

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia Vegetale
Ciclo XXVII

Caratterizzazione di una nuova isoforma della
Glutammato Deidrogenasi (GDH) in *Arabidopsis*
thaliana: definizione del ruolo fisiologico e
meccanismi di regolazione.

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Marcello Tomaselli

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Anna Torelli

Co-tutor:
Chiar.mo Prof. Francesco M. Restivo

Dottoranda: Laura Marchi

*Meravigliarsi di tutto è il primo
passo della ragione verso la scoperta.*

Louis Pasteur

INDICE

Abstract	1
Riassunto	2
Introduzione	2
1. Metabolismo dell'azoto	4
1.1 Importanza dell'azoto	4
1.2 Assimilazione dell'azoto nelle piante	5
2. Glutammato deidrogenasi nelle piante superiori	9
2.1 Localizzazione e pattern isoenzimatico della GDH	9
2.2 Presenza di un terzo gene GDH in <i>Arabidopsis</i>	12
3. Ruolo fisiologico della GDH	14
3.1 Ruolo anabolico	14
3.2 Ruolo catabolico	16
3.3 Ulteriori studi	17
4. Regolazione della sintesi e dell'attività della GDH	19
Scopo del lavoro	22
Materiali e metodi	24
1. Materiali vegetali e condizioni di crescita	25
1.1 Materiale vegetale	25
1.2 Condizioni di crescita “ <i>in serra</i> ”	25
1.3 Condizioni di crescita “ <i>in vitro</i> ”	26
1.4 Esperimenti “Split Root”	27
2. Estrazione proteine dai tessuti vegetali ed analisi elettroforetica	29
2.1 Preparazione degli estratti	29
2.2 Elettroforesi nativa su gel di poliacrilamide (PAGE)	29
2.3 Determinazione “ <i>in gel</i> ” dell'attività della GDH (Zimogramma)	30
2.4 Saggio di immunoinattivazione della GDH	31
2.5 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)	31
2.6 Western blotting	32
2.6.1 Trasferimento	32

2.6.2	Immunodetection	33
3.	Costruzione di proteine GDH chimeriche ed espressione eterologa.....	35
	in lievito	
3.1	Estrazione dell'RNA e retro-trascrizione	35
3.2	Reazione di amplificazione (PCR).....	35
3.3	Elettroforesi su gel di agarosio	37
3.4	Vettori plasmidici.....	37
3.5	Manipolazione del DNA	39
3.5.1	Reazione di restrizione.....	39
3.5.2	Defosforilazione	39
3.5.3	Reazione di ligazione.....	40
3.5.4	Purificazione del DNA	40
3.6	Cepi batterici e condizioni di coltura.....	40
3.7	Trasformazione di <i>E.coli</i>	41
3.8	Estrazione del DNA plasmidico batterico	41
3.9	Cepi di lievito e condizioni di coltura.....	41
3.10	Trasformazione di <i>S. cerevisiae</i>	42
3.11	Colony PCR.....	42
3.12	Estrazione proteica da <i>S. cerevisiae</i>	43
3.13	Saggio della stabilità termica della GDH.....	44
4.	Tecniche bioinformatiche	45
4.1	Sequence analysis	45
4.2	Protein modeling	45
	Risultati e Discussione	47
1.	Localizzazione organo –specifica dell'isoenzima GDH3 come funzione dello sviluppo della pianta.....	48
1.1	Pattern isoenzimatico della GDH durante lo sviluppo della pianta	49
1.2	Localizzazione stadio florale- e organo florale -specific dell'isoforma 6 γ di <i>A.thaliana</i>	52
1.3	Differente focalizzazione su gel dell'isoforma 6 γ a seconda dell'organo analizzato.....	55

2. Analisi dell'espressione di 6 γ in condizioni di stress	57
2.1 Effetto della starvation d'azoto sull'attività dell'omoesamero 6 γ	57
2.2 Effetto della fonte di carbonio sull'attività dell'omoesamero 6 γ	61
2.3 Analisi immunologica.....	64
3. Induzione chinetina-dipendente dell'attività dell'isoforma 6 γ	66
3.1 Effetto della chinetina sull'induzione dell'attività dell'isoforma 6 γ	67
3.2 Rimozione degli organi riproduttivi.....	68
4. Meccanismo di segnalazione.....	70
4.1 Split Root	70
4.2 Ruolo del glutammato.....	71
5. Analisi filogenetica	75
5.1 Analisi del pattern isoenzimatico della GDH in altre specie appartenenti alla famiglia delle <i>Brassicaceae</i>	75
6. Valutazione della termostabilità degli omoesameri della GDH di <i>A. thaliana</i>	77
6.1 Stabilità termica dei differenti isoenzimi della GDH	78
6.2 Modeling della proteina GDH.....	82
6.3 Espressione eterologa di proteine GDH chimeriche	86
6.4 Analisi dell'intorno amminoacidico del residuo 411.....	89
Conclusioni e Prospettive	91
1. Conclusioni.....	92
1.1 Regolazione dell'espressione dell'omoesamero 6 γ durante lo sviluppo	92
1.2 Regolazione azoto- e citochinina- dipendente dell'attività dell'omoesamero 6 γ	93
1.3 Espressione dell'omoesamero 6 γ nelle <i>Brassicaceae</i>	96
1.4 Termoresistenza.....	96
2. Prospettive.....	99
Bibliografia.....	101
Materiale supplementare.....	117
Ringraziamenti.....	119

ABSTRACT

NAD(H)-glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2) is a very abundant enzyme that exist in different isoenzymatic forms. In *Arabidopsis thaliana* three genes (*GDH1*, *GDH2* and *GDH3*) encodes three different GDH subunits (β , α and γ) that randomly associate to form a complex array of homo- and hetero- GDH hexamers. In this report we have analysed the modification of the GDH isozyme pattern during *Arabidopsis* plant development. In particular our attention was focused on the regulation of the *GDH3* encoded GDH isoforms. For this we take advantage of the availability of single and double GDH mutants impaired in the expression of *GDH1* and/or *GDH2* genes. The physiological role of the GDH3 isoform was investigated in plants subjected to various nutritional and hormonal treatments. Our results suggested a possible role for GDH3 during plant senescence and/or nutrient remobilization processes . We have also analysed the biochemical characteristic of the GDH isoenzymes by evaluating their thermal stability: expression in yeast of WT and mutated GDH1 and GDH3 isoforms indicated that the carboxyl-end of the GDH subunits is involved in the stabilization of the oligomeric structure of the enzyme.

RIASSUNTO

La glutammato deidrogenasi NAD(H)-dipendente (GDH; EC 1.4.1.2) è un enzima abbondante presente in differenti forme isoenzimatiche. In *Arabidopsis thaliana* sono presenti tre geni (*GDH1*, *GDH1* e *GDH3*) che codificano per tre differenti subunità (β , α e γ) in grado di associarsi casualