undergone a duplication process, giving rise to the isoenzymes P5CS1 and P5CS2. To date, the studies carried out to understand the differences between them have mainly focused on the analysis of their transcriptional regulation. However, the biochemical characteristics of these two isoforms should also be investigated, therefore in this project the enzymes P5CS1 of *A. thaliana* and P5CS2 of rice were cloned, expressed in bacterial cells and characterized. Through enzymatic assays conducted *in vitro*, it was possible to determine the kinetic properties of both enzymes and the mechanisms for their post-translational regulation.

Investigations on the second isoform of rice were completed, highlighting that exogenous proline, even at low concentrations, inhibits the enzyme, while the presence of chlorides has a positive effect on the activity. It has been hypothesized that both rice isoenzymes are involved in the accumulation of proline during osmotic stress, while in *A. thaliana* they should play a more distinct functional role. For this reason, it was decided to continue the experiments on *AtP5CS1* and *AtP5CS2* enzymes. In the present project some preliminary results related to *AtP5CS1* are reported that show some relevant details. Also this isoform, as expected, is positively modulated by the presence of salts. More interestingly, proline does not exert feedback inhibition, supporting the hypothesis that this isoenzyme allows the plant to accumulate the amino acid during exposure to osmotic stress.

The last aspect taken into consideration concerns the role of proline within the symbiotic process between legumes and rhizobia. Some studies reported that the levels of some enzymes involved in proline metabolism increase inside the nodules during symbiosis. To explain this phenomenon,

some hypotheses have been formulated on the implications that proline can have in the process, during which it could act as an energy substrate, support symbiosis in stressful situations, or play a role in the differentiation of bacteroids. None of these theories has been conclusively proven, but understanding these mechanisms could prove fundamental to maximize the yields obtainable from the symbiotic process. For this reason, information relating to the topic was collected and presented in a mini-review, where informations relating to a third isoform of P5CS identified in *Medicago truncatula* were also reported, which could represent a specific leguminous variant involved in the symbiotic process.

Within this doctoral project, therefore, some research lines have been carried out to broaden our knowledge relating to the roles of proline and the regulation of the enzymes involved in its metabolism, with the aim to provide new ideas toward the development of new plant varieties more able to cope with stressful situations.

1. INTRODUZIONE

1.1 Lo stress nelle piante

Il termine stress è definibile come un evento temporale che può modificare negativamente le funzioni della pianta, ripercuotendosi su crescita e produttività. Lo stress ambientale può essere sia di natura biotica (erbe infestanti, organismi patogeni, insetti fitofagi e animali erbivori) che abiotica (carenza o eccesso di nutrienti, sali, temperatura, acqua e radiazione luminosa). La natura sessile dei vegetali impedisce loro di fuggire alle situazioni sopracitate, perciò attraverso l'evoluzione sono state sviluppate diverse strategie di difesa per limitare i danni dovuti all'ambiente sfavorevole. Nonostante le risposte ad alcuni tipi di stress siano già state descritte dettagliatamente, in altri casi l'identificazione del meccanismo sensoriale che permette di trasdurre il segnale esterno in una risposta biologica risulta ancora non completamente definito (Lamers et al., 2020).

In generale, le piante reagiscono alle situazioni ambientali sfavorevoli con una serie di modificazioni che impattano su ciclo e divisione cellulare, ma anche a livello strutturale, biochimico e molecolare. Tra le risposte più frequenti agli stress abiotici vi è l'accumulo di osmoliti compatibili (Kishor et al., 2005). Gli osmoliti compatibili sono piccoli soluti utilizzati dalle cellule per mantenere il proprio volume quando, per esempio, si trovano in situazioni di carenza idrica, provocando l'aumento della pressione osmotica interna e limitando quindi la perdita di liquidi. Esempi di questi soluti sono zuccheri, polioli, metilammine, aminoacidi e loro derivati. Il termine "compatibile" indica che non manifestano effetti perturbanti verso attività e strutture delle macromolecole (Yancey, 2005).

Tra gli osmoliti compatibili più diffusi troviamo la prolina. Essa è un iminoacido molto solubile, non polare, non tossico, inodore, implicato nella sintesi proteica (Patriarca et al., 2021). Dal punto di vista chimico-strutturale è un'ammina secondaria caratterizzata dalla presenza di due atomi di carbonio legati all'azoto amminico a formare un anello eterociclico (Trovato et al., 2019). Queste sue caratteristiche, oltre a renderla un ottimo osmolita, le permettono di ricoprire importanti ruoli nella determinazione strutturale delle proteine, influenzandone stabilità ed assemblaggio, ma non solo. Essa infatti risulta coinvolta in numerosi altri contesti quali crescita, sviluppo, protezione dai radicali liberi, fioritura, regolazione dell'equilibrio redox, riproduzione e sviluppo embrionale (Trovato et al., 2019).

Le tipologie di stress che ne causano l'accumulo sono molteplici, come ad esempio bassa disponibilità idrica, eccessiva presenza di sali nel terreno, temperature avverse, congelamento, infezioni patogene, carenza di nutrienti e contaminazioni da metalli pesanti (Hare & Cress, 1997;

Trovato et al., 2019; Verbruggen & Hermans, 2008). Tale accumulo deriva principalmente dall'aumentata sintesi di prolina a fronte della sua ridotta degradazione all'interno delle cellule (Verbruggen & Hermans, 2008), ma concorrono anche una riduzione del suo utilizzo per la sintesi di nuove proteine (Boggess & Stewart, 1980) e l'incremento del turnover proteico per riottenere l'aminoacido in forma libera (Fukutoku & Yamada, 1984).

1.2 Il metabolismo della prolina nei procarioti

Nella maggior parte dei batteri la sintesi di prolina avviene a partire dal glutammato e coinvolge 3 diversi enzimi: γ -glutamil chinasi (GK, EC 2.7.2.11), γ -glutamil fosfato reduttasi (GPR, nota anche come glutammato semialdeide deidrogenasi, EC 1.2.1.41) e δ^1 -pirrolin-5-carbossilato reduttasi (P5CR, EC 1.5.1.2). In *Escherichia coli* ma anche in altri membri delle *Enterobacteriaceae* essi sono codificati dai geni *proB*, *proA* e *proC*, rispettivamente (Aral & Kamoun, 1997; Fichman et al., 2015). Più nel dettaglio, il primo enzima ad intervenire è la GK che, utilizzando come co-fattore ATP, fosforila il glutammato in posizione 7, generando γ -glutamil fosfato che in successione viene ridotto a glutammato semialdeide (GSA) dalla GPR che sfrutta come donatore di elettroni il NADPH (Aral & Kamoun, 1997; Trovato et al., 2019). L'attività chinasi risulta essere lo step catalitico limitante per la velocità di sintesi di prolina e, in batteri ed eucarioti, subisce una regolazione a feed-back negativo da parte di quest'ultima (Hu et al., 1992; Zhang et al., 1995). Nel caso specifico dei batteri, è stato dimostrato che la GK di *E. coli* viene positivamente regolata da parte del glutammato ma, all'aumentare della concentrazione di prolina, questa va a competere con il substrato suggerendo che l'enzima sia in grado di legare entrambe le molecole (Fichman et al., 2015).

Una volta ottenuta la GSA, questa va incontro ad una conversione spontanea e reversibile in pirrolin-5-carbossilato (P5C), forma ciclica con la quale stabilisce un equilibrio che risulta influenzato dal pH intracellulare: se superiore a 6.5, viene favorita la conformazione ciclica (Tanner, 2008). Infine, a completare la via biosintetica, interviene la P5CR servendosi di un'ulteriore molecola di NAD(P)H per ridurre il P5C a prolina (Fichman et al., 2015; Hayzer & Leisinger, 1980).

In alcuni batteri una via alternativa per la sintesi di prolina utilizza come precursore l'ornitina, un intermedio della biosintesi dell'arginina sintetizzato anch'esso a partire dal glutammato, attraverso cinque reazioni. Gli enzimi di *E. coli* coinvolti in esse sono *argA* (EC 2.3.1.1), *argB* (EC 2.7.2.8), *argC* (EC 1.2.1.38), *argD* (EC 2.6.1.11) e *argE* (EC 3.5.1.16), che catalizzano reazioni di acetilazione, fosforilazione, riduzione, transaminazione e deacetilazione, rispettivamente. In alternativa, l'ornitina può essere ricavata anche dall'idrolisi dell'arginina catalizzata dall'enzima arginasi (EC

3.5.3.1). Questa seconda via prevede l'intervento dell'enzima ornitina ciclodeaminasi (EC 4.3.1.12), che sfruttando come cofattore il NAD⁺ rimuove il gruppo α -amminico dell'ornitina e ne induce la ciclizzazione per ultimarne la conversione in prolina (Jensen & Wendisch, 2013; Trovato et al., 2019). Glutammato ed ornitina, anche se per mezzo di enzimi differenti, possono essere impiegati come precursori della sintesi di prolina anche dalle cellule eucariotiche ma, a differenza di queste ultime, nei procarioti esiste una terza via biosintetica. Quest'ultima coinvolge il pirrolin-2-carbossilato (P2C) sintetizzato anch'esso partendo dall'ornitina, la quale viene convertita dall'enzima ornitina α -aminotransferasi (α OAT, EC 2.6.1.68) in α -keto- δ -aminovalerato, che spontaneamente ciclizza in P2C. Infine una P2C reduttasi (P2CR, EC 1.5.1.1) NADPH-dipendente riduce il P2C in prolina (Fichman et al., 2015). Nonostante che in passato sia stata ipotizzata l'esistenza di un gene codificante per la P2CR anche in alcune piante (Mestichelli et al., 1979), al momento si esclude che possa partecipare al processo di sintesi di prolina. Infatti questo ipotetico gene vegetale non è mai stato caratterizzato dal punto di vista molecolare e il risultato dell'allineamento con il gene procariotico rivela alcune ambiguità (Trovato et al., 2019).

Per quanto riguarda il catabolismo, nei batteri la prolina viene ossidata a glutammato attraverso 2 step enzimatici. Nel primo di questi interviene la prolina deidrogenasi (PRODH, EC 1.5.5.2) che trasferisce gli elettroni dalla prolina al FAD, ossidandola a GSA che, come già accennato, in soluzione è in equilibrio con il P5C. La seconda reazione viene catalizzata dalla P5C deidrogenasi (P5CDH, EC 1.2.1.88) che, sfruttando NAD(P)⁺ come accettore di elettroni, ossida il P5C a glutammato. I due enzimi appena citati sono altamente conservati in quasi tutte le specie ma a volte le attività prolina- e P5C-deidrogenasica sono presenti su un unico enzima bifunzionale denominato "proline utilization A" (PutA). Questo accade in specie come *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas putida* nelle quali, oltre ad essere coinvolto nella degradazione della prolina, PutA svolge anche una terza funzione, che consiste nel reprimere la sua stessa espressione andando ad interagire con specifiche sequenze di DNA intergenico (Tanner, 2008).

1.3 Il metabolismo della prolina in lievito

Come illustrato nella figura 1, in *Saccharomyces cerevisiae* la sintesi di prolina avviene nel citosol a partire dal glutammato seguendo la stessa via metabolica descritta per i procarioti: la GK e la GPR, codificati rispettivamente dai geni *Pro1* e *Pro2*, fosforilano e riducono il glutammato in GSA/P5C (Aral & Kamoun, 1997). L'omeostasi viene garantita dal controllo trascrizionale di questi due geni e

Pro1, analogamente alla GK di *E. coli*, è soggetto a feed-back negativo da parte del prodotto finale della via, la prolina, limitando quindi il suo accumulo (Takagi, 2008).

Anche nelle cellule di lievito la presenza di glutammato non è indispensabile per la sintesi di P5C. Analogamente ai batteri, infatti, essa può avvenire a partire dall'intermedio di sintesi/degradazione dell'arginina bypassando le reazioni catalizzate da GK e GPR (Aral & Kamoun, 1997). In lievito, l'arginasi è codificata dal gene *CAR1* e idrolizza l'arginina in ornitina, che in questo caso entra nei mitocondri dove viene convertita a GSA/P5C dall'ornitina δ -aminotransferasi (δ OAT, EC 2.6.1.13) utilizzando come co-fattore il piridossal-5-fosfato (Takagi, 2008; Trovato et al., 2019). Quest'ultima via però risulta bloccata quando nella cellula sono disponibili fonti di azoto preferibili come ammonio, glutammina o asparagina, condizione in cui interviene il sistema di repressione del catabolismo dell'azoto, facendo sì che la via del glutammato prenda il sopravvento (ter Schure et al., 2000). Una volta ottenuto il P5C, la P5CR di lievito (Pro3) catalizza l'ultima reazione di riduzione nel citosol che, sfruttando come donatore di elettroni il NAD(P)H, permette di ottenere il composto finale: la prolina (Takagi, 2008).

Quando nella cellula di lievito l'aminoacido raggiunge alte concentrazioni, viene indotta la via catabolica. A differenza dei procarioti, negli eucarioti questo processo viene compartimentalizzato all'interno dei mitocondri ma consiste nelle stesse reazioni, catalizzate dalla PRODH e dalla P5CDH in successione (Brandriss & Magasanik, 1979). In *S. cerevisiae*, questi due enzimi prendono il nome di Put1 e Put2, rispettivamente. I geni che li codificano si trovano sotto il controllo trascrizionale di Put3, che risulta costitutivamente legato ai loro promotori inducendone l'espressione, ma raggiunge i massimi livelli quando nella cellula si registrano alte concentrazioni di prolina e ridotta disponibilità di sorgenti azotate migliori (Huang & Brandriss, 2000). Un altro induttore dell'espressione di questi geni è rappresentato dal "controllo generale degli aminoacidi", il quale si attiva nel momento in cui un qualsiasi aminoacido risulta carente nella cellula interagendo con i geni responsabili della rispettiva biosintesi. Put3, invece, pare non essere soggetto ad alcun tipo di regolazione (Brandriss & Falvey, 1992).

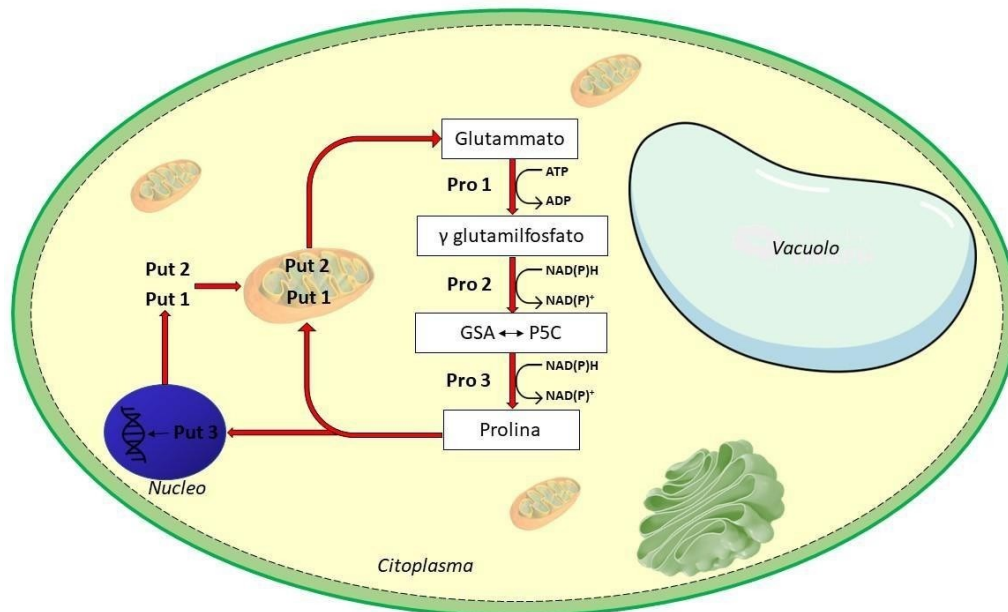


Figura 1. Il metabolismo della prolina nella cellula di lievito. L'immagine illustra le reazioni e gli enzimi che caratterizzano il metabolismo della prolina in lievito, riportando la via di sintesi che utilizza come precursore il glutammato. Viene inoltre evidenziato il ruolo di Put3 nel controllo trascrizionale dei geni *Put1* e *Put2*.

1.4 Il metabolismo della prolina negli animali

La sintesi di prolina negli animali è cellulo-, tessuto- e specie-specifica e, come negli organismi descritti sino ad ora, può utilizzare come precursori sia il glutammato che l'ornitina. Nei mammiferi, i tessuti deputati a questo compito sono principalmente quello mammario, intestinale, epatico e renale (Wu et al., 2011).

La via che sfrutta come precursore l'ornitina è analoga a quella descritta per il lievito, in cui questo aminoacido funge da substrato per l'enzima mitocondriale δ OAT, il quale catalizza il trasferimento del gruppo δ -amminico dell'ornitina all' α -ketoglutarato, ottenendo GSA (e quindi P5C) (Wu et al., 2008).

Per quanto riguarda la via del glutammato, lo stesso prodotto si ottiene mediante l'intervento dell'enzima P5CS (EC 2.7.2.11), codificato dal gene *P5CS*. A differenza di procarioti e lieviti, questo enzima è bifunzionale ed è quindi in grado di catalizzare entrambe le prime reazioni della via: attraverso il dominio N-terminale, sfruttando come co-fattore l'ATP, fosforila il glutammato a γ -glutamil fosfato che in successione viene ridotto a GSA dal dominio C-terminale con spesa di NAD(P)H (Fichman et al., 2015).

Le due vie sopradescritte convergono nella fase finale, ovvero nella riduzione del P5C neoformato in prolina. A questo scopo interviene l'enzima P5CR (Aral & Kamoun, 1997). A differenza degli

organismi descritti fino ad ora, però, la localizzazione di questo enzima può variare. In *Homo sapiens*, infatti, sono state individuate tre isoforme di P5CR: PYCR1, PYCR2 e PYCR3 (o PYCRL). Le prime due si localizzano a livello mitocondriale e sono maggiormente coinvolte nella sintesi di prolina a partire da glutammato, mentre la terza è citoplasmatica e come substrato utilizza principalmente il P5C derivante dall'ornitina (Fichman et al., 2015).

La degradazione ha luogo nei mitocondri ed inizia con l'ossidazione della prolina a P5C, reazione catalizzata dalla PRODH che sfrutta il FAD come cofattore. Quest'ultimo, acquisendo elettroni dalla prolina, si riduce a FADH₂ che può essere impiegato per rifornire la catena di respirazione mitocondriale per la sintesi di ATP. Al contempo, però, gli elettroni possono essere ceduti direttamente all'ossigeno generando ione superossido e quindi favorire la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Phang, 2021). In seguito, anche negli animali la via catabolica prevede una seconda reazione di ossidazione mediata dall'enzima P5CDH, il quale converte il P5C a glutammato. In questo caso la molecola che interviene come cofattore è il NAD⁺ che, acquisendo l'elettrone dal P5C, si riduce a NADH (Tanner, 2008).

Negli animali e nell'uomo, l'intero processo può avere importanti ripercussioni su tutto il metabolismo cellulare ed è implicato sia in contesti fisiologici che patologici.

1.5 Il metabolismo della prolina nei vegetali

Anche nelle piante la sintesi di prolina può avvenire utilizzando come precursori glutammato e ornitina (figura 2). Per scoprire quale delle due vie fosse la principale, sono state condotte ricerche *in vivo* utilizzando precursori radiomarcati. Dai risultati è emerso che in condizioni di elevata biodisponibilità di azoto la pianta predilige come precursore l'ornitina, mentre in seguito a situazioni di stress osmotico la via di sintesi preferenziale è quella che parte dal glutammato (Delauney & Verma, 1993; Morris et al., 1969). Indagini più recenti però mettono in discussione questa teoria e, almeno per quanto riguarda *A. thaliana*, la via che per mezzo dell'enzima δ OAT converte l'ornitina in GSA sembrerebbe assumere un ruolo più marginale. Stando a ciò, nei vegetali la sintesi di prolina potrebbe avvenire principalmente o esclusivamente a partire dal glutammato, mentre la via dell'ornitina sarebbe importante per mobilitare le risorse accumulate o trasportate sotto forma di arginina al fine di rifornire la cellula di azoto (Funck et al., 2008).

Negli organismi fotosintetici superiori la prima reazione di riduzione del glutammato a GSA avviene nel citosol ed è catalizzata dall'enzima P5CS che, come negli animali, è bifunzionale e utilizza come cofattori ATP e NADPH. In soluzione acquosa e pH fisiologico la GSA stabilisce un equilibrio che

favorisce l'assunzione della sua conformazione ciclica, il P5C (Fichman et al., 2015, Aral & Kamoun, 1997; Trovato et al., 2019). A concludere la via, sempre all'interno del citosol, interviene l'enzima P5CR che riduce il P5C a prolina sfruttando anche in questo caso il NAD(P)H come donatore di potere riducente.

Come in tutti gli eucarioti, il catabolismo della prolina nelle cellule vegetali ha luogo nei mitocondri ed inizia con l'ossidazione FAD-dipendente della prolina a P5C, catalizzata dalla PRODH, a cui segue una seconda reazione di ossidazione mediata dall'enzima P5CDH per convertire il P5C a glutammato (Lehmann et al., 2010).

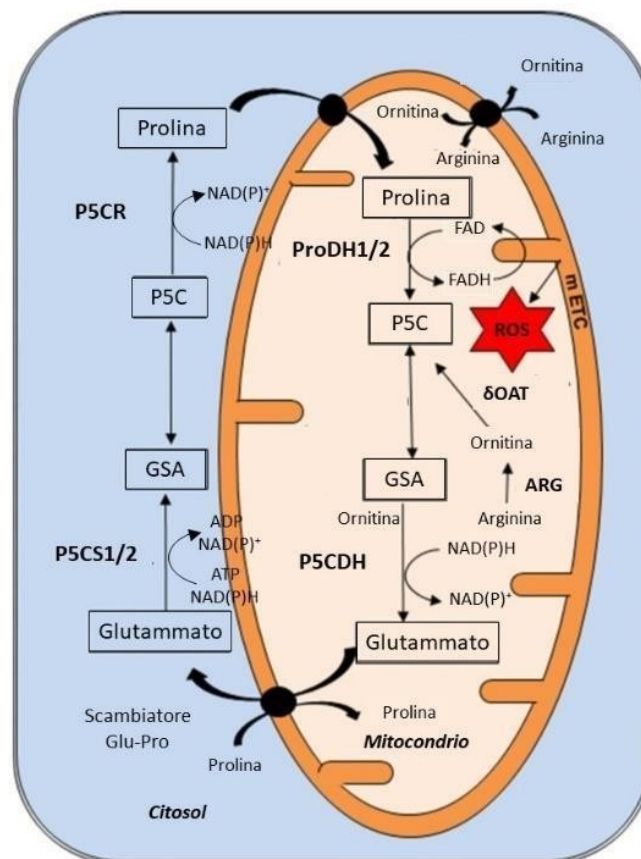


Figura 2. Il metabolismo della prolina nella cellula vegetale. L'immagine illustra le reazioni e gli enzimi che caratterizzano il metabolismo della prolina nella cellula vegetale. Sono riportate sia la via del glutammato che dell'arginina/ornitina. Riguardo al catabolismo, si evidenzia la cessione di elettroni alla catena di trasporto mitocondriale mediata dal FADH, processo che può portare alla produzione di ROS (Qamar, 2015).

1.6 Il ciclo della prolina

Già quarant'anni fa furono prese in considerazione le implicazioni che l'interconversione di P5C e prolina può avere sul metabolismo cellulare (Phang, 1985).

Come riportato in precedenza, in situazioni di stress la maggior parte degli organismi tende ad accumulare prolina all'interno delle cellule (Hare & Cress, 1997; Trovato et al., 2019; Verbruggen &

Hermans, 2008). Nonostante ciò, quando questo aminoacido viene fornito esogenamente, risulta tossico già a concentrazioni millimolari favorendo l'induzione della morte cellulare programmata (Hellmann et al., 2000; Maxwell & Davis, 2000). Per quanto riguarda le piante, tale suscettibilità aumenta in mutanti difettivi per gli enzimi deputati al catabolismo della prolina mentre diminuisce in mutanti che sovraesprimono gli stessi (Miller et al., 2009).

Prendendo in considerazione i lieviti, è stato osservato che la sovraespressione di PUT1 (PRODH) aumenta l'apoptosi indotta dalla prolina esogena ed in mutanti difettivi per PUT2 (P5CDH) si rileva una maggior produzione di ROS. Da ciò si è giunti alla conclusione che l'effetto tossico conseguente al trattamento con prolina esogena potrebbe essere dovuto all'accumulo di elevate concentrazioni di P5C (Nomura & Takagi, 2004), ipotesi che è stata estesa anche ai vegetali (Deuschle et al., 2004; Hellmann et al., 2000).

Al fine di limitare l'eccessivo accumulo di P5C risultante dall'ossidazione della prolina, l'evoluzione ha portato alcuni organismi come piante ed animali a sviluppare una strategia che consenta loro di ridurre in tempi brevi il P5C a prolina nel citosol, rendendola poi nuovamente disponibile nel mitocondrio come substrato per la PRODH. Si instaura così un ciclo apparentemente futile ma indispensabile per mantenere il giusto rapporto tra l'aminoacido ed il suo intermedio e far fronte a situazioni di stress (Miller et al., 2009).

1.6.1 Il ciclo della prolina negli animali

Il "ciclo della prolina" è stato caratterizzato per la prima volta negli organismi animali ed è implicato in numerosi contesti, sia fisiologici che patologici (Miller et al., 2009; Phang et al., 1980; Yoon et al., 2004).

Come rappresentato nella figura 3, l'inizio del ciclo coincide con il primo step di ossidazione della prolina a P5C catalizzato all'interno del mitocondrio dalla PRODH che utilizza il FAD come accettore di elettroni. Il P5C neo-formato, anziché essere ulteriormente ossidato a glutammato per completare la via catabolica, può essere nuovamente ridotto a prolina dalla P5CR NAD(P)H-dipendente (Christensen et al., 2020; Fichman et al., 2015; Yoon et al., 2004).

L'esistenza del ciclo della prolina all'interno delle cellule animali è stata ampiamente discussa e dimostrata attraverso numerosi esperimenti. Dai risultati delle analisi emerge che questo processo consente di regolare i livelli di nucleotidi piridinici e, attraverso il trasferimento di elettroni alla catena di trasporto mitocondriale mediato dalla PRODH ed il suo cofattore FAD, promuove la sintesi di ATP e la produzione di ROS. Nonostante in questi organismi, grazie all'espressione di PYCR1 e

PYCR2, il processo possa compiersi interamente nel mitocondrio, i risultati sperimentali evidenziano che il ciclo della prolina favorisce anche lo scambio di equivalenti riducenti tra mitocondri e citosol senza che vi sia alcun trasferimento netto di molecole carboniose tra i due compartimenti, risultando molto vantaggioso per l'economia cellulare. Affinché questo sia possibile è però necessario che il P5C attraversi la membrana mitocondriale per raggiungere il citosol dove è presente PYCRL, ma ad oggi non è ancora stato individuato il trasportatore deputato a questo scopo (Christensen et al., 2020; Phang, 2021).

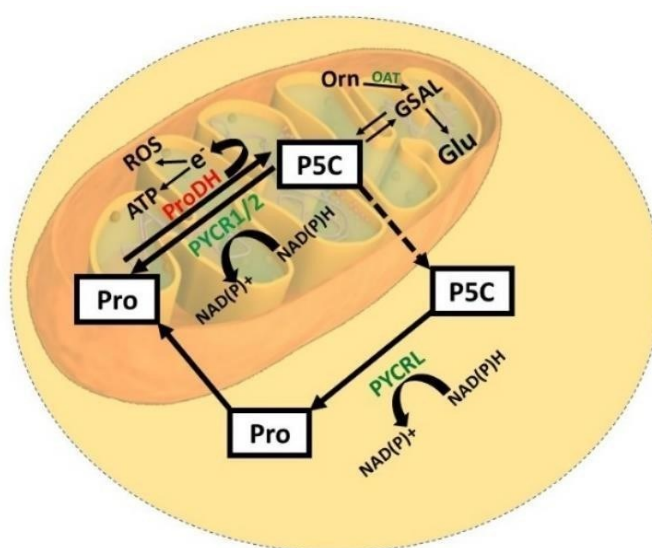


Figura 3. Il ciclo della prolina nelle cellule animali. Nel mitocondrio delle cellule animali, il P5C derivante dall'ossidazione della prolina può fungere da substrato per gli enzimi PYCR1 e PYCR2 venendo nuovamente ridotto a prolina. In questo modo si genera un ciclo che alimenta la catena respiratoria di elettroni (e^-), promuovendo la sintesi di ATP e la produzione di ROS. Grazie ad un trasportatore specifico (non ancora caratterizzato) il P5C può inoltre uscire dal mitocondrio per essere ridotto a prolina dalla PYCRL, favorendo lo scambio di equivalenti riducenti tra i due compartimenti.

Nei mammiferi la prolina è implicata anche nei tumori. Come è noto, lo sviluppo tumorale comporta una riprogrammazione di tutto il metabolismo cellulare al fine di poter soddisfare le aumentate richieste di ATP, molecole carboniose e potere riducente conseguenti all'intensificata attività proliferativa (Ding et al., 2020; Xiao et al., 2020). In questo contesto la prolina assume un ruolo rilevante per poter sostenere la sintesi di nuove proteine e collagene, ma il maggior contributo che l'aminoacido fornisce al processo tumorigenico sembra correlato al suo metabolismo ed in particolar modo al ciclo che instaura con il P5C (D'Aniello et al., 2020; Tanner et al., 2018).

Consentendo il trasferimento di equivalenti riducenti dal citosol ai mitocondri e garantendo una maggior sintesi di ATP, infatti, il ciclo della prolina può fornire supporto allo sviluppo tumorale

(Hagedorn & Phang, 1983; Launay et al., 2019; Phang, 1985). Inoltre, anche se attraverso meccanismi non del tutto noti, l'aumentata produzione di ROS derivante dall'attività della PRODH contribuisce anch'essa alla cancerogenesi, interferendo con processi di apoptosi e autofagia (Hu et al., 2007; Huynh et al., 2020; Zareba et al., 2017). In molte neoplasie è stato infatti riportato che l'espressione di P5CR e PRODH risulta alterata, soprattutto nelle fasi in cui le richieste cellulari aumentano come per esempio durante il processo metastatico (Ding et al., 2020; Maxwell & Rivera, 2003; Weijin et al., 2019; Xiao et al., 2020). In quest'ottica, sia PRODH che P5CR rappresentano due potenziali bersagli per la terapia del cancro (Tanner et al., 2018).

1.6.2 Il ciclo prolina-P5C nei vegetali

Nelle cellule vegetali, a differenza di quelle animali, la P5CR non si localizza all'interno dei mitocondri ma solamente nel citosol (Funck et al., 2012). Di conseguenza, per garantire il compimento del ciclo appena descritto è necessario che il P5C prodotto nella matrice mitocondriale dalla PRODH fuoriesca nel citosol per essere nuovamente ridotto dalla P5CR NAD(P)H-dipendente a prolina, che può quindi tornare nel mitocondrio (figura 4). A differenza della membrana mitocondriale esterna, permeabile a numerose molecole, la membrana che delimita la matrice risulta molto selettiva e per consentire la fuoriuscita del P5C è necessario l'ausilio di un carrier specifico che, ad oggi, non è ancora stato identificato (Miller et al., 2009).

Ciononostante, l'ipotesi che anche nei vegetali la prolina prenda parte a questo ciclo è stata parzialmente confermata dagli studi di Miller e collaboratori nel 2009. In questo lavoro è stata indotta la sovraespressione della PRODH sia in tabacco che *Arabidopsis*, al fine di favorire l'ossidazione della prolina a P5C. Sorprendentemente, quando le piante transgeniche sono state sottoposte a vari tipi di stress, il contenuto di prolina non è risultato inferiore rispetto a quello rilevato in piante *wild-type* (WT) sottoposte alle stesse condizioni. Al contempo, i livelli di P5C non aumentano e la sensibilità agli stress idrico e salino non subisce particolari variazioni. Questi risultati possono essere spiegati dal fatto che dopo la sua sintesi nei mitocondri, accelerata dalla sovraespressione della PRODH, il P5C viene immediatamente trasferito e ridotto a prolina nel citosol, consentendo il mantenimento del rapporto tra i due composti (Miller et al., 2009).

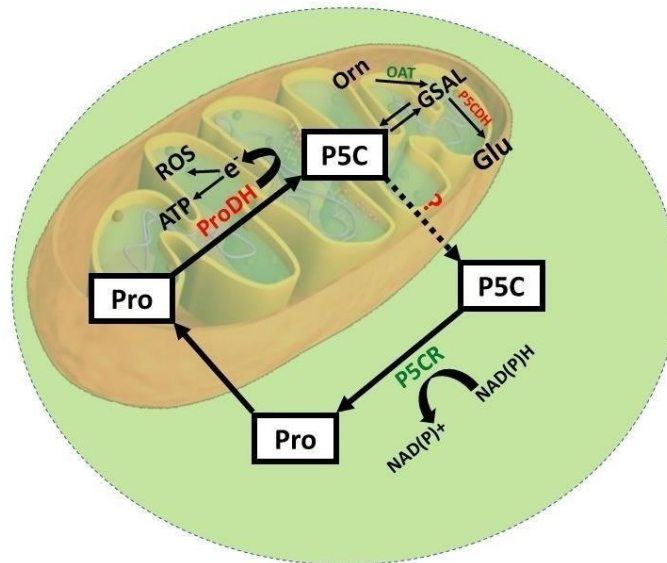


Figura 4. Il ciclo prolina-P5C nelle cellule vegetali. Nel mitocondrio, la prolina viene ossidata a P5C dalla P5CDH, processo che rifornisce di elettroni (e^-) la catena respiratoria favorendo la sintesi di ATP. Per completare il ciclo, il P5C dovrebbe fuoriuscire dal mitocondrio per essere nuovamente ridotto dalla P5CR nel citosol.

Per fornire supporto all'ipotesi di esistenza di questo ciclo sono state condotte ulteriori analisi utilizzando piante di *Arabidopsis p5cdh*, incapaci dunque di ossidare il P5C a glutammato. In seguito ad esposizione a stress idrico, i mutanti accumulano prolina in maniera del tutto analoga al WT. In fase di recupero post-stress, ovvero quando aumenta l'espressione di PRODH per riutilizzare la prolina non più necessaria per la compensazione osmotica, la concentrazione di questo aminoacido rimane elevata nei mutanti, all'interno dei quali ancora una volta i livelli di P5C non aumentano e nemmeno dei suoi potenziali prodotti (glutammato, arginina e ornitina). Con i risultati di questi esperimenti si evidenzia dunque che, nonostante l'assenza della P5CDH, con elevata probabilità le cellule siano in grado di limitare l'accumulo di P5C riducendolo nuovamente a prolina mettendo in atto il ciclo tra mitocondri e citosol (Miller et al., 2009).

Quando questo processo è attivo in maniera sostenuta, come accade per esempio nelle linee che sovraesprimono la PRODH, la catena di trasporto mitocondriale riceve un'elevata quantità di elettroni da questo enzima FAD-dipendente che in parte tendono ad essere acquisiti dall'ossigeno, promuovendo quindi la formazione di ROS. È in questo momento che entra in gioco la P5CDH, l'enzima deputato all'ossidazione del P5C a glutammato e che quindi sottrae parte del substrato necessario per il compimento del ciclo. In accordo a ciò, mutanti *p5cdh* producono maggiori quantità di ROS rispetto ai WT. Quindi, seppur non direttamente coinvolta all'interno del ciclo prolina-P5C, la P5CDH assume un importante ruolo regolatorio nei confronti di quest'ultimo contribuendo a

controllare l'equilibrio redox nei mitocondri e prevenendo la sovrapproduzione di ROS (Miller et al., 2009).

1.7 Le funzioni della prolina

Come menzionato precedentemente, la prolina svolge molteplici funzioni all'interno delle cellule ed è per questo motivo che viene comunemente definita "aminoacido multifunzionale" (Szabados & Savaouré, 2010). Nei batteri, infatti, è stata ampiamente dimostrata una relazione causale tra accumulo di prolina e resistenza agli stress salini e ciò ha portato all'assunzione che anche nelle piante stressate l'accumulo di questo aminoacido svolgesse funzioni protettive (Csonka et al., 1988; Szabados & Savaouré, 2010). In realtà, per i vegetali la relazione non è così evidente e vi sono alcune incongruenze. Per esempio, esperimenti condotti su mutanti di *Arabidopsis* rivelano che la sovrapproduzione di prolina comporta ipersensibilità al sale ed alle basse temperature (Liu & Zhu, 1997; Xin & Browse, 1998). In varietà di riso tolleranti alla siccità, invece, l'accumulo di prolina ha conseguenze positive. Ciò nonostante, è evidente che il metabolismo di questo aminoacido manifesta una complessa serie di effetti sullo sviluppo delle piante e sulla loro risposta allo stress (Szabados & Savaouré, 2010). Il coinvolgimento del metabolismo della prolina è stato infatti ipotizzato in una serie di funzioni tra le quali l'eliminazione di radicali liberi, il *signaling* molecolare, la regolazione dell'equilibrio redox, la morte cellulare programmata, lo sviluppo, la risposta ai patogeni e la sintesi di metaboliti secondari (Trovato et al., 2019). Nell'uomo la prolina è coinvolta in numerosi contesti, come regolazione del metabolismo e della fisiologia cellulare, guarigione delle ferite, reazioni antiossidanti e risposta immunitaria (Wu et al., 2008). Dal punto di vista patologico, mutazioni a livello dei geni deputati alla sua sintesi o degradazione sono causa di patologie genetiche rare, ed in vari tipi di tumori si riscontrano alterazioni del suo metabolismo (Geng et al., 2021; Pérez-Arellano et al., 2010).

1.7.1 Le funzioni nei vegetali

Nella maggior parte dei vegetali sottoposti a stress, si riscontra un accumulo di prolina all'interno delle loro cellule (Szabados & Savaouré, 2010). L'aumentata concentrazione di questo aminoacido può dipendere da molteplici fattori quali aumentata biosintesi, ridotto catabolismo, trasporto aminoacidico intra/intercellulare e degradazione proteica (Trovato et al., 2019). Questo accumulo avviene soprattutto nei tessuti fotosinteticamente attivi, in particolare a livello di cloroplasti e citosol (Büßis & Heineke, 1998).

Sono state formulate varie ipotesi nel tentativo di motivare tale fenomeno, ma non si può ancora affermare con certezza di aver compreso appieno tutte le numerose funzioni che questo aminoacido ricopre all'interno delle cellule vegetali.

1.7.2 Prolina come osmolita compatibile

La maggior parte degli studiosi sostiene che uno dei motivi per cui, in seguito ad esposizione a stress osmotico, le cellule vegetali accumulano al loro interno prolina consista in un suo impiego come osmolita compatibile. Questa ipotesi viene riportata all'interno di numerosi articoli scientifici, ma di fatto non è mai stata dimostrata in modo inequivocabile (Forlani et al., 2019). Le cellule vegetali per evitare la perdita di acqua durante l'esposizione a stress osmotico o idrico devono diminuire il loro potenziale idrico. Per ottenere ciò, considerando il volume di acqua approssimativo presente in una cellula vegetale, la concentrazione di prolina dovrebbe aumentare di almeno $80-130 \mu\text{mol (g fw)}^{-1}$. Ad eccezione di alcune piante appartenenti alla famiglia delle *Solanaceae*, quali peperoncino, tabacco e pomodoro, in cui le concentrazioni di prolina possono aumentare di centinaia di volte a seguito dell'induzione dello stress osmotico (Binzel et al., 1987, 1987; Santos-Díaz & Ochoa-Alejo, 1994), gli altri dati sperimentali disponibili in letteratura riportano che nella maggior parte delle altre specie tale incremento si aggira intorno a $5-10 \mu\text{mol (g fw)}^{-1}$ (Poustini et al., 2007). Preso singolarmente, dunque, non sempre l'accumulo di prolina può contribuire in maniera così preponderante al mantenimento dell'equilibrio osmotico (Forlani et al., 2019).

1.7.3 Prolina come stabilizzante di enzimi e membrane

Un'altra plausibile spiegazione per motivare l'accumulo di prolina indotto da stress consiste nel suo possibile impiego come agente kosmotropico. In seguito a situazioni di carenza idrica o eccessiva salinità, le proteine presenti in soluzione possono essere soggette a modificazioni conformazionali a causa del progressivo incremento di sostanze caotropiche (principalmente ioni) concomitante ad una ridotta solvatazione delle macromolecole presenti nel citosol (Forlani et al., 2019). È in queste condizioni che le molecole che presentano una ridotta tendenza a formare aggregati, come la prolina, possono esercitare un effetto kosmotropico e stabilizzare le strutture macromolecolari presenti in soluzione, aiutando a garantire la formazione del guscio di solvatazione. Nello specifico, la prolina sembra interagire con i residui idrofobici delle proteine, incrementandone l'area idrofilica (Schobert & Tschesche, 1978). Oltre a questo, assume un ruolo importante nel favorire la rinaturazione delle macromolecole evitandone l'aggregazione.

In condizioni di ridotta disponibilità idrica è importante che anche le membrane mantengano la propria integrità. Ancora una volta questo aminoacido, grazie alla sua natura anfipatica, può esercitare una funzione stabilizzante andando ad intercalarsi nel doppio strato fosfolipidico per interagire con le regioni apolari delle molecole di fosfatidilcolina (Rudolph et al., 1986).

1.7.4 Prolina come *scavenger* delle ROS e antiossidante

Lo stato elettronico fondamentale dell'ossigeno molecolare è di tripletto (3O_2) e, per le regole di conservazione dello spin, risulta piuttosto inerte nei confronti dei materiali biologici. In particolari condizioni, però, l'ossigeno molecolare può subire una modificazione del suo stato elettronico e trasformarsi in ossigeno singoletto (1O_2). La principale via per produrre ossigeno singoletto *in vitro* consiste nell'irradiazione di pigmenti definiti fotosensibilizzanti. Quello che accade in natura è del tutto analogo, ne è un esempio il processo fotosintetico: il P680, primo donatore di elettroni del centro di reazione del fotosistema II, agisce da fotosensibilizzante e rappresenta la principale fonte di ossigeno singoletto nei vegetali. Quest'ultimo, rispetto al tripletto, presenta proprietà ben diverse e funge da potente ossidante nei confronti di molecole quali aminoacidi, lipidi e DNA (Matysik et al., 2002). Più nel dettaglio, l'ossigeno tende a reagire con altre molecole andando a generare dei composti molto reattivi, definiti radicali liberi. Tra questi, lo ione superossido ($O_2^{-1} \cdot$) ed il radicale idrossile ($OH \cdot$) sono le principali specie reattive dell'ossigeno. La presenza di ROS nei sistemi biologici induce la produzione di ulteriori ROS, andando ad innescare un processo autocatalitico deleterio ed è per questo che l'evoluzione ha portato le cellule a sviluppare varie strategie per ridurre al minimo i danni.

In condizioni normali, l'attività di enzimi protettivi come superossido dismutasi, catalasi ed ascorbato perossidasi consente il mantenimento di basse concentrazioni di ROS. Ma in situazioni di stress, oltre ad aumentare l'espressione e l'attività degli enzimi sopracitati, nelle cellule vegetali aumenta anche la concentrazione di soluti compatibili tra cui la prolina, il cui ruolo però non è ancora del tutto chiaro (Aswani et al., 2019).

In accordo con le ipotesi avanzate alla fine degli anni '80 riguardo alla capacità della prolina di proteggere dai radicali idrossilici (Smirnoff & Cumbes, 1989), analisi computazionali abbastanza recenti mostrano che effettivamente l'aminoacido potrebbe reagire direttamente con essi, considerati tra i più potenti ROS, convertendoli in specie non reattive (Signorelli et al., 2014). Attraverso esperimenti *in vitro* e *in vivo* condotti analizzando altre specie radicaliche quali ossigeno

singoletto, ione superossido, ossido nitrico, azoto diossido e perossinitrite, però, non è stato possibile giungere alla stessa conclusione (Signorelli et al., 2016).

Altri articoli riportano che la prolina sia in grado di proteggere le cellule vegetali dai radicali liberi attraverso strategie non enzimatiche, ma senza dimostrare l'esistenza di una reazione diretta tra essi (Alia et al., 1995; Saradhi et al., 1995). In aggiunta, studi successivi incentrati sull'analisi dei danni ossidativi al complesso I della catena respiratoria dimostrano che la prolina non sia in grado di svolgere un ruolo protettivo diretto nei suoi confronti, al contrario di altri soluti come glutatione, acido ascorbico e tocoferolo o enzimi quali catalasi, ascorbato perossidasi e superossido dismutasi. Nonostante ciò, il coinvolgimento di questo aminoacido nella risposta allo stress da radicali liberi è ben documentata ed è stata dimostrata la sua capacità di indurre l'attività enzimatica di catalasi, perossidasi e polifenol ossidasi. Inoltre, grazie alle sue caratteristiche chimico fisiche, può fungere da protettore e stabilizzatore delle loro strutture. Da tali evidenze si può dedurre quindi che l'effetto migliorativo che si osserva in concomitanza all'accumulo di prolina nelle piante soggette a stress ossidativo sia principalmente dovuto al potenziamento dell'intero sistema antiossidante (Alia et al., 2001; Matysik et al., 2002; Szabados & Saviouré, 2010).

In supporto a quest'ultima ipotesi, uno studio condotto su *Arabidopsis* mutante *p5cs1* ipersensibile al sale riporta che l'attività degli enzimi antiossidanti coinvolti nel ciclo glutatione-ascorbato risulta inferiore a causa della ridotta sintesi di prolina, condizione che porta ad un netto accumulo di H₂O₂ (Székely et al., 2008).

1.7.5 Prolina come regolatrice dell'equilibrio redox

In situazioni di stress, al fine di prevenire l'eccessiva ossidazione di NADPH a NADP⁺, le cellule fotosintetiche riducono l'attività del ciclo di Calvin. Se in concomitanza a questa situazione la pianta viene esposta ad elevata intensità luminosa, potrebbero riscontrarsi problemi a livello della catena di trasporto degli elettroni poiché il pool dell'accettore di elettroni NADP⁺ risulterebbe insufficiente a garantire il completamento della fase luminosa della fotosintesi. Come conseguenza, gli elettroni nel centro di reazione del fotosistema I (PSI) tendono ad essere acquisiti dall'ossigeno, portando alla formazione di ossigeno singoletto e accumulo di ROS (Chaves et al., 2009). È in tale contesto che la via di sintesi della prolina torna nuovamente utile per limitare i danni: il consumo di NADPH necessario per ridurre glutammato e P5C rigenera NADP⁺ che torna nuovamente disponibile a livello plastidiale per l'acquisizione di elettroni nel PSI. In aggiunta, il dominio chinasi della P5CS consuma ATP producendo ADP, che a sua volta funge da substrato per la ATP sintasi.

È facile intuire quindi che l'aumentata biosintesi di prolina in situazioni di stress consente il mantenimento di un adeguato rapporto NADPH:NADP⁺, la stabilizzazione dell'equilibrio redox nei vari compartimenti subcellulari e la limitazione dei danni all'apparato fotosintetico da parte dei ROS. Questa intuizione trova supporto in uno studio condotto su piante di soia transgeniche, nella quali il gene *AtP5CR* è stato inserito con orientamento senso o antisenso. Durante situazioni di siccità le piante "antisenso", caratterizzate da una minor funzionalità della P5CR, presentano una riduzione dei livelli di NADP⁺ rispetto alle piante "senso", che in aggiunta risultano maggiormente tolleranti. Questo conferma come l'aumentata attività della P5CR a spese di NADPH nelle piante senso favorisca la rigenerazione del pool di NADP⁺ con conseguente limitazione della sintesi di ROS a livello plastidiale durante lo stress (De Ronde et al., 2004).

Mentre per i cloroplasti la biosintesi di prolina svolge un ruolo funzionale consumando le riserve di NADPH in condizioni di elevata esposizione alla luce, nei mitocondri ciò che assume importanza per il sostentamento e la sopravvivenza cellulare è il processo catabolico. La prolina che si è accumulata durante il periodo di stress, infatti, può fornire supporto ai mitocondri fungendo da riserva di potere riducente e ATP. Gli elettroni derivanti dall'attività della PRODH possono infatti entrare nella catena respiratoria mitocondriale contribuendo alla produzione di energia necessaria per consentire la ripresa della crescita una volta che lo stimolo stressante cessa (Hare & Cress, 1997; Kishor et al., 2005). Inoltre, grazie alle sue caratteristiche chimico-strutturali, la prolina protegge i complessi della catena stessa e stabilizza il processo di respirazione cellulare (Hamilton & Heckathorn, 2001).

1.7.6 Prolina nella risposta ai patogeni

Quando le cellule vegetali entrano in contatto con un organismo patogeno, si instaurano una serie di reazioni complesse dalle quali dipende la sensibilità o la resistenza della pianta. Se i meccanismi di resistenza dell'ospite non sono in grado di bloccare l'infezione, il patogeno (che in questo caso viene definito virulento) colonizza la pianta da cui trarrà i composti necessari al compimento del suo ciclo vitale e replicazione. Al contrario, se l'ospite risulta in grado di riconoscere il patogeno e prevenire o arrestare l'infezione, la pianta viene definita resistente ed il patogeno avirulento (Qamar, 2015).

Nell'ultimo ventennio si è visto che la risposta ai patogeni può coinvolgere anche il metabolismo della prolina (Fabro et al., 2004). Di per sé, l'aminoacido non manifesta alcun effetto nei confronti dei patogeni. In alcuni casi però, come nell'infezione avirulenta di *A. thaliana*, è stato dimostrato come che il processo di ossidazione della prolina sia in grado di innescare lo scoppio ossidativo e

quindi la risposta ipersensibile attraverso l'aumentata produzione di ROS indotta dall'attività della PRODH nei mitocondri (Qamar, 2015). In altri casi, come nelle prime fasi dell'attacco patogeno da *Melampsora lini*, è stato osservato che nel sito di infezione aumenta l'espressione di *FIS1*, omologo in lino di *P5CDH* (Cecchini et al., 2011). In maniera analoga, anche in tabacco (*Nicotiana benthamiana*) infettato con *Pseudomonas syringae* si riscontra l'aumentata espressione dello stesso enzima (Senthil-Kumar & Mysore, 2012).

È plausibile quindi che l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina possa influire sulla risposta ai patogeni. In questo contesto, è noto che il ciclo prolina-P5C sia in grado di favorire il trasporto di equivalenti riducenti verso i mitocondri, alterare il rapporto $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nel citosol ma soprattutto, attraverso l'attività della PRODH, incrementare il flusso di elettroni alla catena di trasporto mitocondriale, concorrendo anche in questo caso alla produzione di ROS e quindi all'induzione della risposta ipersensibile (Rejeb et al., 2014). In aggiunta a ciò, molti studi sottolineano il fatto che l'accumulo di P5C sia responsabile dell'induzione di morte cellulare programmata o necrosi in cellule di lievito, umane e vegetali. Da tali evidenze è possibile dedurre che sia il ciclo prolina-P5C sia l'accumulo di P5C possono contribuire alla risposta ipersensibile per confinare l'invasione da parte dei patogeni (Qamar, 2015).

1.8 La P5CS vegetale

La P5CS è l'enzima bifunzionale che sfruttando come co-fattori ATP e NADPH catalizza il passaggio limitante per la sintesi di prolina partendo da glutammato. Intervenendo a questo livello, nei vegetali l'attività di questo enzima risulta soggetta a feedback negativo da parte del prodotto finale della via, limitando quindi un suo accumulo quando la cellula si trova in condizioni fisiologiche (Hong et al., 2000).

Grazie all'isolamento e al sequenziamento del gene *P5CS* è stato possibile osservare che in molte specie vegetali come *A. thaliana*, *Medicago sativa*, *Lycopersicon esculentum* e *Phaseolus vulgaris* questo gene ha subito un processo di duplicazione, dando origine a due paraloghi denominati *P5CS1* e *P5CS2*, i cui prodotti intervengono in situazioni e tessuti differenti (Chen et al., 2010; Fujita et al., 1998; Ginzberg et al., 1998; Strizhov et al., 1997). In *Medicago truncatula* è stata identificata l'espressione di un terzo isoenzima che presenta un segmento amino-terminale extra rispetto alle altre due isoforme ed è probabilmente implicato nel processo simbiotico tra leguminose e rizobi (Kim & Nam, 2013). Attraverso analisi bioinformatiche, inoltre, alcuni ricercatori hanno individuato

la presenza di 11 diversi *P5CS* in pero (*Pyrus betulifolia*), sottolineando come questo gene sia potenzialmente implicato in numerosi contesti (Ma et al., 2022).

Allo scopo di identificare le principali differenze tra *P5CS1* e *P5CS2*, sono state condotte analisi su *A. thaliana*, specie vegetale modello in cui le due forme presentano un simil numero di introni, esoni e residui aminoacidici, analogamente a quanto osservato per *Oryza sativa* (Rai & Penna, 2013). Il gene *AtP5CS1* è costituito da 3492 paia di basi e risulta quindi più corto del suo paralogo *AtP5CS2*, che ne conta 5276 (The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR). Tale divergenza deriva principalmente dalla differente lunghezza degli introni, mentre gli esoni dei due geni si presentano dimensionalmente simili (ad eccezione dell'esone 20) e sono caratterizzati da un'identità di sequenza piuttosto elevata, compresa tra l'80 ed il 94%. Pertanto, i trascritti dei due paraloghi condividono l'82% della loro sequenza nucleotidica e vengono tradotti in isoenzimi le cui catene aminoacidiche risultano per il 93% sovrapponibili. L'enzima *AtP5CS1*, rilevabile in quasi tutti i tessuti, è costituito da 717 aminoacidi mentre la *AtP5CS2* ne conta 726 e viene prevalentemente espressa nelle aree di attiva divisione cellulare (Strizhov et al., 1997). Confrontando le sequenze delle *P5CS* vegetali di *Arabidopsis* e *Vigna aconitifolia* (Hu et al., 1992) con quelle degli enzimi γ -GK e GSA-DH di *E. coli* (Deutch et al., 1984) e *Serratia marcescens* (Omori et al., 1992), si riscontra la conservazione dei domini catalitici, dei siti di legame ad ATP e NADPH e delle regioni ricche in leucina (Savouré et al., 1995). Inoltre, i due residui aminoacidici presenti nella *P5CS* di *Vigna aconitifolia* implicati nel meccanismo a feed-back negativo mediato dalla prolina (Zhang et al., 1995) sono individuabili anche in entrambi gli isoenzimi di *A. thaliana* (Strizhov et al., 1997). Resta quindi da indagare la presenza di altri domini deputati alle interazioni con modulatori post traduzionali, che potrebbero determinare sostanziali differenze funzionali tra le due isoforme.

Riguardo alla compartimentalizzazione intracellulare, in uno studio del 2008 viene riportato che la prima delle due isoforme si localizzi a livello plastidiale, mentre la seconda prevalentemente all'interno del citosol (Székely et al., 2008). Analizzando le loro sequenze, però, nessuno dei due isoenzimi presenta il tipico peptide segnale necessario per il trasporto ai cloroplasti (Strizhov et al., 1997). Studi più recenti, infatti, condotti su piante transgeniche esprimenti le due sintetasi fuse al peptide "green fluorescent protein" (*P5CS1:GFP* e *P5CS2:GFP*), dimostrano che entrambi gli enzimi si localizzano esclusivamente all'interno del citosol (Funck et al., 2020, figura5).

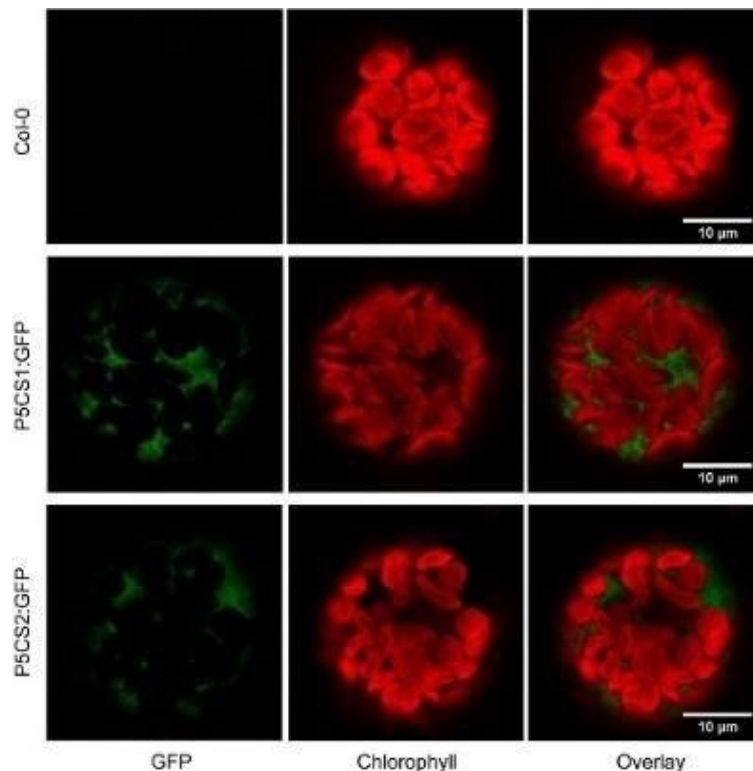


Figura 5. Localizzazione subcellulare di AtP5CS1 e AtP5CS2. Le immagini di microscopia confocale sono state ottenute analizzando la fluorescenza di clorofilla (rossa) e GFP (verde) nei protoplasti isolati da piante WT (Col-0), P5CS1:GFP o P5CS2:GFP. Dalla sovrapposizione delle immagini si osserva che l'emissione di fluorescenza dei cloroplasti è interamente attribuibile alla clorofilla, mentre quella della GFP è rilevabile solo nel citosol (Funck et al., 2020).

Ciò che distingue maggiormente i due geni, dunque, consisterebbe nei siti di legame a fattori di trascrizione che, in base alle condizioni in cui la cellula si trova, possono mediare l'espressione di una o dell'altra isoforma (Fichman et al., 2015; Zarattini & Forlani, 2017).

Attraverso l'utilizzo di mutanti è stato possibile stabilire che, almeno per quanto riguarda *A. thaliana*, la P5CS1 è responsabile dell'accumulo di prolina in seguito a condizioni di stress mentre la P5CS2 svolge importanti ruoli per il normale sviluppo della pianta e la crescita radicale (Funck et al., 2020). Dopo la germinazione infatti i mutanti *p5cs2*, a differenza delle piante WT e mutanti *p5cs1*, difficilmente vanno incontro a una normale crescita vegetativa per la quale, come riportato in studi precedenti (Wang et al., 2014), è necessaria la presenza di prolina per stimolare la proliferazione del meristema radicale. In accordo a ciò, aggiungendo prolina esogena al terreno di coltura la crescita di questi mutanti riprende, sottolineando l'importanza della P5CS2 durante le prime fasi di sviluppo (Funck et al., 2020). I mutanti *p5cs1*, invece, accumulano minori quantità di prolina in condizioni di stress osmo-salino. Sorprendentemente, lo stesso trattamento con il sale favorisce lo sviluppo dei mutanti *p5cs2*, in maniera del tutto analoga all'effetto esercitato dalla prolina esogena. Questo fatto suggerisce che l'aumento di attività della P5CS1 indotta dallo stress salino può compensare la

mancata espressione della seconda isoforma (Funck et al., 2020).

Nonostante le molteplici analisi condotte *in silico* e l'abbondante reperibilità di articoli sulla regolazione trascrizionale della P5CS nei vari tessuti vegetali, sono pochi i dati relativi a struttura, caratteristiche biochimiche e regolazione post-traduzionale delle due isoforme, indispensabili per meglio comprendere come vari il loro contributo alla sintesi di prolina in base alle situazioni in cui le cellule vegetali si trovano.

Informazioni più dettagliate sono disponibili per l'enzima presente negli organismi animali. Ogni monomero della P5CS è costituito da cinque sottodomini: tre di questi si trovano nel dominio GK dove mediano il legame con glutammato, ATP e NAD(P)H. Gli altri due sono localizzati nel dominio GPR: uno corrisponde al sito catalitico mentre l'altro è implicato nella formazione di oligomeri. Secondo questo modello, infatti, due monomeri di P5CS tendono a interagire tra loro mediante i domini GPR. Gli omodimeri, a loro volta, si assemblano ulteriormente in omotetrameri interagendo però mediante i domini GK (Zhong et al., 2022). Gli stessi autori sostengono che, affinché risulti attiva, la P5CS deve organizzarsi in una struttura più complessa dove i vari tetrameri si legano tra loro per formare dei filamenti a struttura elicoidale, osservabili attraverso tecniche di microscopia crio-elettronica (Zhong et al., 2022). Vista l'analogia funzionale tra l'enzima animale e quello vegetale, i risultati di questo studio potrebbero fornire importanti spunti per lo studio della P5CS delle piante.

1.9 La P5CR vegetale

Sia la via dell'ornitina che quella del glutammato convergono nella reazione finale, in cui il P5C viene ridotto a prolina ad opera della P5CR. Nonostante alcuni ricercatori documentino una possibile compartimentalizzazione della P5CR vegetale a livello plastidiale (Noguchi et al., 1966), analisi di microscopia confocale più recenti svolti su cellule del mesofillo e protoplasti hanno messo in evidenza che, analogamente alla P5CS, anche la P5CR sembrerebbe localizzarsi nel citosol, sia durante lo sviluppo vegetativo sia in condizioni iperosmotiche (Funck et al., 2012, figura 6). Quel che è ormai certo è che ad oggi, al contrario degli organismi animali, non è mai stata rilevata la presenza di questo enzima all'interno dei mitocondri.

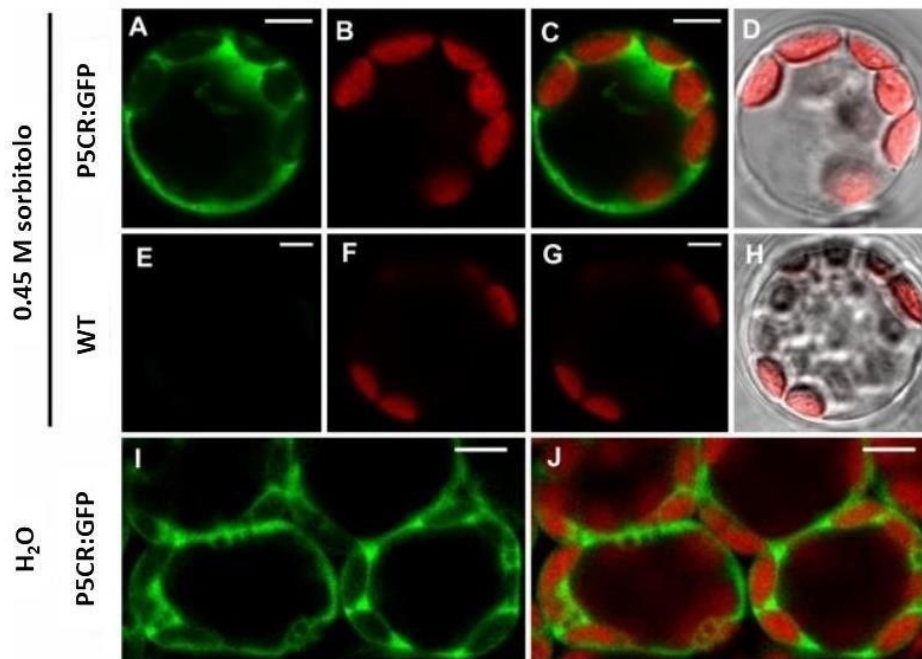


Figura 6. Localizzazione subcellulare della P5CR. Le immagini di microscopia confocale sono relative a protoplasti isolati da foglie di *Arabidopsis* WT o mutanti *P5CR:GFP*. A-D: protoplasti derivati da pianta esprime la proteina di fusione P5CR:GFP, sottoposta a iperosmosi. E-H: protoplasti derivati da pianta WT, sottoposti a iperosmosi. I, J: parenchima a palizzata di una foglia infiltrata con acqua ed esprime la proteina di fusione P5CR:GFP, vista dal lato adassiale. A, E, I: fluorescenza dovuta alla GFP (verde). B, F: autofluorescenza della clorofilla (rosso). C, G, J: sovrapposizione delle due fluorescenze. D, H: Fusione della fluorescenza della clorofilla con un'immagine in campo chiaro. Le immagini mostrano come la localizzazione cellulare della P5CR sia sempre citosolica (Funck et al., 2012).

Dal punto di vista genetico, nella maggior parte delle piante superiori il gene codificante per la P5CR è a singola copia, come nel caso di *A. thaliana* e *O. sativa*, ma ci sono alcune eccezioni come per esempio *Glycine max* che presenta almeno due isoforme di questo enzima (Fichman et al., 2015). Trovandosi al punto di convergenza delle due vie, la mancata espressione della P5CR nei vegetali blocca l'intero processo biosintetico. Infatti mutazioni nel gene *P5CR* causano morte embrionale e la somministrazione di inibitori specifici per la P5CR determina effetti fitotossici (Forlani et al., 2007; Meinke, 2020).

Nonostante lo step anabolico limitante per la sintesi di prolina sia quello catalizzato dalla P5CS, è importante che anche la P5CR venga sottoposta ad una fine regolazione. In effetti l'espressione dell'enzima sembrerebbe dipendere da molteplici fattori quali stabilità dei trascritti, associazione di polisomi ed efficienza di traduzione, tant'è che analizzando piante sottoposte a stress osmotico, la quantità proteica e le concentrazioni di prolina intracellulare non coincidono con i livelli del corrispondente mRNA (Hua et al., 1997, 2001).

Dal punto di vista biochimico, la P5CR è stata caratterizzata in varie specie vegetali. Dalle analisi *in*

vitro è emerso che l'enzima è in grado di utilizzare come cofattore sia NADH sia NADPH (Szoke et al., 1992). In *Arabidopsis* e riso, che come menzionato precedentemente possiedono un unico gene per la P5CR, l'attività NADH-dipendente viene completamente soppressa dal NADP⁺ mentre utilizzando NADPH come cofattore, la modulazione risulta molto più lieve. Analogamente, sia la presenza di sali che di prolina manifestano un effetto inibitorio solo sull'attività NADH-dipendente. Seppur non estendibili a tutte le specie vegetali, questi risultati suggeriscono che anche *in vivo*, specialmente in risposta allo stress, la P5CR predilige l'utilizzo di NADPH come cofattore, in presenza del quale l'attività degli enzimi di riso e *Arabidopsis* risulta addirittura stimolata da concentrazioni crescenti di NaCl, KCl e altri ioni (Forlani, Bertazzini, et al., 2015; Giberti et al., 2014). In generale, possiamo dunque affermare che la disponibilità del donatore di elettroni, che dipende da più fattori, può influire sull'attività enzimatica (Forlani et al., 2015).

Dal punto di vista strutturale, i geni *P5CR* presentano sequenze di lunghezza simile nella maggior parte delle specie e codificano per proteine il cui peso molecolare (PM) supera di poco i 30 KDa (Forlani et al., 2015; Ruszkowski et al., 2015). Analizzando la struttura cristallografica dell'enzima di *Neisseria meningitides* si è visto che l'unità catalitica è rappresentata da un dimero (Nocek et al., 2005). *Oryza sativa* (Forlani, Bertazzini, et al., 2015), *Medicago truncatula* (*Mt*, *M. truncatula*) (Ruszkowski et al., 2015), *Homo sapiens* (*Hs*) (Meng et al., 2006) e *Streptococcus pyogenes* (Nocek et al., 2005) sono invece esempi di specie in cui 5 omodimeri di P5CR interagiscono tra loro a formare strutture decameriche i cui dieci siti catalitici si dispongono attorno ad un solco periferico circolare. L'indagine dalla struttura nativa di questi enzimi, oltre ad approfondire le conoscenze relative al metabolismo della prolina, si rivela utile per individuare i siti di interazione con substrati e modulatori post-traduzionali. La prima caratterizzazione conformazionale dettagliata è stata ottenuta nel 2015 relativamente all'enzima di *M. truncatula* (Ruszkowski et al., 2015, figura 7), leguminosa modello la cui P5CR condivide caratteristiche biochimiche del tutto analoghe a quelle di riso e *Arabidopsis*.

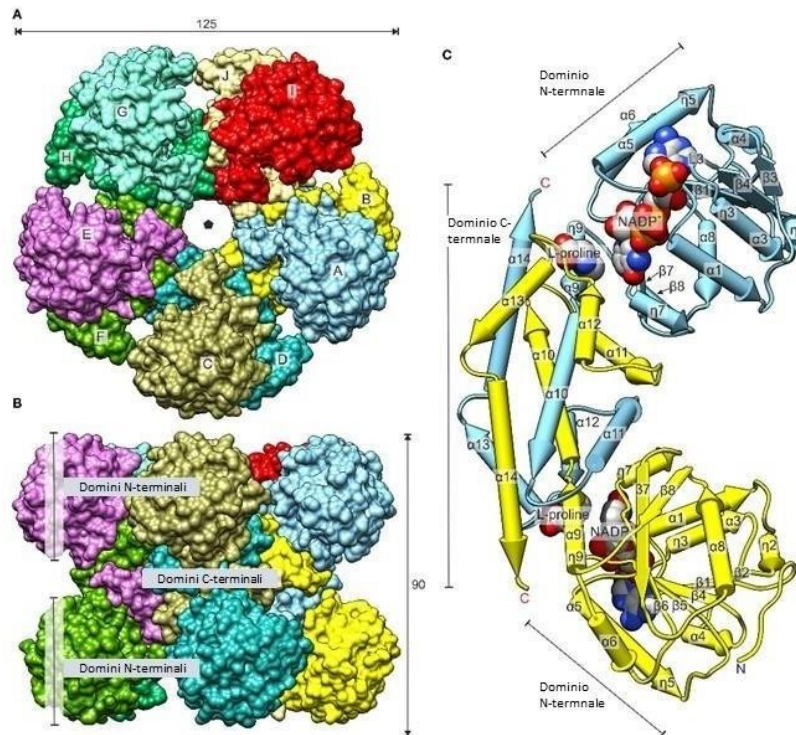


Figura 7. Struttura cristallografica della P5CR di *Medicago truncatula*. (A) Vista dall'alto. Cinque monomeri interagiscono tra loro a formare una struttura decamerica a forma di ciambella. (B) Vista di lato. (C) Il dimerico di *MtP5CR* (monomeri A-B) e siti di legame al prodotto (L-prolina) ed al coenzima (NADP⁺). Dimensioni riportate in Å (Ruszkowski et al., 2015).

Nel lavoro vengono descritte quattro strutture cristallografiche che corrispondono alle conformazioni tridimensionali assunte dall'enzima in assenza di ligandi o in presenza di NADP⁺, NAD⁺ e L-prolina. A causa della ridotta stabilità del P5C a pH fisiologico, non è stato possibile analizzarne il dominio di interazione all'enzima, che però dovrebbe coincidere con quello di rilascio del prodotto finale prolina. Quest'ultima, per mezzo del suo atomo di azoto, forma un legame a idrogeno debole con la treonina 243. È probabile che il P5C, a causa della conformazione sp² del suo atomo di azoto, non interagisca con lo stesso aminoacido ma con la valina 236, formando un legame più stabile che ne aumenta l'affinità rispetto alla prolina. Questo spiegherebbe perché in *M. truncatula* e altre specie la P5CR non risente dell'inibizione da prodotto. Inoltre, con questi esperimenti è stato possibile dimostrare per la prima volta ciò che precedentemente si era osservato attraverso i saggi enzimatici, ovvero la preferenza nell'utilizzo del donatore di elettroni: il legame che l'enzima stabilizza con il NADP⁺ è più stabile rispetto a quello che forma con il NAD⁺, spiegando la maggiore affinità nei confronti del NADPH che del NADH (Ruszkowski et al., 2015). Le analisi strutturali possono facilitare la progettazione di nuove molecole capaci di interferire con l'attività catalitica, potenziandola o inibendola a scopi terapeutici o per il controllo delle infestanti (Forlani et al., 2008, 2021).

1.10 SCOPO DELLA TESI

Con l'intento di comprendere più nel dettaglio i ruoli della prolina e del suo metabolismo nella risposta allo stress, questo progetto di dottorato si è focalizzato principalmente sullo studio degli enzimi coinvolti nella sintesi di questo aminoacido.

Tutti gli organismi, sia eucarioti che procarioti, possono utilizzare come precursore della prolina il glutammato, che deve subire una serie di reazioni per essere ridotto a prolina. Nella maggior parte delle specie superiori, gli enzimi che catalizzano queste reazioni sono la P5CS e P5CR. Le analisi riportate in questo progetto sono quindi state condotte al fine di approfondire a livello biochimico le conoscenze relative alle loro funzioni e regolazione.

A. thaliana e *O. sativa* sono state scelte come sistema sperimentale. Esse sono tra le specie vegetali in grado di accumulare prolina in seguito a svariate situazioni di stress ed entrambe presentano due copie del gene *P5CS*. Studiando le proprietà di P5CS1 e P5CS2 si pongono le basi per chiarire quali siano le differenze tra i due isoenzimi, la cui regolazione trascrizionale è già stata abbondantemente discussa in numerosi articoli, mentre scarseggiano i dati relativi a caratteristiche biochimiche, regolazione post-traduzionale e conformazione strutturale. Per quanto riguarda la P5CR, esperimenti relativi alla sua caratterizzazione biochimica sono stati eseguiti anche sull'enzima umano, che è stato caratterizzato biochimicamente focalizzando l'attenzione sulla valutazione dell'effetto inibitorio di alcuni aminobisfosfonati, già rivelatisi attivi nei confronti della P5CR vegetale e batterica.

Studiare queste strategie di interferenza ha il fine di individuare nuove tecniche per contrastare la proliferazione di piante infestanti (poiché la sintesi di prolina è indispensabile per crescita e sviluppo nei vegetali) e di tumori nell'uomo (dove, in alcuni casi, si riscontra un'aumentata sintesi di prolina). Oltre che sull'enzima purificato, l'effetto degli stessi composti è stato valutato anche su alcune linee cellulari di carcinoma umano.

La P5CR è stata caratterizzata anche in lievito che, a differenza di piante e animali, non sembrerebbe accumulare prolina in seguito a situazioni di stress. Le proprietà biochimiche della P5CR di *S. cerevisiae* erano già state analizzate in un precedente lavoro risalente agli anni '80 (Matsuzawa & Ishiguro, 1980), nel quale però non erano stati presi in considerazione i meccanismi di regolazione post-traduzionale. In questo caso, quindi, la ScP5CR è stata purificata direttamente dalle cellule di lievito e la caratterizzazione è stata condotta per comprendere come venisse modulata la sua regolazione, confrontando i risultati ottenuti con quelli relativi alla P5CR di specie che accumulano

prolina in seguito a stress.

L'attenzione è stata infine rivolta anche all'analisi di un possibile coinvolgimento della sintesi di prolina nella relazione simbiotica che si instaura tra leguminose e rizobi. Recentemente, infatti, è stato riportato che in *M. truncatula*, leguminosa modello, è presente una terza isoforma dell'enzima P5CS il cui silenziamento si ripercuote negativamente sulla formazione di noduli e sull'efficienza del processo di fissazione dell'azoto.

2. Caratterizzazione funzionale della P5C reduttasi di *Saccharomyces cerevisiae*, enzima al punto di convergenza del metabolismo di prolina e arginina

S. cerevisiae, organismo modello il cui genoma è stato interamente sequenziato nel 1996, non accumula prolina in seguito a condizioni di stress (Takagi, 2008).

In questo microrganismo la sintesi di prolina può cominciare a partire sia da glutammato che da ornitina. Indipendentemente dal precursore, in entrambi i casi si giunge alla produzione di P5C che per concludere il processo viene ridotto a prolina dall'enzima P5CR (Pro3) (Takagi, 2008). L'omeostasi viene garantita attraverso il controllo trascrizionale di Pro1 e Pro2, gli enzimi che nella via del glutammato sintetizzano P5C, ma anche dal feed-back negativo che la prolina stessa esercita su Pro1 (Sekine et al., 2007).

L'enzima che si trova al punto di convergenza delle due vie biosintetiche, Pro3, è stato purificato e caratterizzato per la prima volta nel 1980 (Matsuzawa & Ishiguro, 1980). Nonostante siano state descritte alcune tra le sue principali proprietà biochimiche, come affinità per i substrati e massa molecolare nativa, non sono riportate informazioni relative ad eventuali meccanismi di regolazione post-traduzionale. L'interesse verso questi ultimi deriva dal fatto che sostanze quali sali, NAD(P)⁺ o aminoacidi sono in grado di modulare positivamente o negativamente l'attività della P5CR di altre specie (Forlani et al., 2015; Giberti et al., 2014; Sabbioni et al., 2021), perciò estendere la valutazione dei loro effetti sull'enzima di lievito potrebbe contribuire alla comprensione dei meccanismi che impediscono l'accumulo di prolina all'interno di questo microorganismo.

Nel seguente articolo sono dunque raccolti i risultati relativi ad analisi condotte *in vitro* ed *in silico* che hanno permesso di caratterizzare più nel dettaglio la P5CR di *S. cerevisiae*, valutandone i meccanismi di regolazione post-traduzionale e confrontandone proprietà e struttura con quelle della P5CR di altre specie.



Article

Functional Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* P5C Reductase, the Enzyme at the Converging Point of Proline and Arginine Metabolism

Giuseppe Forlani ^{1,*} Giuseppe Sabbioni ¹ and Milosz Ruskowski ² ¹ Department of Life Science and Biotechnology, University of Ferrara, 44121 Ferrara, Italy² Department of Structural Biology of Eukaryotes, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland

* Correspondence: flg@unife.it; Tel.: +39-0532-455311

Abstract: The enzyme that, in *Saccharomyces cerevisiae*, catalyzes the last step in both proline synthesis and arginine catabolism, δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) reductase, was purified to near homogeneity and characterized thoroughly. Retention patterns upon gel permeation chromatography were consistent with a homodecameric composition of the holomer. High lability of the purified preparations and stabilization by reducing compounds suggested susceptibility to reactive-oxygen-species-mediated damage. Both NADH and NADPH were used as the electron donor, the latter resulting in a 3-fold higher V_{max} . However, a higher affinity toward NADH was evident, and the NADPH-dependent activity was inhibited by NAD^+ , proline, arginine, and a variety of anions. With proline and arginine, the inhibition was of the competitive type with respect to the specific substrate, and of the uncompetitive- or mixed-type with respect to NADPH, respectively. The results suggest that, contrary to the enzyme from higher plants, yeast P5C reductase may preferentially use NADH in vivo. An in silico analysis was also performed to investigate the structural basis of such enzyme features. Superposition of the protein model with the experimental structure of P5C reductase from *Medicago truncatula* allowed us to hypothesize on the possible allosteric sites for arginine and anion binding, and the cysteine pairs that may be involved in disulfide formation.

Keywords: P5C reductase; proline; arginine; allosteric regulation; NAD(P)H as electron donor

Citation: Forlani, G.; Sabbioni, G.; Ruskowski, M. Functional Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* P5C Reductase, the Enzyme at the Converging Point of Proline and Arginine Metabolism.

Microorganisms **2022**, *10*, 2077.<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102077>

microorganisms10102077

Academic Editors: María-Isabel González-Siso and Manuel Becerra

Received: 27 September 2022

Accepted: 18 October 2022

Published: 20 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Due to its peculiar properties, in recent decades, the metabolism of the cyclic amino acid proline has attracted increasing interest. In addition to its role as a proteinogenic compound, in most microorganisms and plants, proline acts as a stress protectant, being accumulated in the cell to high concentrations in response to a plethora of stress conditions, ranging from drought to excess salt, and from cold and freezing to the presence of heavy metals [1]. The exact mechanisms by which proline benefits the cell are still a matter of debate, and it has been hypothesized that it may act as a compatible osmolyte favoring osmotic compensation, as a protein-folding chaperone in the presence of high salt levels, and as a membrane stabilizer or a scavenger of reactive oxygen species (ROS) [2]. Moreover, the interconversion of glutamate and proline is believed to contribute to controlling the redox status and the NADP(H) to NAD(H) ratio in the cell, and to allow transferring reducing equivalents to the mitochondrial respiratory chain [3]. As a consequence, modulation of proline metabolism is required both in plants for the activation of the hypersensitive response to pathogen attack [4], and in mammals to alternatively lead to ROS production and triggering of the apoptotic mechanism, or to increased ATP synthesis for protective autophagy [5]. Consistently, growing evidence shows that the enzymes involved in proline metabolism are subject to a complex array of regulative mechanisms at both the transcriptional [6,7] and post-translational [8,9] levels.

In this context, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* represents an exception, as it does not accumulate proline under the above-mentioned stress conditions [10]. Proline in yeast is synthesized in the cytosol from glutamate through three steps catalyzed by γ -glutamyl-kinase (Pro1, EC 2.7.2.11), γ -glutamylphosphate reductase (Pro2, EC 1.2.1.41), and δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) reductase (Pro3; EC 1.5.1.2) [11]. The last reaction is shared with the pathway for arginine degradation [12], in which P5C is produced by ornithine- δ -aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13). Because of this, strains that are defective for pro1 and pro2 are able to satisfy their requirement for proline through arginine catabolism. However, when preferred nitrogen sources (such as ammonia, glutamine, or asparagine) are present, the arginine degradation pathway is blocked by the nitrogen catabolite repression system (NCRs) [13]. As a consequence, pro1 and pro2 strains can grow only in minimal media lacking ammonia, in which the NCRs is not activated. Proline homeostasis is ensured by transcriptional control of *Pro1* and *Pro2*, as well as by negative feedback inhibition of Pro1 activity. A Pro1 variant that was less sensitive to feedback inhibition was found to accumulate proline, and exhibited an increased tolerance to freezing and desiccation [14]. High levels of proline induce, in turn, the expression of the proline catabolic pathway, which is located in the mitochondrion and consists of two steps sequentially catalyzed by proline dehydrogenase (Put1, EC 1.5.5.2) and P5C dehydrogenase (Put2, EC 1.2.1.88) [15]. *Put1* and *Put2* are induced by a transcriptional activator, Put3, which is constitutively bound to *Put1* and *Put2* promoters, but is maximally activated only in the presence of proline and in the absence of better nitrogen sources [16]. Moreover, *Pro1* and *Pro2* expression is upregulated by the general amino acid control, a system by which, in yeast, many of the genes involved in amino acid biosynthesis are induced in response to starvation for any single amino acid [17]. In striking contrast, *Pro3* is constitutively expressed and is—apparently—under no form of regulation.

Yeast P5C reductase was purified and partially characterized in early studies [18,19]. The enzyme was found to use either NADH or NADPH as the electron donor with similar affinity, but resulting in twice the maximal velocity with the former. The native relative molecular mass (about 120 kDa) was consistent with an unusual tetrameric quaternary structure. To the best of our knowledge, no further studies have investigated enzyme features, and the possible occurrence of mechanisms for post-translational regulation has not been assessed. Indeed, recent data showed that the enzyme from other sources is subject to allosteric modulation by proline, NAD(P)⁺, and salts [20–23], with remarkable differences depending on which reduced pyridine dinucleotide acts as a co-factor [8,24]. Here, we report a thorough characterization of *S. cerevisiae* P5C reductase, as well as an in silico analysis to compare the structure and the properties of the enzyme from yeast with those from plants, mammals, and bacteria.

2. Materials and Methods

2.1. Substrates and Reagents

Unless otherwise specified, all reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and were of analytical grade. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid was synthesized by the periodate oxidation of δ -*allo*-hydroxylysine (Sigma H0377) and purified by cation-exchange chromatography onto a Dowex AG50W-X4 (200–400 mesh) column, as described in [25]. DL-P5C solutions (about 50–60 mM) in 1 M HCl were stored at 4 °C in the dark, and brought to neutral pH just before the assay using proper aliquots of a 1 M Tris base solution.

2.2. Purification of Yeast P5C Reductase

Commercial bakers' yeast (5 to 10 g material) was homogenized in an ice-cold mortar with 4 g g⁻¹ of alumina and resuspended in 5 mL g⁻¹ of extraction buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 1 mM dithiothreitol [DTT]). All subsequent operations were carried out at 4 °C. The homogenate was clarified for 5 min at 3000 g, and the supernatant was further centrifuged for 5 min at 12,000 g. The crude extract was fractionated with ammonium sulfate, and the 60–80% saturated fraction was collected by centrifugation,

resuspended in 5–10 mL of extraction buffer, and desalted by passage through a BioGel P6DG column equilibrated with the same buffer. The desalted sample was loaded at a constant flow of 60 mL h⁻¹ onto a DEAE-Sephacel column (2.5 cm ϕ ; 30 mL bed volume). Proteins were eluted with a linear gradient from 0 to 300 mM NaCl in a 400 mL buffer while collecting 8 mL fractions. Active fractions were pooled and immediately supplemented with 1 mM DTT. The sample was concentrated to a volume of about 5 mL by centrifugation in a centrifugal filter device with a cut-off of 50 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore [Burlington, MA, USA]), and loaded onto a Sephacryl S300 (Pharmacia [Cologno Monzese, Italy]) column (2.5 cm ϕ ; 250 mL bed volume) equilibrated in column buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 1 mM DTT and 200 mM NaCl). Elution proceeded at a flow rate of 30 mL h⁻¹, for the collection of 2.5 mL fractions. Active fractions were pooled, concentrated as above, and column-desalted against extraction buffer, as described.

Discontinuous SDS–polyacrylamide gel electrophoresis was performed at 8 mA with a 5% stacking and a 12% separating gel, using a Minigel system (BioRad [Segrate, Italy]). Samples were mixed with the same volume of 125 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 4% (*w/v*) SDS, 20% (*v/v*) glycerol, and 10% (*v/v*) β -mercaptoethanol, and denatured 5 min at 100 °C. Proteins were visualized by soaking gels in Quick Coomassie Stain (CliniSciences [Nanterre, France]) overnight.

2.3. P5C Reductase Assay

Enzyme activity was measured at 30 °C as the P5C-dependent oxidation of NAD(P)H. Assays were performed in 96-microwell plates in a final volume of 0.2 mL. The standard assay mixture contained 2 mM DL-P5C and 0.5 mM of either NADH or NADPH in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. Parallel blanks were performed in which P5C had been omitted. The decrease in absorbance was measured for 5 min at 0.5 min intervals using a Ledetect plate reader (Labexim [Lengau, Austria]) equipped with an LED plugin at 340 nm. Residual NAD(P)H content was estimated on the basis of calibration curves obtained under the same conditions. Activity was calculated by linear regression of data using Prism 6 for Windows, version 6.03 (GraphPad Software [San Diego, CA, USA]). Protein concentration was measured by the Coomassie Brilliant Blue method [26], using bovine serum albumin (BSA) as the standard. To evaluate substrate affinity, invariable substrates were fixed at the same levels as in the standard assay. For variable substrates, L-P5C ranged from 35 to 1000 μ M, while the concentration of NADH and NADPH ranged from 50 to 500 μ M. In all cases, assays were performed in triplicate (technical replications). Each experiment was repeated at least twice with different enzyme preparations (biological replicates). K_M and V_{max} values, as well as K_{IS} and their confidence intervals, were estimated by nonlinear regression analysis using Prism 6. The concentrations causing 50% inhibition (IC_{50}) and their confidence intervals were computed by using the function log(inhibitor) vs. normalized response—variable slope.

2.4. In Silico Analyses

The three-dimensional model of ScP5CR was built using the ColabFold implementation of AlphaFold [27]. Residue conservation on the enzyme surface was calculated using the ConSurf server [28]. Identity cut-offs were set to 35–95%, which gave 1991 unique sequences from the Uniref90 subset [29] that were compared, and the conservation scores were calculated on a sample of 150 sequences that represent the list of homologs to the query. Structural analyses and molecular figures were conducted in UCSF Chimera 1.16 [30]. The charge distribution on the protein surface was calculated in the PDB2PQR and APBS servers [31,32].

3. Results

3.1. Purification of Yeast P5C Reductase

When assayed using NADH as the electron donor, P5C reductase activity was detectable in extracts from commercial bakers' yeast at a relatively constant level of 41.6 ± 1.4 nkat mg⁻¹

protein ($n = 18$). The activity in crude extracts was quite stable at 4 °C, with a half-life of about 50 days. The addition of a reducing compound was neither required nor enhanced the resulting activity level, yet the presence of 1 mM DTT was found to slightly increase enzyme stability with time (Figure 1a). This notwithstanding, when, during preliminary experiments, crude extracts were fractionated by anion-exchange chromatography, activity was rapidly lost in partially purified preparations. The assessment of the effect of treatments with potentially protective compounds confirmed enzyme lability in diluted preparations. The activity was stabilized by adding substances able to scavenge reactive oxygen species, such as BSA and DTT (Figure 1b). Therefore, DTT was included in all purification steps, and allowed the attainment of homogeneous preparations (Supplementary Figure S1) through a combination of ammonium sulfate fractionation, anion-exchange, and gel permeation chromatography (Table 1).

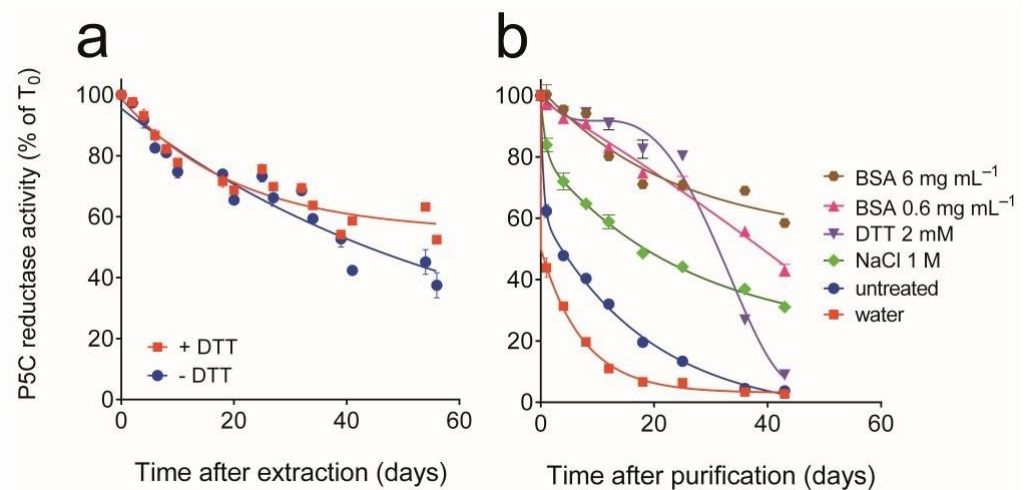


Figure 1. Stability of yeast P5C reductase in crude extracts and in purified preparations. (a) Crude extracts were prepared in the presence or in the absence of 1 mM DTT, and stored on ice; the specific activity of the enzyme was measured at increasing time, and expressed as percent value of activity at time 0 (102.7 ± 0.7 nkat mg^{-1} protein, evaluated using NADPH as the electron donor). Two different experiments were performed, each with 3 replicates. Data were combined and plotted as mean values \pm SE. (b) Active fractions from a DEAE-Sephacel column were pooled; aliquots were mixed with the same volume of different solutions, as indicated, and stored on ice. The specific activity of the enzyme was measured at increasing time and expressed as percent value of activity at time 0 (48.95 ± 0.37 μkat mg^{-1} protein). Data are mean \pm SE over 3 independent replicates.

Table 1. Purification of *Saccharomyces cerevisiae* P5C reductase ¹.

Step	Total Activity	Protein (mg)	Specific Activity (nkat (mg protein) ⁻¹)	Purification (Fold)	Yield (%)
Crude extract	3234.8	85.6	37.79	1.0	100.0
60–80% ammonium	1169.1	16.71	69.96	1.9	36.1
Anion-exchange chromatography	787.4	0.0386	20,398	540	24.3
Gel permeation chromatography	505.3	0.0053	95,344	2523	15.6

¹ Presented data are for a typical purification starting from 10 g of cell material. Activity was measured using NADH as the electron donor.

The last step also allowed an estimate of the relative molecular mass of the enzyme under native conditions. The comparison with the elution pattern of molecular markers (Figure 2) was consistent with a mass of 320 ± 15 kDa. Based on a gene-deduced molecular mass of 30,132 Da for a single subunit, this suggested a homodecameric composition of the holomer. Specific activity in final samples reflected a 2500-fold purification, with a yield of about 16% of the initial amount of the enzyme.

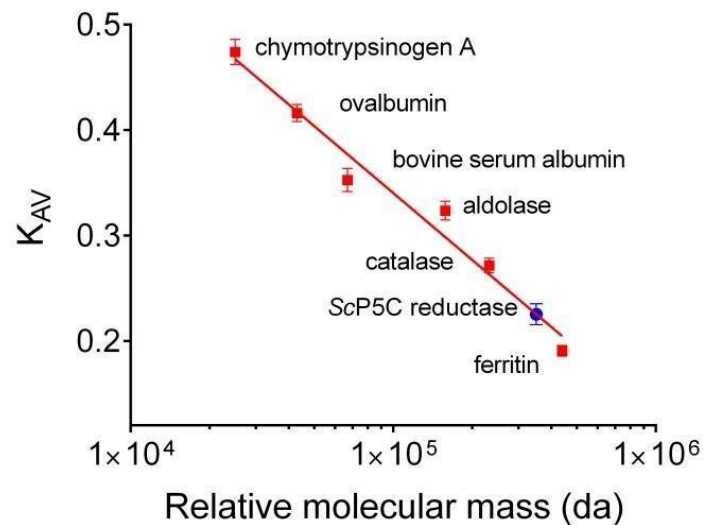


Figure 2. Relative molecular mass of yeast P5C reductase under native conditions. The retention pattern of the enzyme upon gel permeation chromatography on a Sephacryl S300 column was compared with that of molecular weight markers (Gel Filtration Calibration Kit, Pharmacia 17-0442-01 and 17-0441-01). Results are mean \pm SD over 3 independent runs. Linear regression of K_{AV} values plotted against the logarithm of the protein molecular mass allowed an estimate of 320 ± 15 kDa for yeast P5C reductase.

3.2. Properties of Yeast P5C Reductase

The purified enzyme was characterized thoroughly. The results are summarized in Table 2. As expected, yeast P5C reductase was able to use either pyridine dinucleotide as the electron donor. The apparent affinity for NADH was higher than that for NADPH, yet the maximal activity attainable with the former was 3-fold lower than with the latter. With respect to the specific substrate also, the apparent affinity for P5C was 5-fold higher when NADH was the co-factor, but under non-limiting conditions, the maximal activity was 2-fold higher with NADPH (Supplementary Figure S2). As a consequence, activities under standard assay conditions were comparable.

The possibility that enzyme products or related compounds may modulate enzyme activity was then considered. The addition of an increasing concentration of NADP^+ up to 10 mM was found ineffective. On the contrary, NAD^+ was slightly inhibitory in the 10^{-4} to 10^{-2} M range, with a significantly higher effect when NADPH was the electron donor (Figure 3). Similar patterns were found also with the other enzyme product, proline. In this case, 50% inhibition of enzyme activity was achieved at 115 mM proline when NADPH was the co-factor, whereas a 3-fold higher level was required to obtain the same result with NADH (Figure 4a). Interestingly, very similar data were evident when the reaction mixture was added with analogous levels of arginine. IC_{50} values were almost identical than with proline, while the differential effect was even more pronounced, in that arginine concentrations up to 100 mM were substantially ineffective when NADH was the co-factor (Figure 4b). The same concentrations of ornithine were not inhibitory, independently of the electron donor used (Figure 4c).

Table 2. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* P5C reductase.

Specific activity (NADH) ¹	95.9 ± 2.7 μkat (mg protein) ⁻¹
Specific activity (NADPH) ¹	239.8 ± 6.8 μkat (mg protein) ⁻¹
pH optimum ²	6.61 to 7.34
K _M (app) for L-P5C (NADH) ³	64.3 ± 5.5 μM
K _M (app) for L-P5C (NADPH) ³	440.5 ± 21.4 μM
K _M (app) for NADH ³	84.0 ± 7.1 μM
K _M (app) for NADPH ³	133.4 ± 7.3 μM
V _{max} (NADH) ³	107.9 ± 3.0 μkat (mg protein) ⁻¹
V _{max} (P5C, with NADH as the co-substrate) ³	111.9 ± 2.2 μkat (mg protein) ⁻¹
V _{max} (NADPH) ³	294.2 ± 5.7 μkat (mg protein) ⁻¹
V _{max} (P5C, with NADPH as the co-substrate) ³	349.1 ± 8.1 μkat (mg protein) ⁻¹
K _{cat} (NADH) per monomer ⁴	3314 s ⁻¹
K _{cat} (NADPH) per monomer ⁴	10,515 s ⁻¹
K _{cat} /K _M (NADH)	3.95 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹
K _{cat} /K _M (NADPH)	7.88 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹

¹ Specific activity was calculated under standard assay conditions (1 mM L-P5C and 0.5 mM NAD(P)H in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2) at 30 °C. Data are mean ± SE over three independent enzyme preparations. ² The pH dependence of activity was evaluated by assaying the purified enzyme for up to 5 min in the presence of various amounts of Tris base to correct the pH following the addition of P5C in 1 M HCl. The actual pH value in the reaction mixture was measured at the end of the reaction with a microelectrode. pH optimum is defined as the pH interval in which the enzyme has >90% of maximal activity. ³ Apparent affinity constants and maximal catalytic rates were estimated from the plots obtained at varying NADH or NADPH concentration at a nearly saturating P5C level, and vice versa. Concentrations for the invariable substrate were 1 mM for L-P5C and 0.5 mM for NADH and NADPH. Variable substrates had a range of 60–600 μM and 100–1000 μM for the couple NADPH-P5C, and 40–400 μM and 50–700 μM for the couple NADH-P5C, respectively. Data and confidence intervals were computed using the corresponding functions in Prism 6 for Windows, version 6.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). ⁴ Catalytic constant was calculated from the computed maximal catalytic rate on the basis of a molecular weight of 30,132 Da, estimated from the gene sequence.

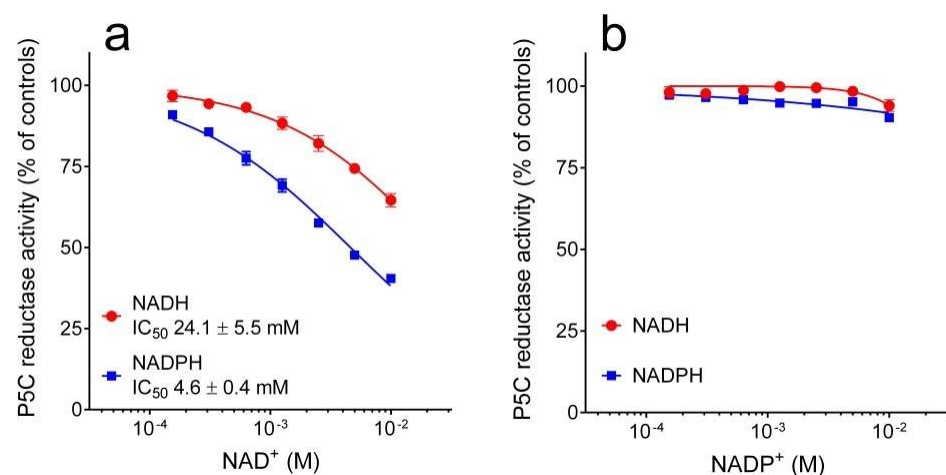


Figure 3. Effect of oxidized pyridine dinucleotides on the activity of yeast P5C reductase. The purified enzyme was assayed in the absence or in the presence of increasing concentrations of NAD⁺ (a) or NADP⁺ (b), using either NADH or NADPH as the electron donor. Results were expressed as percent of the activity obtained with untreated controls. Data are means ± SE over three replicates.

To obtain further information about the mechanism of enzyme inhibition, a kinetic analysis was performed. Results are presented in Figure 5. In the case of proline, reduced K_M and V_{max} and increased K_M with unaffected V_{max} accounted for an inhibition of uncompetitive and competitive type with respect to NADPH and P5C, respectively. The same pattern than with NADPH was obtained with NADH at higher proline doses (K_i = 534 ± 26 mM). Concerning arginine, the same competitive inhibition was found with respect to P5C. On the contrary, an increase in K_M and a decrease in V_{max} suggested an inhibition of mixed type with respect to NADPH.

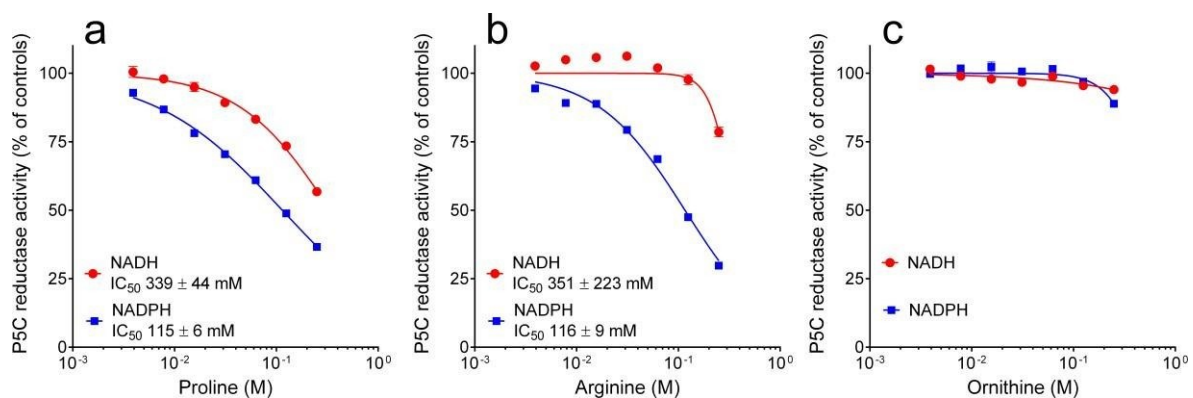


Figure 4. Effect of proline (a), arginine (b), and ornithine (c) on the activity of yeast P5C reductase. The purified enzyme was assayed in the absence or in the presence of increasing concentrations of a given amino acid, using either NADH or NADPH as the electron donor. Results were expressed as the percent of the activity obtained with untreated controls. For arginine and ornithine, added as hydrochlorides to prevent changes in the pH of the reaction mixture, controls received the same level of NaCl. Data are means ± SE over three replicates.

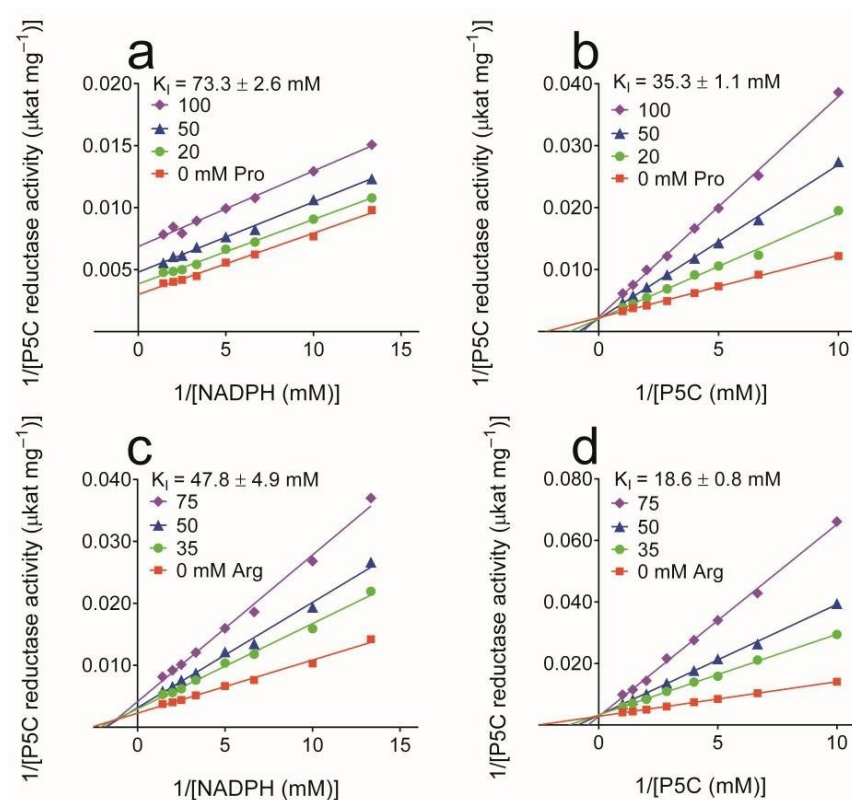


Figure 5. Kinetic analysis of the inhibition brought about by proline and arginine on the activity of yeast P5C reductase. Enzyme affinity was evaluated in the absence or in the presence of increasing concentrations of either amino acid. In the case of proline, reduced K_M and V_{max} (parallel lines in Lineweaver–Burk plot; panel a) and increased K_M with unaffected V_{max} (lines converging to the y-axis; panel b) accounted for an inhibition of uncompetitive and competitive type with respect to NADPH and P5C, respectively. The same pattern as with NADPH was obtained with NADH at higher proline doses. Concerning arginine, the same inhibition type was found with P5C (panel d). On the contrary, with NADPH K_M increased while V_{max} lowered (panel c), suggesting a mixed-type inhibition. The resulting K_i values are indicated, with that for proline against NADH equal to 534 ± 26 mM. The results are the mean over 3 technical replications. The whole experiment was repeated at least twice with different enzyme preparations, obtaining consistent results.

Finally, the influence of increasing concentrations of salt was taken into account. Once again, a striking difference was found depending on which pyridine dinucleotide served as the electron donor. With NADH, the presence of salts up to 200 mM was completely ineffective. On the contrary, with NADPH as the co-factor, enzyme activity was inhibited by 50% at around 100 mM (Figure 6). The comparison of the patterns obtained with salts with the same anion and different cations (Figure 6a,b and Figure 6c,d), and vice versa (Figure 6a,c and Figure 6b,d), strongly suggested that the effect is primarily due to the anion.

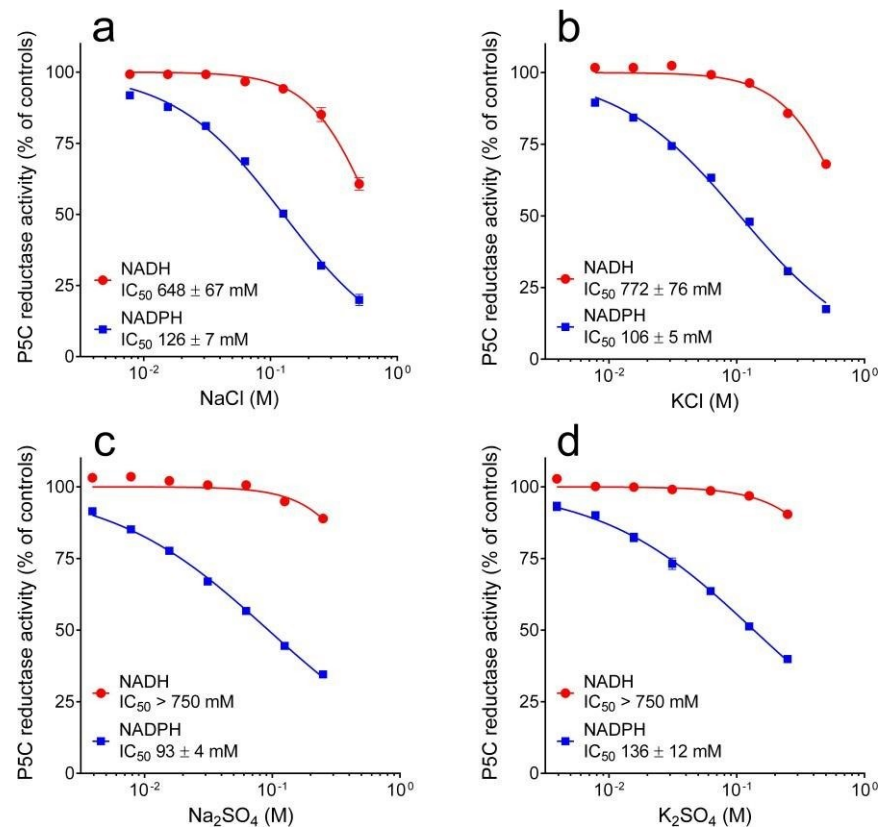


Figure 6. Effect of cations and anions on the activity of yeast P5C reductase. The purified enzyme was assayed in the absence or in the presence of increasing concentrations of chlorides (Panels a and b) or sulfates (Panels c and d), using either NADH or NADPH as the electron donor. Results were expressed as percent of the activity obtained with untreated controls. Data are means \pm SE over three replicates.

In order to understand whether such effects may have a significance *in vivo*, the activity of the purified enzyme was measured under standard assay conditions or in the presence of substrates, effectors, and ions at concentrations similar to those existing in the yeast cell [33]. The results are shown in Figure 7. Under near-saturating conditions, the activity with NADPH as the electron donor was 2.5-fold higher than that with NADH. On the contrary, at physiological levels of P5C (100 μ M), NADH (500 μ M), and NADPH (100 μ M), the ratio was exactly reversed. Moreover, the presence of NAD⁺, NADP⁺, proline, arginine, and potassium phosphate did not significantly affect the NADH-dependent activity, whereas the NADPH-dependent rate was further reduced. When all effectors were present, as in the cell, the activity with NADH was 7-fold higher than that with NADPH.

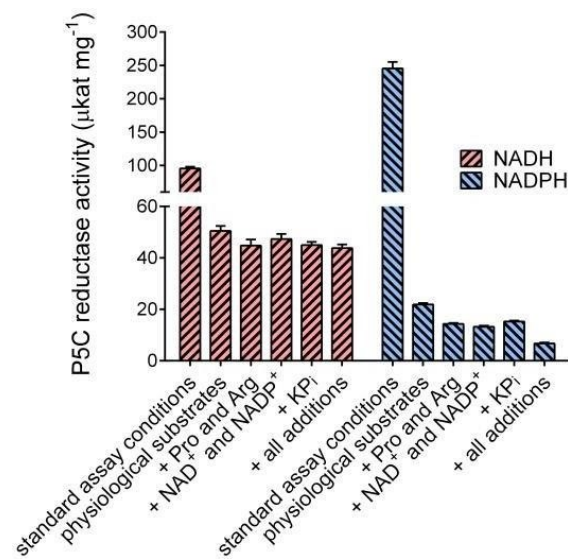


Figure 7. Influence of physiological concentrations of substrates and effectors on the activity of yeast P5C reductase. Enzyme activity was assayed under standard assay conditions (L-P5C 1 mM and NAD(P)H 0.5 mM), or in the presence of substrates and effectors at concentrations similar to those reported inside the yeast cell (L-P5C 100 μ M, NADH 500 μ M, NADPH 100 μ M, NAD⁺ 1 mM, NADP⁺ 200 μ M, Pro 1 mM, Arg 15 mM, and potassium phosphate 20 mM, pH 7.0), in a various array of combinations, as indicated. Results are mean \pm SE over four replicates.

3.3. Structural Features of Yeast P5C Reductase

In order to identify structural features that may account for the differences pointed out between the properties of yeast P5C reductase and the enzymes from other sources, an *in silico* analysis was carried out. A phylogenetic tree built with a multiple alignment for 728 P5C reductase amino acid sequences [24] and analyzed with the interactive Tree of Life (iTOL) software (version 6.4.3; [34]) allowed positioning the yeast enzyme among the predicted members of the P5C reductase family. It should be noted that the clade comprising all the sequences from fungi was found to be located at a considerable genetic distance from the clusters of other eukaryotes, and very close to the clade comprising most archaea (Supplementary Figure S3). Given the lack of an experimental structure of ScP5CR protein, we built its three-dimensional model using the ColabFold implementation of AlphaFold [27]. A homodimer was constructed to represent the complete active site and the swapped C-terminal fragment. Five best-scoring models of yeast P5C reductase were compared to each other to reveal the RMSD values between 0.19 and 0.28 Å. These low variations are consistent with the overall very high confidence of the structure prediction. Of note, the closest ScP5CR homolog, whose structure is available in the Protein Data Bank (PDB), is the P5C reductase from the model plant *Medicago truncatula* (MtP5CR) [35], with whom the protein shares 31% sequence identity (Supplementary Figure S4). Superposition of the ScP5CR model with the experimental structure of MtP5CR revealed the RMSD of 1.2 Å for 186 C α pairs within a 2 Å distance. Most of the secondary structure elements overlap well, except for regions 23–38 and 60–67 in ScP5CR that are substantially longer than the corresponding fragments in the MtP5CR structure (Figure 8). Analysis of the residue conservation with ConSurf [28] showed that the region 60–67 is particularly variable (Figure 8a,b).

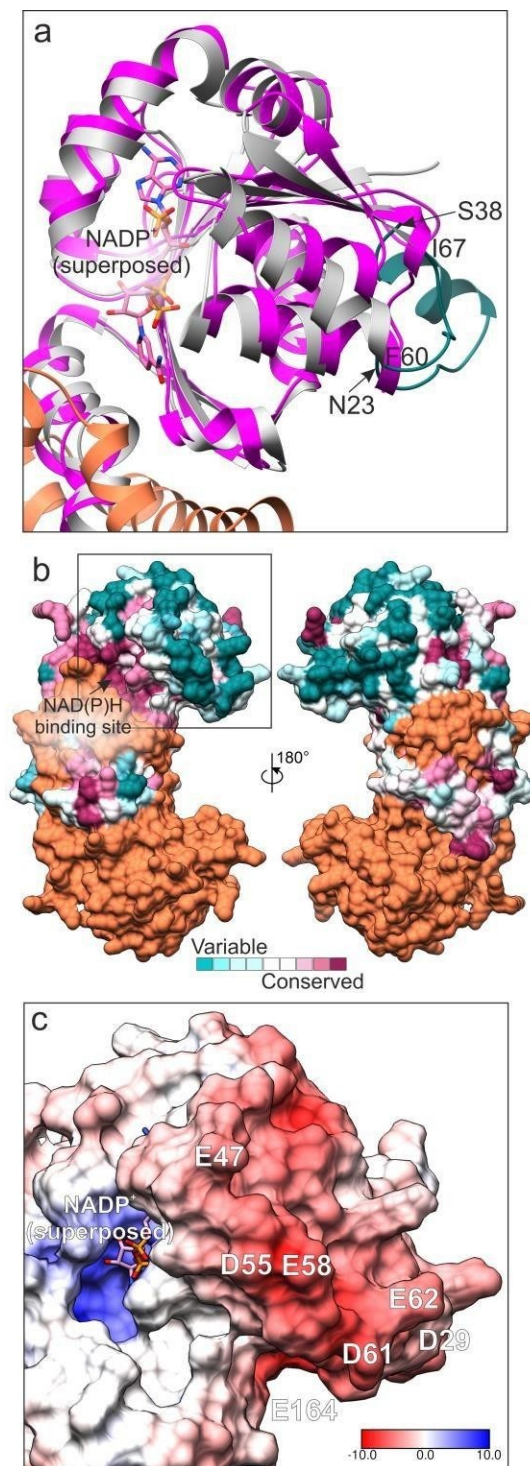


Figure 8. Analysis of the predicted structure of yeast P5C reductase. The three-dimensional model was built using the ColabFold implementation of AlphaFold [27]. A homodimer is shown for clarity, although the protein forms homodecamers. Panel a shows a comparative analysis of the ScPro3 model and the experimental structure of MtP5CR (magenta) in complex with NADP⁺ (PDB ID 5bsg, [35]). The variable fragments in the yeast enzyme (F60-I67 and N23-S38) are green. In (panel b), residue conservation is mapped on the ScP5CR surface for one subunit according to the color key (bottom); the second subunit is coral. The orientation on the left side in (panel b) is the same as in (panel a); the black rectangle indicates the fragment in (panels a and c). Surface electrostatic potential is shown in (panel c) for the same region as in (a); the color key is in kT/e. Negatively charged residues at variable positions are labeled.

When NADPH is the electron donor, arginine exhibited a mixed-type inhibition, suggesting that it may bind at an allosteric site, in addition to the active site. To propose the allosteric site, we analyzed the distribution of electrostatic potential on the *ScP5CR* surface (Supplementary Figure S5). The analysis revealed negatively charged patches, which occur at surface regions of high sequence variability (Figure 8b,c). In particular, residues Asp29, Glu47, Asp55, Glu58, Asp61, Glu62, and Glu164, all of which are highly variable in other species, contribute to the negative charge on the *ScP5CR* surface (Figure 8c). The molecular mechanism of the inhibition brought about by arginine cannot be inferred without the knowledge of its binding site. However, two conceivable scenarios include (i) inducing changes in the protein region that binds the 2'-phosphate of NADPH, or (ii) interfering with the protein flexibility by locking the hinge. Interestingly, ornithine was ineffective, suggesting that the site must specifically recognize the guanidine moiety. We also mapped the P5C binding site by superposing the structure of *MtP5CR* in complex with proline (PDB ID 5bsh); proline is a mimic of P5C, likely binding at the same site. Proline/P5C most likely binds to the ²⁴⁸GGTT²⁵¹ motif in *ScP5CR* that is highly conserved across species (Supplementary Figure S4). However, the putative allosteric binding site for arginine lies more than 25 Å away from that for proline/P5C. Therefore, independent binding of two arginine molecules at these two sites may contribute to the *ScP5CR* regulation brought about by arginine.

The superposition with the *MtP5CR* structure in complex with NADP⁺ (PDB ID 5bsg) was also used to hypothesize on the possible anion binding site. Due to the different effectiveness depending on the pyridine dinucleotide used, the inhibiting anions most likely compete with the 2'-phosphate of NADPH by interacting with the ⁴⁵HDEPS⁴⁹ fragment of *ScP5CR* (Figure 9a). In this scenario, the helix dipole increases the positive charge on the protein surface.

The AlphaFold model of *ScP5CR* also allowed the indication of cysteine pairs that could explain the stabilizing effect of DTT. The sequence of *ScP5CR* contains seven Cys residues (positions 10, 43, 131, 145, 218, 245, and 256, Figure 9b). We then measured the SY-SY distances, allowing for inter-subunit pairing. In pairs Cys10-Cys43 and Cys245-Cys256, the SY atoms are further than 8 Å apart, strongly disfavoring a disulfide formation, unless a major conformational change takes place. However, in the Cys145-Cys218* (* indicates an element from the other subunit), the distance SY-SY was 3.8 Å. This suggests that a minor rearrangement, such as a change in the Cα-Cβ torsion angle, could enable an S-S bond formation (Figure 9c).

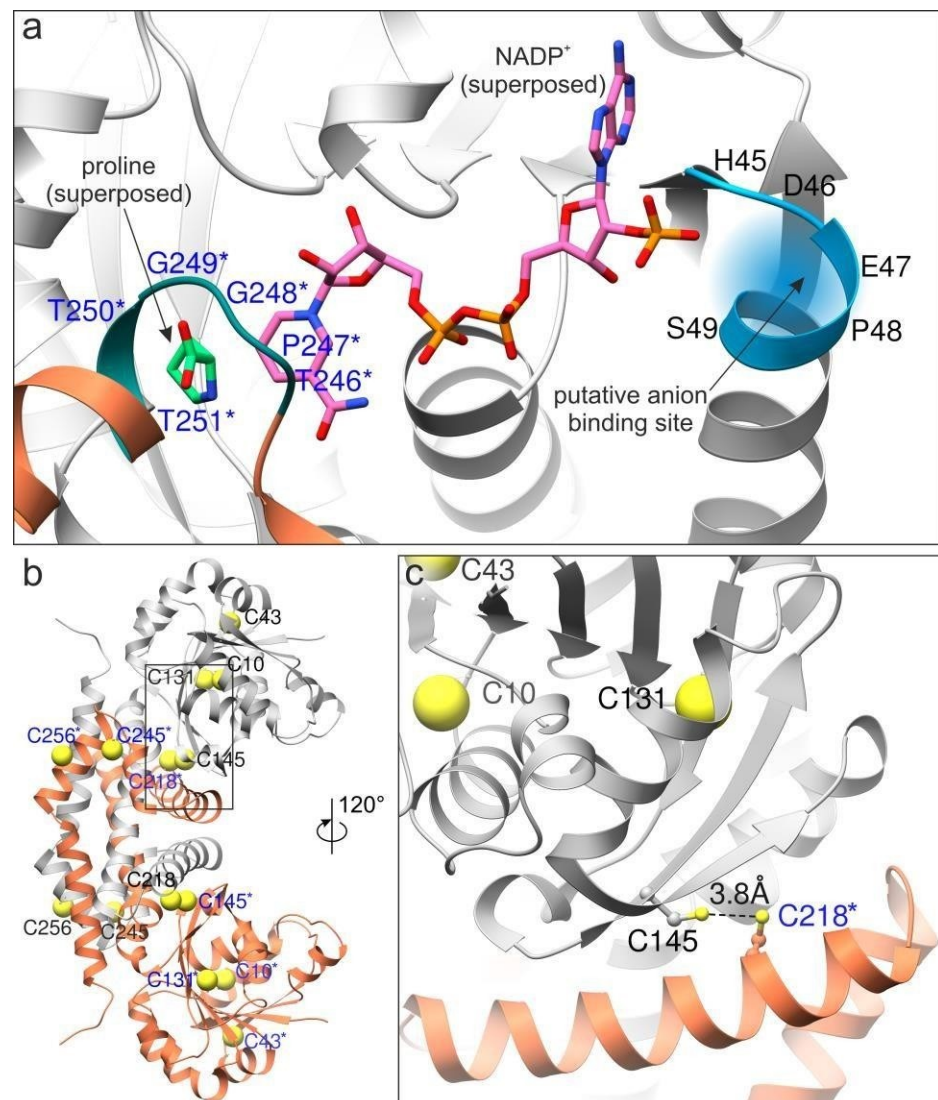


Figure 9. Identification of the putative sites of anion binding and disulfide formation. The coenzyme binding site with superposed NADP⁺ (from PDB ID 5bsg, [35]) and proline (PDB ID 5bsh) is shown in (panel a); the two subunits are gray and coral, respectively. Residues from the second subunit are labeled in blue and marked with asterisks. The anions most likely compete with the 2'-phosphate of NADPH. (Panel b) shows cysteine residues in *ScP5CR* (SY atoms shown as yellow spheres), whereas a close-up over the Cys145-Cys218* pair (ball-and-stick) is presented in (panel c).

4. Discussion

The purification and a preliminary characterization of P5C reductase from bakers' yeast were first reported in the 1980s [18,19]. It was described as a protein with a molecular weight of 125 kDa and a specific activity of about 47 $\mu\text{kat} (\text{mg protein})^{-1}$, showing a similar affinity toward NADH, NADPH, and P5C (K_M values of 48, 56, and 80 μM , respectively) but a V_{max} with NADPH that was about a half of that with NADH. The results we report are not in agreement with some of those conclusions. Retention patterns upon gel permeation chromatography suggested a remarkably larger native molecular mass (about 320 kDa) that would be consistent with a homodecameric composition of the holomer. Indeed, all crystallographic studies with full-length members of the P5C reductase superfamily showed to date only two oligomeric forms of the enzyme: dimeric (about 60 kDa) and decameric (about 300 kDa), whereas the occurrence of homotetramers has never been reported [24]. Concerning substrate affinity, a similar K_M value for P5C was found when NADH was the electron donor, but a much higher value was evident with NADPH. Only a

single value had been reported in the cited early studies, most likely that with NADH as the co-factor. Conflicting results were obtained also with respect to the activity at saturating nicotinamide adenine dinucleotide concentrations, as, in our study, V_{\max} with NADPH was not lower, but 2.5-fold higher than that with NADH. Although the presence of enzyme forms with dissimilar properties in different *S. cerevisiae* strains cannot be completely ruled out, a possible explanation for this discrepancy may be found in the sensitivity of the NADPH-dependent activity to salts. The presence of anions in the 10^{-2} to 10^{-1} M range was found to progressively reduce enzyme activity when NADPH was the electron donor, without affecting the NADH-dependent rate (Figure 6). Ion overloading into the reaction mixture may result from the contamination of the enzyme preparation and/or substrate solutions. In fact, in those early studies, the final protein fraction containing the enzyme, obtained from a DEAE-Sephadex column eluted with a gradient of 0–250 mM KCl, had not been desalted [18], and DL-P5C had been added following regeneration of its hydrazone in HCl [36] and subsequent neutralization, most likely by KOH addition.

In addition to correcting such errors, the present study provides information on other properties of the yeast enzyme, which have never been reported before and may contribute to a better understanding of its activity modulation in vivo. All members of the P5C reductase family have been reported to use both NADH and NADPH as the electron donor in vitro [24]. However, a thorough characterization of the enzyme from higher plants accounted for a likely preferential use of NADPH in vivo, although a significantly higher V_{\max} was found at saturating concentrations of NADH [8,20,35]. Several features were in fact shown to limit the NADH-dependent activity under conditions similar to those expected in the cell. With NADH as the co-factor, enzyme activity was inhibited by NADP^+ concentrations in the 10 to 100 μM range, by proline in the 10 to 100 mM range, and by anions at levels exceeding 100 mM, all conditions under which the NADPH-dependent activity was unaffected. On the contrary, cation concentrations higher than 10 mM were found to stimulate the latter up to 4-fold, contributing at least in part to stress-induced proline synthesis. Moreover, the apparent affinity for P5C was in all cases about 10-fold higher with NADH than with NADPH [8,20,35], with K_M values remarkably higher than the intracellular level of the substrate [37], which is suspected to exert toxic effects at millimolar concentrations [37,38]. Analogous results were reported for the enzyme from the human pathogen *Streptococcus pyogenes*, although, in that case, the sensitivity to salts was not investigated [22]. The properties found for yeast P5C reductase show an exactly opposite pattern. A significantly higher V_{\max} is evident at saturating concentrations of NADPH, but the NADPH-dependent activity is inhibited by NAD^+ , proline, and anions, and shows an apparent K_M value for P5C (440 μM) largely exceeding the expected intracellular level of the substrate (50–100 μM). Under the same conditions, the NADH-dependent activity was substantially unaffected. On the whole, data, thus, seem to suggest a preferential use of NADH in vivo. Indeed, the activity with NADPH in the presence of substrates and effectors at concentrations similar to those reported in yeast cytoplasm [33] was only about 15% of that with NADH (Figure 7). Only for P5C reductase from the obligate fermentative bacterium *Zymomonas mobilis*, a preference for NADH has also been described to date, but in that case, it was a consequence of an intrinsically lower K_{cat}/K_M ratio ($\approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ with NADH vs. $0.08 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ with NADPH [23]). Contrary to the plant enzyme, the presence of salt did not stimulate the activity of *S. cerevisiae* P5C reductase, a result that seems consistent with the fact that yeast does not accumulate proline under hyperosmotic stress conditions [10].

Interestingly, the NADPH-dependent activity of yeast P5C reductase was found to be inhibited by millimolar concentrations of arginine, with an IC_{50} value almost identical to that of proline. To the best of our knowledge, this feature has not been reported to date for the enzyme from any other source, and is most likely a consequence of the dual role of P5C reductase in yeast, where it catalyzes the last reaction in both proline synthesis and arginine degradation [12]. A somehow similar mechanism has been reported for P5C synthetase, a bifunctional enzyme bearing both Pro2 and Pro1 activities, which is present in mammals in

two forms deriving from the same primary transcript by differential splicing. The short form was found to be inhibited by ornithine (IC_{50} 0.25 mM), whereas the long version was unaffected, suggesting that the latter is responsible for the synthesis of proline, whereas the former is involved in the synthesis of ornithine and arginine via P5C and the reverse reaction of OAT [7]. In higher plants, which synthesize ornithine and arginine through a route that is distinct from that of proline [39], P5C synthetase was consistently found to be inhibited by ornithine and arginine only at concentrations significantly exceeding their homeostatic levels ($IC_{50} > 50$ mM [9]). In addition, yeast P5C reductase under substrate non-limiting conditions is inhibited by arginine at high doses ($IC_{50} = 116$ mM, Figure 4). However, the inhibition is of competitive type with respect to P5C, and a kinetic analysis at varying P5C concentration showed a K_i value of 19 mM (Figure 5), a concentration very near to that reported for arginine in the cell (15 mM [33]). These results strengthen the possibility that inhibition may take place *in vivo*, yet its significance could be questioned if considering that the rate of proline synthesis would not be reduced as a consequence, with the NADH-dependent activity being substantially unaffected. An opposite situation occurs in plants, where P5C reductase preferentially uses NADPH and is inhibited by proline only if NADH is the co-factor [8,20]. Although more experimental evidence is required to substantiate such a hypothesis, arginine inhibition may represent a mechanism to avoid NADPH depletion and maintain an optimal NADH/NADPH ratio under conditions in which high rates of P5C reductase activity are needed to use the amino acid as the main nitrogen or carbon source. NADPH levels in yeast are 5–10 fold lower than those of NADH [33], and recent data showed that perturbation of the subsequent mitochondrial oxidation of proline may in fact alter the redox balance [40]. In plants, on the contrary, when proline accumulation is needed to counteract an osmotic imbalance, inhibition of the NADH-dependent activity could be functional to avoid NADH depletion, with NADPH being continuously produced by the activation under stress of the oxidative pentose phosphate pathway.

The highest specific activity of yeast P5C reductase and its constitutive expression cause the presence of a limited amount of the enzyme in the cell. This, combined with its high lability during ammonium sulfate fractionation, restrained the yield of purified protein, and hampered the attempts to obtain crystals for X-ray diffraction. This notwithstanding, an *in silico* analysis allowed us to investigate the structural basis of at least part of enzyme features. Among the members of the P5C reductase family for which a crystallographic structure is available, the sequence of the yeast protein showed the highest similarity with that from the legume *M. truncatula*, despite exhibiting contrasting functional properties. The main structural difference is evident in the amino-terminal region (residues 23–38 and 60–67 in ScP5CR; Figure 8, Supplementary Figure S4) that is substantially longer than that of the plant enzyme. In fact, these additional fragments contribute to form a negatively charged surface near the NADPH binding site that could represent the allosteric site for arginine interaction. Between these two additional sequences is also positioned the 45 HDEPS $_{49}$ fragment, which may interact with anions that compete with the 2'-phosphate of NADPH (Figure 9a), thereby causing the specific inhibition of the NADPH-dependent activity. *In silico* analysis also allowed us to hypothesize on cysteine pairs that could explain enzyme lability and the stabilizing effect of reductants. The structure of yeast P5C reductase contains only two Cys residues that are near enough to consent disulfide formation, Cys145 and Cys218* (where * indicates an element from the other subunit forming a functional homodimer; Figure 9c). Such a linkage would lock the coenzyme-binding N-terminal domain in one conformation, suboptimal for catalysis. The addition of DTT to purified preparations prevented enzyme inactivation, but did not restore activity. Consistently, a secondary protein band with a retardation coefficient that is coherent with that of a homodimer was found upon SDS-PAGE analysis of purified preparations (Supplementary Figure S1).

5. Conclusions

The functional properties of yeast P5C reductase, only partially investigated in previous works, have been thoroughly determined. Contrary to the enzyme from plants, results account for a preferential use of NADH. Some unusual features, such as an allosteric inhibition by arginine and a lack of stimulation by salts, are in agreement with the peculiar role of proline metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, which does not accumulate proline under hyperosmotic stress and uses P5C reductase also for arginine catabolism.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10102077/s1>, Figure S1: Purification of yeast P5C reductase; Figure S2: Substrate affinity of yeast P5C reductase; Figure S3: Phylogenetic tree depicting the position of the yeast enzyme among the predicted members of the P5C reductase family; Figure S4: Multiple sequence alignment of *Saccharomyces cerevisiae* P5C reductase and selected representatives of the P5C reductase family; Figure S5: Distribution of electrostatic potential on the ScP5CR surface.

Author Contributions: G.F. designed the study; G.F., G.S. and M.R. performed the research; G.F. and M.R. analyzed the data; G.F. drafted the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by grants from the University of Ferrara (FAR 2021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Trovato, M.; Forlani, G.; Signorelli, S.; Funck, D. Proline Metabolism and Its Functions in Development and Stress Tolerance. In *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*; Hossain, M.A., Kumar, V., Burritt, D.J., Fujita, M., Mäkelä, P.S.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; pp. 41–72.
2. Forlani, G.; Trovato, M.; Funck, D.; Signorelli, S. Regulation of Proline Accumulation and Its Molecular and Physiological Functions in Stress Defence. In *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*; Hossain, M.A., Kumar, V., Burritt, D.J., Fujita, M., Mäkelä, P.S.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; pp. 73–97.
3. Zheng, Y.; Cabassa-Hourton, C.; Planchais, S.; Lebreton, S.; Savouré, A. The proline cycle as an eukaryotic redox valve. *J. Exp. Bot.* **2021**, *72*, 6856–6866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Qamar, A.; Mysore, K.S.; Senthil-Kumar, M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 503. [[CrossRef](#)]
5. Huynh, T.Y.L.; Zareba, I.; Baszanowska, W.; Lewoniewska, S.; Palka, J. Understanding the role of key amino acids in regulation of proline dehydrogenase/proline oxidase (prodh/pox)-dependent apoptosis/autophagy as an approach to targeted cancer therapy. *Mol. Cell. Biochem.* **2020**, *466*, 35–44. [[CrossRef](#)]
6. Zarattini, M.; Forlani, G. Toward Unveiling the Mechanisms for transcriptional regulation of proline biosynthesis in the plant cell response to biotic and abiotic stress conditions. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fichman, Y.; Gerdes, S.Y.; Kovács, H.; Szabados, L.; Zilberstein, A.; Csonka, L.N. Evolution of proline biosynthesis: Enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev.* **2015**, *90*, 1065–1099. [[CrossRef](#)]
8. Giberti, S.; Funck, D.; Forlani, G. Delta1-Pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: Stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol.* **2014**, *202*, 911–919. [[CrossRef](#)]
9. Sabbioni, G.; Funck, D.; Forlani, G. Enzymology and regulation of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase 2 from rice. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 672702. [[CrossRef](#)]
10. Takagi, H. Proline as a stress protectant in yeast: Physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 211–223. [[CrossRef](#)]

11. Tomenchok, D.M.; Brandriss, M.C. Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5364–5372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brandriss, M.C.; Magasanik, B. Proline: An essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1980**, *143*, 1403–1410. [[CrossRef](#)]
13. Ter Schure, E.G.; van Riel, N.A.; Verrips, C.T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 67–83. [[CrossRef](#)]
14. Sekine, T.; Kawaguchi, A.; Hamano, Y.; Takagi, H. Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* gamma-glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 4011–4019. [[CrossRef](#)]
15. Brandriss, M.C.; Magasanik, B. Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: Enzyme induction by proline. *J. Bacteriol.* **1979**, *140*, 498–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Huang, H.L.; Brandriss, M.C. The regulator of the yeast proline utilization pathway is differentially phosphorylated in response to the quality of the nitrogen source. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 892–899. [[CrossRef](#)]
17. Hinnebusch, A.G. Transcriptional and translational regulation of gene expression in the general control of amino-acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1990**, *38*, 195–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Matsuzawa, T.; Ishiguro, I. Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate reductase from Baker's yeast. Purification, properties and its application in the assays of L- δ^1 -pyrroline-5-carboxylate and L-ornithine in tissue. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Enzymol.* **1980**, *613*, 318–323. [[CrossRef](#)]
19. Matsuzawa, T.; Ishiguro, I. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from baker's yeast: Further purification by affinity chromatography with 5' AMP-Sepharose 4B. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Enzymol.* **1980**, *616*, 381–383. [[CrossRef](#)]
20. Forlani, G.; Bertazzini, M.; Zarattini, M.; Funck, D.; Ruszkowski, M.; Nocek, B. Functional properties and structural characterization of rice δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Forlani, G.; Nocek, B.; Chakravarthy, S.; Joachimiak, A. Functional characterization of four putative δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductases from *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1442. [[CrossRef](#)]
22. Petrollino, D.; Forlani, G. Coenzyme preference of *Streptococcus pyogenes* δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase: Evidence supporting NADPH as the physiological electron donor. *Amino Acids* **2012**, *43*, 493–497. [[CrossRef](#)]
23. Forlani, G.; Nocek, B.; Ruszkowski, M. Peculiar substrate specificity of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in the obligately fermentative bacterium *Zymomonas mobilis*. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 6205–6211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Forlani, G.; Makarova, K.S.; Ruszkowski, M.; Bertazzini, M.; Nocek, B. Evolution of plant δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Williams, I.; Frank, L. Improved chemical synthesis and enzymatic assay of δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 85–97. [[CrossRef](#)]
26. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
27. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Zidek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589. [[CrossRef](#)]
28. Ashkenazy, H.; Abadi, S.; Martz, E.; Chay, O.; Mayrose, I.; Pupko, T.; Ben-Tal, N. ConSurf 2016: An improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W344–W350. [[CrossRef](#)]
29. Suzek, B.E.; Wang, Y.Q.; Huang, H.Z.; McGarvey, P.B.; Wu, C.H.; The UniProt Consortium. UniRef clusters: A comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 926–932. [[CrossRef](#)]
30. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]
31. Baker, N.A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M.J.; McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10037–10041. [[CrossRef](#)]
32. Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; Baker, N.A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665–W667. [[CrossRef](#)]
33. Ramirez-Gaona, M.; Marcu, A.; Pon, A.; Guo, A.C.; Sajed, T.; Wishart, N.A.; Karu, N.; Djoumbou Feunang, Y.; Arndt, D.; Wishart, D.S. YMDB 2.0: A significantly expanded version of the yeast metabolome database. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D440–D445. [[CrossRef](#)]
34. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ruszkowski, M.; Nocek, B.; Forlani, G.; Dauter, Z. The structure of *Medicago truncatula* δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mezl, V.A.; Knox, W.E. Properties and analysis of a stable derivative of pyrroline-5-carboxylic acid for use in metabolic studies. *Anal. Biochem.* **1976**, *74*, 430–440. [[CrossRef](#)]
37. Giberti, S.; Bertazzini, M.; Liboni, M.; Berlicki, L.; Kafarski, P.; Forlani, G. Phytotoxicity of aminobisphosphonates targeting both δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase and glutamine synthetase. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 435–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Deuschle, K.; Funck, D.; Forlani, G.; Stransky, H.; Biehl, A.; Leister, D.; van der Graaff, E.; Kunze, R.; Frommer, W.B. The role of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell* **2004**, *16*, 3413–3425. [[CrossRef](#)]

39. Winter, G.; Todd, C.D.; Trovato, M.; Forlani, G.; Funck, D. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 534. [[CrossRef](#)]
40. Zulkifli, M.; Neff, J.K.; Timbalia, S.A.; Garza, N.M.; Chen, Y.; Watrous, J.D.; Murgia, M.; Trivedi, P.P.; Anderson, S.K.; Tomar, D.; et al. Yeast homologs of human MCUR1 regulate mitochondrial proline metabolism. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4866. [[CrossRef](#)]

3. Aminoetilenbisfosfonati fenil-sostituiti inibiscono la P5C reduttasi umana e manifestano attività antiproliferativa nei confronti di cellule tumorali che sintetizzano prolina ad alte concentrazioni.

Nella maggior parte degli organismi, indipendentemente dal precursore, l'ultima reazione necessaria per la produzione di prolina coinvolge l'enzima P5C reduttasi, il quale riduce il P5C a prolina in un processo NAD(P)H dipendente (Forlani et al., 2015). Andando a compromettere l'espressione di questo enzima, l'intero processo viene bloccato impedendo alla cellula di sintetizzare l'aminoacido. Per i vegetali questa situazione risulta fatale, infatti mutazioni che compromettono la funzionalità della P5CR di *Arabidopsis thaliana* sono causa di morte embrionale (Meinke, 2020). In quest'ottica, la P5CR rappresenta un potenziale bersaglio per lo sviluppo di inibitori enzimatici impiegabili come erbicidi (Forlani et al., 2008).

Nel caso specifico dello sviluppo di alcuni tipi tumore, condizione in cui si verifica una profonda riprogrammazione del metabolismo cellulare, è stato riportato che l'espressione di P5CR e PRODH subisce un incremento. Questo si verifica soprattutto nelle fasi in cui le richieste cellulari aumentano come ad esempio durante il processo metastatico, per il quale è necessario soddisfare le aumentate richieste di ATP, molecole carboniose e potere riducente conseguenti all'intensificata attività proliferativa (Ding et al., 2020; Xiao et al., 2020). È facile intuire come in questo contesto assuma particolare rilevanza il ciclo della prolina che, coinvolgendo P5CR e PRODH, consente alle cellule di trasferire equivalenti riducenti dal citosol ai mitocondri e, al contempo, rifornire di elettroni la catena respiratoria mitocondriale (Hagedorn & Phang, 1983; Phang, 2021). Come per i vegetali, dunque, lo sviluppo di molecole in grado di inibire l'attività della P5CR umana potrebbe risultare utile per interferire con la sopravvivenza cellulare, rappresentando una nuova strategia terapeutica contro il cancro.

A partire dal 2008 è stato condotto un processo di screening su una serie di derivati dell'acido aminometilenebisfosfonico, per valutare la loro capacità di interferire con il meccanismo catalitico della P5CR (Forlani et al., 2007, 2008). Tali analisi hanno dimostrato come queste molecole siano in grado di inibire l'enzima vegetale. Attraverso studi *in silico* è stato inoltre possibile ipotizzare quali fossero le caratteristiche strutturali necessarie per esplicitare questo effetto inibitorio, ovvero la presenza di due gruppi fosfonici, un anello fenilico ed un donatore di legami a idrogeno (Forlani et al., 2008, 2013).

Per quanto riguarda l'enzima umano, allo stesso scopo è stato condotto uno screening su composti farmaceutici già commercialmente disponibili. Attraverso questo studio è stata identificata come blando inibitore la pargilina, farmaco che di norma viene utilizzato come antipertensivo. Lo studio si è esteso anche agli analoghi di questa molecola, ed il composto che *in vitro* ha mostrato la concentrazione inibente (IC_{50}) più bassa, pari a $9 \mu M$, è la 4-bromopargilina. Il trattamento di cellule tumorali con questa molecola è però risultato poco efficace, portando alla riduzione della proliferazione del 30-40% alla dose di $10 \mu M$ (Milne et al., 2019).

Con l'intento di individuare un composto che esplicasse un'inibizione più marcata, nel seguente lavoro si è deciso di testare una tra le molecole che nei precedenti studi ha esercitato maggior effetto inibente nei confronti della P5CR vegetale: l'acido 3.5-dibromofenil-aminometilene bisfosfonico ($Br_2PAMBPA$) (Forlani et al., 2013). Questa molecola presenta tutti i requisiti strutturali precedentemente descritti necessari per esercitare l'inibizione. Esperimenti condotti su colture di colza (*Brassica napus*) mostrano che il trattamento con il composto provoca una riduzione della proliferazione e contemporaneamente un aumento della concentrazione intracellulare di P5C, risultato che fornisce una prova diretta dell'avvenuta inibizione dell'enzima (Giberti et al., 2017). L'effetto inibitorio è stato riscontrato anche verso l'enzima derivante dal patogeno umano *Streptococcus pyogenes*, sottolineando la versatilità di questo composto (Forlani et al., 2012).

Sulla base di tali evidenze, il presente studio è stato condotto allo scopo di valutare l'efficacia inibitoria del $Br_2PAMBPA$ nei confronti dell'enzima umano purificato. Inoltre, lo stesso composto è stato utilizzato per il trattamento di due linee cellulari tumorali, selezionate per analizzarne gli effetti sulla proliferazione.

Phenyl-substituted aminomethylene-bisphosphonates inhibit human P5C reductase and show antiproliferative activity against proline-hyperproducing tumour cells

Giuseppe Forlani^a, Giuseppe Sabbioni^a, Daniele Ragno^b, Davide Petrollino^a and Monica Borgatti^a 

^aDepartment of Life Science and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy; ^bDepartment of Chemical, Pharmaceutical and Agricultural Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

ABSTRACT

In certain cancers, such as breast, prostate and some lung and skin cancers, the gene for the enzyme catalysing the second and last step in proline synthesis, *d*¹-pyrroline-5-carboxylate (P5C) reductase, has been found upregulated. This leads to a higher proline content that exacerbates the effects of the so-called proline-P5C cycle, with tumour cells effectively using this method to increase cell survival. If a method of reducing or inhibiting P5C reductase could be discovered, it would provide new means of treating cancer. To address this point, the effect of some phenyl-substituted derivatives of aminomethylene-bisphosphonic acid, previously found to interfere with the catalytic activity of plant and bacterial P5C reductases, was evaluated *in vitro* on the human isoform 1 (PYCR1), expressed in *E. coli* and affinity purified. The 3,5-dibromophenyl- and 3,5-dichlorophenyl-derivatives showed a remarkable effectiveness, with IC₅₀ values lower than 1 mM and a mechanism of competitive type against both P5C and NADPH. The actual occurrence *in vivo* of enzyme inhibition was assessed on myelogenous erythroleukemic K562 and epithelial breast cancer MDA-MB-231 cell lines, whose growth was progressively impaired by concentrations of the dibromo derivative ranging from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M. Interestingly, growth inhibition was not relieved by the exogenous supply of proline, suggesting that the effect relies on the interference with the proline-P5C cycle, and not on proline starvation.

ARTICLE HISTORY

Received 1 February 2021
Revised 9 April 2021
Accepted 15 April 2021

KEYWORDS

Antiproliferative activity;
P5C reductase inhibitors;
proline-P5C cycle; proline-
overproducing tumours


Introduction

Tumour development implies a deep reprogramming of cell metabolism, often inducing some additional or differential metabolic dependencies. These can be exploited for the identification of new therapeutic strategies based on substances able to target specific requirements of malignant cells¹. Among the changes in the metabolic fluxes undergone by tumoral cells to satisfy a larger demand for carbon skeletons, ATP and reducing power, increasing rates of the so-called proline-P5C cycle seem to play a significant role in several cancer types^{2–3}. Although some other mechanisms have been also hypothesised, such as an increase of collagen synthesis and maturation and the acquisition of cancer cell plasticity and heterogeneity⁴, the main contribution of proline metabolism to tumorigenesis seems to rely upon the consequently augmented redox cycling and maintenance of pyridine nucleotides⁵. Proline is synthesised from glutamate or ornithine in short pathways sharing the last step, the NAD(P)H-dependent reduction of the common intermediate *d*¹-pyrroline-5-carboxylic acid (P5C) by P5C reductase (EC 1.5.1.2)⁶. P5C is also formed during the mitochondrial degradation of proline to glutamate, which involves two oxidative steps catalysed in sequence by proline dehydrogenase (ProDH; EC 1.5.5.2)⁷ and P5C dehydrogenase (P5CDH, also known as aldehyde dehydrogenase 4; EC 1.2.1.88)⁸. The former is believed to feed electrons directly to the respiratory ubiquinone pool,⁹ whereas the

latter uses NAD⁺ as the electron acceptor¹⁰. The occurrence of a shortcut in which the P5C released by ProDH is not further oxidised by P5CDH, but is reduced back to proline by P5C reductase, has been early hypothesised¹¹. Such apparently futile proline-P5C cycle (Figure 1) may provide the cell with a mechanism for transferring reducing equivalents from the cytosol to the mitochondrion^{11–12}, and to fuel the respiratory chain¹³. Moreover, ProDH activity may alternatively lead to ROS production¹⁴, which can trigger in turn the apoptotic mechanism¹⁵, or increased ATP synthesis for protective autophagy¹⁶. Although in plants the occurrence of the proline-P5C cycle is still a matter of debate due to the physical separation of P5C reductase and ProDH¹⁷, its role in human cell is now well established¹⁸. Consistently, high levels of expression of both ProDH and P5C reductase have been reported in a series of cases in which cell metabolism needs to be enhanced, for instance during nutrient stress¹⁹ or metastasis formation²⁰.

Being highly expressed in several cancer types and possibly linked to tumour cell survival^{2–4,21–23}, the activity of P5C reductase represents a potential target for the development of new therapeutic approaches²⁴. In fact, recent studies on breast²⁵ and prostate²⁶ cancer cell lines demonstrated that P5C reductase knockout was effective in inducing a reduction in tumour size *in vivo* and an increase in cell cycle arrest and apoptosis *in vitro*, respectively. These results would open interesting perspectives through gene

CONTACT Giuseppe Forlani  flg@unife.it  Department of Life Science and Biotechnology, University of Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara (FE), Italy

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

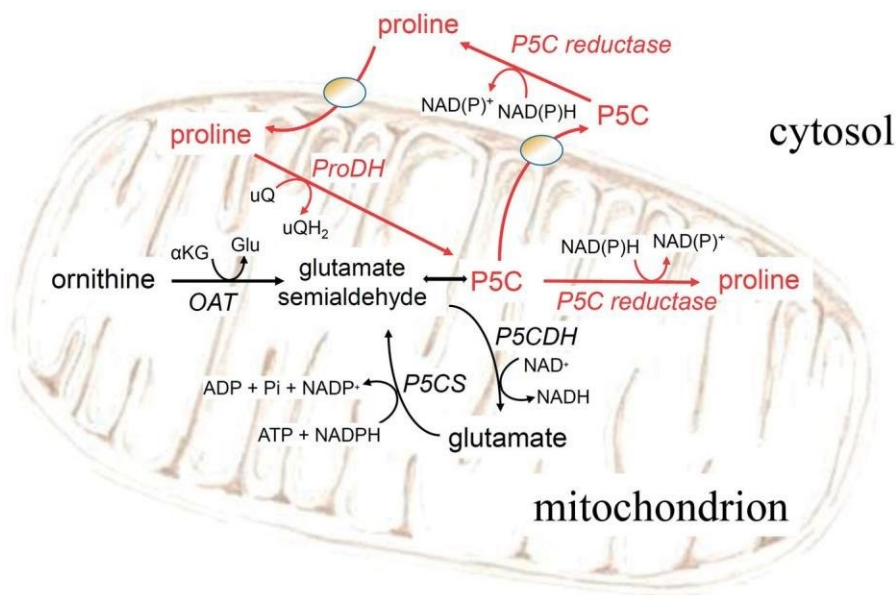


Figure 1. The proline-P5C cycle. Abbreviations that are not listed in the text: OAT: ornithine-d-aminotransferase; α KG: α -ketoglutarate; Glu: glutamate; P5CS: P5C synthetase; uQ: oxidised ubiquinone; uQH₂: reduced ubiquinone.

therapy, when approved. In the meantime, an amenable approach would be represented by the identification of specific and effective inhibitors of P5C reductase, to be used as antiproliferative agents. A previous screening of a commercially available library of pharmaceutically active compounds pointed out pargylin as a fragment-like hit, with a modest IC₅₀ of 200 μ M, but an encouraging ligand efficiency. The analysis of a number of analogues allowed identifying 4-bromopargyline as the most effective inhibitor, showing an IC₅₀ value of 9 μ M. However, the treatment of cancer cells with the compound resulted in mild effects, with 30–40% reduction of breast cancer cell proliferation at 10 μ M, and an unclear dose-activity relationship on intracellular free proline at higher levels²⁷.

Inhibitors of P5C reductase have been previously exploited as potential herbicides. A preliminary screening *in vitro* pointed out the ability of some aminomethylene bisphosphonic acids to interfere with the activity of the plant enzyme in the micromolar to millimolar range²⁸. Synthesis and analysis of several active derivatives allowed defining the steric and electronic requirements for maintenance or enhancement of the inhibitory properties²⁹, and identifying 3,5-dibromophenyl-aminomethylene bisphosphonic acid as the most effective analogue³⁰. The ability of the latter to inhibit plant growth, and cause the accumulation of P5C levels in treated seedlings, proved that the inhibition of P5C reductase takes place *in vivo*³¹. Moreover, the same compounds were found even more active *in vitro* against P5C reductase of the human pathogen *Streptococcus pyogenes*, although concentrations 2 orders of magnitude higher than IC₅₀ were required to inhibit bacterial growth³². Based on this rationale, we investigated the effectiveness of aminomethylene-bisphosphonic acids in inhibiting human P5C reductase and reducing proliferation of some selected tumour cell lines.

Methods

Substrates, reagents and inhibitors

Unless specified otherwise, all compounds were purchased from Sigma-Aldrich, and were of analytical grade. D¹-pyrroline-5-carboxylic acid was synthesised by the periodate oxidation of *d*-allo-

hydroxylysine (Sigma H0377) and purified by cation-exchange chromatography onto a Dowex AG50W-X4 (200–400 mesh) column, as described³³. DL-P5C solutions in 1 M HCl were stored at 4 °C in the dark, and brought to neutral pH just before the assay using proper aliquots of a 1 M Tris base solution. Pargyline (*N*-methyl-*N*-(2-propynyl)benzylamine hydrochloride) was from Sigma(P8013), whereas 4-bromopargyline²⁷ was a generous gift from prof. Reuven Agami (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands). Phenyl-substituted aminomethylene-bisphosphonic acids were synthesised as described²⁹. For 3,5-dibromophenylaminomethylene-bisphosphonic acid (Br₂PAMBPA) a slightly different procedure was adopted, as it follows.

Procedure for the synthesis of 3,5-dibromophenylaminomethylene-bisphosphonic acid

3,5-Dibromoaniline (3.01 g, 12.00 mmol), triethyl orthoformate (2.40 mL, 14.40 mmol) and diethyl phosphite (6.18 mL, 48.00 mmol) were vigorously stirred and heated at 120 °C for 16 h. After cooling, volatiles were evaporated under reduced pressure. Trituration of the solid with *n*-hexane followed by filtration furnished the pure ester tetraethyl (3,5-dibromophenylaminomethylene) bisphosphonate (4.38 g, 68% yield) which was further dissolved in concentrated hydrochloric acid (300 mL) and refluxed for 4 h. After this period the reaction mixture was cooled and concentrated under reduced pressure affording a solid which was washed with small amounts of cold distilled water and dried under vacuum to obtain the pure bisphosphonic acid Br₂PAMBPA as a whitish solid (3.31 g, 65% overall yield). For NMR analysis ¹H (300 MHz), ¹³C (101 MHz), ³¹P (122 MHz) NMR spectra (Supplementary Figures S1 and S2) were recorded in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ solutions at room temperature. The chemical shifts in ¹H and ¹³C NMR spectra were referenced to trimethylsilane (TMS), while in ³¹P NMR were referenced to 85% H₃PO₄ in D₂O. Peak assignments were aided by ¹H-¹H COSY and gradient-HMQC experiments.

Tetraethyl (3,5-Dibromophenylaminomethylene)bisphosphonate:
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (s, 1H, Ar), 6.77 (s, 2H, Ar), 4.35 (bs, 1H, NH), 4.27–4.08 (m, 8H, OCH₂), 4.05 (t, ²J_{H-P} ¼ 22.0 Hz, 1H, CHP₂), 1.32 (t, ¹J_{H-H} ¼ 7.1 Hz, 6H, CH_{3(a)}), 1.28 (t, ¹J_{H-H} ¼ 7.1 Hz,

6H, CH_{3(b)}); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148.2 (C, Ar), 124.2 (CH, Ar), 123.4 (2 C, Ar), 115.2 (2 CH, Ar), 63.9 (2 OCH_{2(a)}), 63.6 (2 OCH_{2(b)}), 49.9 (t, ¹J_{C-P} 148.0 Hz, CHP₂), 16.4 (2 CH_{3(a)}), 16.3 (2 CH_{3(b)}); ³¹P NMR (122 MHz, CDCl₃) δ 18.8 (2 P).

3,5-Dibromophenylaminomethylenebisphosphonic acid: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.88 (bs, 4H, 4 OH), 6.97 (s, 2H, Ar), 6.81 (s, 1H, Ar), 6.18 (bs, 1H, NH), 3.96 (d, ²J 22.0 Hz, CHP₂); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.2 (C, Ar), 122.8 (CH, Ar), 120.3 (2 C, Ar), 114.8 (2 CH, Ar), 50.8 (t, ¹J_{C-P} 140.0 Hz, CHP₂); ³¹P NMR (122 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15.0 (2 P).

Purification of human P5C reductase

The gene coding for P5C reductase 1 (*PYCR1*, gene ID 5831), cloned into the expression vector pET28ab³⁴, was kindly provided by prof. Zihao Rao (Tsinghua University, China). For heterologous expression, *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells (Invitrogen) were made competent by the calcium chloride method, transformed with the recombinant vector and selected on kanamycin-containing LB plates. About 6 h after inducing gene expression in liquid LB medium at 24 °C by the addition of 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside, cells were harvested by centrifugation and stored at -20 °C. Aliquots (about 1 g cell material) were lysed in an ice-cold mortar with 2 g g⁻¹ alumina and resuspended in 20 mL g⁻¹ extraction buffer (50 mM Na phosphate buffer, pH 7.5, containing 200 mM NaCl and 20 mM imidazole). The His-tagged protein was purified from clarified extracts by affinity chromatography onto a His-Trap™ FF column (1 mL, GE Healthcare 17-5319-01). Stepwise elution was achieved by increasing concentrations of imidazole in extraction buffer. Discontinuous SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed at 8 mA with a 5% stacking and a 12% separating gel, using a Minigel system (BioRad). Samples were mixed with the same volume of 125 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol and 10% (v/v) *b*-mercaptoethanol, and denatured 5 min at 100 °C. Proteins were visualised by soaking gels in Quick Coomassie Stain (CliniSciences) overnight.

P5C reductase assay

Enzyme activity was measured at 30 °C as the P5C-dependent oxidation of NAD(P)H. Assays were performed in 96-microwell plates in a final volume of 0.2 mL. The assay mixture contained 4 mM DL-P5C and 0.5 mM of either NADH or NADPH in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Parallel blanks were performed in which P5C had been omitted. The decrease of absorbance was measured for 5 min at 0.5-min intervals using a Ledetect plate reader (Labexim, Lengau, Austria) equipped with a LED plugin at 340 nm. Residual NAD(P)H content was estimated on the basis of calibration curves obtained under the same conditions. Activity was calculated by linear regression of data using Prism 6 for Windows, version 6.03 (GraphPad Software, San Diego, CA); one unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyses the P5C-dependent oxidation of 1 nmol NAD(P)H s⁻¹ (nkat). Proteins were measured by the Coomassie Brilliant Blue method³⁵, using bovine serum albumin as the standard. To evaluate substrate affinity, invariable substrates were fixed at the same levels as in the standard assay. For variable substrates, L-P5C ranged from 400 to 2000 μ M, while the concentration of NADH and NADPH ranged from 125 to 500 μ M. To evaluate the inhibition brought about by pargyline and aminomethylene-bisphosphonates, freshly prepared 10 mM stock solution in water and 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, respectively, were diluted with water and added to the

reaction mixture before enzyme addition. Parallel control samples were carried out in the absence of any inhibitor. Activity was calculated as described above. Mean activity value in controls was set as 100%, and activity in treated samples was expressed as percent of such value. Percent values were plotted against the logarithm of inhibitor concentration, and data were interpolated using the equation $Y = 100 / (1 + 10^{(X - X_{50}) / HillSlope})$. Assays were

performed in triplicate (technical replications). Each experiment was repeated at least twice with different enzyme preparations (biological replicates). K_M and V_{max} values, as well as the concentrations causing 50% inhibition (IC₅₀), K_I values and their confidence intervals were estimated by non-linear regression analysis using Prism 6.

Human cell lines and growth conditions

Human myelogenous erythroleukemic K562 cells³⁶ were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂/air either in complete RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) or in a modified medium without L-proline (United States Biological, Massachusetts, USA), both supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Biowest, Nuaille, France), 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 μ g mL⁻¹ streptomycin. Human epithelial breast cancer MDA-MB-231 cells³⁷ were cultured under the same conditions in DMEM medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS, 100 U mL⁻¹ penicillin, 100 μ g mL⁻¹ streptomycin and 2 mM L-glutamine.

Antiproliferative assays

K562 cells in the late exponential phase of growth were seeded in 1 mL medium without FBS in 24-well plates to an initial density of about 20,000 cells mL⁻¹. Treatments with Br₂PAMBPA in the range 1–200 μ M were carried out 5 h after seeding. Cell growth was monitored at increasing time after the treatment by determining cell density on 50- μ L aliquots with a Z1 Coulter Counter (Coulter Electronics), considering a dimensional range between 8 and 20 μ m. MDA-MB-231 cells in the late exponential phase of growth (90% confluence) were washed with sterile PBS, incubated with sterile trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) for 2 min, resuspended in fresh DMEM medium and centrifuged at 1000 g at room temperature for 5 min. Pellets were resuspended in sterile PBS and spun again to remove any residue of trypsin. Cells were finally resuspended in DMEM medium without FBS, and seeded in 24-well plates in a final volume of 1 mL to an initial density of about 20,000 cells mL⁻¹. Treatments with Br₂PAMBPA in the range 1–200 μ M were carried out 5 h after seeding, and 2% FBS was added to each well 24 h thereafter. Cell growth was monitored at increasing time after the treatment by destructive harvest. For both cell lines each treatment was carried out at least in triplication, and each experiment was performed at least twice.

Cell viability assay

Cell viability was assessed by the Trypan Blue exclusion test³⁸. Stained cells were counted in a Bürker chamber. Viable and nonviable cells were recorded separately, and the results of three independent counts were pooled. Data were expressed as percent of alive cells.

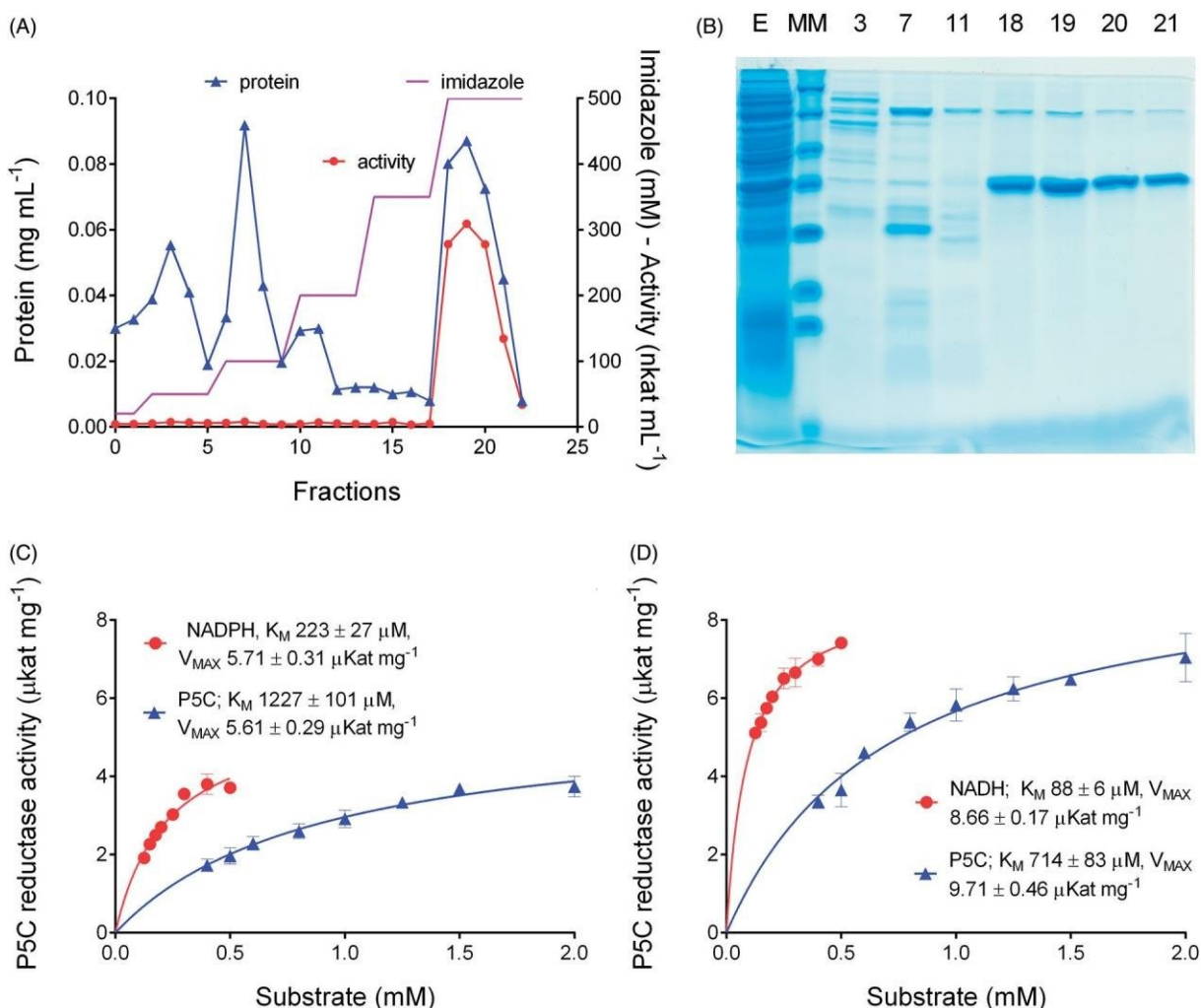


Figure 2. Purification and kinetic characterisation of human P5C reductase. The gene for P5C reductase 1 (*PYCR1*, gene ID 5831) was heterologously expressed in *E. coli*, and the recombinant His-tagged protein was affinity purified by a stepwise gradient of imidazole (panel A). Homogeneity of purified preparations was checked by SDS-PAGE (panel B). Number of lanes in the gel refer to the fractions in panel A; E, crude extract; MM, molecular markers (Fermentas SM0431). Specific activity of the enzyme was measured at varying either substrate, using NADPH (panel C) or NADH (panel D) as the electron donor. Reported data are mean \pm SE over three technical replicates. The whole analysis was repeated with three different enzyme preparations, and similar data were obtained. Both Michaelis-Menten constants and V_{MAX} values pointed at a higher catalytic efficiency with NADH.

Measurement of intracellular free proline and P5C levels

For proline and P5C quantification, treatments were carried out in T-25 flasks containing 10 mL medium. Cells were harvested by centrifugation at 1000 g for 5 min at RT. Each pellet was resuspended in 1.4 mL of sterile PBS and spun again to remove the medium. Washed pellets were transferred on ice, resuspended in a minimal volume of a 3% (w/v) solution of 5-sulfosalicylic acid and subjected to various freeze-thaw cycles to induce rupture of the phospholipid membrane. Cell debris were sedimented by centrifugation at 12,000 g for 5 min at RT, and the supernatants were analysed by the acid ninhydrin method of Williams and Frank, as described³³.

Results

Effect of phenyl-substituted aminomethylenebisphosphonates on the activity of human P5C reductase 1

In order to investigate whether some aminomethylenebisphosphonic acids that had been previously identified as effective inhibitors of plant^{28–31} and bacterial³² P5C reductase have the

potential to inhibit also the human enzyme, P5C reductase-1 was purified through heterologous expression in *Escherichia coli* (Figure 2(A,B)). A stepwise elution protocol with increasing imidazole concentrations allowed resolving the enzyme, with an expected denatured molecular mass of 34.2 kDa, from most contaminating proteins. Only another minor band with a denatured mass of about 70 kDa was evident upon SDS-PAGE analysis, which could be a dimer of P5C reductase itself, as found in other cases^{39–41}. Mean specific activity of the homogeneous enzyme was $2893 \pm 138 \text{ nkat mg}^{-1}$ protein when assayed using NADPH as the electron donor. Activity was not perfectly stable, with a half-life of about 2 weeks at 4 °C (data not shown), yet the amount of protein attainable from a single preparation from 400 mL of induced *E. coli* cells allowed to carry out several thousand assays. A kinetic characterisation of the enzyme was performed to define proper conditions for activity assay (Figure 2(C,D)). Consistently with previous results^{42–44}, data showed a lower K_M and a higher V_{MAX} for NADH. High K_M values for P5C hampered the attainment of completely saturating conditions, especially when NADPH was the co-factor.

Under these optimised experimental conditions, the effect of increasing concentrations of some previously-described inhibitors

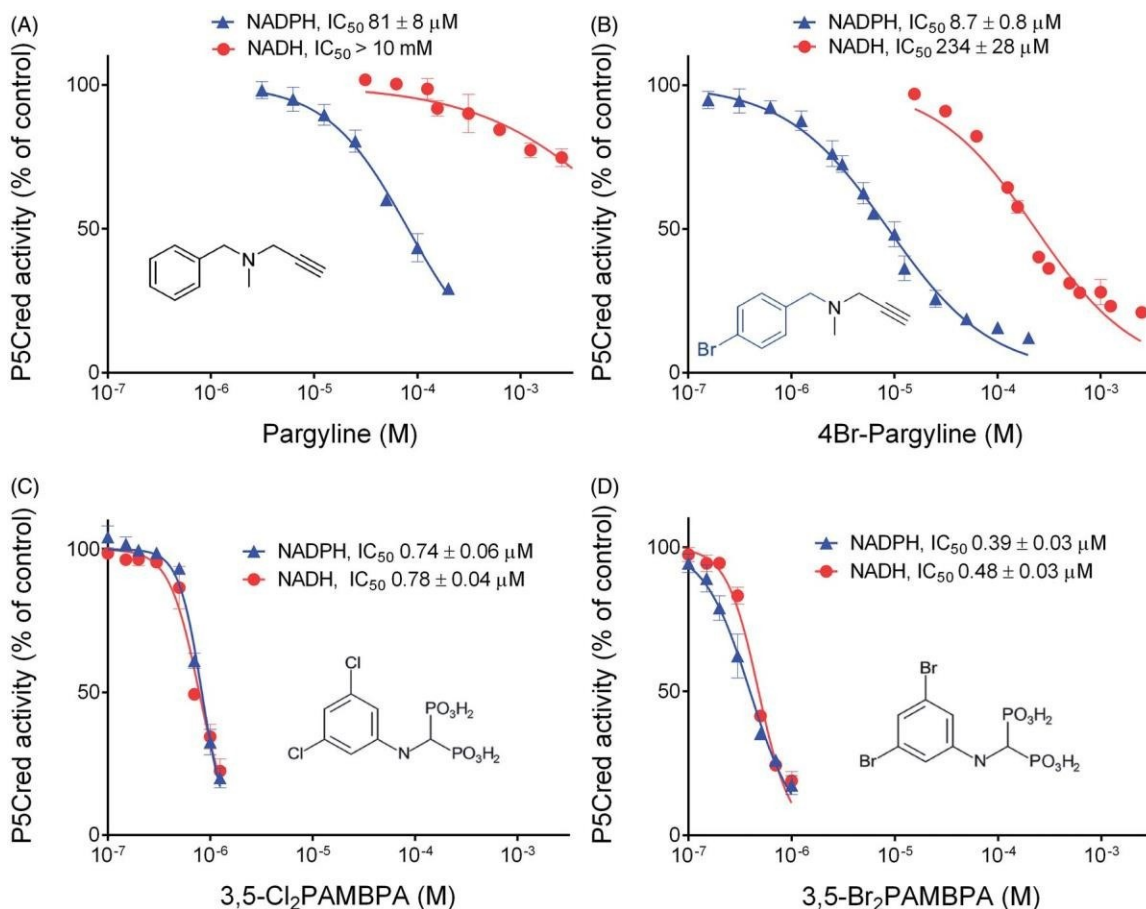


Figure 3. Inhibition of human P5C reductase 1 by pargyline or aminomethylene-bisphosphonates. The purified enzyme was assayed in the presence of increasing concentrations of each compound, as indicated. Parallel controls were carried out in the absence of any inhibitor. Mean activity value in control samples was set as 100%, and activity in treated samples was expressed as percent of such value. Percent values were plotted against the logarithm of inhibitor concentration. Non linear regression of data allowed the calculation of the concentrations causing 50%-inhibition of enzyme activity (IC_{50}). In the case of pargyline (panels A and B), different results were obtained using NADPH or NADH as the electron donor, whereas with aminomethylenebisphosphonic acids (panels C and D) almost overlapping curves were evident. Reported results are mean \pm SE over three technical replicates. The whole experiment was repeated twice with different enzyme preparations, and consistent patterns were obtained.

of human P5C reductase²⁷ was at first assessed. With NADPH as the electron donor, pargyline and 4-bromopargyline confirmed their efficacy (Figure 3(A,B)), with IC_{50} values (81 and 9 μ M, respectively) that were compatible with those (198 and 9 μ M) found hitherto²⁷. A strikingly lower effectiveness was on the contrary evident if NADH was used instead, with IC_{50} values more than one order of magnitude higher (Figure 3(A,B)). When the same experiment was performed with phenyl-substituted aminomethylenebisphosphonates, a remarkably different picture was obtained. Both the 3,5-dichlorophenyl- and the 3,5-dibromophenyl-derivative almost completely suppressed the activity of human P5C reductase at concentrations as low as 1 μ M, and very similar IC_{50} values were found irrespectively of the pyridine dinucleotide used (Figure 3(C,D)). The effect of some other analogues with a different substitution pattern in the phenyl ring³² was also determined. Although several of them were found active in the micromolar range (data not presented), no one showed higher effectiveness than Br_2 PAMBPA, which was therefore used for further determinations.

Kinetic analysis of the inhibition brought about by Br_2 PAMBPA on human P5C reductase 1

Aminomethylenebisphosphonates had been found to inhibit plant²⁸ and bacterial³² P5C reductases with a mechanism of non

competitive type with respect to NAD(P)H and of uncompetitive type with respect to P5C. To ascertain whether the same holds true for human P5C reductase, a kinetic analysis was performed. Results are summarised in Figure 4. With P5C as the variable substrate, lines converging to the Y-axis in Lineweaver-Burk plots were consistent with an inhibition of competitive type with either NADPH (panel A) or NADH (B) as the electron donor. A similar pattern was obtained at varying NADPH concentration (Figure 4(C)), whereas with NADH results were consistent with a mixed type mechanism of inhibition (Figure 4(D)). A mechanism of competitive type may be an unfavourable feature for an inhibitor, since substrate accumulation *in vivo* might lead to a partial reversal of the inhibitory effect. To take one step further, experiments were therefore carried out to verify whether P5C reductase inhibition by Br_2 PAMBPA takes place inside human cells, leading to proline starvation.

Effect of Br_2 PAMBPA on the growth of human cancer cell lines

When increasing concentrations of Br_2 PAMBPA were added to a modified RPMI medium not containing proline, the growth of human myelogenous leukaemia K562 cells was indeed found to be inhibited in the range from 2 to 200 μ M, with an effect that was proportional to the dose. Inhibition took place 24–36 h following the addition, and 50%-inhibition was achieved at about 20 μ M.

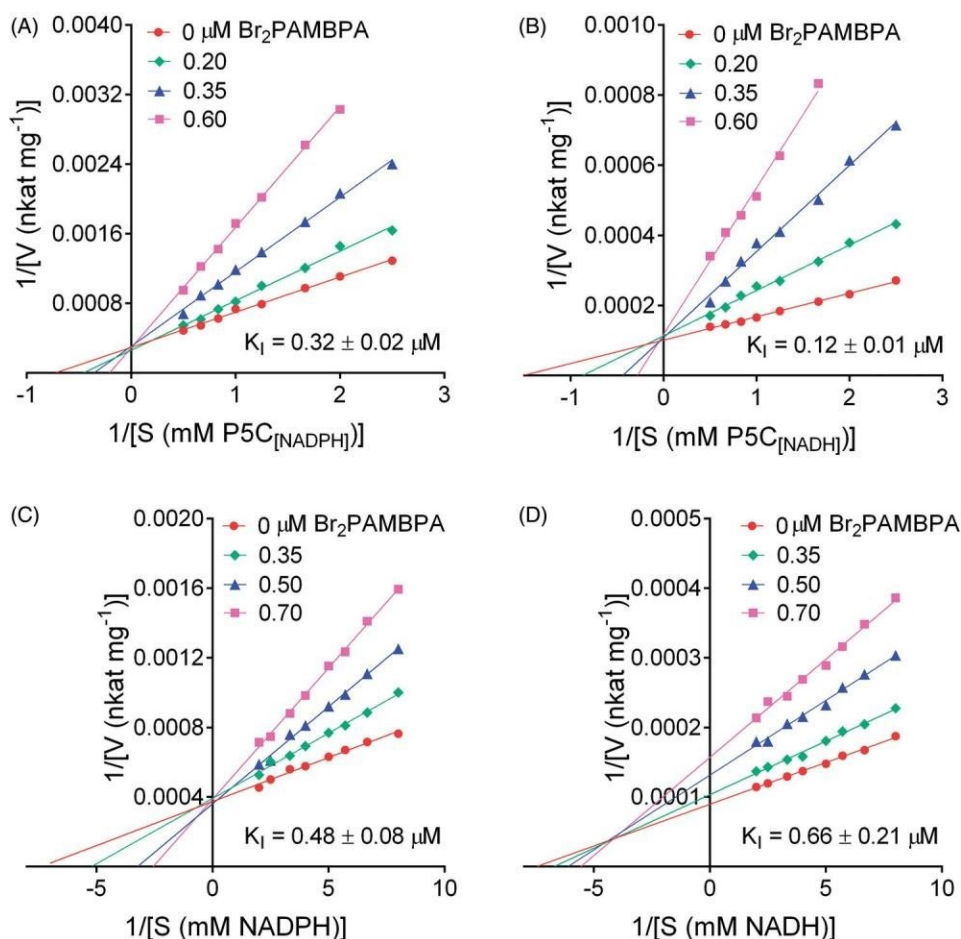


Figure 4. Kinetic analysis of the inhibition of *HsPYCR1* by Br_2PAMBPA . The catalytic rate of the purified enzyme was measured at varying the concentration of a given substrate in the absence or in the presence of increasing levels of the inhibitor. Lines converging to the Y-axis in double reciprocal (Lineweaver-Burk) plots accounted for an inhibition of competitive type against P5C both when using NADPH (panel A) or NADH (panel B) as the electron donor. The same result was evident with respect to NADPH (panel C). On the contrary, with NADH as the variable substrate the pattern was suggestive of an inhibition of mixed-type (panel D). Data are mean over three technical replicates. The whole analysis was repeated three times, and similar patterns were obtained. The reported K_i values are mean \pm SD over replications.

Interestingly, not only the growth rate was slowed down, but treated cells reached a plateau at a lower cell density than untreated controls (Figure 5(A)). Cell viability was significantly reduced at concentrations exceeding 50 μM , yet most cells were still alive at doses at which growth had been severely impaired (Figure 5(B)). Remarkably, when the intracellular levels of free proline were quantified, concentrations in treated cultures were not significantly different than in controls (Figure 5(B)), suggesting that the inhibitory effect was not related to proline starvation. Consistently, when the experiment was repeated in unmodified RPMI medium containing 20 mg L^{-1} (174 μM) Pro, the inhibition was not reversed. On the contrary, a slightly higher effect was evident, with 50% inhibition at about 7 μM (Figure 5(C)), and a more pronounced effect on cell viability (Figure 5(D)). Once again, when free proline content was expressed with respect to viable cells, no reduction was evident up to 50 μM , dose at which less than 50% reduction was evident in cells whose proliferation has been almost completely abolished. In all cases, no detectable ($> 1 \text{ nmol [10}^6 \text{ cells]}^{-1}$) levels of P5C were found.

To obtain further evidence, similar experiments were carried out with a breast cancer cell line (MDA-MB-231) in which the inhibition of P5C reductase 1 by small-hairpin RNA had been reported to significantly reduce growth and invasion capabilities⁴⁵. However, in this case cell proliferation strictly required the addition of FBS to DMEM medium, and preliminary experiments

carried out in standard medium showed only mild effects at Br_2PAMBPA concentrations exceeding 50 μM (data not shown). Because such a failure may depend on the interaction between the inhibitor and some FBS components, preventing (or greatly reducing) its uptake by human cells⁴⁶, cell cultures were treated with the bisphosphonate under serum-free conditions, and FBS was added 24 h thereafter. By using this protocol, confirmative results were obtained (Figure 6). Starting from 5 μM , both cell growth rate and maximal cell density were progressively reduced, and from 50 μM onward cell proliferation was completely abolished (Figure 6(A)). Almost identical patterns were obtained when the medium was supplemented with 20 mg L^{-1} Pro, condition under which the growth of untreated controls was slightly speeded up (Figure 6(B)).

Discussion

In human cells, three forms of P5C reductase are present that have specialised roles and different subcellular localizations⁴⁴. The mitochondria-localized PYCR1 is believed to play a main role in the production of proline from glutamate for protein synthesis. PYCR1 has similar K_M s for NADH and NADPH, but a higher reaction rate with NADH, and is competitively inhibited by proline. During recent years, PYCR1 has attracted increasing interest

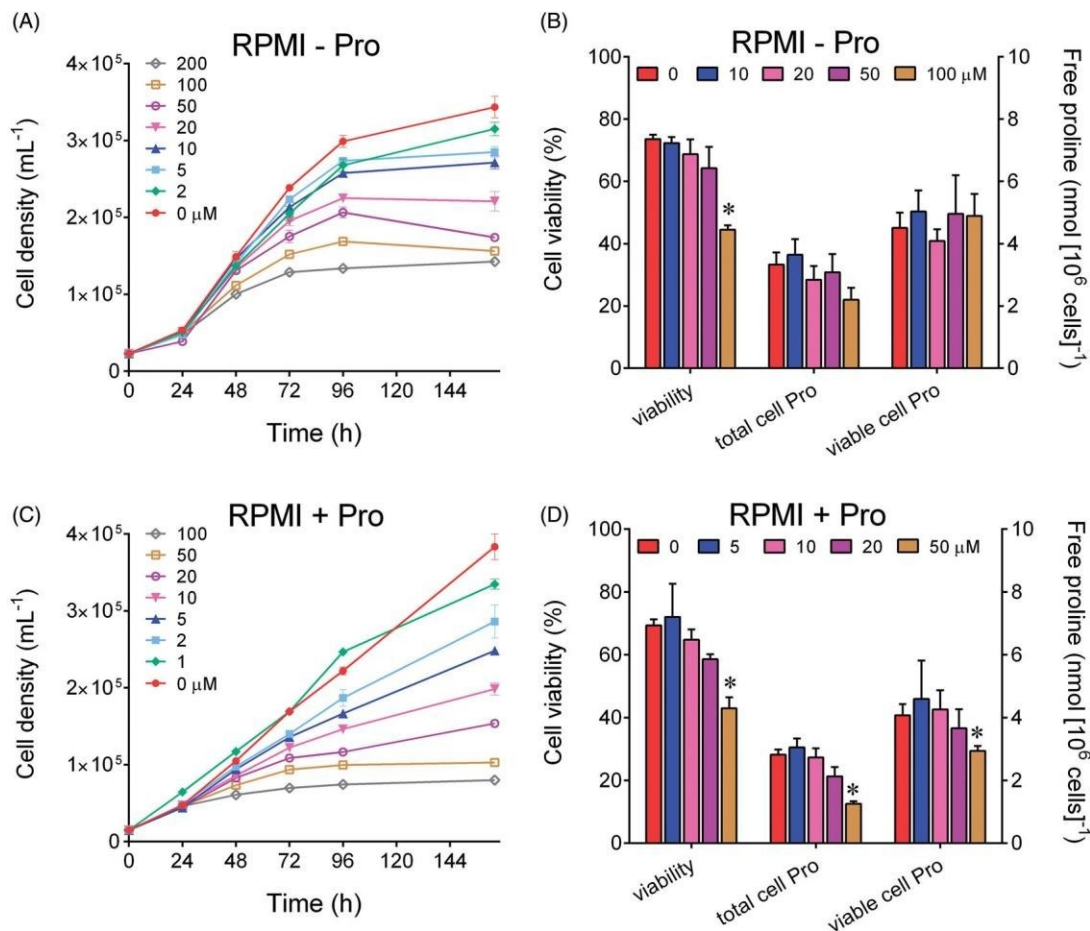


Figure 5. Effect of micromolar levels of Br₂PAMBPA upon the growth of human myelogenous leukaemia K562 cells. The compound was added 5 h after seeding to a modified RPMI medium not containing proline, and the resulting growth was followed until untreated controls reached the early stationary phase (panel A). Cell viability and free proline content were measured by destructive harvest in parallel samples 96 h after the inoculum. Proline concentration was expressed with respect to either total or viable cells (panel B). The same set of determinations was carried out also in unmodified RPMI medium containing 20 mg L⁻¹ Pro (panels C and D). In all cases results are means ± SD over biological triplicates. Statistical significance of differences between treated and control samples in panels B and D were determined by multiple *t* test using the Holm-Sidak method, with a ¼ 1.00% (ω).

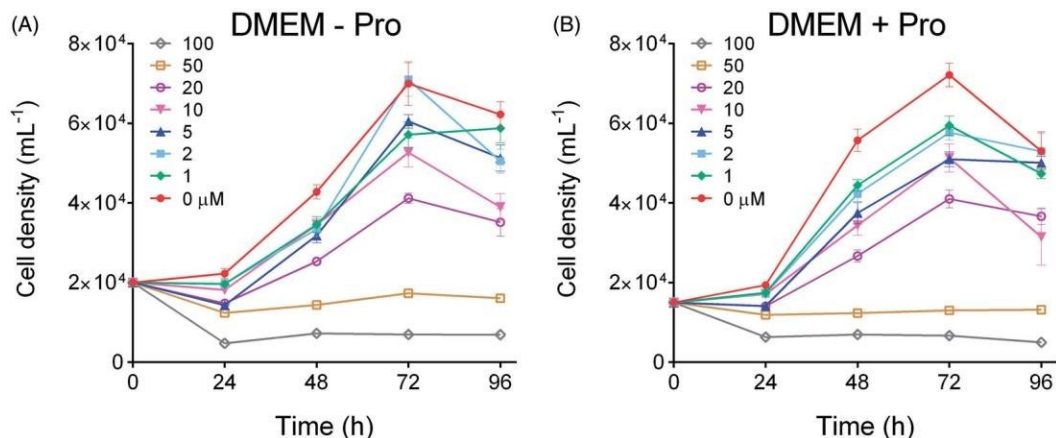


Figure 6. Effect of micromolar levels of Br₂PAMBPA upon the growth of human epithelial breast cancer MDA-MB-231 cells. The compound was added to DMEM medium 5 h after seeding, and 2% FBS was added 24 h thereafter. The resulting growth was followed by destructive harvest until untreated controls reached confluence (panel A). The same experiment was carried out also in DMEM medium supplemented with 20 mg L⁻¹ Pro (panel B). In all cases results are means ± SE over six biological replicates.

because its upregulation has been found involved in tumour growth and metastatic progression of several types of cancers²⁻⁵. A wide study of mRNA profiles from about two thousand tumours

across 19 different cancer types showed PYCR1 as one of the most consistently overexpressed metabolic genes⁴⁷, and its down-regulation was found to reduce tumour growth and invasion

capabilities, making cancer cells more susceptible to conventional chemotherapeutics⁴⁵. Therefore, P5C reductase represents nowadays an attractive potential target for cancer therapy.

Preliminary results towards the identification of specific inhibitors for human P5C reductase have been recently described, showing 4-bromopargyline as the most effective substance²⁷. However, P5C reductase had been previously exploited as a potential target for herbicides. A long lasting research in our laboratory allowed identifying halogen-substituted derivatives of phenyl-aminomethylene-bisphosphonic acid as potent inhibitors of the plant enzyme^{28–31}. The same compounds were also found to efficiently inhibit the enzyme from a bacterial pathogen³². Their evaluation on human P5C reductase *in vitro*, herein reported, showed an even higher effectiveness, with IC₅₀ values two orders of magnitude lower than those for the plant enzyme, and tenfold lower than that for 4-bromopargyline. Moreover, the same inhibition patterns were found using either NADH or NADPH as the electron donor, whereas in our hands pargyline showed efficacy in the micromolar range only against the NADPH-dependent activity. The higher sensitivity of human P5C reductase corresponded to a different kinetic mechanism. A remarkable difference between the amino acid sequence of the mammal and the plant enzyme does indeed exist, resulting into significant variations in their three-dimensional structure^{6,41} that seem thus to involve the binding site for aminobisphosphonates and influence their interaction. A mechanism of competitive type may represent a drawback, in that substrate accumulation deriving from enzyme inhibition could relieve at least in part the effect of the inhibitors *in vivo*. Confirmative results in a cellular system are thus crucial to support the possibility of using aminomethylene-bisphosphonates to reduce P5C reductase activity inside the cell.

When increasing concentrations of the most active compound were added to the culture medium of two human cancer cell lines, antiproliferative effects were in fact found starting from levels about tenfold higher than IC₅₀ values *in vitro*. This notwithstanding, cell growth was progressively reduced in the range from 2 to 20 mM Br₂PAMBPA, and completely abolished at higher concentrations. Interestingly, even at levels at which proliferation was only slowed down, cell cultures did not attain the same maximal densities than untreated controls, but arrested growth at values that were inversely proportional to the dose. Results obtained with myelogenous leukaemia K562 cells, which grow in suspension to highest densities³⁶, were confirmed with substrate-adhering breast cancer MDA-MB-231 cells that were chosen as a validated system in which PYCR1 is overexpressed and its inhibition causes the reduction of growth and invasion capabilities⁴⁵. In the latter case, the addition of FBS to the medium was found to greatly reduce Br₂PAMBPA effectiveness, most likely as a consequence of inhibitor binding to BSA or other serum components⁴⁶, which may prevent the bisphosphonate from entering the cell. This would represent a serious obstacle for *in vivo* treatments with the compound, yet the problem could be overcome by the adoption of suitable delivery systems⁴⁸.

Interestingly, neither Br₂PAMBPA treatment led to proline starvation, nor the exogenous supply of the amino acid decreased its effectiveness. These results might be consistent with the occurrence of other unrelated target(s) of bisphosphonates in cell metabolism. In fact, the same compounds were found in plants to inhibit also the activity of both cytosolic and plastidal forms of glutamine synthetase, with similar or even higher effectiveness than P5C reductase^{49–50}. However, the possibility that the observed antiproliferative effects may depend on the inhibition of glutamine synthetase is unlikely, since the human enzyme has

been found substantially insensitive to these compounds (IC₅₀ for 3,5-dichlorophenyl-AMPBA of 780 ± 30 mM)⁵¹. Moreover, also phytotoxic effects of these bisphosphonate were found unrelated to proline starvation, which in treated tissues on the contrary accumulated along with the putatively toxic intermediate P5C³¹. Both in control and treated K562 cells P5C was undetectable, and free proline concentration was constant in the range 4–5 nmol (10⁶ cells)⁻¹, levels that were found conserved independently of the presence of exogenous proline in the culture medium, suggesting a strict homeostatic control⁵². Only the treatment with highest Br₂PAMBPA concentrations caused a slight but significant lowering in free proline content. Such results are consistent with those obtained with 4-bromopargyline, whose effect on the intracellular level of proline was not proportional to the dose²⁷.

On the whole, data strongly suggest that the antiproliferative activity of P5C reductase inhibitors is mediated by an interference with the proline-P5C cycle. In this half-biosynthetic, half-catabolic set of reactions, proline is oxidised by ProDH to P5C but the latter, instead of being further oxidised to glutamate in the mitochondrion by P5CDH, is reduced back to proline in the cytosol by P5C reductase (Figure 1). Without resulting in a net change of free proline level, this apparently futile cycle may allow the transfer of reducing equivalents from the cytosol to the mitochondrion, fueling the respiratory chain^{11–13}. An increased activity of this cycle can improve cancer cell survival, proliferation, and metastasis through a variety of mechanisms ranging from enhanced ATP production, nucleotide synthesis, anaplerosis, and redox homeostasis²⁴. Inhibition of P5C reductase is therefore expected to interfere with all these mechanisms, hampering cell growth even without impacting on proline availability for protein synthesis.

Further information is obviously required to strengthen the possibility of using Br₂PAMBPA or other bisphosphonates for cancer therapy. Next steps will be a deeper insight on the molecular mechanisms fostering cell growth inhibition, the study of the effects against non tumoral cells, and the evaluation of the therapeutic potential in more sophisticated experimental systems. In any case, the availability of specific and effective inhibitors of P5C reductase could help elucidating the functions of the P5C-proline cycle in either physiological or pathological environments. Work is currently in progress with these aims in our laboratory.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Funding

This research was supported by grants from the University of Ferrara [FAR 2019].

ORCID

Monica Borgatti  <http://orcid.org/0000-0001-8470-2496>

References

1. Luengo A, Gui DY, Van der Heiden MG. Targeting metabolism for cancer therapy. *Cell Chem Biol* 2017;24:1161–80.

2. Ding Z, Ericksen RE, Escande-Beillard N, et al. Metabolic pathway analyses identify proline biosynthesis pathway as a promoter of liver tumorigenesis. *J Hepatol* 2020;72:725–35.
3. Xiao S, Li S, Yuan Z, Zhou L. Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (PYCR1) upregulation contributes to gastric cancer progression and indicates poor survival outcome. *Ann Transl Med* 2020;8:937.
4. D'Aniello C, Patriarca EJ, Phang JM, Minchiotti G. Proline metabolism in tumor growth and metastatic progression. *Front Oncol* 2020;10:776.
5. Phang JM. Proline metabolism in cell regulation and cancer biology: recent advances and hypotheses. *Antioxid Redox Signal* 2019;30:635–49.
6. Forlani G, Makarova KS, Ruskowski M, et al. Evolution of plant *d*¹-pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. *Front Plant Sci* 2015;6:567.
7. Liu W, Phang JM. Proline dehydrogenase (oxidase) in cancer. *Biofactors* 2012;38:398–406.
8. Korasick DA, Končičková R, Kopečná M, et al. Structural and biochemical characterization of aldehyde dehydrogenase 12, the last enzyme of proline catabolism in plants. *J Mol Biol* 2019;431:576–92.
9. Cabassa-Hourton C, Schertl P, Bordenave-Jacquemin M, et al. Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 2016;473:2623–34.
10. Forlani G, Bertazzini M, Zarattini M, Funck D. Functional characterization and expression analysis of rice *d*¹-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide new insight into the regulation of proline and arginine catabolism. *Front Plant Sci* 2015;6:591.
11. Hagedorn CH, Phang JM. Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and *d*¹-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys* 1983;225:95–101.
12. Phang JM. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr Top Cell Regul* 1985;25:91–132.
13. Launay A, Cabassa-Hourton C, Eubel H, et al. Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2019;70:6203–14.
14. Hancock CN, Liu W, Alvord WG, Phang JM. Co-regulation of mitochondrial respiration by proline dehydrogenase/oxidase and succinate. *Amino Acids* 2016;48:859–72.
15. Hu CA, Donald SP, Yu J, et al. Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent and mitochondria-mediated apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2007;295:85–92.
16. Huynh TYL, Zareba I, Baszanowska W, et al. Understanding the role of key amino acids in regulation of proline dehydrogenase/proline oxidase (prodh/pox)-dependent apoptosis/autophagy as an approach to targeted cancer therapy. *Mol Cell Biochem* 2020;466:35–44.
17. Winter G, Todd CD, Trovato M, et al. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci* 2015;6:534.
18. Liu W, Hancock CN, Fischer JW, et al. Proline biosynthesis augments tumor cell growth and aerobic glycolysis: involvement of pyridine nucleotides. *Sci Rep* 2015;5:17206.
19. Phang JM, Pandhare J, Liu Y. The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate. *J Nutr* 2008;138:2008S–15S.
20. Elia I, Broekaert D, Christen S, et al. Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells. *Nat Commun* 2017;8:15267.
21. Ye Y, Wu Y, Wang J. Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 promotes cell proliferation via inhibiting apoptosis in human malignant melanoma. *Cancer Manag Res* 2018;10:6399–407.
22. Cai F, Miao Y, Liu C, et al. Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 promotes proliferation and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2018;15:731–40.
23. Wang QL, Liu L. PYCR1 is associated with papillary renal cell carcinoma progression. *Open Med (Wars)* 2019;14:586–92.
24. Tanner JJ, Fendt SM, Becker DF. The proline cycle as a potential cancer therapy target. *Biochemistry* 2018;57:3433–44.
25. Loayza-Puch F, Rooijers K, Buil L, et al. Tumour-specific proline vulnerability uncovered by differential ribosome codon reading. *Nature* 2016;530:490–4.
26. Zeng T, Zhu L, Liao M, et al. Knockdown of PYCR1 inhibits cell proliferation and colony formation via cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer. *Med Oncol* 2017;34:27.
27. Milne K, Sun J, Zaal EA, et al. A fragment-like approach to PYCR1 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2019;29:2626–31.
28. Forlani G, Giberti S, Berlicki L, et al. Plant P5C reductase as a new target for aminomethylenebisphosphonates. *J Agric Food Chem* 2007;55:4340–7.
29. Forlani G, Occhipinti A, Berlicki L, et al. Tailoring the structure of aminobisphosphonates to target plant P5C reductase. *J Agric Food Chem* 2008;56:3193–9.
30. Forlani G, Berlicki L, Duò M, et al. Synthesis and evaluation of effective inhibitors of plant *d*¹-pyrroline-5-carboxylate reductase. *J Agric Food Chem* 2013;61:6792–8.
31. Giberti S, Bertazzini M, Liboni M, et al. Phytotoxicity of aminobisphosphonates targeting both *d*¹-pyrroline-5-carboxylate reductase and glutamine synthetase. *Pest Manag Sci* 2017;73:435–43.
32. Forlani G, Petrollino D, Fusetti M, et al. *D*¹-pyrroline-5-carboxylate reductase as a new target for therapeutics: inhibition of the enzyme from *Streptococcus pyogenes* and effects *in vivo*. *Amino Acids* 2012;42:2283–91.
33. Forlani G, Funck D. A specific and sensitive enzymatic assay for the quantitation of L-proline. *Front Plant Sci* 2020;11:582026.
34. Meng Z, Lou Z, Liu Z, et al. Purification, characterization, and crystallization of human pyrroline-5-carboxylate reductase. *Protein Expr Purif* 2006;49:83–7.
35. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
36. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976;18:421–31.
37. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 1978;14:911–5.
38. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;2016. doi: [10.1101/pdb.prot087155](https://doi.org/10.1101/pdb.prot087155)
39. Giberti S, Funck D, Forlani G. *D*¹-pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feed-back regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol* 2014;202:911–9.

40. Forlani G, Bertazzini M, Zarattini M, et al. Functional properties and preliminary structural characterization of rice *d*¹-pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front Plant Sci* 2015;6:565.
41. Ruszkowski MJ, Nocek B, Forlani G, Dauter Z. The structure of *Medicago truncatula* *d*¹-pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants. *Front Plant Sci* 2015;6:869.
42. Yeh GC, Harris SC, Phang JM. Pyrroline-5-carboxylate reductase in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1981;67:1042–6.
43. Lorans G, Phang JM. Proline synthesis and redox regulation: differential functions of pyrroline-5-carboxylate reductase in human lymphoblastoid cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;101:1018–25.
44. Christensen EM, Patel SM, Korasick DA, et al. Resolving the cofactor-binding site in the proline biosynthetic enzyme human pyrroline-5-carboxylate reductase 1. *J Biol Chem* 2017;292:7233–43.
45. Ding J, Kuo M-L, Su L, et al. Human mitochondrial pyrroline-5-carboxylate reductase 1 promotes invasiveness and impacts survival in breast cancers. *Carcinogenesis* 2017;38: 519–31.
46. Zhang Y, Xu YY, Sun WJ, et al. FBS or BSA inhibits EGCG induced cell death through covalent binding and the reduction of intracellular ROS production. *Biomed Res Int* 2016; 2016:5013409.
47. Nilsson R, Jain M, Madhusudhan N, et al. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nat Commun* 2014;5: 3128.
48. Das RP, Singh BG, Kunwar A, et al. Tuning the binding, release and cytotoxicity of hydrophobic drug by Bovine Serum Albumin nanoparticles: influence of particle size. *Colloids Surf B Biointer* 2017;158:682–8.
49. Obojska A, Berlicki Ł, Kafarski P, et al. Herbicidal pyridyl derivatives of amino-methylene-bisphosphonic acid inhibit plant glutamine synthetase. *J Agric Food Chem* 2004;52: 3337–44.
50. Occhipinti A, Berlicki Ł, Giberti S, et al. Effectiveness and mode of action of phosphonate inhibitors of plant glutamine synthetase. *Pest Manag Sci* 2010;66:51–8.
51. Kosikowska P, Bochno M, Macegoniuk K, et al. Bisphosphonic acids as effective inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase. *J Enz Inh Med Chem* 2016;31:931–8.
52. Hu C-A, Lin WW, Obie C, Valle D. Molecular enzymology of mammalian *D*¹-pyrroline-5-carboxylate synthase. Alternative splice donor utilization generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. *J Biol Chem* 1999;274: 6754–62.

4. Caratterizzazione funzionale dell'enzima δ^1 -pirroline-5-carbossilato sintetasi 2 di *Oryza sativa*

Lo studio dei meccanismi che consentono agli organismi vegetali di far fronte alle situazioni di stress rappresenta un importante obiettivo per fronteggiare i danni conseguenti ai sempre più frequenti cambiamenti climatici. Dal punto di vista delle rese, infatti, è stato stimato che molte specie coltivate non superano il 20% del proprio potenziale produttivo a causa delle condizioni di crescita non ottimali (Boyer, 1982). Si è visto che in molte di queste situazioni le piante rispondono accumulando prolina all'interno delle loro cellule (Chu et al., 1978; Delauney & Verma, 1993; Fabro et al., 2004; Hayat et al., 2012; S. S. Sharma & Dietz, 2006). L'aumento di concentrazione di questo aminoacido dipende dalla sinergia di vari fattori quali trasporto aminoacidico intra/intercellulare, degradazione proteica, riduzione del suo catabolismo ma soprattutto incremento della sua biosintesi (Trovato et al., 2019). Nella maggior parte delle specie vegetali il gene codificante per la P5CS, l'enzima che catalizza la reazione limitante nella biosintesi di prolina, ha subito un processo di duplicazione indipendente, dando origine a due paraloghi denominati *P5CS1* e *P5CS2* (Chen et al., 2010; Fujita et al., 1998; Ginzberg et al., 1998; Strizhov et al., 1997). I prodotti di questi, nonostante catalizzino la stessa reazione all'interno del citosol, agiscono in tessuti e situazioni differenti. In *Arabidopsis*, infatti, *AtP5CS1* viene prevalentemente espressa nella maggior parte degli organi vegetali mentre la seconda isoforma predomina nelle aree di attiva divisione cellulare (Strizhov et al., 1997). Dal punto di vista trascrizionale, i due paraloghi (localizzati, rispettivamente, sui cromosomi 2 e 3) sono differenzialmente indotti da stimoli quali siccità e salinità. Attraverso esperimenti di mutagenesi è emerso che i mutanti *p5cs1* risultano ipersensibili a stress salino mentre le mutazioni aberranti di *p5cs2* causano aborto embrionale durante le ultime fasi di sviluppo del seme. Da questi risultati è possibile ipotizzare che *AtP5CS1* sia responsabile principalmente dell'accumulo di prolina in seguito a situazioni di stress mentre *AtP5CS2* sia indispensabile per garantire la sintesi di questo aminoacido durante le fasi di sviluppo embrionale e crescita (Székely et al., 2008).

Anche il gene *P5CS* di riso, che presenta un numero di introni, esoni e residui aminoacidici simile a quello di *Arabidopsis*, ha subito un processo di duplicazione. Sul cromosoma 1 si localizza *OsP5CS1*, mentre la sequenza codificante per *OsP5CS2* si trova sul cromosoma 5. In questo caso, però, la tipologia di stimoli ed i ruoli che distinguono l'una dall'altra isoforma non sono ancora ben definiti. Quel che si è visto è che *OsP5CS1* risulta espressa ubiquitariamente ed è inducibile da stress abiotici

quali esposizione a sali, disidratazione e basse temperature mentre *OsP5CS2* si ritrova principalmente nelle piante mature ed è inducibile da NaCl e mannitolo (Rai & Penna, 2013).

La maggior parte degli studi relativi a questi geni si è fino ad ora focalizzata principalmente sull'analisi dei meccanismi di regolazione trascrizionale. Al contrario, sono poche le informazioni relative a caratteristiche biochimiche, strutturali e sulla regolazione post-traduzionale dei due isoenzimi.

Uno dei pochi studi che trattano questo argomento riguarda la P5CS di *Vigna aconitifolia*, dove si mette in evidenza il fatto che l'attività enzimatica risulta inibita dal prodotto finale della via, la prolina (Hu et al., 1992). Anche in altri lavori vengono riportati i risultati dei saggi enzimatici *in vitro* condotti sulla P5CS di varie specie vegetali, tra cui *Arabidopsis*, ma in tutti questi casi i dati sono ottenuti attraverso metodiche che misurano solo una parziale attività della P5CS, ovvero la fosforilazione del glutammato. La stessa attività glutamil chinasica, però, è caratteristica anche di un altro enzima che potrebbe essere presente negli estratti analizzati, ovvero la glutammina sintetasi (EC 6.3.1.2), attiva anche in presenza di basse concentrazioni di ammonio (Forlani et al., 2006).

Nello studio riportato qui di seguito viene descritta una nuova metodica per analizzare l'attività della P5CS che prende in considerazione l'intera reazione specifica catalizzata dall'enzima. La P5CS2 di riso è stata clonata ed espressa all'interno di cellule batteriche per consentirne l'espressione ad alti livelli, e la successiva purificazione e caratterizzazione.



Enzymology and Regulation of δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase 2 From Rice

Giuseppe Sabbioni¹, Dietmar Funck² and Giuseppe Forlani^{1*}

¹Department of Life Science and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy, ²Plant Physiology and Biochemistry Laboratory, Department of Biology, University of Konstanz, Konstanz, Germany

Under several stress conditions, such as excess salt and drought, many plants accumulate proline inside the cell, which is believed to help counteracting the adverse effects of low water potential. This increase mainly relies upon transcriptional induction of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), the enzyme that catalyzes the first two steps in proline biosynthesis from glutamate. P5CS mediates both the phosphorylation of glutamate and the reduction of γ -glutamylphosphate to glutamate-5-semialdehyde, which spontaneously cyclizes to δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C). In most higher plants, two isoforms of P5CS have been found, one constitutively expressed to satisfy proline demand for protein synthesis, the other stress-induced. Despite the number of papers to investigate the regulation of P5CS at the transcriptional level, to date, the properties of the enzyme have been only poorly studied. As a consequence, the descriptions of post-translational regulatory mechanisms have largely been limited to feedback-inhibition by proline. Here, we report cloning and heterologous expression of P5CS2 from *Oryza sativa*. The protein has been fully characterized from a functional point of view, using an assay method that allows following the physiological reaction of the enzyme. Kinetic analyses show that the activity is subjected to a wide array of regulatory mechanisms, ranging from product inhibition to feedback inhibition by proline and other amino acids. These findings confirm long-hypothesized influences of both, the redox status of the cell and nitrogen availability, on proline biosynthesis.

OPEN ACCESS

Edited by:

Omar Borsani,
Universidad de la República, Uruguay

Reviewed by:

Donald Becker,
University of Nebraska-Lincoln,
United States
Ernesto Cuevasanta,
Universidad de la República, Uruguay

*Correspondence:

Giuseppe Forlani
fig@unife.it

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Abiotic Stress,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 26 February 2021

Accepted: 10 August 2021

Published: 14 September 2021

Citation:

Sabbioni G, Funck D and
Forlani G (2021) Enzymology and
Regulation of δ^1 -Pyrroline-5-
Carboxylate Synthetase 2 From Rice.
Front. Plant Sci. 12:672702.
doi: 10.3389/fpls.2021.672702

Keywords: proline biosynthesis, substrate affinity, product inhibition, enzyme regulation, redox status, NADPH/NADP⁺ ratio

INTRODUCTION

Water stress tolerance is a major goal for plant genetic improvement, and most likely a need to secure crop productivity threatened by ongoing climate changes (Ahanger et al., 2017). As soon as a lowering in soil water potential hinders water absorption at the root level, plants react by closing stomata and activate a series of mechanisms for osmotic compensation, among which a pivotal role is played by the accumulation of the so-called compatible osmolytes (Sharma et al., 2019). These osmoprotectants include sugars (Iordachescu and Imai, 2008), tertiary amines (Annunziata et al., 2019), and amino acids (Hildebrandt, 2018). Among amino acids, accumulation of the cyclic amino acid proline is the most widespread in plants and

other organisms (Verbruggen and Hermans, 2008; Meena et al., 2019). However, there are a number of reports indicating that the concentrations of accumulated proline are not high enough to contribute significantly to osmotic adjustment (e.g., Forlani et al., 2019a). Free proline is rapidly accumulated not only in response to drought and salinity, but also to cold, heavy metals, or pathogen attack (Hayat et al., 2012). Because of this variety of inducing stimuli, several other beneficial effects of proline have been hypothesized, ranging from stabilization of membranes and enzymes to reactive oxygen species scavenging, regulation of redox balance, or induction of antioxidant defenses (Liang et al., 2013; Kishor and Sreenivasulu, 2014; Govrin et al., 2019; Forlani et al., 2019b).

Whatever the exact, multifaceted role in the plant response to adverse conditions, stress-induced accumulation of proline has been shown to depend mainly upon an increase of its biosynthetic rate (Trovato et al., 2019). Several pathways have been described for the biosynthesis of this amino acid, being those from glutamate or ornithine as the major routes (Fichman et al., 2015). In bacteria, proline synthesis from glutamate is accomplished by three enzymes: γ -glutamyl kinase (EC 2.7.2.11) that catalyzes glutamate phosphorylation, NADPH-dependent γ -glutamyl phosphate reductase (EC 1.2.1.41) that reduces the product to glutamate semialdehyde, which in solution spontaneously cyclizes to δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C), and P5C reductase (EC 1.5.1.2) that produces proline, using either NADH or NADPH as the electron donor (Chen et al., 2006; Csonka and Leisinger, 2007; Forlani et al., 2017). In higher plants, the first two steps were found to be catalyzed by a single bifunctional enzyme bearing both catalytic domains of glutamyl kinase and glutamyl-phosphate reductase, P5C synthetase (P5CS; Hu et al., 1992; Rai and Penna, 2013).

Another plant enzyme able to synthesize glutamate semialdehyde was similarly isolated by trans-complementation of *proBA* mutants (Delauney et al., 1993). Because of the occurrence of such an ornithine- δ -aminotransferase (EC 2.6.1.13) and of the finding that mammalian P5CS is feedback-inhibited by ornithine (Hu et al., 1999), it was hypothesized that under conditions of osmotic stress and nitrogen limitation proline synthesis in plants proceeds through the glutamate pathway, while the ornithine pathway assumes prominence under high nitrogen input (Delauney and Verma, 1993; Anwar et al., 2018). Although some confirmatory results have been reported (Da Rocha et al., 2012), other findings have shown that ornithine-derived P5C is oxidized to glutamate in the mitochondrion (Funck et al., 2008; Winter et al., 2015), and – at least in *Arabidopsis* – proline biosynthesis is now believed to proceed exclusively *via* the glutamate pathway.

Consistently, induction of *P5CS* was found in virtually all cases in which proline accumulation occurred in response to the exposure to stress conditions (Trovato et al., 2019).

Isolation and sequencing of *P5CS* led to the identification of two isogenes in several plant species and phylogenetic analyses demonstrated that *P5CS* duplication occurred independently in several taxonomic groups (Turchetto-Zolet et al., 2008; Rai and Penna, 2013; Fichman et al., 2015).

These paralogs (named P5CS1 and P5CS2) showed non-overlapping roles, with varying temporal and spatial expression patterns. In *Arabidopsis thaliana*, *AtP5CS1* is expressed in most plant organs, whereas *AtP5CS2* is predominantly expressed in areas of active cell division (Strizhovet et al., 1997; Székely et al., 2008). The analysis of GFP-fused proteins suggested partial chloroplastic localization of P5CS1, whereas P5CS2:GFP was predominantly found in the cytosol (Székely et al., 2008). However, more recent data conclusively demonstrated a cytosolic localization of both isoenzymes (Funck et al., 2020). Transcription of the *P5CS* genes was differentially induced by drought, salinity, and abscisic acid and, consistently, the occurrence of a wide but different array of putative transcription factor binding sites was shown in the promoters of the two paralogs (Fichman et al., 2015; Zarattini and Forlani, 2017).

Knockout *p5cs1* mutants showed reduced proline synthesis under stress, hypersensitivity to salt stress, and accumulation of reactive oxygen species, whereas *p5cs2* mutations caused embryo abortion during late stages of seed development (Székely et al., 2008). Germination and establishment under ambient conditions, but not susceptibility to infection with *Pseudomonas syringae*, were impaired in *p5cs2* mutants, whereas stress-induced proline accumulation was much less affected than in *p5cs1* mutants (Funck et al., 2020). Overall, *AtP5CS1* has therefore been identified as the major contributor to stress-induced proline accumulation, whereas *AtP5CS2* plays a pivotal role in embryo development and growth. The rice (*Oryza sativa*) genome also contains two *P5CS* isogenes, which seem to have a somehow less defined role. *P5CS1*, located on chromosome 1, was induced by stress conditions, such as the exposure to salt, dehydration, and cold. *P5CS2*, mapping on chromosome 5, was expressed in mature plant parts, yet it was also induced by salt and mannitol treatments (Rai and Penna, 2013; Forlani et al., 2015a).

Contrary to the large amount of information available on the regulation of *P5CS* gene expression in different plant tissues, during development and in response to environmental signals, very little is known about the biochemical features of P5CS isoenzymes and the occurrence of post-translational regulatory mechanisms. The activity of a single enzyme cloned from *Vigna aconitifolia* showed 50%-inhibition at 6 mM proline (Hu et al., 1992). The activity of the same enzyme and of a proline-insensitive form obtained by site-directed mutagenesis was characterized in more detail afterward, showing K_m values for glutamate and ATP of 3.6 and 2.7 mM, respectively (Zhang et al., 1995). However, these data were obtained using an assay method that measures only the partial glutamyl kinase activity, and not the full forward reaction catalyzed by the enzyme. Another study on the effect of osmotic stress on P5CS activity in *Arabidopsis* leaves used quantification of the inorganic phosphate released after glutamyl-phosphate reduction (Parre et al., 2010). An assay that follows the glutamate- and ATP-dependent oxidation of NADPH was used to analyze the activity of a recombinantly expressed putative P5CS from tomato, which has later been identified as a bacterial contamination in the cDNA library used (García-Ríos et al., 1997). A similar

assay has also been used to demonstrate the activity of P5CS overexpressed in switchgrass (*Panicum virgatum*; Guan et al., 2019). However, proper controls were not performed in any of these studies to test if the detected activity was influenced by the presence in the crude extracts of glutamine synthetase (EC 6.3.1.2), which also catalyzes the phosphorylation of glutamate and releases phosphate in the presence of even low concentrations of ammonia (Forlani et al., 2006). To the best of our knowledge, neither kinetic analysis of plant P5CS activity has been reported, nor the functional features of P5CS isozyme pairs have been investigated and compared so far. As a consequence, some long lasting hypotheses linking modulation of proline biosynthesis with either the nitrogen status (Delauney et al., 1993; Delauney and Verma, 1993) or the redox status (Sharma et al., 2011; Shinde et al., 2016) of the cell still await substantiation. Here, we report cloning, recombinant expression, purification, and functional characterization of P5CS2 from rice, providing a first body of evidence toward this goal.

MATERIALS AND METHODS

Cloning, Heterologous Expression, and Purification of Rice P5CS2

The coding sequence of *O. sativa* P5C synthetase 2 (locus Os05g38150; protein ID BAG95649) was amplified by PCR from cDNA clone J033099M14 (RGRC-NIAS) with the primers P5CS2-fw (caccATGGCGAGCGTGCACCCGT) and P5CS2-rev (agcatttgaccTCATTGCAAAG), and inserted by directional TOPO cloning into the expression vector pET151 that provides an N-terminal His₆-tag (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States). For heterologous expression, *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), made competent by the calcium chloride method, were transformed with the resulting vector pET151-OsP5CS2. Transformants were selected on LB plates containing 100 mg L⁻¹ ampicillin and 50 mg L⁻¹ chloramphenicol. After inducing the expression of the plant protein at 24°C by the addition of 1 mM IPTG to liquid LB medium, the cells were harvested by centrifugation and extracted by either sonication or grinding with 2 g g⁻¹ alumina in a mortar at 4°C in extraction buffer (50 mM Na phosphate buffer, pH 7.5, containing 200 mM NaCl, 5 mM DTT, and 20 mM imidazole). The clarified extract was loaded at a constant flow of 10 ml h⁻¹ onto a His-SpinTrap™ Nickel Sepharose Gel column (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom; 0.1 ml bed volume) for purification of the His-tagged protein. Stepwise washing and elution was achieved by increasing concentrations of imidazole in extraction buffer, while collecting 1-ml fractions. For activity assays, the purified enzyme was diluted into assay buffer (see below).

Alternatively, cells were extracted in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 5 mM DTT. Following centrifugation for 5 min at 10,000 g, the soluble extract was desalted by passage through a BioGel P6DG (BioRad) column, and loaded onto a DEAE-Sepharcel (Pharmacia) column (1.5 cm diameter, 10 ml bed volume) equilibrated with the same buffer at a constant

flow of 30 ml h⁻¹. The column was then eluted with a linear gradient from 0 to 250 mM NaCl (200 ml), for the collection of 4-ml fractions.

The His₆-tag was cleaved by treatment with His-tagged TEV protease (final concentration 0.1 mg ml⁻¹) for 20 min at pH 7.5. To remove TEV protease and the cleaved fragment, a negative chromatography on the same His-SpinTrap™ Nickel Sepharose Gel column was carried out after diluting the sample to lower imidazole concentration. Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard. Enzyme preparations were stored at 4°C in the dark.

P5C Synthetase Assay

Glutamyl Kinase Assay

Glutamyl kinase assay was performed as described previously (Campanile et al., 1993), with minor modifications. Enzyme preparations (about 2 µg protein) were incubated up to 30 min at 30°C with 20 mM glutamate, 4 mM ATP, and 100 mM hydroxylamine hydrochloride in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 75 µl. The reaction was terminated by the addition of 150 µl of a colorimetric mixture consisting of 10% (w/v) FeNO₃ × 9 H₂O, 6.67% (v/v) HCl, and 5% (w/v) trichloroacetic acid. Following centrifugation for 3 min at 12,000 g, samples were read at 535 nm against non-incubated blanks. The γ-glutamyl-hydroxamate formed was quantified on the basis of a calibration curve obtained with an authentic standard.

Glutamyl Phosphate Reductase Assay

To determine glutamyl phosphate reductase activity (Campanile et al., 1993), enzyme preparations (about 2 µg protein) were incubated up to 20 min at 30°C with 2 mM DL-P5C, 5 mM NADP⁺, and 10 mM K₂HPO₄ in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µl. The P5C-dependent formation of NADPH was followed by reading the samples at 1 min intervals at 340 nm against blanks in which P5C had been omitted. The amount of NADPH formed was quantified on the basis of a calibration curve obtained with an authentic standard. DL-P5C was synthesized by the periodate oxidation of δ-*allo*-hydroxylysine and purified by cation exchange chromatography on a 200–400 mesh Dowex AG50W-X4 column, as previously described (Forlani and Funck, 2020).

NADPH Oxidation Assay

The physiological, forward reaction of P5C synthetase was measured by following the glutamate-dependent oxidation of NADPH in the presence of ATP. Aliquots of the purified enzyme preparations (0.5–1 µg protein) were incubated in a final volume of 200 µl with 20 mM L-glutamate, 4 mM ATP, and 0.4 mM NADPH in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. When aiming at the evaluation of the effect of chlorides on enzyme activity, Tris-HCl buffer concentration was lowered to 10 mM, or replaced with 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Incubation proceeded at 30°C for up to 20 min. The decrease of absorbance at 340nm was determined at 0.5 min intervals

against exact blanks in which glutamate had been omitted. Assays were either performed in cuvettes with 0.2 or 1 cm pathlength (UVette; Eppendorf, Milan, Italy), or in 96-microwell plates. In the former case, OD_{340} was determined with a Novaspec plus spectrophotometer (Amersham Biosciences, Milan, Italy) equipped with an UVette adaptor. In the latter case, the plate was equilibrated at 30°C prior to enzyme addition, and absorbance was measured using a Ledetect plate reader (Labexim, Lengau, Austria) equipped with a LED plugin at 340 nm. Each sample was carried out in triplicate (technical replications). Each determination was repeated with at least three different enzyme preparations (biological replications). Presented data refer to a single enzyme preparation, and are means \pm SE over technical replicates. Linear and non-linear regressions of data, as well as kinetic constant values, were computed using Prism 6 for Windows, version 6.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States).

Analytical Methods

For SDS-PAGE analysis, samples were denatured by boiling for 5 min in a treatment buffer consisting of 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, and 5% (v/v) β -mercaptoethanol in 62.5 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8. Sample aliquots (10–40 μ l) were subjected to discontinuous sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 8 mA with a 5% stacking and a 10% separating gel. For total protein analysis, *E. coli* cells were harvested by centrifugation and directly resuspended in treatment buffer at 10 optical units (600 nm) ml^{-1} . For soluble protein analysis, *E. coli* cells were harvested by centrifugation, resuspended in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 20 optical units (600 nm) ml^{-1} , and sonicated with five 1-min pulses at 70% amplitude with a UP50H ultrasonic processor (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Germany). Samples were centrifuged again, and the supernatant was treated with the same volume of 2X treatment buffer. Gels were stained for proteins with Quick Coomassie Stain (Neo Biotech, Nanterre, France).

Inclusion bodies were isolated by differential centrifugation according to Upadhyay et al. (2012). Solubilization of proteins from inclusion bodies was performed with the methods reported by Singh et al. (2015).

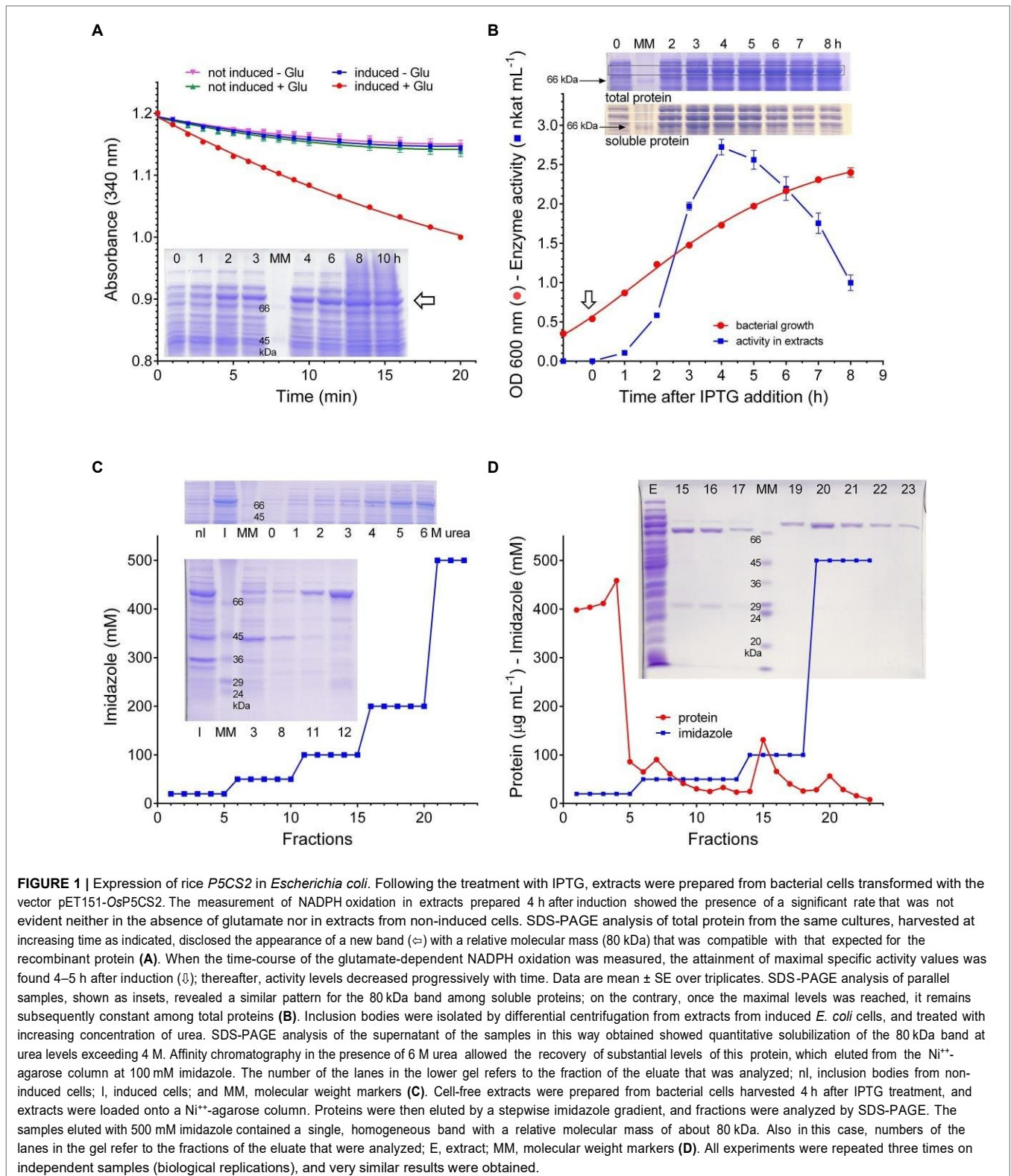
To obtain peptide mapping, the purified protein was subjected to SDS-PAGE and then excised, destained, digested with both trypsin and pepsin, and analyzed by reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an Esquire 3000 spectrometer (Bruker Daltonics), connected to an Agilent 1100 HPLC. After sample injection, the column was washed for 5 min with 90% mobile phase A (0.1% formic acid) and 10% mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile), and peptides were eluted using a linear gradient from 10 to 80% mobile phase B in 20 min at 50 μ l min^{-1} . The Esquire mass spectrometer was operated in a data-dependent mode in which each full MS scan was followed by three MS/MS scans where the three most abundant molecular ions were dynamically selected and fragmented by collision-induced dissociation. Dynamic exclusion was allowed.

RESULTS

Heterologous Expression of *Oryza sativa* P5C Synthetase 2 in *E. coli* and Affinity Purification of the Catalytically Active Protein

The gene coding in rice for the stress-induced P5CS isoenzyme 2 (protein ID O04226) was cloned into the expression vector pET151 and used to transform *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells. Following the treatment with IPTG, glutamate and ATP-dependent NADPH oxidation activity was detectable in crude extracts, which was not present in extracts from either non-induced cells or induced cells transformed with the empty vector. Simultaneously, a pronounced band of the predicted molecular mass (81.5 kDa) became evident upon SDS-PAGE analysis of total protein samples prepared at increasing time after IPTG addition (**Figure 1A**). Preliminary attempts to purify the plant protein from induced cells harvested 10–24h after induction failed, since negligible protein amounts were found in the eluate from Nickel Affinity Gel columns. To understand the reason for such a failure, the presence of the protein was investigated by gel electrophoresis of samples obtained by either directly resuspending bacterial cells with denaturing treatment buffer (total protein), or using supernatants obtained after cell sonication (soluble protein). Results showed that in total protein samples the band of interest reached a maximal amount about 4h after induction, and remained constant thereafter. On the contrary, after reaching maximal amounts in a similar timeframe, its presence among soluble proteins declined at increasing time to lowest levels. Consistent patterns were obtained when specific activity levels of glutamate and ATP-dependent NADPH oxidation were measured in cell free extracts from parallel samples (**Figure 1B**). Because results were suggestive of a fast and complete sequestering of the heterologous protein in inclusion bodies, induction was performed at lower temperatures, down to 15°C, but this did not lead to substantial improvements. As an alternative approach, protein solubilization from inclusion bodies was performed. Several treatments were tried with this aim, such as 5% (v/v) DMSO or *n*-propanol or 0.5–2% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside, but the best results were obtained with urea: extraction with 5–6M urea allowed a quantitative recovery of the protein in the supernatant, and the inclusion of 6M urea into column buffers afforded satisfactory yields from the subsequent affinity chromatography step (**Figure 1C**). However, despite the many attempts by means of dilution, dialysis, or column desalting protocols, renaturation of purified samples did not provide an active protein. Active P5CS2 protein was obtained only when non-denaturing extracts were prepared from cells harvested 3–5h after IPTG treatment, when bacterial cultures were still in the mid-exponential phase of growth. Even in this case, the attainment of homogeneous preparations required a careful setup of elution conditions from the affinity column, and extensive washing with buffers containing 50 and 100 mM imidazole was necessary to resolve the plant enzyme from contaminant *E. coli* proteins that were also retained by the resin (**Figure 1D**).

The identity of the purified protein was confirmed by peptide mapping, from which a 55%-coverage was obtained



(Supplementary Figure S1). The His₆-tail was removed by treatment with TEV protease and subsequent negative chromatography on the Nickel Affinity Gel column to get rid of the detached fragment and the protease. No differences

were found in the enzymological features of the protein before and after the cleavage. Therefore, the removal was not carried out subsequently, also to avoid a consequent, partial loss of specific activity. The purified enzyme was in fact extremely

unstable, with a half-time of less than 24 h at 4°C (data not shown). Every attempt to identify stabilizing conditions failed. The only treatment that slightly increased the stability of recombinant P5CS2 was the addition of high concentrations of a reducing agent (dithiothreitol 5–10 mM) to extraction and column buffers, although in the latter case levels higher than 5 mM could not be used in order to avoid interference with the affinity gel. In the absence of dithiothreitol, activity was completely lost within 24 h. To overcome such drawback, small amounts of the protein were purified each day, and used for the characterization of the functional properties of the enzyme within 4–5 h after the isolation.

Activity Assays and Substrate Affinities

Rice P5CS2 was at first assayed with two colorimetric methods that had been previously described in the literature, i.e., the phosphorylation of glutamate in the presence of product-trapping hydroxylamine (glutamyl kinase assay), and the reverse, P5C-dependent reduction of NADP⁺ in the presence of inorganic phosphate (glutamyl phosphate reductase assay). In both cases, activity was detectable when 1–2 µg of purified protein was incubated at 30°C up to 30 min. However, due to the low molar extinction coefficient of the glutamyl-hydroxamate assay (760 A₅₃₅ M⁻¹ cm⁻¹), very low absorbance values were obtained in the former case. In the latter, though the change in absorbance was much greater ($\epsilon = 6,220$ A₃₄₀ M⁻¹ cm⁻¹), the activity rapidly lost linearity and was not proportional to the amount of enzyme, most likely because of the reversibility of the reaction. On the contrary, when all the three substrates (glutamate, ATP, and NADPH) were incubated with the purified protein (NADPH oxidation assay), a nearly linear rate of NADPH oxidation was detected at 340 nm (Figure 2A), which was significantly higher than both rates of the partial activities when data were expressed on a molar basis (Figure 2B). The simultaneous production of P5C was also verified (Supplementary Figure S2). Because this method measures in addition the full, physiological reaction, it was used thereafter throughout the characterization of the enzymological features of the enzyme. The presence of non-limiting ATP and glutamate concentrations was required to maintain a linear reaction rate over time. However, an initial burst of NADPH oxidation was evident even in the absence of one or both of the other substrates (Figure 2C). If equimolar amounts of NADPH were oxidized, similar results could imply the occurrence of a biphasic mechanism in which a rapid reaction of NADPH with the enzyme is followed by a slower steady-state process, in which glutamyl phosphate is produced and subsequently reduced to P5C. On the contrary, the amount of NADPH oxidized largely exceeded that of the enzyme in the reaction mixture, and the transfer of electrons to an enzyme-bound cofactor was not supported by the UV-vis spectrum of the purified protein (Supplementary Figure S3). The possibility therefore exists that such an initial burst may depend on a trace compound introduced with the enzyme or the buffer, which is rapidly reduced by NADPH. In any case, following a pre-incubation with the dinucleotide before the addition of glutamate and ATP, the resulting rate of NADPH oxidation

was linear, and the rates in the stationary state with or without pre-incubation were comparable (Supplementary Figure S4). No detectable utilization of NADH was found, even at the highest concentration tested (0.5 mM). For the subsequent estimation of the steady state rate and the assessment of biochemical parameters and functional features, each sample was therefore read at 30 s intervals for 20 min against an exact blank in which glutamate had been omitted. The resulting difference in absorbance decreased almost linearly with time, and was strictly proportional to the amount of enzyme (Figure 2D). Under such standard assay conditions, a mean specific activity of 15.92 ± 0.43 nkat mg⁻¹ protein ($n = 20$) was found.

Substrate affinities were evaluated by varying the concentration of a single substrate while maintaining the other substrates at saturating concentrations (20 mM glutamate, 4 mM ATP, and 0.4 mM NADPH, Figures 3A–C). Lineweaver-Burk plots of the results obtained in this way allowed estimation of apparent K_M values (Table 1). Consistent results were calculated in all cases for the maximal catalytic rate, with a V_{max} value of about 18 nkat (mg protein)⁻¹, which corresponds to only 1.5 catalytic events s⁻¹. Significant enzyme activity required the presence of 1–10 mM glutamate, 0.1–1 mM ATP, and 10–100 µM NADPH, but ATP concentrations exceeding 4 mM were found inhibitory (Figure 3B). Fitting the data to a substrate inhibition model ($Y = V_{max} * X / (K_M(app) + X * [1 + X/K_I])$), where V_{max} is the maximum enzyme velocity, if the substrate did not also inhibit enzyme activity, and K_I is the dissociation constant for substrate binding in such a way that two substrates can bind to an enzyme; equation 5.44 in Copeland, 2000) allowed calculation of a K_I value for ATP of 11.6 ± 5.1 mM. Multisubstrate enzymatic reactions may proceed through two different mechanisms, a sequential process in which the binding of all substrates must take place before the release of products, and a non-sequential or “ping-pong” mechanism in which one substrate binds, and one product is released before a second substrate binds, and a second product is released. Converging lines in a global Lineweaver-Burk plot (Figure 3D) are considered supportive of the former possibility. However, additional experiments to study the variation of apparent V_{max} and K_M while varying other substrates are needed to confirm the nature of the mechanism.

Product and Feed-Back Inhibition by Proline, Proline Analogues, and Metabolically Related Amino Acids

To evaluate the possible occurrence of post-translational regulative mechanisms, rice P5CS2 was assayed in the presence of increasing concentrations of products, analogues, and intermediates in proline synthesis, as well as other amino acids that are metabolically related, or represent an index of the nitrogen status of the cell. As expected, millimolar levels of proline were found inhibitory (Figure 4A), with a concentration inhibiting activity by 50% (IC₅₀) of less than 3 mM (Table 2). The four-atom ring analogue of proline, azetidine-2-carboxylate (A2CA), similarly inhibited P5CS2 activity, although with a 3.8-fold higher IC₅₀. Pipecolate, which

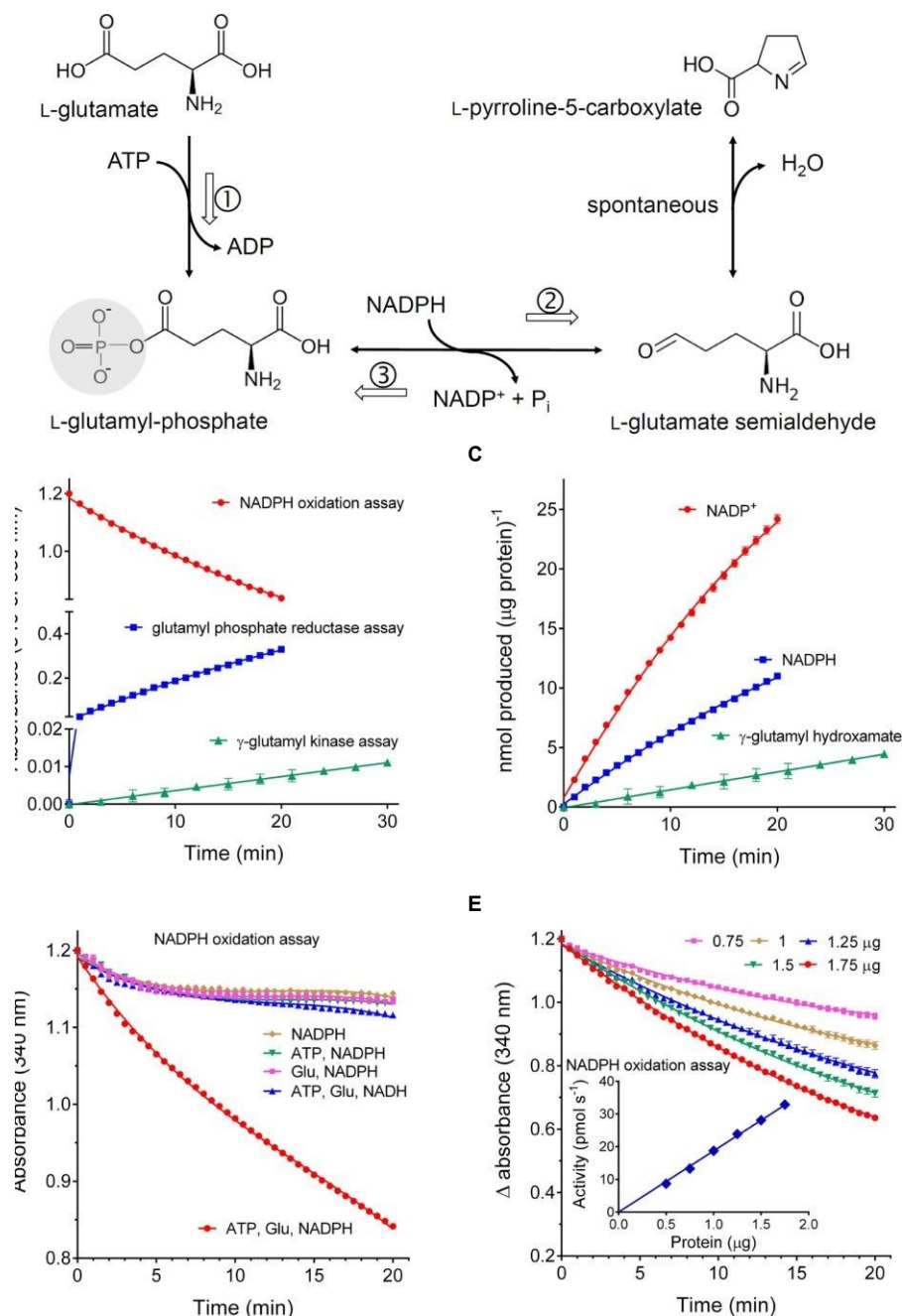
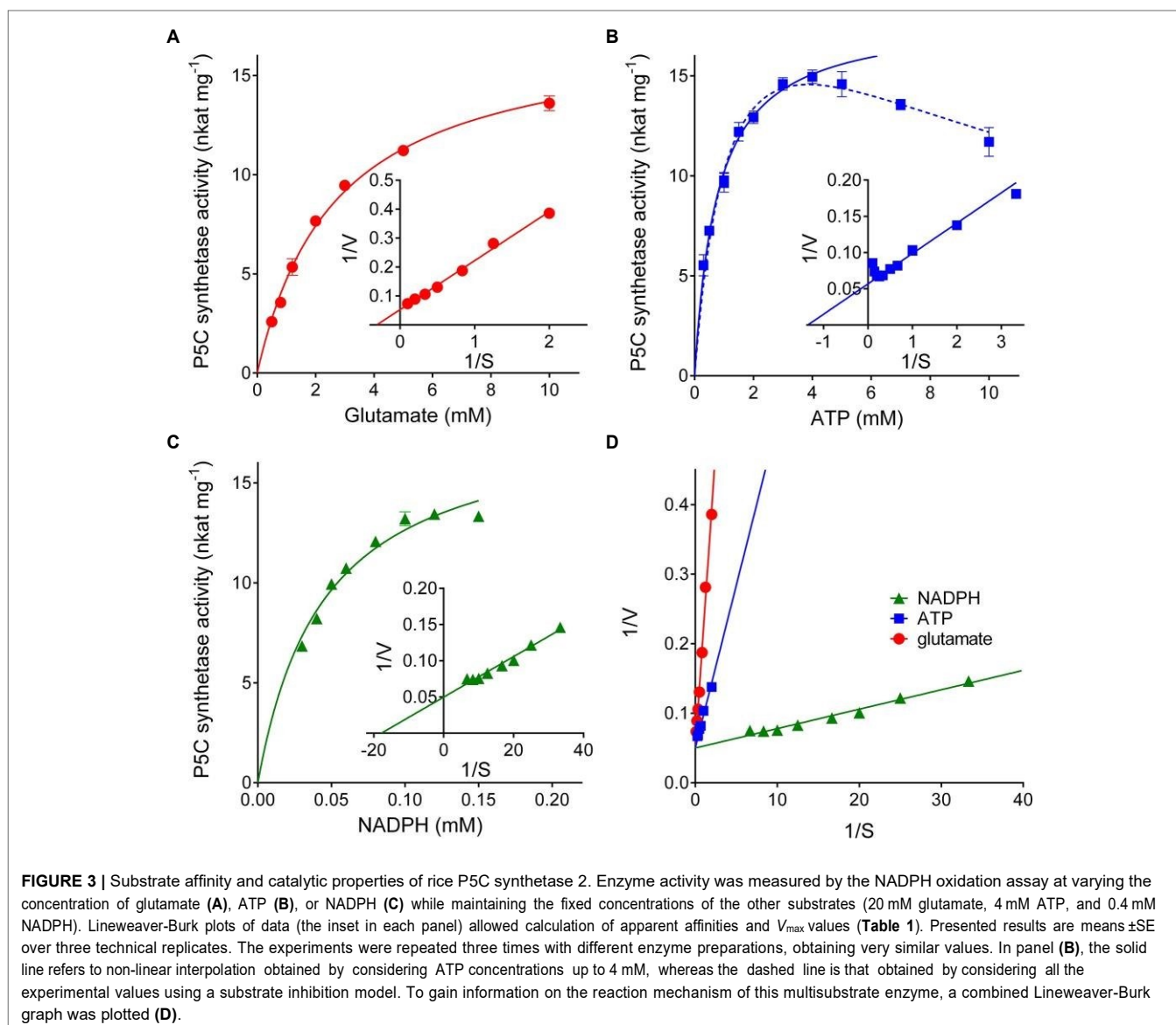


FIGURE 2 | Activity of recombinant rice P5C synthetase 2. **(A)** shows the reaction catalyzed by the enzyme: following glutamate phosphorylation and ADP release, glutamyl-phosphate is reduced using NADPH as the electron donor, yielding glutamate semialdehyde that spontaneously cyclizes to P5C. Three assay methods have been described: the glutamate kinase assay, which measures the formation of γ -glutamyl-hydroxamate in the absence of NADPH (①); the glutamyl-phosphate reductase assay, which follows the reverse, P5C- and P_i-dependent reduction of NADP⁺ in the absence of glutamate (③); the NADPH oxidation assay in the presence of all three substrate, thereby following the full forward, physiological reaction of the enzyme (① + ②). The purified protein was assayed with these three methods using aliquots corresponding to 2, 2, and 1 μ g protein, respectively **(B)**. To obtain a quantitative comparison of the three methods, data in **(A)** were used to calculate the absolute amounts of the product formed in each case *per* μ g of protein **(C)**. The NADPH oxidation assay was performed by incubating 1 μ g of the purified protein with 0.4 mM NADPH in the presence of an array of all possible combinations of the other substrates. A mixture containing ATP and NADH instead of NADPH was also included. Non-limiting levels of all three substrates were required to maintain the rate of NADPH oxidation over time **(D)**. Because an initial burst of NADPH consumption was evident also in the absence of ATP and glutamate, the activity of increasing amounts of protein was measured against exact blanks in which glutamate had been omitted **(E)**. The inset shows that in this case activity values, calculated by interpolation of the linear rate of NADPH oxidation, were strictly proportional to the amount of the enzyme. In all cases, results are means \pm SE over three technical replications. Each experiment was repeated three times with different enzyme preparations, obtaining very similar patterns.

**TABLE 1** | Kinetic properties of P5C synthetase 2 from rice.

V_{max} (Glu)	17.38 ± 0.52	nkat (mg protein) ⁻¹
V_{max} (ATP)	17.96 ± 0.46	nkat (mg protein) ⁻¹
V_{max} (NADPH) steady-state rate	18.36 ± 0.64	nkat (mg protein) ⁻¹
KM(app) for L-Glu	2.69 ± 0.19	mM
KM(app) for ATP*	0.764 ± 0.067	mM
KM(app) for NADPH steady-state rate	0.045 ± 0.004	mM

*Value calculated from the Lineweaver-Burk plot of results obtained by considering ATP concentrations ≤ 4 mM. When all the results shown in Figure 3B were considered using the inhibition model, a value of 1.29 ± 0.20 was instead found.

differs from proline by an additional C-atom in the ring, was found completely ineffective in the range tested (Figure 4A). Up to 100mM, D-proline was unable to interfere with the activity of P5CS2, whereas hydroxyproline and phosphonoproline showed partial inhibition (Figure 4B). On the whole, these results suggest

that similarly-sized structural analogues of L-proline are able to bind to P5CS2 and mimic the feed-back inhibition of the enzyme.

Concerning the possibility that the P5CS2 may be subjected to product inhibition, the addition of micro to millimolar levels of P5C or inorganic phosphate to the assay mixture did not exert any significant effect. On the contrary, a remarkable inhibition was found in the case of both $NADP^+$ and ADP (Figure 4C). The latter was inhibitory only at concentrations exceeding that of ATP in the reaction mixture (4mM), and 9 mM ADP was required to reduce activity by 50%. More interestingly, $NADP^+$ exerted a significant inhibition already at levels 5-fold lower than those of NADPH in the assay, and 50% inhibition was achieved when $NADP^+$ and NADPH were present at the same concentration (0.4mM). NAD^+ was completely ineffective (not shown). The results therefore strengthen the possibility that P5CS activity may be regulated *in vivo* by both the adenylate charge and, mainly, by the redox status of the cell.

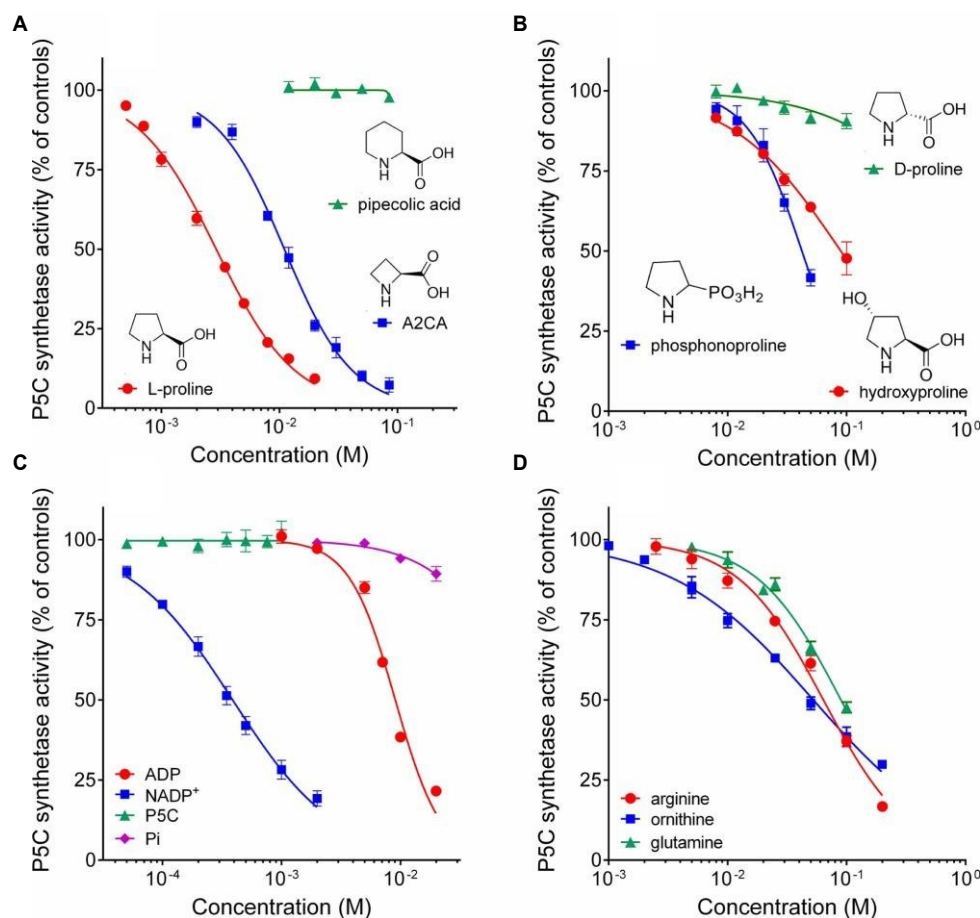


FIGURE 4 | Effect of reaction products and related amino acids on the activity of rice P5C synthetase 2. The activity of the purified protein was assayed in the presence of increasing concentrations of the final product of the pathway, L-proline, and its 4C (A2CA) and 6C (pipecolic acid) analogues (**A**); of the D-isomer and other natural and synthetic analogues of proline (**B**); of the four enzyme products (**C**); of some amino acids that are metabolically interconnected with proline, or represent a cellular index of nitrogen availability (**D**). Results were expressed as per cent of mean values in untreated controls. Presented data are means \pm SE over three technical replicates. Each experiment was repeated three times with different enzyme preparations, and virtually identical patterns were obtained. Ornithine and arginine were added as hydrochlorides. To rule out the possibility that effects may depend on a consequent change in pH and not to the added substances, the actual pH in each sample was measured with a microelectrode at the end of the incubation. Non-linear regression of data (log[inhibitor] vs. normalized response – variable slope) was performed using GraphPad Prism; IC₅₀ values and their confidence intervals are reported in **Table 2**.

TABLE 2 | Concentrations of selected substances able to inhibit by 50% the activity of *Oryza sativa* P5C synthetase 2.

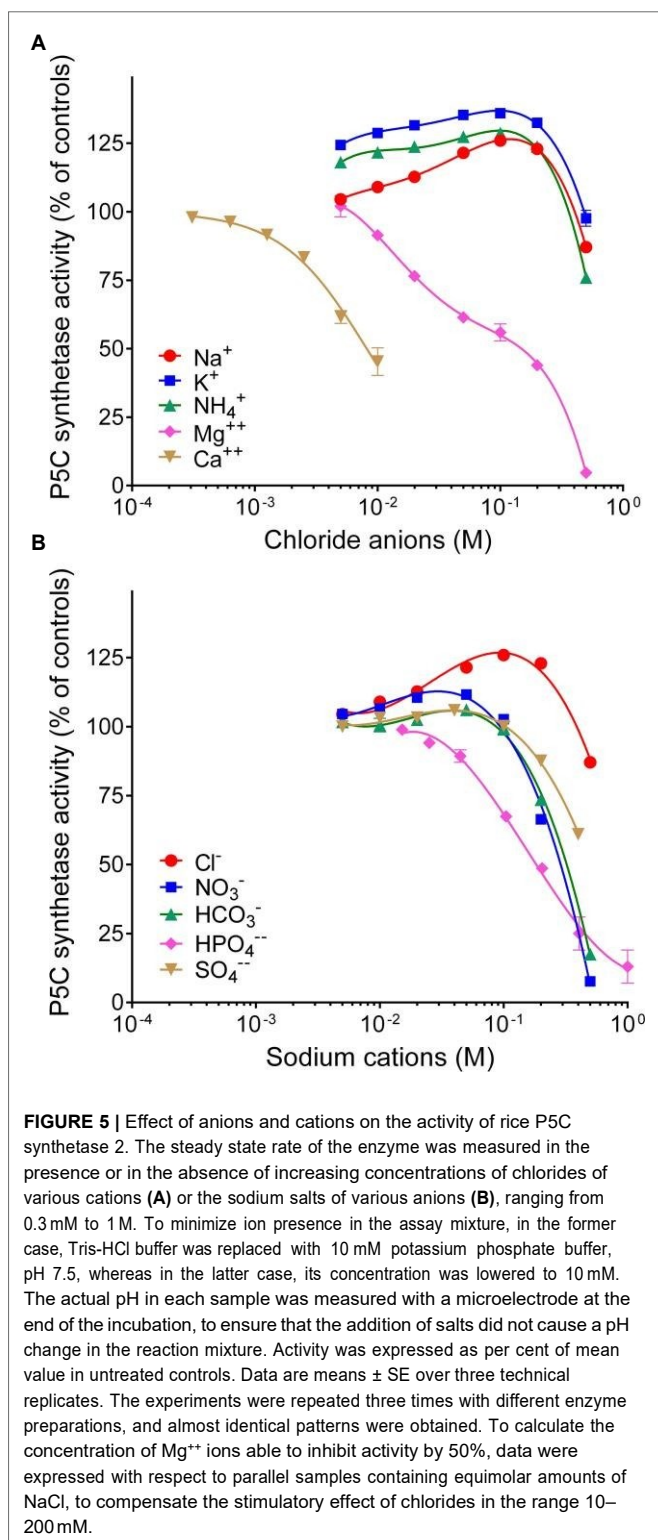
	IC ₅₀ (mM)	Lower limit (mM)	Upper limit (mM)
L-proline	2.91	2.76	3.08
azetidine-2-carboxylic acid	11.0	10.2	11.9
phosphonoproline	42.2	37.8	47.3
L-4-hydroxyproline	89.5	76.4	105
NADP ⁺	0.389	0.365	0.414
ADP	9.06	8.40	9.77
ornithine	52.6	48.4	57.2
arginine	63.9	58.0	70.3
glutamine	89.7	83.7	96.2
Mg ⁺⁺	34.8	27.6	46.4
Ca ⁺⁺	4.09	3.60	4.63

Confidence intervals ($p = 0.05$) are also reported.

The effect of the presence of other amino acids was also analyzed. The addition of concentrations of ornithine exceeding 2 mM was found inhibitory (**Figure 4D**), and 50%-inhibition of P5CS activity was obtained at about 50 mM (**Table 2**). A similar pattern was evident also with arginine, though the effect was slightly lower. Enzyme activity was affected also by glutamine at concentrations exceeding 10 mM, with an IC₅₀ value of about 100 mM. Asparagine and α -ketoglutarate were on the contrary ineffective up to 100 mM (data not presented).

Effect of Anions and Cations on Enzyme Activity

Finally, because the synthesis of proline is often induced by the exposure to hyperosmotic conditions, the effect of the main anions and cations present in plant cells on the activity of P5CS was investigated (**Figure 5**). When considered overall, data suggested



a stimulatory effect of chloride anions in the range 10–100 mM. On the contrary, sodium cations seem inhibitory, but only at concentrations exceeding 100 mM. Among the other anions, HPO_4^{--} reduced P5CS activity when added to the reaction mixture at levels higher than 20 mM. Unexpectedly, a strong inhibitory

effect was evident with divalent Ca^{++} and Mg^{++} . Ca^{++} was more effective, although it had only a negligible effect at concentrations typically present in the cytosol. Mg^{++} ions at 20 mM, a level that had been routinely added to the γ -glutamyl kinase assay (Zhang et al., 1995), exerted 25% inhibition (Figure 4A), and 50% inhibition was found at about 35 mM (Table 2).

DISCUSSION

Recombinant expression of rice P5CS isoenzyme 2 in *E. coli* and subsequent affinity purification to electrophoretic homogeneity yielded an active protein, but the activity was highly unstable. In the absence of reducing agents, the half-life of P5CS2 activity was less than 24 h. This feature is in striking contrast to the remarkable stability of the enzyme that catalyzes the second and last step in proline biosynthesis, P5C reductase, which retained more than 90% activity after 3-month storage at 4°C (Giberti et al., 2014; Ruszkowski et al., 2015; Forlani et al., 2015b). Another remarkable difference between the two enzymes concerns their catalytic constants, with P5CS2 catalyzing only 1.5 reactions s^{-1} per monomer, whereas rice P5C reductase showed the capability of reducing 350 to almost 5,000 P5C molecules s^{-1} under non-limiting conditions, depending on whether NADPH or NADH was the electron donor (Forlani et al., 2015b). Such a huge difference may be functional *in vivo* to avoid any accumulation of P5C, which has been hypothesized to exert (or trigger) cytotoxic effects (Deuschle et al., 2004; Qamar et al., 2015; Giberti et al., 2017), and could explain the lack of correlation between the expression level of P5C reductase and the intracellular concentration of proline (Hua et al., 1997). Moreover, a high lability of the enzyme that catalyzes the limiting step in a biosynthetic route may facilitate a rapid activation or deactivation of the pathway as a function of the cellular need for the final product. However, more evidence is required to confirm that P5CS2 may have a similar lability also inside the plant cell, where microenvironmental conditions or posttranslational modifications could improve its half-life. Both *A. thaliana* P5CS isoenzymes were found to be phosphorylated *in vivo* (PhosPhAt database; Durek et al., 2010) but no information is available about the influence of these modifications on the stability or activity of P5CS.

Proline biosynthesis from glutamate is competitively feedback-inhibited by proline binding near the glutamate binding site of the γ -glutamylkinase domain of P5CS, and Hill coefficients of 1.7–2 indicated cooperativity between proline binding to individual γ -glutamylkinase active sites (Zhang et al., 1995; Pérez-Arellano et al., 2010; Fichman et al., 2015). The activity of purified rice P5CS2 was inhibited by 50% at about 3 mM proline, and less than 20% catalytic rate was retained at 10 mM proline. These values are similar to the reported proline inhibition of the γ -glutamyl kinase activity of P5CS from *V. aconitifolia*, and roughly 20 times higher than the IC_{50} of *E. coli* γ -glutamyl kinase (Zhang et al., 1995; Pérez-Arellano et al., 2010). Moderate sensitivity to proline inhibition seems consistent with the role hypothesized for class 2 P5CS isozymes, i.e., to provide the

steady-state intracellular levels of proline required for protein synthesis (Rai and Penna, 2013). A phenylalanine residue (F133 in OsP5CS2) that was found critical for feedback inhibition of plant P5CS (Zhang et al., 1995) is conserved in both P5CS isoenzymes in rice, as well as in *Arabidopsis*. It remains to be analyzed, if differences at other positions render the stress-inducible isoforms less sensitive to inhibition by proline in order to allow proline accumulation. Interestingly, the 4C-ring analogue A2CA was also found to interact with rice P5CS2, thereby exerting a *false* feedback that was early hypothesized to explain part of the phytotoxic effects of this naturally-occurring compound (Nielsen et al., 1986).

The activity of rice P5CS was measured with three methods that had been described in the literature: by following the ATP-dependent phosphorylation of glutamate in the absence of NADPH (glutamyl kinase assay), the P5C-dependent reverse reduction of NADP⁺ (glutamyl phosphate reductase assay), and the complete forward reaction in the presence of all three substrates (NADPH oxidation assay). The rate of glutamyl phosphate production was much lower than that of the whole reaction. This could depend on the lability of γ -glutamyl phosphate (Hayzer and Leisinger, 1980) even in the presence of product-trapping hydroxylamine. The alternative possibility that a slow kinase reaction is favored by a faster release of ADP in the presence of NADPH would imply a “ping-pong” mechanism for this multisubstrate enzyme. On the contrary, the occurrence of an initial burst of NADPH oxidation even in the absence of glutamate and ATP strengthens a biphasic mechanism in which a rapid reaction of NADPH with the enzyme is followed by a slower process in which glutamyl phosphate is produced and reduced. Considering that the glutamyl phosphate reductase assay is not sensitive to feedback inhibition by proline (Zhang et al., 1995; **Supplementary Figure S4**), these data emphasize the need of adopting the NADPH oxidation assay to obtain a reliable estimate of the biochemical features of P5CSs. However, the presence of several unrelated activities able to hydrolyze NADPH, coupled with the low specific activity of P5CS2, makes this assay poorly feasible if used with crude extracts. Accordingly, knockout of one P5CS isoform had only a small effect on total ATP- and glutamate-dependent NADPH oxidation in total protein extracts of *Medicago truncatula* (Nguyen et al., 2013). With the NADPH oxidation assay, the purified rice P5CS2 showed a K_m value for glutamate similar to those described previously, whereas the K_m value calculated for ATP (0.76 mM) was significantly lower than those reported for the half-reactions (glutamyl kinase assay) of the enzymes from *V. aconitifolia* (2.7 mM; Zhang et al., 1995) or *A. thaliana* (1.5 mM; Parre et al., 2010). Substrate inhibition was also found at ATP concentrations exceeding 4 mM. If we convert literature data (25–35 nmol g⁻¹ fw; e.g., Yu et al., 2020) into molar levels on the assumption of an intracellular volume (excluding vacuoles) equal to about 2–4% of the total water content in rice leaves, the concentration of ATP in the cell should range from 0.6 to 1.5 mM. It is therefore likely that such inhibition does not have a physiological role. Our kinetic analysis of purified rice P5CS2 also enabled determination of the apparent K_m for

NADPH as 45 μ M, which had not been determined before for any plant P5CS.

The actual concentration of NADPH in the plant cell is not easy to be estimated, as literature data are expressed in nmol (g FW)⁻¹ (Queval and Noctor, 2007; Takahashi et al., 2009; Sharma et al., 2011). However, these values should correspond to cytosolic concentrations of NADPH ranging from 50 to 100 μ M. This would imply that every fluctuation of the NADPH level could influence the rate of P5C synthesis. Taking into account that the exposure to stress conditions is well-known to induce cytosolic NADPH production through the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP; Baxter et al., 2007), this would also explain the significant increase of proline homeostatic levels that rapidly occurred in rice cell cultures after the exposure to hyperosmotic stress even in the absence of any variation in P5CS expression levels (Forlani et al., 2015a). Indeed, following a treatment with PEG at -1.2 MPa, NADPH levels in 7-day-old seedlings of *A. thaliana* increased from 0.3 to 2 nmol (g FW)⁻¹ (i.e., from about 15 to 100 μ M; Sharma et al., 2011). A higher rate of proline synthesis would in turn regenerate NADP⁺, allowing sustained OPPP activity (Hare and Cress, 1997; Verslues and Sharma, 2010). Interestingly, we found that the activity of rice P5CS2 is also sensitive to product inhibition, with 50% reduction of the catalytic rate in the presence of equimolar levels (0.4 mM) of NADP⁺ and NADPH. An even higher sensitivity to NADP⁺ has been found for plant P5C reductases, but only if NADH was the electron donor, whereas the NADPH-dependent activity was unaffected (Giberti et al., 2014; Ruszkowski et al., 2015; Forlani et al., 2015b). The almost complete inability of rice P5CS2 to use NADH as cofactor indicates a strong interaction with the phosphate group of NADPH, which may explain why also NADP⁺ may be bound strongly and thus inhibit NADPH binding. Structures of human P5CS (2H5G) and glutamyl phosphate reductase from yeast (1VLU) are available, but they do not include NADPH. NADP⁺ levels in *Arabidopsis* usually range from 2 to 25 nmol (g FW)⁻¹, approximately corresponding to 0.1–1.25 mM; Queval and Noctor, 2007; Takahashi et al., 2009; Sharma et al., 2011). If similar values were present also in rice, this would imply that under nonstressful conditions P5CS2 activity is significantly inhibited by NADP⁺, but promptly activated under stress as a consequence of the above-mentioned reduction of the pyridine dinucleotide pool. Mechanisms linking the modulation of proline biosynthesis with the redox status of the cell have long been hypothesized (Hare and Cress, 1997; Sharma et al., 2011; Shinde et al., 2016). Characterization of rice P5CS2 provides for the first time useful elements to substantiate this hypothesis.

Also noteworthy is the finding that rice P5CS2 is inhibited not only by proline, but also by ornithine, arginine, and glutamine. In mammals, P5CS is not feedback-inhibited by proline, but its activity is regulated by ornithine, with a K_i value (0.4 mM) very near the predicted intracellular concentration of the intermediate (Hu et al., 1999). However, in mammals, the P5CS reaction serves both proline and arginine biosynthesis, whereas in plants, the first committed step of arginine production is the acetylation of glutamate, yielding a product that is then subjected to phosphorylation and reduction steps analogous

to those catalyzed by P5CS (Winter et al., 2015). This notwithstanding, it has been hypothesized that the glutamate pathway is the main route for proline synthesis in plants only under nitrogen limitation, whereas under high nitrogen input the ornithine pathway assumes prominence (Delauney and Verma, 1993; Anwar et al., 2018). Although the occurrence of the ornithine pathway has been questioned in *Arabidopsis* (Funck et al., 2008), the sensitivity of P5CS not only to ornithine, but also to amino acids that are abundant under high nitrogen input might provide the molecular basis of such regulative mechanism. P5CS2 was inhibited *in vitro* by ornithine and arginine concentrations higher than those found in rice cultured cells [4–15 nmol (g FW)⁻¹ and 15–76 nmol (g FW)⁻¹ for ornithine and arginine, which should correspond to about 0.1–0.4 and 0.4–4 mM, respectively; Forlani et al., 2014]. However, higher concentrations of ornithine, arginine, and glutamine are found in certain plant tissues as nitrogen storage forms [e.g., 0.4, 5, and 35 μmol (g FW)⁻¹, respectively, in 12 day-old *Arabidopsis* seedlings Majumdar et al., 2016; or 14, 53, and 9 μmol (g DW)⁻¹, respectively, in shoots of fertilized plants of *Vaccinium vitis-idaea* Ann-Brittedfast et al., 1994], and inside the cell cumulative effects also are likely to occur. Therefore, inhibition of P5CS activity by other amino acids than proline may have a physiological role under certain conditions.

On the other hand, the addition to the reaction mixture of chlorides in the 10–100 mM range was found to apparently stimulate P5CS2 activity up to 40%. This effect might be functional to proline accumulation under hyperosmotic stress. A similar effect has been shown to a much higher extent (up to 4-fold) also for P5C reductase, but only when NADPH was the electron donor (Forlani et al., 2015b). In *E. coli*, glutamate binding to the active site of γ-glutamylkinase is stabilized by an inter-subunit hydrogen bond network and it is perceivable that such a network may be sensitive to subtle changes in the quaternary structure brought about by altered ion concentrations in the cytosol (Pérez-Arellano et al., 2010). Crystallographic or mutational studies will be required to determine the effects of ion binding to P5CS. Contrary to *A. thaliana*, where mostly the P5CS1 isoform mediates stress-induced proline accumulation, both P5CS isoforms are important for proline accumulation and stress tolerance in rice (Hien et al., 2003; Hur et al., 2004; Forlani et al., 2015a). Indeed,

to obtain a comprehensive picture of the post-translational regulation of the glutamate pathway for proline synthesis, the elucidation of functional properties of a P5CS family-1 member is also required. Work is currently in progress in our laboratory to fill this gap through cloning, heterologous expression, purification, and characterization of rice P5CS1.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GF designed the study, performed part of the experiments, elaborated the results, and drafted the paper. GS purified the P5CS2 protein and performed part of the experiments. DF cloned the *P5CS2* gene and performed peptide mapping. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from the University of Ferrara (FAR 2019 and 2020).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Michele Bertazzini for technical assistance during gene cloning and the Proteomics Center of the University of Konstanz for peptide mass fingerprinting.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.672702/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ahanger, M. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., and Ahmad, P. (2017). Plant responses to environmental stresses-from gene to biotechnology. *AoB Plants* 9:plx025. doi: 10.1093/aobpla/plx025
- Ann-Brittedfast, T. N., Ericsson, A., and Nordén, L.-G. (1994). Accumulation of amino acids in some boreal forest plants in response to increased nitrogen availability. *New Phytol.* 126, 137–143. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb07539.x
- Annunziata, M. G., Ciarniello, L. F., Woodrow, P., Dell'Aversana, E., and Carillo, P. (2019). Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 10:230. doi: 10.3389/fpls.2019.00230
- Anwar, A., She, M., Wang, K., Riaz, B., and Ye, X. (2018). Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 19:3681. doi: 10.3390/ijms19113681
- Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Reipsilber, D., Patil, K. R., Nielsen, J., et al. (2007). The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant Physiol.* 143, 312–325. doi: 10.1104/pp.106.090431
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Campanile, C., Forlani, G., Basso, A. L., Marasco, R., Ricca, E., Sacco, M., et al. (1993). Identification and characterization of the *proBA* operon of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 519–522. doi: 10.1128/aem.59.2.519-522.1993
- Chen, M., Cao, J., Zheng, C., and Liu, Q. (2006). Directed evolution of an artificial bifunctional enzyme, γ-glutamyl kinase/γ-glutamyl phosphate reductase, for improved osmotic tolerance of *Escherichia coli* transformants. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 41–47. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00397.x

- Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2nd Edn. Bridgewater, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- Csonka, L. N., and Leisinger, T. (2007). "Biosynthesis of proline," in *EcoSal-Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. eds. A. Block, R. Curtis, III, J. B. Kaper, R. D. Karp, F. C. Neidhardt and T. Nystrom et al. (Washington, D.C.: ASM Press).
- Da Rocha, I. M. A., Vitorello, V. A., Silva, J. S., Ferreira-Silva, S. L., Viégas, R. A., Silva, E. N., et al. (2012). Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *J. Plant Physiol.* 169, 41–49. doi: 10.1016/j.jplph.2011.08.001
- Delauney, A. J., Hu, C. A., Kishor, P. B., and Verma, D. P. (1993). Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 18673–18678. doi: 10.1016/S0021-9258(17)46682-8
- Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215–223. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., et al. (2004). The role of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. An update. *Plant Cell.* 16, 3413–3425. doi: 10.1105/tpc.104.023622
- Durek, P., Schmidt, R., Heazlewood, J. L., Jones, A., MacLean, D., Nagel, A., et al. (2010). PhosPhAt: the *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.* 38, D828–D834. doi: 10.1093/nar/gkp810
- Fichman, Y., Gerdes, S. Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., and Csonka, L. (2015). Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 1065–1099. doi: 10.1111/brv.12146
- Forlani, G., Bertazzini, M., and Cagnano, G. (2019a). Stress-driven increase in proline levels, and not proline level itself, correlates with the ability to withstand excess salt in a group of 17 Italian rice genotypes. *Plant Biol.* 21, 336–342. doi: 10.1111/plb.12916
- Forlani, G., Bertazzini, M., and Giberti, S. (2014). Differential accumulation of γ -aminobutyric acid in elicited cells of two rice cultivars showing contrasting sensitivity to the blast pathogen. *Plant Biol.* 16, 1127–1132. doi: 10.1111/plb.12165
- Forlani, G., Bertazzini, M., Zarattini, M., and Funck, D. (2015a). Functional characterization and expression analysis of rice δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide new insight into the regulation of proline and arginine catabolism. *Front. Plant Sci.* 6:591. doi: 10.3389/fpls.2015.00591
- Forlani, G., Bertazzini, M., Zarattini, M., Funck, D., Ruskowski, M., and Nocek, B. (2015b). Functional properties and structural characterization of rice δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front. Plant Sci.* 6:565. doi: 10.3389/fpls.2015.00565
- Forlani, G., and Funck, D. (2020). A specific and sensitive enzymatic assay for the quantitation of L-proline. *Front. Plant Sci.* 11:582026. doi: 10.3389/fpls.2020.582026
- Forlani, G., Nocek, B., Chakravarthy, S., and Joachimiak, A. (2017). Functional characterization of four putative δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductases from *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 8:1442. doi: 10.3389/fmicb.2017.01442
- Forlani, G., Obojska, A., Berlicki, L., and Kafarski, P. (2006). Phosphinothricin analogues as inhibitors of plant glutamine synthetases. *J. Agric. Food Chem.* 54, 796–802. doi: 10.1021/jf0526285
- Forlani, G., Trovato, M., Funck, D., and Signorelli, S. (2019b). "Regulation of proline accumulation and its molecular and physiological functions in stress defense," in *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*. eds. M. A. Hossain, V. Kumar, D. J. Burritt, M. Fujita and P. Mäkelä (Switzerland: Springer Nature).
- Funck, D., Baumgarten, L., Stift, M., von Wirén, N., and Schönemann, L. (2020). Differential contribution of P5CS isoforms to stress tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 11:565134. doi: 10.3389/fpls.2020.565134
- Funck, D., Stadelhofer, B., and Koch, W. (2008). Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 8:40. doi: 10.1186/1471-2229-8-40
- García-Ríos, M., Fujita, T., LaRosa, P. C., Locy, R. D., Clithero, J. M., Bressan, R. A., et al. (1997). Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding γ -glutamyl kinase and γ -glutamyl phosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8249–8254. doi: 10.1073/pnas.94.15.8249
- Giberti, S., Bertazzini, M., Liboni, M., Berlicki, L., Kafarski, P., and Forlani, G. (2017). Phytotoxicity of aminobisphosphonates targeting both δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase and glutamine synthetase. *Pest Manag. Sci.* 73, 435–443. doi: 10.1002/ps.4299
- Giberti, S., Funck, D., and Forlani, G. (2014). Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol.* 202, 911–919. doi: 10.1111/nph.12701
- Govrin, R., Obstbaum, T., and Sivan, U. (2019). Common source of cryoprotection and osmoprotection by osmolytes. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 13311–13314. doi: 10.1021/jacs.9b06727
- Guan, C., Cen, H. F., Cui, X., Tian, D. Y., Tadesse, D., and Zhang, Y. W. (2019). Proline improves switchgrass growth and development by reduced lignin biosynthesis. *Sci. Rep.* 9:20117. doi: 10.1038/s41598-019-56575-9
- Hare, P. D., and Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79–102. doi: 10.1023/A:1005703923347
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., and Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal. Behav.* 7, 1456–1466. doi: 10.4161/psb.21949
- Hayzer, D. J., and Leisinger, T. (1980). The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 118, 287–293. doi: 10.1099/00221287-118-2-287
- Hien, D. T., Jacobs, M., Angenon, G., Hermans, C., Thu, T. T., Van Son, L., et al. (2003). Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Sci.* 65, 1059–1068. doi: 10.1016/S0168-9452(03)00301-7
- Hildebrandt, T. M. (2018). Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. *Plant Mol. Biol.* 98, 121–135. doi: 10.1007/s11103-018-0767-0
- Hu, C. A., Delauney, A. J., and Verma, D. P. (1992). A bifunctional enzyme (δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9354–9358. doi: 10.1073/pnas.89.19.9354
- Hu, C. A., Lin, W. W., Obie, C., and Valle, D. (1999). Molecular enzymology of mammalian δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase. Alternative splice donor utilization generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. *J. Biol. Chem.* 274, 6754–6762. doi: 10.1074/jbc.274.10.6754
- Hua, X. J., van de Cotte, B., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (1997). Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114, 1215–1224. doi: 10.1104/pp.114.4.1215
- Hur, J., Jung, K.-H., Lee, C.-H., and An, G. (2004). Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci.* 167, 417–426. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.009
- Iordachescu, M., and Imai, R. (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1223–1229. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00736.x
- Kishor, P. B. K., and Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ.* 37, 300–311. doi: 10.1111/pce.12157
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., and Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 998–1011. doi: 10.1089/ars.2012.5074
- Majumdar, R., Barchi, B., Turlapati, S. A., Gagne, M., Minocha, R., Long, S., et al. (2016). Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level. *Front. Plant Sci.* 7:78. doi: 10.3389/fpls.2016.00078
- Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., et al. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon* 5:e02952. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02952
- Nguyen, M. L., Kim, G. B., Hyun, S. H., Lee, S.-Y., Lee, C.-Y., Choi, H.-K., et al. (2013). Physiological and metabolomic analysis of a knockout mutant suggests a critical role of *MtP5CS3* gene in osmotic stress tolerance of *Medicago truncatula*. *Euphytica* 193, 101–120. doi: 10.1007/s10681-013-0957-4
- Nielsen, E., Forlani, G., Cella, R., and Parisi, B. (1986). Biochemical characterization of the natural resistance of rice to the proline analogue azetidin-2-carboxylic acid. *Plant Sci.* 44, 147–154. doi: 10.1016/0168-9452(86)90085-3
- Parre, E., de Virville, J., Cochet, F., Leprince, A. S., Richard, L., Lefebvre-De Vos, D., et al. (2010). A new method for accurately measuring δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase activity. *Methods Mol. Biol.* 639, 333–340. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_21

- Pérez-Arellano, I., Carmona-Álvarez, F., Gallego, J., and Cervera, J. (2010). Molecular mechanisms modulating glutamate kinase activity. Identification of the proline feedback inhibitor binding site. *J. Mol. Biol.* 404, 890–901. doi: 10.1016/j.jmb.2010.10.019
- Qamar, A., Mysore, K. S., and Senthil-Kumar, M. (2015). Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front. Plant Sci.* 6:503. doi: 10.3389/fpls.2015.00503
- Queval, G., and Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.* 363, 58–69. doi: 10.1016/j.ab.2007.01.005
- Rai, A. N., and Penna, S. (2013). Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. *Mol. Biol. Rep.* 40, 6429–6435. doi: 10.1007/s11033-013-2757-2
- Ruszkowski, M., Nocek, B., Forlani, G., and Dauter, Z. (2015). The structure of *Medicago truncatula* δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6:869. doi: 10.3389/fpls.2015.00869
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G., Bali, A. S., et al. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomol. Ther.* 9:285. doi: 10.3390/biom9070285
- Sharma, S., Villamor, J. G., and Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 157, 292–304. doi: 10.1104/pp.111.183210
- Shinde, S., Villamor, J. G., Lin, W.-D., Sharma, S., and Verslues, P. E. (2016). Proline coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and mitochondria. *Plant Physiol.* 172, 1074–1088. doi: 10.1104/pp.16.01097
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., and Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Factories* 14:41. doi: 10.1186/s12934-015-0222-8
- Strizhov, N., Abrahám, E., Okrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., et al. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12, 557–569. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.00557.x
- Székely, G., Abrahám, E., Csépló, A., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., et al. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53, 11–28. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x
- Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S. N., Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., et al. (2009). Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* plants overexpressing the NAD kinase2 gene. *Plant Physiol.* 151, 100–113. doi: 10.1104/pp.109.140665
- Trovato, M., Forlani, G., Signorelli, S., and Funck, D. (2019). “Proline metabolism and its functions in development and stress tolerance,” in *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*. eds. M. A. Hossain, V. Kumar, D. J. Burritt, M. Fujita and P. Mäkelä (Switzerland: Springer Nature).
- Turchetto-Zolet, A. C., Margis-Pinheiro, M., and Margis, R. (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Mol. Genet. Genomics* 281, 87–97. doi: 10.1007/s00438-008-0396-4
- Upadhyay, A. K., Murmu, A., Singh, A., and Panda, A. K. (2012). Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One* 7:33951. doi: 10.1371/journal.pone.0033951
- Verbruggen, N., and Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759. doi: 10.1007/s00726-008-0061-6
- Verslues, P. E., and Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8:e0140. doi: 10.1199/tab.0140
- Williams, I., and Frank, L. (1975). Improved chemical synthesis and enzymatic assay of δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* 64, 85–97. doi: 10.1016/0003-2697(75)90408-X
- Winter, G., Todd, C., Trovato, M., Forlani, G., and Funck, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 6:534. doi: 10.3389/fpls.2015.00534
- Yu, P., Jiang, N., Fu, W., Zheng, G., Li, G., Feng, B., et al. (2020). ATP hydrolysis determines cold tolerance by regulating available energy for glutathione synthesis in rice seedling plants. *Rice* 13:23. doi: 10.1186/s12284-020-00383-7
- Zarattini, M., and Forlani, G. (2017). Toward unveiling the mechanisms for transcriptional regulation of proline biosynthesis in the plant cell response to biotic and abiotic stress conditions. *Front. Plant Sci.* 8:927. doi: 10.3389/fpls.2017.00927
- Zhang, C. S., Lu, Q., and Verma, D. P. (1995). Removal of feedback inhibition of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270, 20491–20496. doi: 10.1074/jbc.270.35.20491

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Sabbioni, Funck and Forlani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. Caratterizzazione funzionale dell'enzima δ^1 -pirrolin-5-carbossilato sintetasi 1 di *Arabidopsis thaliana*

Anche il gene codificante per la prima isoforma di riso, *OsP5CS1*, è stato clonato ed espresso all'interno di cellule batteriche. In questo caso, però, non è stato possibile ottenere la proteina eterologa in forma solubile poiché viene quasi completamente sequestrata all'interno dei corpi di inclusione. Nel tentativo di limitare questo fenomeno, sono state utilizzate varie linee derivate da *E. coli* per condurre la trasformazione, ma con nessuno dei ceppi testati la quantità di *OsP5CS1* presente negli estratti solubili era sufficiente per rilevarne l'attività catalitica. Si è dunque cercato di solubilizzare i corpi di inclusione attraverso trattamenti non invasivi, al fine di preservare la funzionalità dell'enzima, ma anche in questo caso l'approccio è risultato non efficace.

È stato quindi reputato opportuno abbandonare il sistema di riso, in attesa di trovare strategie efficienti per ottenere la forma solubile della proteina. Nel frattempo, l'attenzione è stata riposta sull'enzima *P5CS1* di *Arabidopsis*.

5.1 MATERIALI E METODI

5.1.1 Espressione ectopica della *P5CS* di *Arabidopsis thaliana*

Il gene *P5CS1* di *A. thaliana* (locus At2g39800; ID proteina: A0A178VY37) è stato clonato ed espresso in cellule TOP10 di *E. coli*. A tale scopo, la sua sequenza è stata amplificata attraverso PCR partendo dal clone U14433 (fornito da *Arabidopsis Biological Resource Center*, Ohio, Stati Uniti) e inserita in un plasmide derivato dal vettore di espressione pET-24a(+) (figura 5.1; Life Technologies, Carlsbad, California, Stati Uniti), che in posizione N-terminale presenta il promotore del fago T7, oltre ad una sequenza codificante per 6 istidine (6xHis-tag) utile a facilitare la purificazione ed un sito riconosciuto dalla proteasi TEV per rimuovere lo stesso.

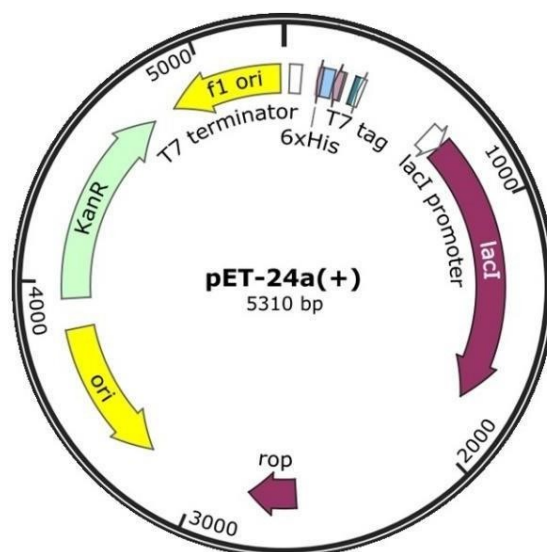


Figura 5.1. Mappa del vettore pET-24a(+) non modificato. Il plasmide non modificato contiene il 6xHis-tag in posizione C-terminale e non presenta la sequenza riconosciuta dall'enzima TEV proteasi (Snappgene).

5.1.2 Amplificazione del plasmide nel ceppo TOP10 di *E. coli* e sua purificazione

Le singole colonie contenenti il plasmide di interesse sono state incubate in 50 mL di terreno Lauria Bertani (LB) Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stati Uniti) in presenza di ampicillina 50 µg ml⁻¹ a 37 °C *overnight* in agitazione. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 5000 g per 5 minuti a temperatura ambiente in tubo Falcon e l'estrazione del DNA è stata condotta utilizzando il kit GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich).

Al pellet sono stati aggiunti 4 ml di "*Resuspension/RNase A Solution*" per risospendere le cellule e, dopo aver effettuato qualche ciclo di vortex, sono stati aggiunti 4 ml di "*Lysis Buffer*" al fine di solubilizzare le membrane e denaturare proteine e DNA. Dopo aver mescolato gentilmente per 6-8 volte, si lascia in incubazione da 3 a 5 minuti a temperatura ambiente finché il preparato non assume una consistenza viscosa. Per evitare di denaturare in maniera irreversibile il DNA plasmidico vengono aggiunti 3 ml di "*Neutralization Solution*" raffreddata in ghiaccio e, dopo aver mescolato per inversione 4-6 volte, si aggiungono 3 ml di "*Binding Solution*", invertendo ancora 1-2 volte. Il preparato viene trasferito in una apposita siringa dotata di filtro fornita con il kit nella quale rimane in incubazione per 5 minuti. Nel frattempo, la "*GenElute HP Midiprep Binding Column*" viene collocata in un "*collection tube*", anch'esso fornito, ed al suo interno si trasferiscono 4 ml di "*Column Preparation Solution*". La colonna viene centrifugata a 3000 g per 2 minuti e l'eluato viene scartato. Trascorsi i 5 minuti, il lisato dalla siringa viene filtrato all'interno della colonna e si centrifuga a 3000

g per 2 minuti, ripetendo l'operazione fino ad esaurire tutto il preparato. L'eluato viene scartato e si aggiungono 4 ml di "Wash Solution 1", si centrifuga come sopra, e si ripete aggiungendo 4 ml di "Wash Solution 2" al fine di rimuovere eventuali contaminanti quali RNA, proteine o nucleasi. A questo punto, la colonna viene trasferita in un nuovo "collection tube" ed il DNA plasmidico viene eluito aggiungendo 1 ml di "Elution Solution" e centrifugando per 5 minuti a 3000 g. Successivamente all'eluizione, il DNA plasmidico è stato sia quantificato con lo strumento BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone) sia valutato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Il plasmide può essere conservato a 4°C per pochi giorni, oppure a -20°C per il lungo periodo.

5.1.3 Preparazione delle cellule competenti

Per procedere con la trasformazione delle cellule batteriche con il vettore purificato pET-24a-*AtP5CS1* è necessario che esse vengano rese competenti, ovvero pronte per integrare al loro interno il DNA esogeno. A questo scopo, sono state usate cellule di *E. coli* SoluBL21 (AmsBio, Abingdon, Oxfordshire, Regno Unito), particolarmente indicate per l'espressione di proteine in forma solubile sotto il controllo del promotore del fago T7 inducibile da isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG). Per la competenza, si parte prelevando una colonia di SoluBL21 da una piastra di terreno LB agarizzato (conservata a 4°C) al fine di allestire una pre-coltura di 15-20mL di LB che viene lasciata crescere in agitazione *overnight* a 37°C. Il giorno successivo, la sospensione batterica viene diluita in terreno fresco per ottenere una densità ottica a 600nm (OD_{600}) di partenza compresa tra 0.05 e 0.1. L'inoculo viene lasciato crescere finché la OD_{600} raggiunge il valore di 0.2, momento in cui viene aggiunto il 2% di $MgCl_2$ 2M e si lascia ulteriormente crescere fino ad un valore di OD_{600} compreso tra 0.45 e 0.55. La beuta contenente la coltura batterica viene quindi trasferita in ghiaccio per 90 minuti al fine di bloccare la crescita, trascorsi i quali si raccolgono le cellule centrifugando per 5 minuti a 3000 g a 4°C. Allontanato il surnatante, le cellule vengono risospese in una soluzione fredda (0-4°C) di Ca^{2+}/Mn^{2+} (Na-Acetato 40 mM, $MnCl_2$ 70 mM, $CaCl_2$ 100 mM) sterilizzata per filtrazione, ad un volume corrispondente alla metà di quello iniziale. La coltura viene incubata in ghiaccio per altre 2 ore, trascorse le quali si centrifuga nuovamente a 3000 g per 5 minuti a 4°C. Rimosso il surnatante, il pellet cellulare viene risospeso in 1/20 del volume iniziale della stessa soluzione Ca^{2+}/Mn^{2+} e, dopo almeno 1 ora di incubazione in ghiaccio, le cellule sono competenti e pronte per essere trasformate con il DNA esogeno.

5.1.4 Trasformazione delle cellule competenti mediante il metodo dello shock termico

Affinché il plasmide pET-24a-*AtP5CS1* possa essere integrato nelle cellule competenti, è necessario favorirne l'ingresso nel citoplasma. A questo scopo, un'aliquota di 50 µl di cellule competenti viene trasferita in una provetta ed incubata con il DNA plasmidico (circa 25 ng) per 30 minuti in ghiaccio. A questo punto, la provetta viene immersa in un bagnetto termostato a 42°C per 45 secondi al fine di indurre lo shock termico necessario per favorire la permeabilizzazione delle cellule batteriche. Immediatamente dopo si aggiungono 450 µl di terreno SOC (triptone 10 g l⁻¹, estratto di lievito 5 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, glucosio 10 mM, MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM, pH a 7.5 con NaOH) sterilizzato per filtrazione. La sospensione viene posta in forte agitazione per 1 ora a 37°C, trascorsa la quale si prelevano differenti volumi (10, 30 e 100 µl) per inoculare piastre Petri selettive contenenti 25 µg ml⁻¹ di kanamicina. Le cellule vengono incubate *overnight* a 37°C.

5.1.5 Espressione eterologa nel ceppo SoluBL21 di *E. coli*

Una volta selezionate le colonie trasformate con il plasmide pET-24a-*AtP5CS1*, si allestisce un pre-inoculo in 30-50 mL di LB contenente 25 µg ml⁻¹ di kanamicina che viene lasciato crescere *overnight* in agitazione a 24°C. Il giorno seguente si diluisce la sospensione cellulare per ottenere una OD₆₀₀ pari a 0.2 in 400 mL dello stesso terreno contenente l'antibiotico di selezione. Dopo circa 2 ore di crescita, ovvero quando l'OD₆₀₀ è compresa tra 0.55 e 0.65, viene addizionato un opportuno volume di IPTG per ottenere la concentrazione finale di 1 mM. La fermentazione prosegue per circa 22 ore e le cellule vengono quindi centrifugate in tubi a fondo conico da 50 mL a 3000 g per 10 minuti a temperatura ambiente. I pellet vengono pesati e immediatamente congelati a -20°C fino all'utilizzo.

5.1.6 Purificazione della *AtP5CS1* mediante cromatografia ad affinità

Grazie alla sequenza 6xHis-tag contenuta nel vettore di espressione pET-24a il processo di purificazione mediante cromatografia di affinità viene semplificato. Le colonne cromatografiche utilizzate contengono infatti una resina di nichel agarosio (His-Select® High Flow Cartridge, Sigma-Aldrich) che interagisce con i residui di istidina.

5.1.6.1 Lisi cellulare

Una volta congelato, il pellet viene sottoposto a lisi meccanica in mortaio (precedentemente raffreddato in ghiaccio) addizionando, per ogni grammo di peso fresco delle cellule, 2 g di allumina

(Sigma-Aldrich). La lisi viene effettuata per 10 minuti, mantenendo il mortaio in ghiaccio, trascorsi i quali l'omogenato viene risospeso in 20 ml g⁻¹ di tampone di estrazione (sodio fosfato 50mM pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT) equilibrato a 4°C e centrifugato a 12000 g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante (estratto grezzo) viene quindi isolato e posto in un tubo Falcon mantenuto in ghiaccio fino al successivo utilizzo.

5.1.6.2 Purificazione

L'estratto grezzo, prima di essere caricato nella colonna di nichel agarosio, viene addizionato con un volume di tampone di eluizione (sodio fosfato 50 mM pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 500 mM imidazolo) tale da ottenere una concentrazione finale di imidazolo pari a 20 mM, al fine di scongiurare la formazione di legami aspecifici tra le proteine e la resina. La purificazione viene quindi eseguita utilizzando colonne monouso His SpinTrap® (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stati Uniti) precedentemente equilibrate con 3 ml di acqua distillata (ddH₂O) e 5 ml di tampone contenente 20mM imidazolo (ottenuto miscelando tra loro opportuni volumi dei tamponi di estrazione e di eluizione). A seguire, si carica l'estratto grezzo ed infine viene condotta un'eluizione *step-wise* utilizzando concentrazioni crescenti di imidazolo (20 mM-50 mM-100 mM-350 mM). L'eluato viene raccolto in frazioni da 1.5 ml conservate in ghiaccio fino al successivo utilizzo. Tutti i processi di equilibratura, caricamento ed eluizione sono stati condotti in camera fredda (10°C) mantenendo la velocità del flusso a 10 ml h⁻¹ con l'ausilio di una pompa peristaltica in ingresso alla colonna.

5.1.7 Quantificazione proteica

La quantificazione proteica è stata effettuata mediante saggio di Bradford (Bradford, 1976). Questo si basa sull'utilizzo del colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250 in grado di interagire con i gruppi amminici liberi delle proteine dando viraggio verso il blu alla soluzione che le contiene: ciò permette di risalire alla loro concentrazione attraverso la misurazione dell'assorbanza del complesso alla lunghezza d'onda di 595 nm. L'assorbanza del complesso a 595 nm risulta quindi proporzionale alla quantità di proteine presenti in soluzione per cui, sulla base di una curva di taratura costruita utilizzando diverse concentrazioni scalari di albumina sierica bovina (BSA, Bovine Serum Albumin), è possibile estrapolare la concentrazione delle soluzioni incognite. Per il saggio, opportuni volumi (da 1 a 25 µl) del campione vengono incubati a temperatura ambiente in piastre da 96 micropozzetti con 200 µl di colorante per almeno 5 minuti, trascorsi i quali viene letta l'assorbanza a 595 nm. Alle

misure dei campioni viene sottratta l'assorbanza di un bianco costituito dal solo reattivo e, per interpolazione lineare, si ricavano le concentrazioni delle soluzioni incognite.

5.1.8 Separazione delle proteine mediante elettroforesi in condizioni denaturanti

L'SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) consente la separazione di proteine in funzione della loro massa molecolare. Come tutte le tecniche elettroforetiche, questa metodica si basa sul fatto che particelle elettricamente cariche migrano a velocità differenti nel gel, quando su quest'ultimo viene applicato un campo elettrico. La corsa elettroforetica è stata effettuata su un supporto costituito da un sottile gel verticale di poliacrilamide (11 X 11cm) usando spaziatori da 1 mm. Il gel di corsa è costituito da due fasi distinte definite *separating gel* (parte bassa) e *stacking gel* (parte alta), polimerizzati a partire dalle soluzioni riportate in tabella 5.1. La concentrazione di acrilammide (Sigma-Aldrich) nello *stacking gel* è pari al 5% e consente alle proteine di concentrarsi all'interfaccia con il *separating gel* prima di essere risolte. La separazione, infatti, avviene quando le proteine attraversano il *separating gel* in cui la concentrazione di acrilammide viene scelta in base al peso molecolare della molecola che si sta indagando (per AtP5CS1 è pari al 10%). I campioni, prima di essere caricati nei pozzetti del gel, vengono diluiti 1:1 con tampone di caricamento (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerolo 20%, SDS 4%, blu di bromofenolo 1 mg ml⁻¹ e 2-β-mercaptoetanololo 10%) in tubi da 0.2 ml e scaldati a 95°C per 10 minuti. Il β-mercaptoetanololo è utilizzato per ridurre gli eventuali ponti disolfuro e per destabilizzarne la struttura terziaria delle proteine, mentre l'SDS, oltre a conferire una carica negativa alle proteine, ne provoca la denaturazione.

	Separating gel 10%	Stacking gel 5%
ddH ₂ O	4.32 ml	1.83 ml
4X gel buffer*	2.25 ml	750 µl
SDS 10 %	90 µl	30 µl
Acrilammide-bis 40% (Sigma-Aldrich)	2.25 ml	375 µl
Ammonio persolfato 10 %	70 µl	30 µl
TEMED	10 µl	7.5 µl

Tabella 5.1. Composizione di *separating* e *stacking gel*. Soluzioni utilizzate per la preparazione di *separating* e *stacking gel* alla concentrazione di acrilammide-bis indicata. *Tampone 4X per *separating gel* = 1.5 M Tris-HCl pH 8.8; tampone 4X per *stacking gel* = 0.5 M Tris-HCl pH 6.8.

A questo punto i campioni possono essere caricati nel gel (fino a 40 μ l, in base alla concentrazione proteica relativa, utilizzando una siringa Hamilton™). La corsa viene eseguita in tampone SDS *tank buffer* (25 mM Tris Base, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8.3) ad un'intensità di corrente pari a 8 mA fin quando il tracciante della corsa (blu di bromofenolo) non raggiunge l'interfaccia tra le due fasi del gel, momento in cui viene aumentata a 10 mA. In queste condizioni la durata della corsa è di circa 4 ore, a seguito delle quali il fronte arriva a circa 1 cm dal fondo del gel. A questo punto il gel può essere trasferito in vaschetta contenente 30 ml di colorante Quick Coomassie® (Protein Ark, Rotherham, Regno Unito) ed incubato in agitazione. Questo permette al colorante di legarsi alle proteine che sono migrate nel gel, consentendone la rilevazione già dopo dieci minuti. Al raggiungimento del risultato desiderato, l'eccesso di colorante viene rimosso ed il gel viene sottoposto ad un paio di lavaggi in ddH₂O e fotografato.

5.1.9 Determinazione del peso molecolare nativo di AtP5CS1 mediante elettroforesi in condizioni non denaturanti

In forma monomerica, l'enzima P5CS1 di *A. thaliana* è caratterizzato da un peso molecolare di circa 77.7 kDa (The Arabidopsis Information Resource, TAIR) ma è probabile che, come è stato dimostrato per la P5CS umana (Zhong et al., 2022), tenda ad organizzarsi in oligomeri. Le condizioni dell'SDS-PAGE provocano la denaturazione delle proteine e dunque permettono la separazione solo della forma monomerica. L'elettroforesi nativa su gel di poliacrilammide è invece una tecnica separativa che, come suggerisce il nome, consente di preservare la conformazione nativa delle proteine ed è dunque importante per discriminare molecole dotate di carica, peso molecolare, dimensioni e forma tridimensionale differenti. Per queste sue caratteristiche, essa può essere utilizzata per stimare il peso molecolare nativo delle proteine senza perturbare la loro struttura quaternaria.

A questo scopo sono stati preparati vari gel (anche in questo caso con orientamento verticale, costituiti dalla fase *separating* più in basso e *stacking* in alto, tabella 5.3) a concentrazioni crescenti di acrilammide (Sigma-Aldrich) in cui, oltre al campione contenente la AtP5CS1 purificata, vengono caricati marcatori di peso molecolare noto. Per compensare le diverse concentrazioni di acrilammide dei vari *separating* gel è stato utilizzato saccarosio (tabella 5.2).

Acrilammide	5%	5.5%	6%	6.5%	7%	7.5%
Saccarosio	3.18%	3.09%	2.99%	2.90%	2.81%	2.72%

Tabella 5.2. Concentrazioni di acrilamide (Sigma-Aldrich) e saccarosio utilizzate per la preparazione dei separating gel.

	SEPARATING						STACKING
	GEL						GEL
	5%	5.5%	6%	6.5%	7%	7.5%	3.12%
ddH₂O	4.12 ml	4.04 ml	3.97 ml	3.91 ml	3.83 ml	3.76 ml	1.23 ml
4x gel buffer	2.25 ml						750 µl
Acrilamide 40%	1.12 ml	1.24 ml	1.35 ml	1.46 ml	1.58 ml	1.69 ml	234 µl
Saccarosio 20%	1.43 ml	1.39 ml	1.35 ml	1.3 ml	1.26 ml	1.22 ml	750 µl
(NH₄)₂S₂O₈ 10%	70 µl						30 µl
TEMED	10 µl						7.5 µl
Vf	9.00 ml						3.00 ml

Tabella 5.3. Reagenti e volumi utilizzati per la preparazione dei gel di poliacrilammide nativi.

Una volta preparato il gel, viene trasferito nell'apparato elettroforetico dove le vaschette all'anodo e al catodo sono riempite con tampone 25mM Tris-glicina pH 8.3. Prima del caricamento dei campioni nei pozzetti viene applicato il campo elettrico all'intensità di 8 mA per 10 minuti, in modo tale da far fluire verso il polo positivo eventuali residui di ammonio persolfato che potrebbero ossidare le proteine. I campioni sono quindi diluiti 1:1 con tampone di caricamento 2x (125 mM Tris HCl pH 6.8, 33% glicerolo, 80 µg ml⁻¹ blu di bromofenolo) e mantenuti in ghiaccio fino al trasferimento nei pozzetti (anche in questo caso fino a 40 µl per ogni campione). Una volta caricati, il campo elettrico viene riattivato all'intensità di 8 mA, che viene poi incrementata a 10 mA quando il tracciante raggiunge l'interfaccia tra le due fasi del gel. Terminata la corsa, il gel viene trasferito in vaschetta contenente soluzione fissativa (40% metanolo, 7% acido acetico) per 1 ora in agitazione a bassa velocità, al fine di evitare che le proteine diffondano. È quindi possibile, previ 5 o 6 lavaggi con ddH₂O, procedere con la colorazione che in questo caso è stata condotta utilizzando il nitrato d'argento. Questa tecnica è dotata di elevata sensibilità e consente di rilevare proteine presenti a bassissime concentrazioni (fino a pochi ng). Dopo i lavaggi, il gel viene trasferito in 40 ml di una soluzione contenente 0.1% AgNO₃ e mantenuto in agitazione per 30 minuti, in modo tale da

consentire alle proteine di legare gli ioni di argento. Dopo i 30 minuti viene effettuato un lavaggio in ddH₂O e si passa alla soluzione di sviluppo (3 % Na₂CO₃, 0.06 % formaldeide) che rende visibile le bande proteiche riducendo gli ioni argento. Raggiunta la colorazione desiderata, si rimuove la soluzione di sviluppo e si incuba il gel con 50 ml di 0.1 % acido acetico per arrestare il processo.

Poiché in condizioni native la velocità di migrazione dipende da dimensioni, forma e carica superficiale a quel determinato valore di pH, non è possibile risalire al PM della proteina di interesse semplicemente confrontando la sua corsa con quella di marcatori purificati. È invece necessario calcolare e confrontare tra loro gli indici di ritenzione (R_f) dei campioni caricati nei gel a concentrazioni crescenti di poliacrilammide.

$$R_f = \frac{\text{Migrazione banda proteica}}{\text{Migrazione del fronte}}$$

Una volta ottenuti questi valori, per ogni campione viene costruito un grafico ponendo in ordinata il log (R_f*100) ed in ascissa le percentuali di acrilammide dei gel analizzati. In questo modo è possibile ottenere una retta la cui pendenza corrisponde al coefficiente di rallentamento (K_r). A questo punto viene creato un secondo grafico che presenta in ordinata l'inverso di K_r ed in ascissa il logaritmo del PM dei vari marcatori, identificando una relazione lineare tra le due grandezze. Dall'equazione della retta interpolante i dati e dalla K_r della AtP5CS1 è possibile risalire al PM nativo di quest'ultima.

5.1.10 Saggio dell'attività *in vitro* della P5CS1 di *Arabidopsis thaliana*

La reazione fisiologica della P5CS1 di *A. thaliana* è stata misurata seguendo l'ossidazione glutammato dipendente del NADPH in presenza di ATP. Aliquote dell'enzima purificato sono state incubate in un volume finale di 200 µl contenente 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM L-glutammato, 2.5 mM ATP, 10 mM MgCl₂ e 0.5 mM NADPH a 30°C fino a 20 minuti. I saggi sono stati allestiti in piastre da 96 micropozzetti ed il calo di assorbanza a 340 nm è stato monitorato a intervalli di 60 secondi contro bianchi nei quali il glutammato è stato omissso, utilizzando il lettore di piastre Ledetect (Labexim, Lengau, Austria). Ogni determinazione è stata ripetuta su almeno tre replicati tecnici differenti e i dati presentati corrispondono alle loro medie ± l'errore standard (SE). Le regressioni lineari e non lineari dei dati sono state calcolate utilizzando il software Microsoft Excel per Windows, versione 365 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Stati Uniti).

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.2.1 Purificazione della P5CS1 di *Arabidopsis thaliana*

L'utilizzo di cellule batteriche come sistema per l'espressione eterologa è una tecnologia ben assodata che consente di ottenere notevoli rese di proteine ricombinanti. Il problema principale di questo processo, però, consiste nel loro isolamento in forma solubile ed attiva. Per questo motivo sono state testate varie linee derivate da *E. coli* e i risultati migliori si sono ottenuti trasformando cellule SoluBL21, particolarmente indicate per l'espressione di proteine eucariotiche in forma solubile, mentre adottando altre linee batteriche la *AtP5CS1* viene quasi completamente sequestrata all'interno dei corpi di inclusione, impedendone l'impiego per la caratterizzazione.

Il vettore pET-24a utilizzato per la trasformazione, oltre a offrire la possibilità di decidere quando indurre la trascrizione del gene di interesse aggiungendo al terreno IPTG, permette di esprimere un tag di 6 istidine fuso alla proteina ricombinante che ne facilita l'isolamento mediante cromatografia ad affinità. Gli estratti grezzi sono stati quindi caricati in colonne monouso His SpinTrap® (GE Healthcare) e l'eluizione *step-wise* è stata condotta sfruttando concentrazioni crescenti di imidazolo. Grazie a questa procedura, le proteine che sono legate alla resina in maniera più blanda vengono rilasciate prima mentre quelle dotate di maggiore affinità per le particelle di nichel vengono eluite con concentrazioni maggiori di imidazolo. Analizzando con saggio di Bradford le frazioni ottenute dalla colonna, si rileva la presenza di un picco proteico (circa $65 \mu\text{g ml}^{-1}$) in corrispondenza a dosi di imidazolo comprese tra 200 e 350 mM (figura 5.2).

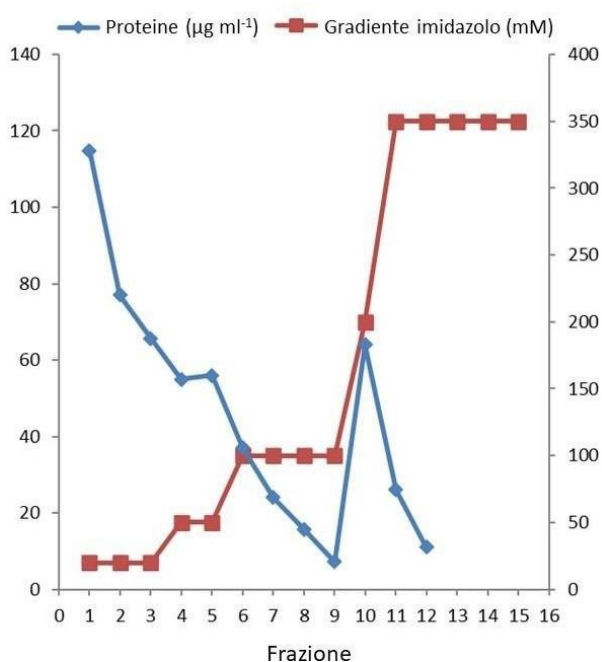


Figura 5.2. Eluizione *AtP5CS1*. Grafico del profilo di eluizione delle proteine dalla colonna cromatografica His SpinTrap®, ottenuto mediante il saggio di Bradford applicato alle frazioni eluite. I rombi (◆) indicano le concentrazioni proteiche quantificate nelle frazioni eluite dalla colonna (asse ordinate principale), i quadrati (■) le concentrazioni di imidazolo utilizzate per l'eluizione (20, 50, 100, 350 mM, asse ordinate secondario).

Per verificare l'effettiva presenza della *AtP5CS* e/o l'eventuale contaminazione da parte di altre proteine di *E. coli* si è proceduto con l'analisi su SDS-PAGE, caricando nel gel i campioni rappresentativi dell'estratto solubile e di alcune frazioni eluite dalla colonna cromatografica, selezionate in base al profilo di eluizione ottenuto. Tenendo in considerazione il 6xHis-tag e la sequenza riconosciuta dalla TEV proteasi presenti nel plasmide di espressione, il PM di ogni monomero di *AtP5CS1* dovrebbe aggirarsi attorno a 79.3 kDa. Come osservabile nella figura 5.3, dove le frecce gialle evidenziano la banda del peso molecolare atteso, la proteina è presente in tutti i campioni analizzati, ad eccezione della frazione 6. In corrispondenza delle frazioni 10, 11 e 12 (eluite con concentrazioni di imidazolo comprese tra 200 e 350 mM), si ottiene la miglior resa di purificazione, nonostante continuino ad essere presenti altre bande di PM differente rispetto a quello di interesse.

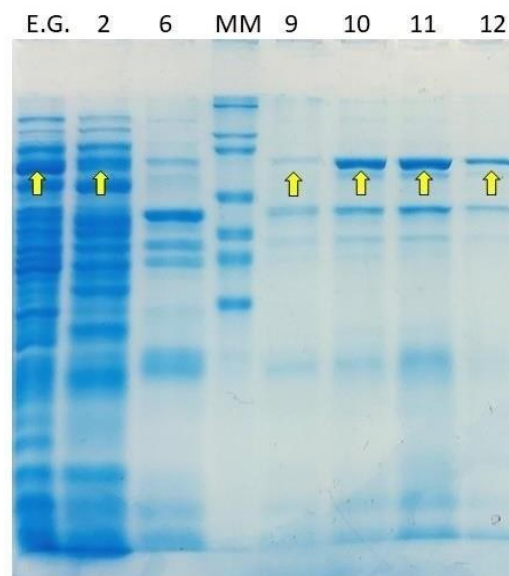


Figura 5.3. Analisi mediante SDS PAGE dell'espressione della proteina *AtP5CS1*.

I campioni caricati sono derivati da cellule di *E. coli* SoluBL21 trasformate con il plasmide pET-24a-*AtP5CS1* indotte per 22 ore con 1 mM imidazolo. La frazione delle proteine solubili è stata purificata mediante cromatografia di affinità. Le frecce evidenziano la banda del peso molecolare atteso corrispondente alla *AtP5CS1*. PM dei marcatori (dal basso verso l'alto): 36, 45, 55, 66, 84, 97, 116, 205 kDa. Abbreviazioni: E.G. = estratto grezzo; MM = marcatori molecolari high range; 6 = eluizione con 100 mM imidazolo; 9 = eluizione con 200 mM imidazolo; 10, 11, 12 = eluizione con 350 mM imidazolo.

5.2.2 Quantificazione proteica

I risultati del saggio di Bradford non sembravano perfettamente coincidenti con l'intensità delle bande visualizzate mediante SDS-PAGE, come se vi fosse una bassa affinità tra la proteina purificata ed il colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250. Con l'intento di chiarire questo aspetto, sono stati caricati su gel volumi scalari sia dell'enzima purificato sia di una soluzione contenente

200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di BSA (figura 5.4). Analizzando la fotografia del gel così ottenuto mediante software Image J (National Institute of Health, Bethesda, Stati Uniti) è possibile ricavare una relazione lineare tra l'area delle bande e la concentrazione proteica. Grazie a questa procedura si è potuto confermare che la concentrazione proteica presente nelle frazioni purificate è maggiore rispetto a quella stimata mediante saggio di Bradford, di un fattore pari a 3.8 che è stato poi applicato alle successive quantificazioni.

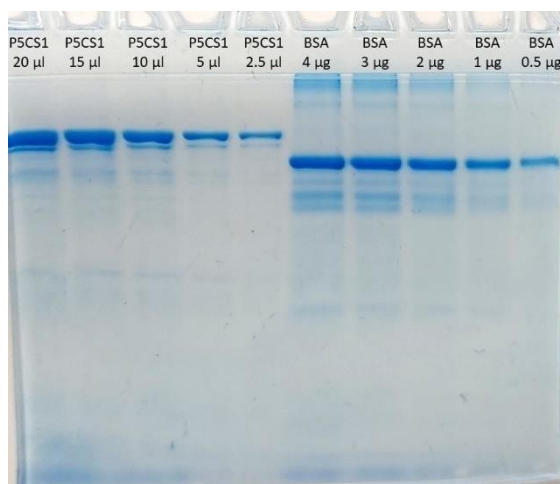


Figura 5.4. Confronto mediante SDS PAGE tra AtP5CS1 e BSA. L'enzima è stato estratto e purificato a partire da cellule di *E. coli* SoluBL21 trasformate con il plasmide pET-24a-AtP5CS1 indotte per 22 ore con 1 mM IPTG. La soluzione di BSA è stata preparata al momento (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

5.2.3 Analisi dell'attività enzimatica

La proteina AtP5CS1 purificata a partire dalle cellule batteriche è stata saggiata per valutarne l'effettiva attività enzimatica *in vitro*, in presenza dei substrati e cofattori necessari. Il saggio, basato sull'analisi del calo di assorbanza a 340 nm dovuto all'ossidazione del NADPH, mostra un'attività specifica piuttosto bassa, tipicamente compresa tra 15 e 20 nkat (mg di proteine)⁻¹. Nonostante il processo di purificazione non sia stato completamente efficiente, l'attività rilevata sembra comunque attribuibile alla sola AtP5CS1, poiché nel controllo negativo (saggio condotto in assenza di glutammato) non si rileva ossidazione del NADPH (figura 5.5).

Oltre a possedere una così ridotta attività specifica, l'enzima risulta soggetto ad un rapido processo di inattivazione (perdita completa di attività nel giro di poche ore, dato non mostrato).

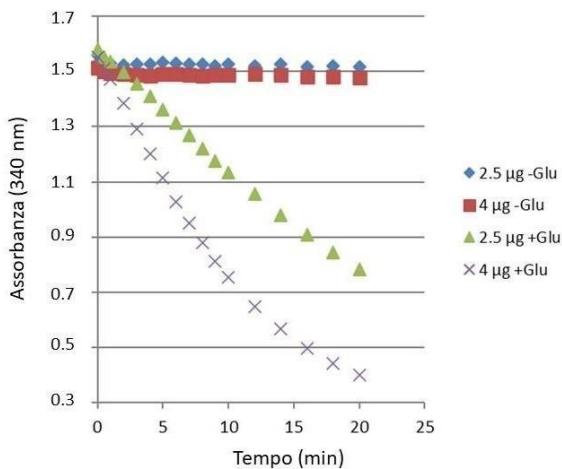


Figura 5.5. Attività *in vitro* della AtP5CS1. Quantità crescenti di AtP5CS1 (2.5 e 4 µg) sono state saggiate in condizioni di reazione standard (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM ATP, 10 mM MgCl₂ e 0.5 mM NADPH) in presenza (+Glu) e assenza (-Glu) di 250 mM glutammato, misurando il calo di assorbanza a 340 nm dovuto all'ossidazione del NADPH.

5.2.4 Proprietà della AtP5CS1

A causa della scarsissima stabilità dell'enzima, per condurre la caratterizzazione biochimica si è reso necessario partire ogni volta da estratti freschi. Oltre che per definire le proprietà cinetiche della AtP5CS1 e l'affinità per i suoi substrati, questo approccio è stato adottato per individuare i meccanismi di regolazione post-traduzionale che in *Arabidopsis* potrebbero attivarsi in seguito ad esposizione a stress.

In primo luogo si è visto come, oltre ai substrati noti (ATP, NADPH, glutammato), sia necessario aggiungere alla reazione MgCl₂ come co-fattore. In assenza di quest'ultimo, infatti, l'attività catalitica non è rilevabile, mentre se addizionato a concentrazioni superiori a 5 mM risulta saturante e consente all'enzima di procedere con la reazione (figura 5.6). Se aggiunto a concentrazioni superiori rispetto alla saturazione, però, il MgCl₂ interferisce con l'enzima inibendolo (dato non presentato).

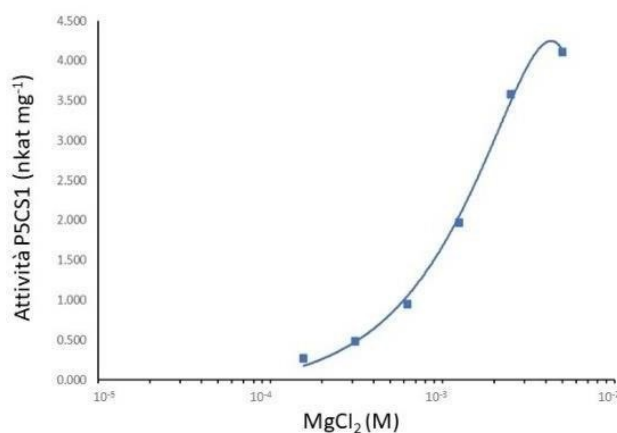


Figura 5.6. L'enzima AtP5CS1 utilizza MgCl₂ come co-fattore. L'enzima è stato saggiato in presenza di quantità crescenti di MgCl₂. Se presente a concentrazioni troppo basse la reazione non procede, mentre a dosi superiori a 5 mM l'enzima risulta saturato dal MgCl₂ e la retta interpolante i dati tende al plateau. I risultati sono espressi in nanokatal per mg di enzima e sono la media di tre repliche ± SE.

Stabilito ciò, le successive analisi sono state condotte includendo ogni volta nella miscela di reazione il MgCl₂ alla dose saturante di 10 mM. Inoltre, l'attività *in vitro* risulta dipendente dalla presenza di NADPH, mentre utilizzando NADH come donatore di elettroni la catalisi non ha luogo (dato non presentato). Partendo da questi presupposti sono state calcolate le costanti catalitiche dell'enzima, riportate in tabella 5.4.

V _{max} L-Glutammato	20.1 ± 0.3 nkat mg ⁻¹
V _{max} ATP	18.3 ± 0.7 nkat mg ⁻¹
V _{max} NADPH	25.3 ± 0.9 nkat mg ⁻¹
K _m L-Glutammato	52.6 ± 1.5 mM
K _m ATP	0.618 ± 0.021 mM
K _m NADPH	0.207 ± 0.014 mM

Tabella 5.4. Proprietà della AtP5CS1 *in vitro*. L'enzima è stato saggiato per determinare l'affinità verso i substrati. I dati riportati sono la media di tre repliche ± SE.

5.2.5 Regolazione post-traduzionale da parte di prodotti finali e intermedi

Successivamente si è cercato di valutare se la AtP5CS1 fosse soggetta a qualche meccanismo di regolazione post-traduzionale. A questo scopo, l'enzima è stato saggiato aggiungendo alla miscela di reazione concentrazioni crescenti di prodotti e intermedi della sintesi di prolina valutando se, rispetto ai controlli non trattati, l'attività subisse particolari variazioni.

A differenza di quanto riportato per l'enzima di riso nel capitolo precedente, l'attività della AtP5CS1 non subisce alcun effetto inibitorio da parte del prodotto finale della via, la prolina. Al contrario, alle concentrazioni testate l'aminoacido sembra indurre un leggero aumento rispetto al controllo non trattato (figura 5.7, grafico A). Analogamente la presenza di P5C, ovvero il prodotto della P5CS derivante da fosforilazione e riduzione del glutammato, stimola leggermente l'attività catalitica (+40 % alla dose di 10 mM), manifestando in questo caso un effetto dose-dipendente (figura 5.7, grafico B). Questi risultati mettono in evidenza il fatto che la AtP5CS1 non sembra essere soggetta a feedback negativo da parte dei prodotti finali della via. Nonostante siano necessarie ulteriori conferme per comprendere se lo stesso tipo di regolazione possa verificarsi anche *in vivo*, questo dato risulta particolarmente rilevante e supporta l'ipotesi del possibile coinvolgimento di AtP5CS1 nell'accumulo di prolina in risposta allo stress.

L'analisi è stata estesa anche nei confronti di NADP⁺ e fosfato inorganico (Pi), ovvero i sottoprodotti derivanti dalle reazioni di riduzione e fosforilazione del glutammato (Figura 5.7, grafici C e D). La

presenza di queste molecole nella miscela di reazione ha un effetto negativo nei confronti della AtP5CS1 la cui attività viene inibita in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione testata. Alle dosi massima, pari a 50 mM per il NADP⁺ e 1M per il Pi, l'enzima risulta quasi completamente inattivato rispetto ai controlli non trattati.

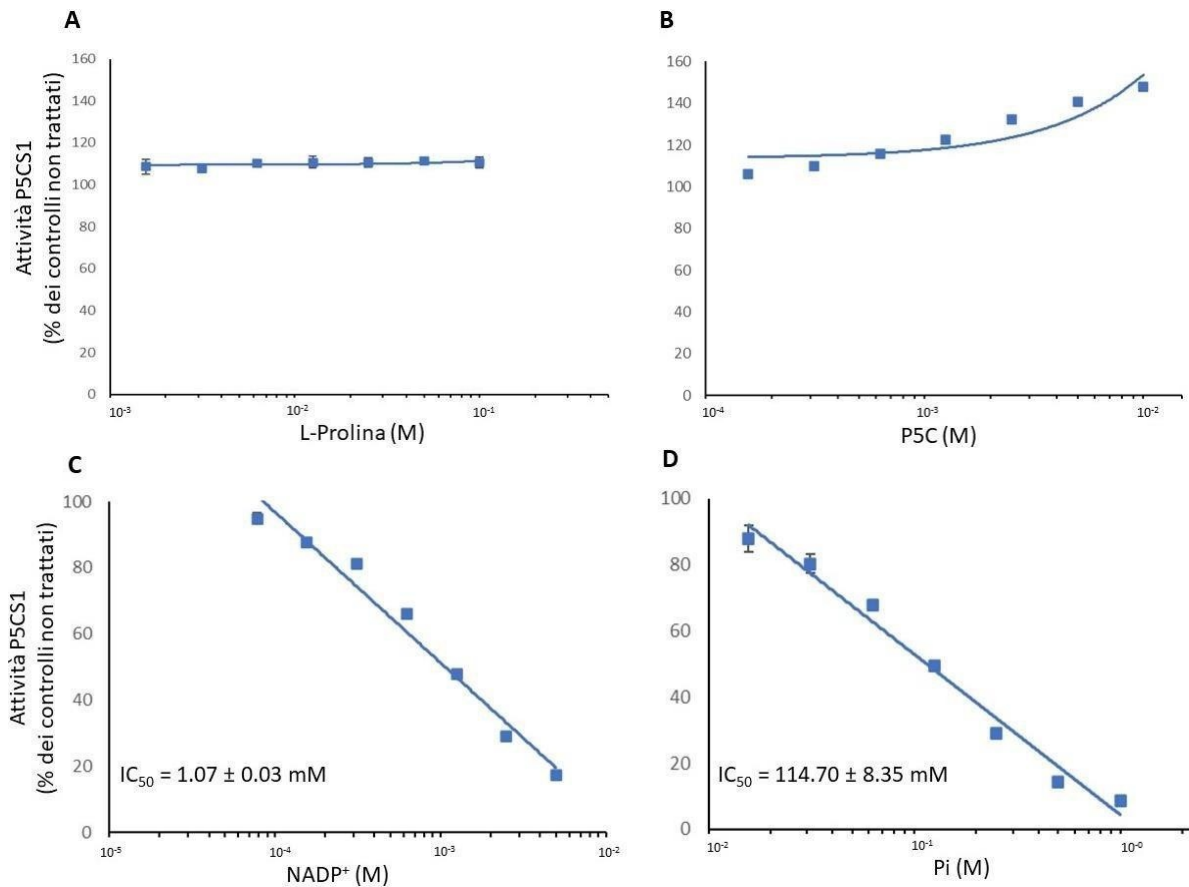


Figura 5.7. Effetto di prodotti finali e intermedi sull'attività *in vitro* della AtP5CS1. L'enzima è stato saggiato in presenza di concentrazioni crescenti di prolina (A), P5C (B), NADP⁺ (D) e fosfato inorganico (D). Alle dosi testate, l'attività non viene influenzata negativamente dai due prodotti della via biosintetica, ma al contrario subisce un leggero aumento. Invece, gli ioni derivanti dall'ossidazione del NADPH e dall'idrolisi dell'ATP inibiscono l'enzima. I risultati sono espressi come percentuale dei controlli non trattati e derivano dalla media di tre repliche \pm SE.

È possibile quindi che *in vivo* l'attività della AtP5CS1 e più in generale l'intera via che porta alla sintesi di prolina dipenda sia dallo stato redox che da quello energetico della cellula, ipotesi supportata dal fatto che anche l'enzima finale della via, la P5CR, subisce inibizione da parte di concentrazioni crescenti di NADP⁺ (Giberti et al., 2014).

5.2.6 Regolazione da parte di sali

Considerando che la sintesi di prolina in *Arabidopsis*, così come anche in altre specie, subisce un aumento in seguito all'esposizione a condizioni iperosmotiche, l'attività della AtP5CS1 è stata analizzata in presenza di concentrazioni crescenti di alcuni sali (figura 5.8).

Fino alla dose di 100 mM, l'enzima procede la sua attività senza subire alcun rallentamento. A concentrazioni più elevate, però, il NaCl (figura 5.8, grafico A) influenza negativamente l'efficienza catalitica, che raggiunge quasi il 50% rispetto al controllo alla dose testata massima di 500 mM. Il KCl agisce invece come potente induttore della AtP5CS1 (figura 5.8, grafico B), provocando quasi il raddoppio dell'attività enzimatica alla dose di 200 mM, oltre la quale anche in questo caso il tasso di reazione diminuisce, restando comunque superiore ai controlli fino alla massima concentrazione testata di 1 M. È plausibile quindi che in situazioni di stress osmotico, quando la concentrazione salina intracellulare incrementa, l'accumulo di prolina sia reso possibile anche dall'aumento dell'attività della P5CS indotto dagli ioni presenti nel citosol.

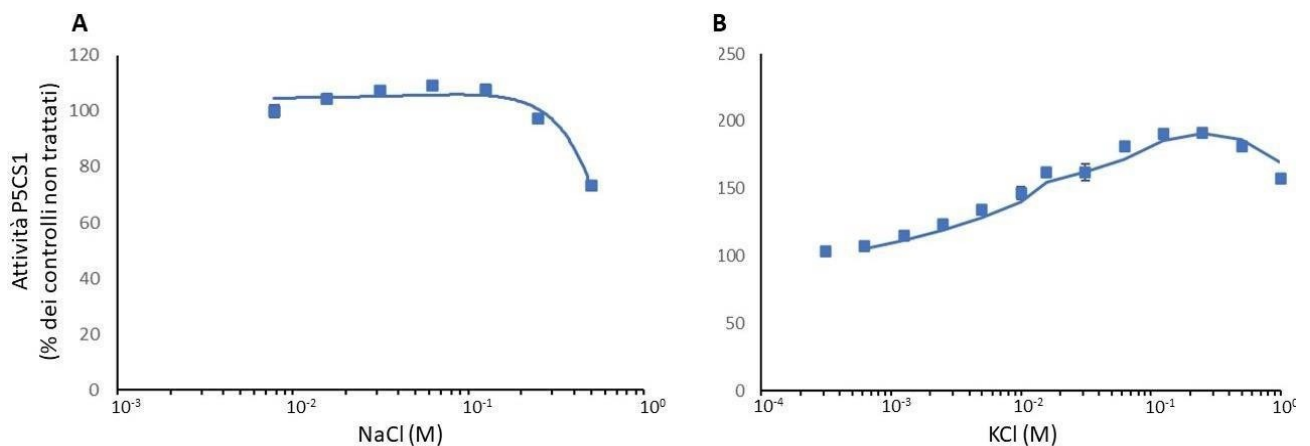


Figura 5.8. Effetto dei sali sull'attività *in vitro* della AtP5CS1. L'enzima è stato saggiato in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl (A) e KCl (B). L'NaCl manifesta un effetto leggermente positivo sull'enzima fino alla dose di 200 mM, oltre la quale l'attività catalitica risulta inibita. Il KCl invece incrementa in maniera molto più marcata l'attività della AtP5CS1, fino a quasi il doppio rispetto ai controlli. I risultati sono espressi come percentuale dei controlli non trattati e derivano dalla media di tre repliche \pm SE.

5.2.7 Regolazione da parte di alcuni composti azotati

In molte piante è stato osservato che la presenza di sali nel terreno è tra i principali fattori che limitano l'assimilazione di azoto. Anche se attraverso meccanismi non del tutto noti, in riso è stato osservato che l'applicazione di prolina esogena durante lo stress osmotico può influenzare questo processo mitigando i danni provocati dalle condizioni di crescita non ideali (Teh et al., 2016). È quindi

plausibile che vi sia una correlazione tra la sintesi di prolina e la disponibilità di azoto. Per questo motivo l'attività della AtP5CS1 è stata saggiata in presenza di concentrazioni crescenti di entrambe le forme inorganiche dell'azoto, ovvero nitrato ed ammonio. Quando si fornisce l'elemento nella sua forma ossidata (figura 5.9, grafico A), l'attività enzimatica rimane pressoché identica ai controlli fino alla dose di 70 mM, dopodiché cala bruscamente. In presenza di ammonio (figura 5.9, grafico B), invece, fino alla dose di 1 M l'enzima risponde positivamente incrementando la sua attività anche del 50%.

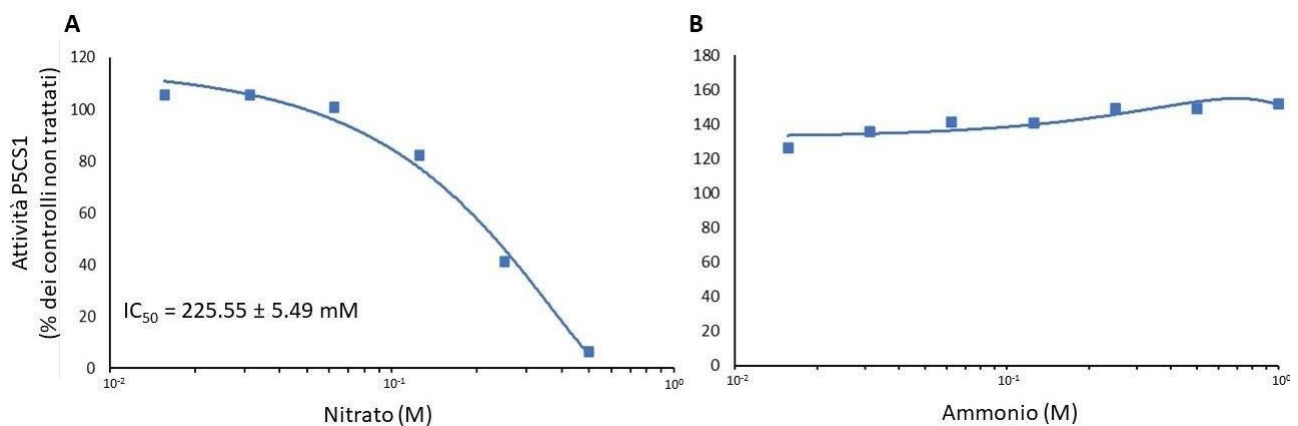


Figura 5.9. Effetto dell'azoto sull'attività della AtP5CS1. L'enzima è stato saggiato in presenza di concentrazioni crescenti di nitrato (A) e ammonio (B). Il nitrato risulta inibente a dosi superiori a 70 mM mentre l'ammonio ha un effetto positivo sulla catalisi, incrementando l'attività dell'enzima fino al 50 % in più dei controlli. I risultati sono espressi come percentuale dei controlli non trattati e derivano dalla media di tre repliche ± SE.

5.2.8 Determinazione del peso molecolare nativo

Al fine di stimare il peso molecolare nativo e comprendere se l'enzima P5CS di *Arabidopsis*, così come la P5CR, tenda ad assemblarsi in oligomeri, la proteina eluita dalla colonna di affinità è stata sottoposta ad un ulteriore passaggio cromatografico di gel filtrazione. Questa tecnica, attraverso il confronto con marcatori di peso molecolare noto, consente di risalire alla massa molecolare incognita della proteina in esame. Nelle frazioni eluite, però, non è stata rilevata alcuna traccia della AtP5CS1.

Per questo motivo si è reso necessario adottare un'altra tecnica, ovvero l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni native. Seguendo questo approccio, i campioni possono essere caricati e visualizzati sul gel senza dover prima subire processi di denaturazione, consentendo quindi di individuare eventuali forme multimeriche dell'enzima. Vi è però un limite, determinato dal fatto che più la proteina tende ad aggregarsi in strutture di grandi dimensioni, più faticherà ad entrare tra le maglie del gel.

È stato comunque individuata, oltre alla forma monomerica, una banda che migra più lentamente all'interno del gel. Confrontando l'indice di ritenzione di quest'ultima con quelli di alcuni marcatori noti (figura 5.10) è stato possibile stimarne il peso molecolare, pari a circa 169 kDa e corrispondente quindi ad una conformazione omodimerica della P5CS.

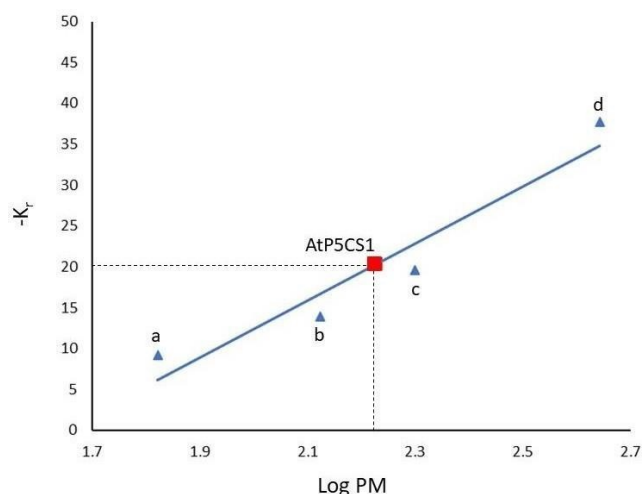


Figura 5.10. Analisi del PM nativo della AtP5CS1. Nel grafico sono riportati gli indici di ritenzione ($-K_r$, in ordinata) della proteina di interesse (AtP5CS1) e di marcatori molecolari (a = BSA monomerica, 66.4 kDa; b = BSA dimerica, 132.8 kDa; c = BSA trimerica, 199.2 kDa; d = ferritina, 440 kDa). In ascissa viene indicato il logaritmo dei vari pesi molecolari. Gli indici di ritenzione sono stati calcolati analizzando la migrazione dei campioni su gel a varia concentrazione di poliacrilammide (5.5, 6, 6.5, 7 e 7.5%). Le immagini dei gel sono state analizzate mediante software Image J (National Institute of Health).

5.3 CONCLUSIONI

L'espressione eterologa dell'enzima AtP5CS1 in cellule SoluBL21 derivate da *E. coli* e la sua successiva purificazione mediante cromatografia di affinità ha consentito l'ottenimento di discrete quantità di enzima in forma attiva.

Attraverso questo approccio è stato possibile condurre le prime analisi relative alla caratterizzazione biochimica della AtP5CS1, gettando le basi per meglio comprendere i contesti in cui è coinvolta. Particolare attenzione è stata posta sullo studio della regolazione post-traduzionale, ovvero sull'eventuale effetto manifestato da prodotti, derivati, intermedi di reazione e sali. Gli esperimenti sono tutt'ora in fase di avanzamento, ma il fatto che concentrazioni crescenti di sali stimolino l'attività enzimatica e che quest'ultima non risulti inibita dall'accumulo di prodotti della via (P5C e prolina) fa

supporre che la *AtP5CS1* possa essere implicata nei processi di risposta allo stress, concordando con quanto era stato osservato dalle analisi di espressione genica.

Sarà comunque necessario condurre ulteriori analisi per confermare che questi meccanismi regolatori possano effettivamente avere implicazioni *in vivo* e, per concludere il quadro, la stessa tipologia di indagine verrà effettuata anche per il secondo isoenzima di *Arabidopsis*, il cui gene è già stato clonato e risulta disponibile nel nostro laboratorio.

6. L'emergente ruolo della prolina nell'instaurarsi e nel funzionamento della simbiosi tra leguminose e *Rhizobium*

Considerando che la popolazione in continua crescita necessita di risorse alimentari sempre maggiori, è importante individuare nuove strategie a basso impatto ambientale per migliorare l'adattamento delle specie vegetali a terreni in cui, per molteplici cause tra cui l'antropizzazione stessa, scarseggia la biodisponibilità dei nutrienti.

Uno dei principali fattori che limitano la produttività delle piante consiste nella carenza di azoto. Tutti i processi vitali nelle piante, infatti, sono associati alle proteine, agli acidi nucleici e alle clorofille, per le quali l'azoto rappresenta un costituente essenziale. Inoltre, un adeguato apporto di azoto è necessario per stimolare la corretta crescita radicale, migliorare la qualità dei frutti, aumentare le dimensioni dei vegetali a foglia, incrementare il contenuto proteico delle colture foraggere e migliorare l'assimilazione e l'utilizzazione di altri nutrienti. Di conseguenza, al fine di garantire maggiori rese dei raccolti, è necessario che questo elemento sia biodisponibile per la pianta (Leghari et al., 2016).

Le leguminose sono una particolare famiglia di vegetali che, per far fronte a situazioni di scarsa biodisponibilità di azoto, ha evoluto un sistema di interazione simbiotica con i batteri del genere *Rhizobium* in grado di fissare l'azoto atmosferico molecolare e fornirlo come nutriente alla pianta. Affinché avvenga il riconoscimento tra piante e batteri, i legumi rilasciano particolari flavonoidi che inducono nei rizobi la sintesi di alcuni lipochito-oligosaccaridi, chiamati fattori Nod (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Questi vengono secreti all'esterno dove interagiscono con specifici recettori espressi dalle cellule radicali inducendo nella pianta una serie di risposte necessarie per prepararla ad accogliere il simbiote. Nello specifico, assieme ad altri fattori, i Nod favoriscono la formazione del filamento di infezione, ovvero una sorta di canale che permette ai batteri di penetrare nel tessuto corticale e raggiungere le cellule bersaglio. Giunti a questo punto, le cellule vegetali della corteccia interna iniziano a dividersi per dare origine ad una struttura definita nodulo, all'interno del quale uno o più rizobi si trovano circondati da una membrana di derivazione dell'ospite, definita peribatteroidale, che limita il simbiosoma, ovvero una sorta di organello all'interno del quale i batteri possono maturare in batteroidi. Solo a questo punto i microorganismi sono in grado di fissare l'azoto atmosferico grazie all'espressione del complesso della nitrogenasi e fornirlo all'ospite sottoforma di ammonio. Per fare ciò, l'ammonio sfrutta specifici canali espressi sulla membrana peribatteroidale per raggiungere la cellula vegetale, dove viene inizialmente assimilato attraverso

la sintesi di asparagina e glutammina (Jones et al., 2007). In cambio, per supportare l'attività nitrogenasica ed il sostentamento dei batteroidi, la pianta ospite fornisce carbonio fissato ed altre risorse energetiche (Wang et al., 2018).

È stato osservato che i livelli di alcuni enzimi coinvolti nella sintesi e nell'utilizzo di prolina aumentano nei noduli di alcune leguminose durante la simbiosi (Kohl et al., 1988). La prolina potrebbe fungere da substrato per il trasferimento di energia dall'ospite al simbionte (Kohl et al., 1988), giocare un ruolo essenziale per supportare la simbiosi durante situazioni di stress (Kohl et al., 1991) oppure favorire la formazione di noduli e il differenziamento dei batteroidi (diCenzo et al., 2015; Jiménez-Zurdo et al., 1997). Inoltre, in *M. truncatula* è stata scoperta una terza isoforma di P5CS, enzima che catalizza lo step anabolico limitante per la sintesi di prolina (Kim & Nam, 2013), la quale potrebbe rappresentare una variante legume-specifica implicata nel processo simbiotico (Kim & Nam, 2013). Al giorno d'oggi, però, nessuna di queste teorie è stata provata in maniera definitiva. Con l'intento di riassumere i risultati sin qui ottenuti in modo che possano rappresentare il punto di partenza per la pianificazione di nuovi esperimenti atti a fare luce sui meccanismi molecolari che stanno alla loro base, le evidenze sperimentali descritte in letteratura sono state raccolte e discusse all'interno della seguente mini-review.



The Emerging Role of Proline in the Establishment and Functioning of Legume-*Rhizobium* Symbiosis

Giuseppe Sabbioni and Giuseppe Forlani*

Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Department of Life Science and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy

High levels of some enzymes involved in proline synthesis and utilization were early found in soybean nodules, and rhizobial knockout mutants were shown to be defective in inducing nodulation and/or fixing nitrogen, leading to postulate that this amino acid may represent a main substrate for energy transfer from the plant to the symbiont. However, inconsistent results were reported in other species, and several studies suggested that proline metabolism may play an essential role in the legume-*Rhizobium* symbiosis only under stress. Different mechanisms have been hypothesized to explain the beneficial effects of proline on nodule formation and bacteroid differentiation, yet none of them has been conclusively proven. Here, we summarize these findings, with special emphasis on the occurrence of a legume-specific isoform of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, the enzyme that catalyses the rate-limiting step in proline synthesis. Data are discussed in view of recent results connecting the regulation of both, the onset of nodulation and proline metabolism, to the redox status of the cell. Full comprehension of these aspects could open new perspectives to improve the adaptation of legumes to environmental stress.

Keywords: bacteroid differentiation, nitrogen fixation, nodule, proline, P5C synthetase, P5C reductase, proline dehydrogenase

OPEN ACCESS

Edited by:

Jianping Wang,
University of Florida, United States

Reviewed by:

Ágnes Szepesi,
University of Szeged, Hungary
Ziliang Luo,
University of Florida, United States

*Correspondence:

Giuseppe Forlani
fg@unife.it

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Symbiotic Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 03 March 2022

Accepted: 10 May 2022

Published: 27 May 2022

Citation:

Sabbioni G and Forlani G (2022) The
Emerging Role of Proline in the
Establishment and Functioning of
Legume-*Rhizobium* Symbiosis.
Front. Plant Sci. 13:888769.
doi: 10.3389/fpls.2022.888769

PROLINE SYNTHESIS IN LEGUME NODULES AS A POSSIBLE MECHANISM FOR ENERGY TRANSFER TO THE BACTERIODS

Legume-*Rhizobium* symbiosis is a mutually beneficial association between higher plants and microbes, during which biological nitrogen fixation occurs in the nodule, a specialized accessory legume organ usually formed on roots. In mature nodules, rhizobia differentiate into bacteroids and convert N_2 into ammonia, essential for plant growth. In return, bacteria obtain carbon and energy sources from the plant (Wang et al., 2018). For nitrogen transport, legumes of tropical origin use ureides that derive from purine oxidation. Sustained purine production requires increased $NADP^+$ availability, which might be obtained through increased proline biosynthesis. In the pioneeristic work of Kohl et al. (1988), the levels, properties, and subcellular location of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) reductase (EC 1.5.1.2, P5CR) and proline dehydrogenase (EC 1.5.5.2, ProDH), the enzymes that catalyze the last step in proline synthesis and the first step in proline catabolism, respectively (Figure 1), were

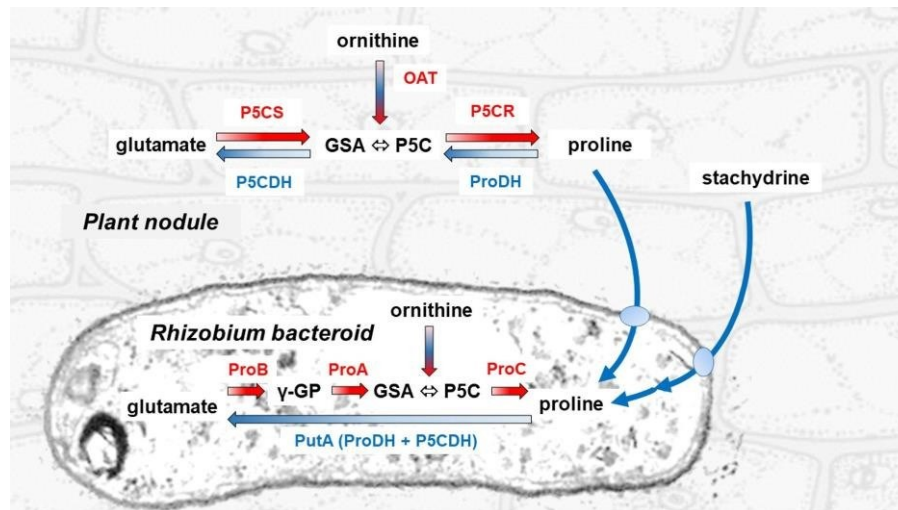


FIGURE 1 | Pathways for proline synthesis and catabolism in the legume plant and the rhizobial symbiont. The synthesis of proline proceeds in the cytoplasm of the plant cell through the sequential action of a bifunctional P5C synthetase (P5CS) that reduces glutamate to glutamate semialdehyde (GSA, which spontaneously cyclizes to P5C), and of a P5C reductase (P5CR) that reduces the latter to proline. In the bacteroid, the same initial reaction is catalyzed by two distinct enzymes, a γ -glutamyl-kinase (ProB) and a glutamyl-phosphate reductase (ProA). Conversely, proline is oxidized back to glutamate in the plant mitochondrion through two steps, catalyzed by a proline dehydrogenase (ProDH) that feeds electrons directly to the respiratory chain, and a P5C dehydrogenase (P5CDH). In the bacterial symbiont, these reactions are mediated by a single proline oxidase (PutA) bearing both catalytic domains of ProDH and P5CDH. GSA/P5C is generated also during arginine catabolism by means of an ornithine- δ -amino transferase (OAT). Utilization of stachydrine, also known as proline betaine, a compatible osmolyte that is accumulated in several legumes under stress, proceeds in the rhizobium by means of some proline-releasing enzymatic activities, whose genes are grouped on the Sym plasmid (Goldmann et al., 1994).

investigated in nodules of soybean (*Glycine max*), an ureide exporting species. P5CR levels were found 20-fold higher in nodule plant cytosol than in leaf extracts, and about 4-fold higher than in nodules of pea, an amide-exporting species. NADH-dependent P5CR activity was insensitive to proline up to 4 mM, whereas it was inhibited by 60% in the presence of 1 mM NADP⁺. These findings led these authors to hypothesize a main role for P5CR in regenerating NADP⁺ for the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) to support purine biosynthesis.

High levels of ProDH were also detected in soybean nodules, only 2% of which were present in mitochondria-enriched fractions. Therefore, it was hypothesized that at least part of the proline synthesized in the plant is transferred to the bacteroids, where it is used as an energy source. A susceptibility to feed-back inhibition by proline only at concentrations exceeding 5 mM, and a reduced activity in the presence of NADP⁺ concentrations in the range 10⁻⁵–10⁻³ M, were later shown as common traits of plant P5CRs (Giberti et al., 2014; Forlani et al., 2015; Ruszkowski et al., 2015). Moreover, when P5CR and OPPP activity levels were measured in extracts from nodules of eight different legumes, no differences were found between ureide and amide-exporting species, and the initial hypothesis of a role of P5CR in sustaining ureide synthesis was not supported (Kohl et al., 1990). High activities of both P5CR and OPPP were found anyway in nodules of all species, and substantial levels of ProDH were also detected. ProDH activity in bacteroids was high enough during the soybean growing season to supply a significant fraction of the energy

required for nitrogen fixation, and even higher levels were found in other legumes, such as *Phaseolus vulgaris* (Kohl et al., 1990). Interestingly, mean ProDH activity levels in ureide-exporting legumes were about 3-fold higher than in amide-exporting species. Being ProDH subjected to a strict control at the transcriptional level by the intracellular concentration of free proline (Liu et al., 2017), this could imply that lower amounts of proline are transferred to the symbionts in legumes of temperate climate origin. However, this aspect was not further considered.

When the properties of P5CR from soybean and *Bradyrhizobium japonicum* were compared, the rhizobial enzyme showed a 6-fold higher affinity for P5C and a 2–3-fold higher specific activity (Chilson et al., 1992). An active proline synthesis in bacteroids would be inconsistent with its role as a possible energy source, leading to a wasteful futile cycle. Contrary to the plant enzyme, *B. japonicum* P5CR was insensitive to NADP⁺ at 0.29 mM, and 50%-inhibited by 20 mM proline, with a K_I value for proline (1.8 mM) similar to the concentration of the amino acid in bacteroids (Chilson et al., 1992). However, these features were evaluated using only NADH as the electron donor, while increasing evidence has been found supporting a preferential use *in vivo* of NADPH in both higher plants (Giberti et al., 2014) and bacteria (Petrollino and Forlani, 2012). The occurrence of post-translational regulative mechanisms modulating P5CR in bacteroids, which may allow utilization of exogenous proline as an energy source, therefore, cannot be ruled out.

EFFECT OF DISRUPTION OF THE BACTERIAL GENES CODING FOR P5CR AND ProDH ON THE ESTABLISHMENT OF LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS

To shed more light on the role of proline metabolism in bacteroids, some mutants impaired in either proline synthesis or utilization were characterized. A *B. japonicum* strain, in which the gene coding for P5CR had been disrupted, was found to be a strict proline auxotroph (King et al., 2000). Therefore, in this species, proline synthesis cannot be accomplished through alternative biosynthetic routes described in other bacteria (Fichman et al., 2015). This strain was unable to elicit nitrogen fixing nodules on soybean: only undeveloped nodules were evident that contained few viable bacteria, without detectable amounts of leghemoglobin (King et al., 2000). These results clearly pointed out that during the establishment of the symbiosis the plant is unable to provide the symbiont with amounts of proline high enough to satisfy its auxotrophic requirement. However, the possibility that a significant proline transfer to the bacteroids takes place at a later stage, when the nodule has completely developed, cannot be excluded.

A *Sinorhizobium meliloti* p5cr strain, in which a gene for ornithine cyclodeaminase had also been disrupted to prevent proline synthesis from arginine, showed a different phenotype depending on the host plant. On white sweet clover (*Melilotus alba*), nodulation was slightly delayed, but the final number of nodules *per* plant was similar to that found with the wild-type strain. However, nodules failed to fix nitrogen and showed the presence of few differentiated bacteroids compared to wild-type-filled nodules. On alfalfa (*Medicago sativa*), the p5cr strain was on the contrary able to induce fully functional nodules, although a decrease in nodule mass and, consequently, in nitrogen fixing rate was found (Dicenzo et al., 2015). The differential effect was interpreted as due to stachydrine (proline betaine) production in alfalfa, which can be converted to proline by *S. meliloti*. Whatever the exact mechanism, these results supported a requirement for proline prototrophy during bacteroid differentiation. Conversely, these data also suggested that -once bacteroid differentiation occurred- active proline synthesis in the bacterial symbiont is dispensable.

Concerning proline catabolism, a cowpea *Rhizobium* strain was found able to use the amino acid as the only carbon source. This notwithstanding, neither bacteroids isolated from *Vigna unguiculata* were capable of proline uptake, nor detectable proline levels were found in snakebean nodule cytosol (Glenn et al., 1991). When a group of *Rhizobium leguminosarum* mutants impaired in either proline synthesis or catabolism were investigated, mutations had a negligible impact on nitrogenase activity, and proline levels in the nodule plant cytosol and in bacteroids did not support proline transfer between the symbionts (Chien et al., 1991). Following insertional mutagenesis and *ProDH* disruption, a strain of *S. meliloti* was shown unable to use either proline or ornithine as the sole nitrogen source. Once again, when

the nodulation of this mutant on alfalfa was considered, no obvious defects were found, and the nitrogen fixation rate was unaffected, although full nodulation was slightly delayed and the number of nodule *per* plant reduced. More pronounced effects were evident in competition assays: after 1:1 inoculation with the wild-type parental, only 6% of nodules were found occupied by the mutant strain (Jiménez-Zurdo et al., 1995). Similar results were obtained with pigeonpea plants colonized by *Rhizobium* sp. (*Cajanus*), although in this case the prodh strain was unable to induce functional nodules (Sharma and Yadav, 2012). Besides suggesting the occurrence of a significant variability among strains as to this point, these results demonstrated not only that proline is not *the sole* energy-yielding compound transferred to the bacteroid, but also that proline catabolism in rhizobia may influence the efficiency of nitrogen fixation. Consistently, another gene involved in the catabolism of stachydrine, whose utilization proceeds through proline, was found to be required for efficient nodulation (Goldmann et al., 1994).

PROTECTIVE ROLE OF PROLINE IN NODULES UNDER HYPEROSMOTIC STRESS

Because of the well-established role of proline (Furlan et al., 2020) and stachydrine (Trinchant et al., 2004) in the legume response to osmotic stress, numerous studies focused on the possibility that proline transfer from the plant host to the rhizobial symbiont may be functional to preserve nodule efficiency under drought or excess salt. Osmotic stress impairs both, the photosynthesis and the photosynthate transport to the nodules, thereby decreasing nitrogen fixation up to 90%. In soybean, proline levels in nodules from osmotically stressed plants were found 3–4-fold higher than in unstressed controls, despite a 2–4-fold increase of ProDH activity (Kohl et al., 1991). The exogenous supply of proline to intact soybean plants increased its intracellular concentration in bacteroids from 0.45 to 3.6 mM, causing in turn an increase of ProDH activity that was highly correlated with the resulting rate of acetylene reduction. Similar effects were also induced by exogenous succinate. However, proline application did not rescue stemgirdled plants from loss of nitrogenase activity, whereas succinate application did, suggesting a phloematic transport of proline (Zhu et al., 1992). Such evidence led these authors to hypothesize that, although dicarboxylates are the main compounds used for energy transfer from the plant to the bacteroids, proline does contribute, and may play a key role under environmental stress and the subsequent recovery (Kohl et al., 1994). Consistently, when nitrogenase was measured in bacteroids isolated from soybean, enzyme activity supported by proline was 8-fold higher in bacteroids from drought-stressed nodules than in bacteroids from controls, while no effect was found with the succinate-dependent activity. Results also showed an increase in the rate of proline uptake

relative to a minor decrease in malate uptake into stressed symbiosomes (Pedersen et al., 1996).

To evaluate whether this may have an agronomic significance, soybean plants were inoculated with either a wild-type or a prodh strain of *B. japonicum*, and seed production was measured following the imposition of water stress conditions. When the stress was mild, plants inoculated with the mutant strain suffered twice the percentage yield decrease than plants inoculated with bacteria able to catabolize proline, whereas no difference was found under severe drought (Straub et al., 1997). The positive impact on nitrogen fixation (and on seed yield in turn) of proline catabolism under mild water stress was further confirmed on soybean plants grown in the absence of alternative sources of nitrogen (Curtis et al., 2004). However, when *ProDH* expression was followed during the symbiotic interaction between *Rhizobium meliloti* and alfalfa plants, transcription was induced by root exudates and during nodule formation, but not in differentiated nitrogen-fixing bacteroids. In this case, a prodh strain showed strongly reduced colonization efficiency (Jiménez-Zurdo et al., 1997).

Conversely, stress-induced production of proline and stachydrine in the plant host was found to be paralleled by an increase of proline levels in bacteroids. Exposure of nodulated alfalfa plants to 0.2 M NaCl for 4 weeks strongly reduced stachydrine turnover, leading to a 4–10-fold increase of its levels in plant tissues. As a consequence, stachydrine and proline concentrations in salt-stressed bacteroids reached 7.4 and 11.8 mM, respectively, up to 15-fold the levels in untreated controls. Ultrastructural analysis showed a large peribacteroid space in salt-stressed nodules, suggesting an increased turgor pressure inside the symbiosomes (Trinchant et al., 2004). A possible and consequent induction of proline catabolism in bacteroids was not investigated.

Transgenic *Medicago truncatula* plants overexpressing P5C synthetase (P5CS), the bifunctional enzyme catalyzing the first and limiting step in proline synthesis (Figure 1), showed higher proline levels in roots, leaves, and nodules. When subjected to osmotic stress, nitrogen fixation by *S. meliloti* was significantly less affected than in untransformed plants. A strong *ProDH* upregulation was found in nodules of both wild-type and transgenic salt-stressed plants (Verdoy et al., 2006). These authors also hypothesized a different mechanism by which increased proline availability may benefit nodule functioning, i.e., through enhanced production of proline-rich proteins, which may provide mechanical support for the cell under stress, and whose transcripts accumulate in bean nodules as a response to drought and excess salt (Verdoy et al., 2004). Analogous results were reported in the case of *M. truncatula* plants constitutively expressing a gene for arginine decarboxylase, an enzyme involved in polyamine synthesis (Hidalgo-Castellanos et al., 2019). Following the exposure to salt stress, transgenic plants showed higher nitrogenase activity and nodule number and biomass. Interestingly, proline was found to increase in nodules of transformed plants but not in untransformed controls, which accumulated glutamate and γ -aminobutyric acid instead (Hidalgo-Castellanos et al., 2019).

HIGH PROLINE LEVELS IN LEGUMES AS DETERMINED BY A SPECIFIC FORM OF P5CS

When a salt-resistant and a salt-sensitive alfalfa cultivar were inoculated with a salt-sensitive and a salt-resistant *S. meliloti* strain in all four possible combinations, amino acid composition of nodules under salt stress was found to depend mainly on the rhizobial strain. In all plants, total free amino acid concentration was much higher in nodules than in roots and leaves, where NaCl treatment was the major driving factor for amino acid accumulation. In both salt-stressed and unstressed nodules, the salt-tolerant rhizobial strain caused a significant increase of most amino acids of the glutamate family, comprising proline, whereas the salt-sensitive strain triggered a remarkable increase of amino acids of the aspartate family (Bertrand et al., 2016). Since amino acids of the glutamate family play a main role in nitrogen assimilation, osmoprotection, and energy conservation (Okumoto et al., 2016), the superior performance under stress of the symbiosis between a salt-tolerant plant and a salt-tolerant symbiont may depend, at least in part, on their specific accumulation.

A major achievement toward a better understanding of the role of proline in the legume-rhizobium symbiosis was made with the discovery of a legume-specific form of P5CS (Kim and Nam, 2013). The occurrence of two P5CS isogenes has in fact been reported in several plant species, and phylogenetic analyses demonstrated that gene duplication occurred independently in several taxonomic groups (Turchetto-Zolet et al., 2009; Rai and Penna, 2013). These paralogs, named P5CS1 and P5CS2, show non-overlapping roles, with varying temporal and spatial expression patterns. Overall, P5CS1 has been identified as the major contributor to stress-induced proline accumulation, whereas P5CS2 plays a pivotal role in embryo development and growth (Fichman et al., 2015). In *M. truncatula*, a third isozyme was found, showing an extra amino-terminal segment (Figure 2). Under salt excess and drought, *MtP5CS3* is expressed in shoots and nodulating roots at levels higher than the other isogenes, and a loss-of-function *p5cs3* mutant accumulated less proline, formed fewer nodules, and showed lower nitrogen fixation rates than the wild-type (Kim and Nam, 2013).

The occurrence of a third P5CS isoform has not been reported in other legumes. However, a homology search based on the deduced sequence of the extra 43 amino acids segment of *MtP5CS3* showed the presence of a similar system in other species, such as *Trifolium pratense*, *Cicer arietinum*, and *Caragana microphylla*. A maximum likelihood tree reconstruction suggests that this legume-specific form derives from a duplication of P5CS2 (Figure 2). It would be interesting to assess whether *MtP5CS3* is also subjected to peculiar post-translational regulation mechanisms, such as a lack of feed-back inhibition by proline, yet this aspect has been poorly investigated to date (Sabbioni et al., 2021). Anyway, its emergence seems to imply that a higher demand for proline is connected with symbiotic nitrogen fixation, and further strengthens the possibility that high proline levels are needed for an optimal functioning of the nodule under stress.

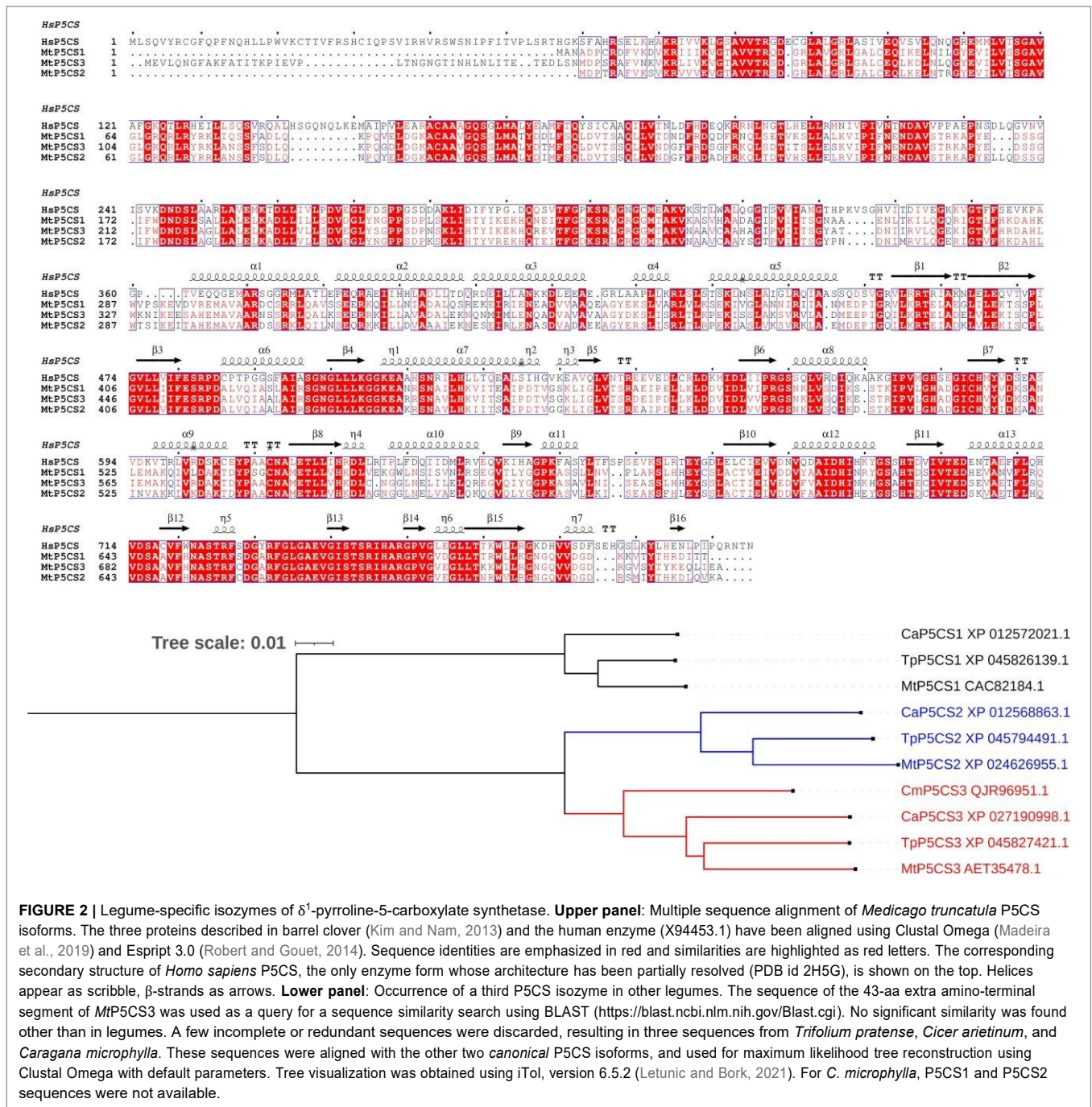


FIGURE 2 | Legume-specific isoforms of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase. **Upper panel:** Multiple sequence alignment of *Medicago truncatula* P5CS isoforms. The three proteins described in barrel clover (Kim and Nam, 2013) and the human enzyme (X94453.1) have been aligned using Clustal Omega (Madeira et al., 2019) and Esript 3.0 (Robert and Gouet, 2014). Sequence identities are emphasized in red and similarities are highlighted as red letters. The corresponding secondary structure of *Homo sapiens* P5CS, the only enzyme form whose architecture has been partially resolved (PDB id 2H5G), is shown on the top. Helices appear as scribble, β -strands as arrows. **Lower panel:** Occurrence of a third P5CS isozyme in other legumes. The sequence of the 43-aa extra amino-terminal segment of *MtP5CS3* was used as a query for a sequence similarity search using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). No significant similarity was found other than in legumes. A few incomplete or redundant sequences were discarded, resulting in three sequences from *Trifolium pratense*, *Cicer arietinum*, and *Caragana microphylla*. These sequences were aligned with the other two canonical P5CS isoforms, and used for maximum likelihood tree reconstruction using Clustal Omega with default parameters. Tree visualization was obtained using iTol, version 6.5.2 (Letunic and Bork, 2021). For *C. microphylla*, P5CS1 and P5CS2 sequences were not available.

POSSIBLE ROLES FOR PROLINE IN THE ESTABLISHMENT OF THE LEGUME-RHIZOBIUM SYMBIOSIS BESIDES AS AN ENERGY SOURCE

Some inconsistent results in legumes other than soybean questioned the possibility that proline may represent an essential compound for energy transfer from the plant to the rhizobial symbiont. Other roles have been hypothesized to explain the

beneficial effect of an active proline metabolism on nodule formation and nitrogen fixation. Among them, the attainment of high protein synthesis rate during bacteroid differentiation, the synthesis of proline-rich proteins to stabilize the cell wall under osmotic stress conditions, an osmotic stabilization of the nodule environment under (mild) stress, or the provision of a high-yield energy source useful as microenvironmental stress substrate. A preferential use of proline as high-yield energy source has found confirmation in some other systems, ranging from inflammation and tumorigenesis (Phang et al.,

2008) to the earliest or most expensive stages of insect flight (Bertazzini et al., 2010).

Another intriguing possibility comes from recent advances in our comprehension of the connection between both, the nodulation process and proline metabolism, and the redox status of the cell. Nodule metabolism continuously generates reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, which during evolution have been recruited as versatile signaling molecules. An increasing body of evidence shows that the balance between such reactive species and antioxidants systems regulates the onset of symbiosis and nodule development through controlling the redox status in legume nodules (Damiani et al., 2016; Matamoros and Becana, 2020). Although the possibility that proline may act as ROS scavenger has not been confirmed (Forlani et al., 2019), several recent studies showed that the interconversion of glutamate and proline may regulate the redox balance and the energy status of the cell in connection with other redox shuttles (Zheng et al., 2021). Accordingly, most enzymes in proline metabolism influence, and are regulated by, the intracellular NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio (Giberti et al., 2014; Sabbioni et al., 2021). Therefore, active proline metabolism in nodules could be involved in generating ROS and/or maintaining redox levels required for a proper establishment of the symbiosis.

REFERENCES

- Bertazzini, M., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maistrello, L., and Forlani, G. (2010). Amino acid content and nectar choice by forager honeybees (*Apis mellifera* L.). *Amino Acids* 39, 315–318. doi: 10.1007/s00726-010-0474-x
- Bertrand, A., Bipfubusa, M., Dhont, C., Chalifour, F. P., Drouin, P., and Beauchamp, C. J. (2016). Rhizobial strains exert a major effect on the amino acid composition of alfalfa nodules under NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.* 108, 344–352. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.08.002
- Chien, C.-T., Rupp, R., Beck, S., and Orser, C. S. (1991). Proline auxotrophic and catabolic mutants of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae strain C1204b are unaffected in nitrogen fixation*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 299–302. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04365.x
- Chilson, O. P., Kelly-Chilson, A. E., and Schneider, J. D. (1992). Pyrroline-5-carboxylate reductase in soybean nodules: comparison of the enzymes in host cytosol, *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids, and cultures. *Plant Physiol.* 99, 119–123. doi: 10.1104/pp.99.1.119
- Curtis, J., Shearer, G., and Kohl, D. H. (2004). Bacteroid proline catabolism affects N₂ fixation rate of drought-stressed soybeans. *Plant Physiol.* 136, 3313–3318. doi: 10.1104/pp.104.044024
- Damiani, I., Pauly, N., Puppo, A., Brouquisse, R., and Boscari, A. (2016). Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the legume–rhizobium symbiotic interaction. *Front. Plant Sci.* 7:454. doi: 10.3389/fpls.2016.00454
- Dicenzo, G. C., Zamani, M., Cowie, A., and Finan, T. M. (2015). Proline auxotrophy in *Sinorhizobium meliloti* results in a plant-specific symbiotic phenotype. *Microbiology* 161, 2341–2351. doi: 10.1099/mic.0.000182
- Fichman, Y., Gerdes, S. Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., and Csonka, L. N. (2015). Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 1065–1099. doi: 10.1111/brv.12146
- Forlani, G., Bertazzini, M., Zarattini, M., Funck, D., Ruzskowski, M., and Nocek, B. (2015). Functional properties and structural characterization of rice δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front. Plant Sci.* 6:565. doi: 10.3389/fpls.2015.00565
- Forlani, G., Trovato, M., Funck, D., and Signorelli, S. (2019). “Regulation of proline accumulation and its molecular and physiological functions in stress defence,” in *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*. eds. M. A. Hossain, V. Kumar, D. J. Burritt, M. Fujita and P. S. A. Mäkelä (Cham: Springer International Publishing), 73–97.
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Giordano, W., Castro, S., and Becker, D. F. (2020). Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant Physiol. Biochem.* 151, 566–578. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.04.010
- Giberti, S., Funck, D., and Forlani, G. (2014). δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol.* 202, 911–919. doi: 10.1111/nph.12701
- Glenn, A. R., Holliday, S., and Dilworth, M. J. (1991). The transport and catabolism of L-proline by cowpea *Rhizobium* NGR 234. *FEMS Microbiol. Lett.* 82, 307–312. doi: 10.1016/0378-1097(91)90279-J
- Goldmann, A., Lecoœur, L., Message, B., Delarue, M., Schoonejans, E., and Tepfer, D. (1994). Symbiotic plasmid genes essential to the catabolism of proline betaine, or stachydrine, are also required for efficient nodulation by *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 305–311. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06655.x
- Hidalgo-Castellanos, J., Duque, A. S., Burgueño, A., Herrera-Cervera, J. A., Fevereço, P., and López-Gómez, M. (2019). Overexpression of the arginine decarboxylase gene promotes the symbiotic interaction *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* and induces the accumulation of proline and spermine in nodules under salt stress conditions. *J. Plant Physiol.* 241:153034. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153034
- Jiménez-Zurdo, J. I., García-Rodríguez, F. M., and Toro, N. (1997). The *Rhizobium meliloti* putA gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol. Microbiol.* 23, 85–93. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.1861555.x
- Jiménez-Zurdo, J. I., Van Dillewijn, P., Soto, M. J., De Felipe, M. R., Olivares, J., and Toro, N. (1995). Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 492–498. doi: 10.1094/MPMI-8-0492
- Kim, G. B., and Nam, Y. W. (2013). A novel δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene of *Medicago truncatula* plays a predominant

CONCLUDING REMARKS

High levels of proline synthesis and utilization are found during nodulation and bacteroid differentiation, whose perturbation leads to reduced nodule mass and number, and to decreased nitrogen fixation. Although the exact mechanism by which proline metabolism benefits the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis is still far to be fully understood, it seems to play a main role in maintaining nodule efficiency under stress. Shedding light on the molecular basis of these effects will provide a reliable tool to handle nodule activity and, hopefully, improve the adaptation of legumes to environmental stress, a main goal in view of the ongoing climate changes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported in part by the University of Ferrara in the frame of the project FAR 2020.

- role in stress-induced proline accumulation during symbiotic nitrogen fixation. *J. Plant Physiol.* 170, 291–302. doi: 10.1016/j.jplph.2012.10.004
- King, N. D., Hojnacki, D., and O'brian, M. R. (2000). The *Bradyrhizobium japonicum* proline biosynthesis gene proC is essential for symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5469–5471. doi: 10.1128/AEM.66.12.5469-5471.2000
- Kohl, D. H., Kennelly, E. J., Zhu, Y., Schubert, K. R., and Shearer, G. (1991). Proline accumulation, nitrogenase (C₂H₂ reducing) activity and activities of enzymes related to proline metabolism in drought-stressed soybean nodules. *J. Exp. Bot.* 42, 831–837. doi: 10.1093/jxb/42.7.831
- Kohl, D. H., Lin, J. J., Shearer, G., and Schubert, K. R. (1990). Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in legume root nodules. *Plant Physiol.* 94, 1258–1264. doi: 10.1104/pp.94.3.1258
- Kohl, D. H., Schubert, K. R., Carter, M. B., Hagedorn, C. H., and Shearer, G. (1988). Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 2036–2040. doi: 10.1073/pnas.85.7.2036
- Kohl, D. H., Straub, P. F., and Shearer, G. (1994). Does proline play a special role in bacteroid metabolism? *Plant Cell Environ.* 17, 1257–1262. doi: 10.1111/j.1365-3040.1994.tb00527.x
- Letunic, I., and Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49, W293–W296. doi: 10.1093/nar/gkab301
- Liu, L. K., Becker, D. F., and Tanner, J. J. (2017). Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Arch. Biochem. Biophys.* 632, 142–157. doi: 10.1016/j.abb.2017.07.005
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz268
- Matamoros, M. A., and Becana, M. (2020). “Chapter three—redox control of the legume-rhizobium symbiosis,” in *Advances in Botanical Research. Vol. 94*. eds. P. Frendo, F. Frugier and C. Masson-Boivin (Academic Press), 67–96.
- Okumoto, S., Funck, D., Trovato, M., and Forlani, G. (2016). Editorial: amino acids of the glutamate family: functions beyond primary metabolism. *Front. Plant Sci.* 7:318. doi: 10.3389/fpls.2016.00318
- Pedersen, A. L., Feldner, H. C., and Rosendahl, L. (1996). Effect of proline on nitrogenase activity in symbiosomes from root nodules of soybean (*Glycine max* L.) subjected to drought stress. *J. Exp. Bot.* 47, 1533–1539. doi: 10.1093/jxb/47.10.1533
- Petrollino, D., and Forlani, G. (2012). Coenzyme preference of *Streptococcus pyogenes* δ¹-pyrroline-5-carboxylate reductase: evidence supporting NADPH as the physiological electron donor. *Amino Acids* 43, 493–497. doi: 10.1007/s00726-011-1077-x
- Phang, J. M., Pandhare, J., and Liu, Y. (2008). The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate. *J. Nutr.* 138, 2008s–2015s. doi: 10.1093/jn/138.10.2008S
- Rai, A. N., and Penna, S. (2013). Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. *Mol. Biol. Rep.* 40, 6429–6435. doi: 10.1007/s11033-013-2757-2
- Robert, X., and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320–W324. doi: 10.1093/nar/gku316
- Ruszkowski, M., Nocek, B., Forlani, G., and Dauter, Z. (2015). The structure of *Medicago truncatula* δ¹-pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6:869. doi: 10.3389/fpls.2015.00869
- Sabbioni, G., Funck, D., and Forlani, G. (2021). Enzymology and regulation of δ¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase 2 from rice. *Front. Plant Sci.* 12:672702. doi: 10.3389/fpls.2021.672702
- Sharma, P. K., and Yadav, A. S. (2012). Symbiotic characterization of mutants defective in proline dehydrogenase in *Rhizobium* sp. *Cajanus* under drought stress condition. *Eur. J. Exp. Biol.* 2, 206–216.
- Straub, P. F., Shearer, G., Reynolds, P. H. S., Sawyer, S. A., and Kohl, D. H. (1997). Effect of disabling bacteroid proline catabolism on the response of soybeans to repeated drought stress. *J. Exp. Bot.* 48, 1299–1307. doi: 10.1093/jxb/48.6.1299
- Trinchant, J. C., Boscarì, A., Spennato, G., Van De Sype, G., and Le Rudulier, D. (2004). Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiol.* 135, 1583–1594. doi: 10.1104/pp.103.037556
- Turchetto-Zolet, A. C., Margis-Pinheiro, M., and Margis, R. (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Mol. Gen. Genomics.* 281, 87–97. doi: 10.1007/s00438-008-0396-4
- Verdoy, D., Coba De La Peña, T., Redondo, F. J., Lucas, M. M., and Pueyo, J. J. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 29, 1913–1923. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01567.x
- Verdoy, D., Lucas, M. M., Manrique, E., Covarrubias, A. A., De Felipe, M. R., and Pueyo, J. J. (2004). Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Cell Environ.* 27, 757–767. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01179.x
- Wang, J., Andersen, S. U., and Ratet, P. (2018). Editorial: molecular and cellular mechanisms of the legume-rhizobia symbiosis. *Front. Plant Sci.* 9:1839. doi: 10.3389/fpls.2018.01839
- Zheng, Y., Cabassa-Hourton, C., Planchais, S., Lebreton, S., and Savouré, A. (2021). The proline cycle as an eukaryotic redox valve. *J. Exp. Bot.* 72, 6856–6866. doi: 10.1093/jxb/erab361
- Zhu, Y., Shearer, G., and Kohl, D. H. (1992). Proline fed to intact soybean plants influences acetylene reducing activity and content and metabolism of proline in bacteroids. *Plant Physiol.* 98, 1020–1028. doi: 10.1104/pp.98.3.1020

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Sabbioni and Forlani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

7. DISCUSSIONE

Durante le situazioni di stress, condizioni in cui crescita e produttività delle piante possono risultare compromesse, una delle risposte più comuni delle cellule vegetali consiste nell'accumulo di prolina (Szabados & Saviouré, 2010).

Negli animali è stato dimostrato e nelle piante ipotizzato che la prolina ed il suo precursore P5C possono entrare a far parte di un ciclo metabolico che risulta essere molto vantaggioso per l'economia cellulare. L'inizio di questo ciclo coincide con l'ossidazione della prolina a P5C, catalizzata all'interno del mitocondrio dalla PRODH. Dopodiché, il P5C neo-formato anziché essere ulteriormente ossidato a glutammato per concludere la via catabolica, viene nuovamente ridotto a prolina dalla P5CR (Christensen et al., 2020; Fichman et al., 2015; Miller et al., 2009; Yoon et al., 2004). Nonostante possa apparire come un processo futile, gli esperimenti condotti dimostrano come questo ciclo consenta alle cellule di aumentare la sintesi di ATP, oltre a garantire lo scambio di equivalenti riducenti tra citosol e mitocondri, risultando molto vantaggioso per l'economia cellulare. D'altra parte, l'ossidazione catalizzata dalla PRODH può comportare anche una maggior produzione di ROS (Miller et al., 2009; Phang, 1985). Nonostante la serie di danni che queste specie possono causare, in alcuni contesti manifestano un effetto positivo sulla pianta, favorendo per esempio l'induzione della risposta ipersensibile durante le infezioni da agenti patogeni (Qamar, 2015).

Viste tali implicazioni, studiare gli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina può rappresentare una strategia utile per comprendere più a fondo i meccanismi di risposta allo stress ed eventualmente trovare strategie per interferire con essi, al fine di migliorare sopravvivenza e rese delle piante esposte a condizioni di crescita sfavorevoli. Il confronto tra sistemi differenti e l'individuazione delle eventuali analogie e differenze che li distinguono possono rivelarsi mezzi utili per approfondire tali aspetti.

Il lievito, per esempio, rappresenta un'eccezione rispetto alla grande maggioranza degli organismi poiché è stato dimostrato che non accumula prolina in seguito all'esposizione a stimoli di stress (Takagi, 2008). Risulta quindi interessante indagare quali siano le caratteristiche degli enzimi che ne catalizzano la sintesi. Una preliminare caratterizzazione della P5C reductasi di *S. cerevisiae* era già stata condotta negli anni '80 (Matsuzawa & Ishiguro, 1980) mostrando una affinità simile nei confronti di tutti i suoi substrati (NADH, NADPH e P5C) e una velocità massima raggiungibile utilizzando NADPH come donatore di elettroni pari alla metà di quella ottenibile con il NADH. Inoltre,

era stata ipotizzata una struttura nativa organizzata in tetrameri dal peso molecolare di circa 125 kDa. Gli esperimenti condotti nell'ambito di questa tesi hanno preso in considerazione numerosi altri aspetti tra cui la regolazione post-traduzionale dell'enzima, e presentano risultati che in parte si discostano da quanto appena riportato. Le costanti di affinità infatti non sono simili per tutti i substrati (tabella 2.2) e, a differenza delle P5CR vegetali caratterizzate sino ad ora, la ScP5CR sembra prediligere l'utilizzo di NADH come donatore di elettroni. Questa conclusione è stata dedotta osservando che in presenza di NADPH, nonostante si raggiunga una velocità massima di 2.5 volte superiore rispetto a quando si utilizza NADH, la K_m per il P5C risulta maggiore rispetto alla concentrazione intracellulare di questo substrato (Giberti et al., 2017) e l'aggiunta di NAD⁺ o prolina nella miscela di reazione manifesta un effetto inibitorio sulla catalisi (figure 2.3 a, 2.4 a) molto maggiore rispetto a quando la reazione viene allestita con il NADH.

Inoltre, la massa molecolare stimata attraverso la cromatografia per gel filtrazione è risultata di circa 320 kDa e concorde quindi ad una struttura omodecamerica dell'enzima, analogamente a quanto riportato negli studi cristallografici condotti sugli omologhi vegetali (Forlani, Bertazzini, et al., 2015; Ruzkowski et al., 2015).

Per simulare condizioni di stress osmotico, l'attività della ScP5CR è stata saggiata in presenza di concentrazioni crescenti di sali (figura 2.6). Nessuno di questi influisce positivamente sull'attività catalitica che, al contrario, viene inibita quando il donatore di elettroni è il NADPH. Il mancato accumulo di prolina in lievito durante le situazioni di stress osmotico, dunque, potrebbe essere correlato al fatto che l'enzima non viene positivamente modulato dalla presenza di anioni e cationi, a differenza degli omologhi espressi in piante che accumulano l'iminoacido, come ad esempio *A. thaliana* (Giberti et al., 2014) e *O. sativa* (Forlani, Bertazzini, et al., 2015). Per completezza sarebbe interessante valutare l'effetto esercitato dai sali sull'enzima che in lievito catalizza lo step anabolico limitante, ovvero la GK. Quest'ultima, ad oggi, non è stata caratterizzata in maniera definitiva, ma sono disponibili dati preliminari che dimostrano come anche in questo caso la prolina risulti inibente, con IC_{50} nettamente inferiore (0.5 mM, Sekine et al., 2007) rispetto a quella calcolata per la ScP5CR (figura 2.4 a).

Un'altra molecola in grado di inibire la ScP5CR è l'arginina, e anche in questo caso l'effetto maggiore si ha in presenza di NADPH (IC_{50} inferiore di circa tre volte rispetto al NADH, figura 2.4 b). È la prima volta che viene riportato questo fenomeno per la P5CR. Ciò potrebbe essere correlato al fatto che in questo organismo, a differenza delle piante, lo stesso enzima è coinvolto sia nella sintesi di prolina che nella degradazione di arginina (Brandriss & Magasanik, 1980). Tale conclusione viene

confermata anche dalle analisi *in silico* condotte sulla ScP5CR. Confrontando la sua struttura con quella della P5CR di *Medicago truncatula*, enzima per cui mostra il maggior grado di omologia, si osserva infatti la presenza di un segmento amino-terminale più lungo e carico negativamente, il quale potrebbe rappresentare il sito allosterico di legame all'arginina.

Spesso l'espressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina risulta relativamente bassa all'interno delle cellule, e le metodiche di purificazione non sempre consentono di ottenere rese sufficienti per portarne a termine la caratterizzazione. Perciò, le analisi sulla P5CR umana e sulle P5CS di *A. thaliana* e *O. sativa* riportate nell'ambito di questo progetto sono state condotte isolando gli enzimi ottenuti mediante espressione eterologa in *E. coli*. Tale approccio permette infatti di esprimere con maggiore efficienza e sotto il controllo di promotori inducibili i geni clonati, oltre a facilitarne la purificazione attraverso la fusione con un frammento che codifichi per una *coda* di poli-istidine.

L'espressione della PYCR animale aumenta durante lo sviluppo di alcuni tipi di tumore, rappresentando un potenziale bersaglio terapeutico (Tanner et al., 2018). Per questo motivo si è deciso di valutare sull'enzima umano l'efficacia di alcune molecole ad effetto inibitorio derivate dall'acido aminometilenebisfosfonico, già risultate attive nei confronti degli enzimi di origine vegetale e batterica (Forlani et al., 2012; Giberti et al., 2017). I risultati hanno evidenziato come, indipendentemente dal donatore di elettroni utilizzato, l'attività *in vitro* dell'enzima umano risulti fortemente inibita dalla presenza di questi composti, in particolar modo dal Br₂PAMBA. L'effetto è superiore rispetto a quello della pargilina e del suo derivato 4Br-pargilina, molecole testate in un precedente studio (Milne et al., 2019). Dalle analisi *in vitro* è emerso anche che il meccanismo di inibizione esercitato dal Br₂PAMBA è di tipo competitivo, quindi l'eventuale accumulo di substrati potrebbe in parte annullarne l'effetto.

Di conseguenza, per verificare se questa sostanza fosse effettivamente in grado di inibire la P5CR *in vivo*, è stata utilizzata per il trattamento di due linee selezionate di cellule tumorali umane (K562 e MDA-MB-231), provocando la riduzione della loro crescita in maniera dose-dipendente. Tale effetto antiproliferativo non sembra correlato ad una ridotta sintesi di prolina, poiché ad eccezione dei campioni trattati con le dosi maggiori di composto, il contenuto intracellulare dell'aminoacido risulta pressoché invariato. È più probabile quindi che la ridotta proliferazione sia dovuta al fatto che inibendo la P5CR si interferisce con il ciclo della prolina, il quale attraverso vari meccanismi fornisce sostegno alla proliferazione cellulare e crescita tumorale (D'Aniello et al., 2020; Tanner et

al., 2018).

D'altra parte è stata effettuata la caratterizzazione biochimica e l'analisi della regolazione post-traduzionale dei due paraloghi *P5CS1* e *P5CS2* presenti in diversi vegetali superiori, per colmare la mancanza di informazioni relative al loro ruolo nel determinare variazioni nella velocità di sintesi di prolina in risposta a diverse condizioni ambientali. Nello specifico, gli esperimenti sono stati condotti su *OsP5CS2* e *AtP5CS1*, clonati ed espressi in *E. coli*. La caratterizzazione è stata portata a termine per l'isoforma 2 di riso, che utilizza NADPH come donatori di elettroni e risulta inibita da dosi relativamente basse di prolina ($IC_{50} = 2.91$ mM, tabella 4.2). Un meccanismo a feed-back negativo simile è stato riscontrato anche nei confronti dell'attività γ -glutamil chinasica della P5CS di *Vigna aconitifolia*, che rappresenta uno dei pochi casi in cui le proprietà cinetiche dell'enzima sono state analizzate (Zhang et al., 1995). *OsP5CS2* è risultata inibita anche dal $NADP^+$, che alla concentrazione di circa 400 μ M riduce del 50% l'attività dell'enzima (tabella 4.2). Se, come stimato per *Arabidopsis*, la concentrazione intracellulare di $NADP^+$ in situazioni normali può aumentare fino a 1.25 mM (Queval & Noctor, 2007; S. Sharma et al., 2011; Takahashi et al., 2009) mantenendo quindi l'inibizione della P5CS, è plausibile che l'enzima sia attivato in situazioni di stress, durante le quali viene indotta la via ossidativa dei pentosi fosfati (OPPP) che permette di abbassare i livelli di $NADP^+$ riducendolo a NADPH (Baxter et al., 2007).

A supporto del fatto che le condizioni di stress iperosmotico possano attivare l'enzima, è stato riscontrato che concentrazioni crescenti di cloruri (10-100 mM) stimolano la *OsP5CS2* fino al 40% rispetto ai controlli. Anche l'enzima finale della via biosintetica, *OsP5CR*, viene positivamente regolato dai cloruri che, alla dose di 100 mM, inducono un incremento dell'attività catalitica di quasi tre volte rispetto ai controlli (Forlani, Bertazzini, et al., 2015). Questo suggerisce che entrambi gli enzimi possano cooperare tra loro durante le situazioni di stress osmotico consentendo l'accumulo di prolina.

In riso, la distinzione funzionale tra *P5CS1* e *P5CS2* non è molto definita e, stando agli studi condotti sulla loro regolazione trascrizionale, entrambi i geni sembrano inducibili dall'esposizione al sale (Rai & Penna, 2013). Questo fatto, sommato all'impossibilità di riuscire ad ottenere quantità apprezzabili di *OsP5CS1* in forma solubile, ha impedito una piena elucidazione di tale aspetto. Perciò, gli esperimenti di caratterizzazione sono stati in parte eseguiti anche sugli enzimi di *Arabidopsis*, i quali dovrebbero ricoprire ruoli più distinti. *AtP5CS1*, infatti, sembrerebbe responsabile dell'accumulo di prolina che si verifica nelle situazioni di stress, mentre *AtP5CS2* partecipa alla sintesi di prolina

durante lo sviluppo embrionale e la crescita (Strizhov et al., 1997). Anche in questo caso quindi i due geni sono stati clonati ed espressi in cellule batteriche, ma le analisi sono tutt'ora in corso, e in questa tesi sono riportati solo i risultati preliminari riguardanti *AtP5CS1*. Come *OsP5S2*, questo isoenzima predilige l'utilizzo di NADPH come donatore di elettroni e presenta nella sua struttura un residuo di fenilalanina che risulta critico per l'inibizione a feed-back attuata dalla prolina (Zhang et al., 1995). Ciononostante, nel caso di *AtP5CS1* l'iminoacido non esercita alcun effetto inibitorio ma, al contrario, stimola leggermente l'attività catalitica (figura 5.7 A). Resta quindi da indagare quali siano le differenze strutturali responsabili di questo effetto.

Sempre a supporto dell'ipotesi che in condizioni iperosmotiche la *AtP5CS1* dovrebbe continuare a produrre il P5C necessario per la sintesi di prolina, le prove condotte in presenza di concentrazioni crescenti di sali hanno evidenziato come dosi relativamente alte di NaCl (fino a 100 mM, figura 5.8 A) non influenzino negativamente la catalisi. Al contrario, il KCl induce un netto incremento dell'attività enzimatica, fino al doppio rispetto ai controlli non trattati (figura 5.8 B).

Inoltre, come osservato per l'enzima *OsP5CS2*, il NADP⁺ agisce da inibitore (figura 5.7 C).

Per quanto riguarda *A. thaliana* e *O. sativa*, dunque, tutti gli enzimi della via di sintesi della prolina caratterizzati sino ad ora prediligano l'utilizzo di NADPH come donatore di elettroni (Giberti et al., 2014; Forlani, Bertazzini, et al., 2015). In presenza di sali, quindi, l'aumentato anabolismo dell'iminoacido provoca un incremento della concentrazione intracellulare di NADP⁺ a discapito del NADPH, condizione che a lungo andare provocherebbe l'arresto della via. D'altra parte, il NADP⁺ derivante da queste reazioni può rifornire la OPPP che, come citato precedentemente, viene anch'essa indotta in situazioni di stress (Baxter et al., 2007) e permette di rigenerare il nucleotide piridinico in forma ridotta. In questo modo può essere mantenuto un adeguato rapporto NADPH/NADP⁺ prevenendo il blocco di entrambe le vie, utili alle cellule per superare le situazioni di stress.

Relativamente al ruolo del metabolismo della prolina nella relazione simbiotica tra leguminose e rizobi, infine, le ipotesi avanzate sono molteplici, e i risultati descritti variano in base alle specie prese in considerazione, l'esposizione a stimoli stressanti e l'intensità di questi ultimi. Dalla raccolta e dall'analisi degli articoli disponibili in letteratura sono state individuate varie funzioni attribuibili alla prolina in questo processo. Ad esempio, essa potrebbe fungere da risorsa energetica, favorire la sintesi di proteine ricche in prolina impiegabili per stabilizzare la parete cellulare durante gli stress osmotici, oppure supportare l'elevata produzione di proteine necessarie per il differenziamento dei

batteroidi. Particolarmente rilevante è stata l'individuazione in *M. truncatula* di una terza isoforma dell'enzima P5CS, caratterizzata da un segmento N-terminale più lungo rispetto agli altri due isoenzimi. I mutanti *p5cs3* presentano un ridotto numero di noduli, una minor efficienza di fissazione dell'azoto e accumulano meno prolina, evidenze che fanno supporre un coinvolgimento specifico di questo isoenzima nella simbiosi. Dalle analisi *in silico* è stato riscontrato che *P5CS3* potrebbe essere frutto di un processo di duplicazione di *P5CS2* e, attraverso una ricerca basata sul frammento N-terminale della proteina, sono stati individuati omologhi anche in altre specie, tutte appartenenti alla famiglia delle leguminose.

Nonostante la tematica richieda ulteriori approfondimenti, i dati raccolti dimostrano che la prolina e/o la serie di reazioni che caratterizzano il suo metabolismo siano coinvolti nel processo simbiotico, e più in particolare sembrano ricoprire importanti ruoli nel mantenimento dell'efficienza dei noduli durante le situazioni di stress.

8. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nell'ambito di questo progetto di dottorato sono stati analizzati i due enzimi che partecipano al processo di sintesi della prolina a partire dal glutammato. L'attenzione è stata focalizzata principalmente sulla loro regolazione post-traduzionale e quindi sull'effetto che sali, aminoacidi, prodotti e analoghi possono esercitare sulle reazioni da essi catalizzate. Lo studio di questi aspetti permette di comprendere come le piante possano modulare la produzione dell'iminoacido in risposta a diverse condizioni e durante l'esposizione allo stress, e quindi può fornire importanti spunti per ottimizzare le condizioni di crescita e le rese ottenibili dai raccolti.

L'estensione delle analisi al di fuori del sistema vegetale, ovvero lo studio degli enzimi PYCR1 e ScP5CR, ha consentito la valutazione di alcune delle caratteristiche che li distinguono dagli omologhi espressi nelle piante. Nonostante catalizzino la stessa reazione, infatti, le differenze presenti nelle loro sequenze amminoacidiche si ripercuotono sull'affinità per i substrati e sui meccanismi di regolazione. Gli esperimenti relativi all'inibizione della P5CR umana, in particolare, hanno reso ancor più evidente come il metabolismo della prolina ed il ciclo che instaura con il P5C abbiano un impatto sulla sopravvivenza cellulare. Saranno comunque necessari ulteriori analisi per valutare il possibile utilizzo degli aminobisfosfonati a scopi terapeutici, come ad esempio l'indagine molecolare del meccanismo antiproliferativo e il loro eventuale effetto su cellule non tumorali.

Riguardo alla P5CS vegetale, i risultati ottenuti rappresentano il primo insieme di dati relativi alle loro proprietà biochimiche. Fino ad oggi, infatti, le informazioni relative alle proprietà cinetiche e alla regolazione post-traduzionale di P5CS1 e P5CS2 erano piuttosto carenti. Tali risultati necessitano di conferme e, per ottenere un quadro esaustivo, sarà indispensabile proseguire con la caratterizzazione della prima isoforma di riso e la seconda di *Arabidopsis*.

Infine, grazie alla raccolta bibliografica condotta sui ruoli che la prolina può svolgere nella simbiosi tra leguminose e rizobi, sono emersi aspetti di potenziale grande interesse che aprono la strada verso nuove ricerche. Per esempio, sarebbe interessante indagare l'espressione della P5CS3 in *M. truncatula* e in altre leguminose e capire come essa viene regolata, contribuendo quindi alla scoperta di nuove strategie per migliorare l'adattamento dei legumi alle situazioni di stress conseguenti ai sempre più frequenti cambiamenti climatici.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alia, null, Mohanty, P., & Matysik, J. (2001). Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 21(2), 195–200. <https://doi.org/10.1007/s007260170026>
- Alia, Prasad, K. V. S. K., & Pardha Saradhi, P. (1995). Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus. *Phytochemistry*, 39(1), 45–47. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00919-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00919-K)
- Aral, B., & Kamoun, P. (1997). The proline biosynthesis in living organisms. *Amino Acids*, 13(3–4), 189–217. <https://doi.org/10.1007/BF01372588>
- Aswani, V., Rajsheel, P., Bapatla, R. B., Sunil, B., & Raghavendra, A. S. (2019). Oxidative stress induced in chloroplasts or mitochondria promotes proline accumulation in leaves of pea (*Pisum sativum*): Another example of chloroplast-mitochondria interactions. *Protoplasma*, 256(2), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1306-1>
- Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Repsilber, D., Patil, K. R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A. R., & Sweetlove, L. J. (2007). The Metabolic Response of Heterotrophic Arabidopsis Cells to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 143(1), 312–325. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090431>
- Binzel, M. L., Hasegawa, P. M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A. K., & Bressan, R. A. (1987). Solute Accumulation in Tobacco Cells Adapted to NaCl 1. *Plant Physiology*, 84(4), 1408–1415. <https://doi.org/10.1104/pp.84.4.1408>
- Boggess, S. F., & Stewart, C. R. (1980). The relationship between water stress induced proline accumulation and inhibition of protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Science Letters*, 17(2), 245–252. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90154-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90154-6)
- Boyer, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), 443–448. <https://doi.org/10.1126/science.218.4571.443>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brandriss, M. C., & Falvey, D. A. (1992). Proline biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of the PRO3 gene, which encodes delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3782–3788. <https://doi.org/10.1128/jb.174.15.5176b.1992>
- Brandriss, M. C., & Magasanik, B. (1979). Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: Enzyme induction by proline. *Journal of Bacteriology*, 140(2), 498–503. <https://doi.org/10.1128/jb.140.2.498-503.1979>
- Brandriss, M. C., & Magasanik, B. (1980). Proline: An essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 143(3), 1403–1410. <https://doi.org/10.1128/jb.143.3.1403-1410.1980>

- Büssis, D., & Heineke, D. (1998). Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *Journal of Experimental Botany*, *49*(325), 1361–1370. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.325.1361>
- Cecchini, N. M., Monteoliva, M. I., & Alvarez, M. E. (2011). Proline Dehydrogenase Contributes to Pathogen Defense in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *155*(4), 1947–1959. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167163>
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, *103*(4), 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chen, J., Zhang, X., Jing, R., Blair, M. W., Mao, X., & Wang, S. (2010). Cloning and genetic diversity analysis of a new P5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, *120*(7), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1263-3>
- Christensen, E. M., Bogner, A. N., Vandekerke, A., Tam, G. S., Patel, S. M., Becker, D. F., Fendt, S.-M., & Tanner, J. J. (2020). In crystallo screening for proline analog inhibitors of the proline cycle enzyme PYCR1. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(52), 18316–18327. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016106>
- Chu, T. M., Jusaitis, M., Aspinall, D., & Paleg, L. G. (1978). Accumulation of Free Proline at Low Temperatures. *Physiologia Plantarum*, *43*(3), 254–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb02573.x>
- Csonka, L. N., Gelvin, S. B., Goodner, B. W., Orser, C. S., Siemieniak, D., & Slightom, J. L. (1988). Nucleotide sequence of a mutation in the proB gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene*, *64*(2), 199–205. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90335-6)
- D’Aniello, C., Patriarca, E. J., Phang, J. M., & Minchiotti, G. (2020). Proline Metabolism in Tumor Growth and Metastatic Progression. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00776>
- De Ronde, J. A., Cress, W. A., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., & Van Staden, J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, *161*(11), 1211–1224. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.014>
- Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, *4*(2), 215–223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x>
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., van der Graaff, E., Kunze, R., & Frommer, W. B. (2004). The Role of Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation. *The Plant Cell*, *16*(12), 3413–3425. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023622>
- Deutch, A. H., Rushlow, K. E., & Smith, C. J. (1984). Analysis of the *Escherichia coli* proBA locus by DNA and protein sequencing. *Nucleic acids research*, *12*(15), 6337–6355. <https://doi.org/10.1093/nar/12.15.6337>
- diCenzo, G. C., Zamani, M., Cowie, A., & Finan, T. M. (2015). Proline auxotrophy in *Sinorhizobium meliloti* results in a plant-specific symbiotic phenotype. *Microbiology (Reading, England)*, *161*(12), 2341–2351. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000182>

- Ding, Z., Ericksen, R. E., Escande-Beillard, N., Lee, Q. Y., Loh, A., Denil, S., Steckel, M., Haegebarth, A., Wai Ho, T. S., Chow, P., Toh, H. C., Reversade, B., Gruenewald, S., & Han, W. (2020). Metabolic pathway analyses identify proline biosynthesis pathway as a promoter of liver tumorigenesis. *Journal of Hepatology*, *72*(4), 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.026>
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., & Alvarez, M. E. (2004). Proline Accumulation and *AtP5CS2* Gene Activation Are Induced by Plant-Pathogen Incompatible Interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], *17*(4), 343–350. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.343>
- Fichman, Y., Gerdes, S. Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., & Csonka, L. N. (2015). Evolution of proline biosynthesis: Enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation: Proline biosynthesis. *Biological Reviews*, *90*(4), 1065–1099. <https://doi.org/10.1111/brv.12146>
- Forlani, G., Berlicki, Ł., Duò, M., Dziędzioła, G., Giberti, S., Bertazzini, M., & Kafarski, P. (2013). Synthesis and Evaluation of Effective Inhibitors of Plant δ 1-Pyrroline-5-carboxylate Reductase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(28), 6792–6798. <https://doi.org/10.1021/jf401234s>
- Forlani, G., Bertazzini, M., Zarattini, M., Funck, D., Ruszkowski, M., & Nocek, B. (2015). Functional properties and structural characterization of rice δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00565>
- Forlani, G., Giberti, S., Berlicki, Ł., Petrollino, D., & Kafarski, P. (2007). Plant P5C Reductase as a New Target for Aminomethylenebisphosphonates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(11), 4340–4347. <https://doi.org/10.1021/jf0701032>
- Forlani, G., Makarova, K. S., Ruszkowski, M., Bertazzini, M., & Nocek, B. (2015). Evolution of plant δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00567>
- Forlani, G., Obojska, A., Berlicki, Ł., & Kafarski, P. (2006). Phosphinothricin analogues as inhibitors of plant glutamine synthetases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(3), 796–802. <https://doi.org/10.1021/jf0526285>
- Forlani, G., Occhipinti, A., Berlicki, Ł., Dziędzioła, G., Wieczorek, A., & Kafarski, P. (2008). Tailoring the Structure of Aminobisphosphonates To Target Plant P5C Reductase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(9), 3193–3199. <https://doi.org/10.1021/jf800029t>
- Forlani, G., Petrollino, D., Fusetti, M., Romanini, L., Nocek, B., Joachimiak, A., Berlicki, L., & Kafarski, P. (2012). Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase as a new target for therapeutics: Inhibition of the enzyme from *Streptococcus pyogenes* and effects in vivo. *Amino Acids*, *42*(6), 2283–2291. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0970-7>
- Forlani, G., Sabbioni, G., Ragno, D., Petrollino, D., & Borgatti, M. (2021). Phenyl-substituted aminomethylenebisphosphonates inhibit human P5C reductase and show antiproliferative activity against proline-hyperproducing tumour cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *36*(1), 1248–1257. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1919890>

- Forlani, G., Trovato, M., Funck, D., & Signorelli, S. (2019). *Regulation of Proline Accumulation and Its Molecular and Physiological Functions in Stress Defence*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8_3
- Fujita, T., Maggio, A., Garcia-Rios, M., Bressan, R. A., & Csonka, L. N. (1998). Comparative Analysis of the Regulation of Expression and Structures of Two Evolutionarily Divergent Genes for Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase from Tomato. *Plant Physiology*, *118*(2), 661–674. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.661>
- Fukutoku, Y., & Yamada, Y. (1984). Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ^{15}N -labelled protein. *Physiologia Plantarum*, *61*(4), 622–628. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb05180.x>
- Funck, D., Baumgarten, L., Stift, M., von Wirén, N., & Schönemann, L. (2020). Differential Contribution of P5CS Isoforms to Stress Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.565134>
- Funck, D., Stadelhofer, B., & Koch, W. (2008). Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biology*, *8*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40>
- Funck, D., Winter, G., Baumgarten, L., & Forlani, G. (2012). Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 191. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-191>
- Geng, P., Qin, W., & Xu, G. (2021). Proline metabolism in cancer. *Amino Acids*, *53*(12), 1769–1777. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03060-1>
- Giberti, S., Bertazzini, M., Liboni, M., Berlicki, Ł., Kafarski, P., & Forlani, G. (2017). Phytotoxicity of aminobisphosphonates targeting both δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase and glutamine synthetase. *Pest Management Science*, *73*(2), 435–443. <https://doi.org/10.1002/ps.4299>
- Giberti, S., Funck, D., & Forlani, G. (2014). Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from Arabidopsis thaliana: Stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.12701>
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., Koncz, C., & Zilberstein, A. (1998). Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology*, *38*(5), 755–764. <https://doi.org/10.1023/A:1006015212391>
- Hagedorn, C. H., & Phang, J. M. (1983). Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *225*(1), 95–101. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90010-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90010-3)
- Hamilton, E. W., & Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, *126*(3), 1266–1274. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1266>

Hare, P. D., & Cress, W. A. (1997). *Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants*. 24. <https://doi.org/10.1023/A:1005703923347>

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>

Hayzer, D. J., & Leisinger, T. (1980). The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 118(2), 287–293. <https://doi.org/10.1099/00221287-118-2-287>

Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., & Frommer, W. B. (2000). Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology*, 122(2), 357–368. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.357>

Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of Feedback Inhibition of Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiology*, 122(4), 1129–1136. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1129>

Hu, C. A., Donald, S. P., Yu, J., Lin, W.-W., Liu, Z., Steel, G., Obie, C., Valle, D., & Phang, J. M. (2007). Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent and mitochondria-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 295(1–2), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9276-6>

Hu, C.-A. A., Delauney, A. J., & VERMAT, D. P. S. (1992). A bifunctional enzyme (Al-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Plant Biology*. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9354>

Hua, X. J., van de Cotte, B., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (1997). Developmental Regulation of Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 114(4), 1215–1224. <https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1215>

Hua, X. J., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2001). The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *The Plant Journal*, 26(2), 157–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01020.x>

Huang, H. L., & Brandriss, M. C. (2000). The Regulator of the Yeast Proline Utilization Pathway Is Differentially Phosphorylated in Response to the Quality of the Nitrogen Source. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 892–899. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.3.892-899.2000>

Huynh, T. Y. L., Zareba, I., Baszanowska, W., Lewoniewska, S., & Palka, J. (2020). Understanding the role of key amino acids in regulation of proline dehydrogenase/proline oxidase (prodh/pox)-dependent apoptosis/autophagy as an approach to targeted cancer therapy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 466(1–2), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03685-y>

Jensen, J. V., & Wendisch, V. F. (2013). Ornithine cyclodeaminase-based proline production by *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-63>

Jiménez-Zurdo, J. I., García-Rodríguez, F. M., & Toro, N. (1997). The *Rhizobium meliloti* putA gene: Its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Molecular Microbiology*, *23*(1), 85–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.1861555.x>

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: The Sinorhizobium–Medicago model. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>

Kim, G.-B., & Nam, Y.-W. (2013). A novel $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene of *Medicago truncatula* plays a predominant role in stress-induced proline accumulation during symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*, *170*(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.10.004>

Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P., & Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, *88*(3), 424–438.

Kohl, D. H., Kennelly, E. J., Zhu, Y., Schubert, K. R., & Shearer, G. (1991). Proline Accumulation, Nitrogenase (C₂H₂ reducing) Activity and Activities of Enzymes related to Proline Metabolism in Drought-Stressed Soybean Nodules. *Journal of Experimental Botany*, *42*(240), 831–837. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.7.831>

Kohl, D. H., Schubert, K. R., Carter, M. B., Hagedorn, C. H., & Shearer, G. (1988). Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: Energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(7), 2036–2040. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.7.2036>

Lamers, J., van der Meer, T., & Testerink, C. (2020). How Plants Sense and Respond to Stressful Environments. *Plant Physiology*, *182*(4), 1624–1635. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01464>

Launay, A., Cabassa-Hourton, C., Eubel, H., Maldiney, R., Guivarc'h, A., Crilat, E., Planchais, S., Lacoste, J., Bordenave-Jacquemin, M., Clément, G., Richard, L., Carol, P., Braun, H.-P., Lebreton, S., & Saviouré, A. (2019). Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *70*(21), 6203–6214. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz351>

Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A., & Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, *10*(9), 209–219.

Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., & Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, *39*(4), 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>

Liu, J., & Zhu, J. K. (1997). Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *114*(2), 591–596. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.591>

Ma, C., Wang, M., Zhao, M., Yu, M., Zheng, X., Tian, Y., Sun, Z., Liu, X., & Wang, C. (2022). The $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase family performs diverse physiological functions in stress responses in pear (*Pyrus betulifolia*). *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1066765>

Matsuzawa, T., & Ishiguro, I. (1980). Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate reductase from Baker's yeast. Purification, properties and its application in the assays of L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate and L-ornithine in tissue. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 613(2), 318–323. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(80)90086-8)

Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). *Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants*. 9.

Maxwell, S. A., & Davis, G. E. (2000). Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. Apoptosis-sensitive tumor cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13009–13014.

Maxwell, S. A., & Rivera, A. (2003). Proline Oxidase Induces Apoptosis in Tumor Cells, and Its Expression Is Frequently Absent or Reduced in Renal Carcinomas *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9784–9789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210012200>

Meinke, D. W. (2020). Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in Arabidopsis. *New Phytologist*, 226(2), 306–325. <https://doi.org/10.1111/nph.16071>

Meng, Z., Lou, Z., Liu, Z., Li, M., Zhao, X., Bartlam, M., & Rao, Z. (2006). Crystal structure of human pyrroline-5-carboxylate reductase. *Journal of Molecular Biology*, 359(5), 1364–1377. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.053>

Mestichelli, L. J., Gupta, R. N., & Spenser, I. D. (1979). The biosynthetic route from ornithine to proline. *Journal of Biological Chemistry*, 254(3), 640–647. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37853-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37853-5)

Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., & Zilberstein, A. (2009). Unraveling Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate-Proline Cycle in Plants by Uncoupled Expression of Proline Oxidation Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26482–26492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009340>

Milne, K., Sun, J., Zaal, E. A., Mowat, J., Celie, P. H. N., Fish, A., Berkers, C. R., Forlani, G., Loayza-Puch, F., Jamieson, C., & Agami, R. (2019). A fragment-like approach to PYCR1 inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(18), 2626–2631. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.047>

Morris, C. J., Thompson, J. F., & Johnson, C. M. (1969). Metabolism of Glutamic Acid and N-Acetylglutamic Acid in Leaf Discs and Cell-free Extracts of Higher Plants. *Plant Physiology*, 44(7), 1023–1026.

Nocek, B., Chang, C., Li, H., Lezondra, L., Holzle, D., Collart, F., & Joachimiak, A. (2005). Crystal structures of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from human pathogens *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Molecular Biology*, 354(1), 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.036>

Noguchi, M., Koiwai, A., & Tamaki, E. (1966). Studies on Nitrogen Metabolism in Tobacco Plants: Part VII. Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate Reductase from Tobacco Leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 30(5), 452–456. <https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858622>

Nomura, M., & Takagi, H. (2004). Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12616–12621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403349101>

- Omorì, K., Suzuki, S., Imai, Y., & Komatsubara, S. (1992). Analysis of the mutant proBA operon from a proline-producing strain of *Serratia marcescens*. *Journal of general microbiology*, *138*(4), 693–699. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-4-693>
- Patriarca, E. J., Cermola, F., D’Aniello, C., Fico, A., Guardiola, O., De Cesare, D., & Minchiotti, G. (2021). The Multifaceted Roles of Proline in Cell Behavior. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 728576. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.728576>
- Pérez-Arellano, I., Carmona-Álvarez, F., Martínez, A. I., Rodríguez-Díaz, J., & Cervera, J. (2010). Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *19*(3), 372–382. <https://doi.org/10.1002/pro.340>
- Phang, J. M. (1985). The Regulatory Functions of Proline and Pyrroline-5-carboxylic Acid. In *Current Topics in Cellular Regulation* (Vol. 25, pp. 91–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152825-6.50008-4>
- Phang, J. M. (2021). Perspectives, past, present and future: The proline cycle/proline-collagen regulatory axis. *Amino Acids*, *53*(12), 1967–1975. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03103-7>
- Phang, J. M., Downing, S. J., & Yeh, G. C. (1980). Linkage of the HMP pathway to ATP generation by the proline cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *93*(2), 462–470. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91100-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91100-6)
- Poustini, K., Siosemardeh, A., & Ranjbar, M. (2007). Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *54*(5), 925–934. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9165-6>
- Qamar, A. (2015). Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00503>
- Queval, G., & Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical Biochemistry*, *363*(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.005>
- Rai, A. N., & Penna, S. (2013). Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. *Molecular Biology Reports*, *40*(11), 6429–6435. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2757-2>
- Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants*, *3*(4), 458–475. <https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Rudolph, A. S., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1986). Effects of three stabilizing agents—Proline, betaine, and trehalose—On membrane phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *245*(1), 134–143. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90197-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90197-9)
- Ruszkowski, M., Nocek, B., Forlani, G., & Dauter, Z. (2015). The structure of *Medicago truncatula* δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00869>
- Sabbioni, G., Funck, D., & Forlani, G. (2021). Enzymology and Regulation of δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase 2 From Rice. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 672702. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.672702>

Santos-Díaz, M. del S., & Ochoa-Alejo, N. (1994). PEG-tolerant cell clones of chili pepper: Growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00048110>

Saradhi, P. P., Alia, null, Arora, S., & Prasad, K. V. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(1), 1–5. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1461>

Savouré, A., Jaoua, S., Hua, X. J., Ardiles, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 372(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00935-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00935-3)

Schobert, B., & Tschesche, H. (1978). Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 541(2), 270–277. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90400-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90400-2)

Sekine, T., Kawaguchi, A., Hamano, Y., & Takagi, H. (2007). Desensitization of Feedback Inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -Glutamyl Kinase Enhances Proline Accumulation and Freezing Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 4011–4019. <https://doi.org/10.1128/AEM.00730-07>

Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2012). Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant, Cell & Environment*, 35(7), 1329–1343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02492.x>

Sharma, S. S., & Dietz, K.-J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711–726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>

Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential Role of Tissue-Specific Proline Synthesis and Catabolism in Growth and Redox Balance at Low Water Potential. *Plant Physiology*, 157(1), 292–304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>

Signorelli, S., Coitiño, E. L., Borsani, O., & Monza, J. (2014). Molecular Mechanisms for the Reaction Between •OH Radicals and Proline: Insights on the Role as Reactive Oxygen Species Scavenger in Plant Stress. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(1), 37–47. <https://doi.org/10.1021/jp407773u>

Signorelli, S., Imparatta, C., Rodríguez-Ruiz, M., Borsani, O., Corpas, F. J., Monza, J., Signorelli, S., Imparatta, C., Rodríguez-Ruiz, M., Borsani, O., Corpas, F. J., & Monza, J. (2016). In vivo and in vitro approaches demonstrate proline is not directly involved in the protection against superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide and peroxynitrite. *Functional Plant Biology*, 43(9), 870–879. <https://doi.org/10.1071/FP16060>

Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)

Strizhov, N., Abrahám, E., Okrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., & Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 115

12(3), 557–569. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.00557.x>

Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>

Székely, G., Ábrahám, E., Cséplő, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., & Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, 53(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x>

Szoke, A., Miao, G.-H., Hong, Z., & Verma, D. P. S. (1992). Subcellular Location of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in Root/Nodule and Leaf of Soybean 1. *Plant Physiology*, 99(4), 1642–1649. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1642>

Takagi, H. (2008). Proline as a stress protectant in yeast: Physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(2), 211–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1698-5>

Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S., Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., Yamaya, T., Yanagisawa, S., & Uchimiya, H. (2009). Pleiotropic Modulation of Carbon and Nitrogen Metabolism in Arabidopsis Plants Overexpressing the NAD kinase2 Gene. *Plant Physiology*, 151(1), 100–113. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140665>

Tanner, J. J. (2008). Structural biology of proline catabolism. *Amino Acids*, 35(4), 719–730. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0062-5>

Tanner, J. J., Fendt, S.-M., & Becker, D. F. (2018). The Proline Cycle As a Potential Cancer Therapy Target. *Biochemistry*, 57(25), 3433–3444. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00215>

Teh, C.-Y., Shaharuddin, N. A., Ho, C.-L., & Mahmood, M. (2016). Exogenous proline significantly affects the plant growth and nitrogen assimilation enzymes activities in rice (*Oryza sativa*) under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6), 151. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2163-1>

ter Schure, E. G., van Riel, N. A. W., & Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 67–83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00533.x>

Trovato, M., Forlani, G., Signorelli, S., & Funck, D. (2019). Proline Metabolism and Its Functions in Development and Stress Tolerance. In M. A. Hossain, V. Kumar, D. J. Burritt, M. Fujita, & P. S. A. Mäkelä (A c. Di), *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 41–72). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8_2

van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124–142. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.124-142.1995>

Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35(4), 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>

Wang, G., Zhang, J., Wang, G., Fan, X., Sun, X., Qin, H., Xu, N., Zhong, M., Qiao, Z., Tang, Y., & Song, R. (2014).

Proline responding1 Plays a Critical Role in Regulating General Protein Synthesis and the Cell Cycle in Maize. *The Plant Cell*, 26(6), 2582–2600. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125559>

Wang, J., Andersen, S. U., & Ratet, P. (2018). Editorial: Molecular and Cellular Mechanisms of the Legume-Rhizobia Symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01839>

Weijin, F., Zhibin, X., Shengfeng, Z., Xiaoli, Y., Qijian, D., Jiayi, L., Qiumei, L., Yilong, C., Hua, M., Deyun, L., & Jiwen, C. (2019). The clinical significance of PYCR1 expression in renal cell carcinoma. *Medicine*, 98(28), e16384. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000016384>

Wu, G., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Kim, S. W., Knabe, D. A., Li, P., Li, X., McKnight, J. R., Satterfield, M. C., & Spencer, T. E. (2011). Proline and hydroxyproline metabolism: Implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, 40(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z>

Wu, G., Bazer, F. W., Datta, S., Johnson, G. A., Li, P., Satterfield, M. C., & Spencer, T. E. (2008). Proline metabolism in the conceptus: Implications for fetal growth and development. *Amino Acids*, 35(4), 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0052-7>

Xiao, S., Li, S., Yuan, Z., & Zhou, L. (2020). Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (PYCR1) upregulation contributes to gastric cancer progression and indicates poor survival outcome. *Annals of Translational Medicine*, 8(15), 937. <https://doi.org/10.21037/atm-19-4402>

Xin, Z., & Browse, J. (1998). Eskimo1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7799–7804. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7799>

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15), 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>

Yoon, K.-A., Nakamura, Y., & Arakawa, H. (2004). Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *Journal of Human Genetics*, 49(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1007/s10038-003-0122-3>

Zarattini, M., & Forlani, G. (2017). Toward Unveiling the Mechanisms for Transcriptional Regulation of Proline Biosynthesis in the Plant Cell Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 927. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00927>

Zareba, I., Surazynski, A., Chrusciel, M., Milytyk, W., Doroszko, M., Rahman, N., & Palka, J. (2017). Functional Consequences of Intracellular Proline Levels Manipulation Affecting PRODH/POX-Dependent Pro-Apoptotic Pathways in a Novel in Vitro Cell Culture Model. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(2), 670–684. <https://doi.org/10.1159/000480653>

Zhang, C., Lu, Q., & Verma, D. P. S. (1995). Removal of Feedback Inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate Synthetase, a Bifunctional Enzyme Catalyzing the First Two Steps of Proline Biosynthesis in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20491–20496. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20491>

Zhong, J., Guo, C.-J., Zhou, X., Chang, C.-C., Yin, B., Zhang, T., Hu, H.-H., Lu, G.-M., & Liu, J.-L. (2022). Structural basis of dynamic P5CS filaments. *ELife*, 11, e76107. <https://doi.org/10.7554/eLife.76107>

9.1 SITOGRAFIA

The Arabidopsis Information Resource (TAIR),

<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=at2g39800>

SnapGene,

<https://www.snapgene.com/resources/plasmid->

[files/?set=pet and duet vectors \(novagen\)&plasmid=pET-24a\(+\)&format=png](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet%20and%20duet%20vectors%20(novagen)&plasmid=pET-24a(+)&format=png)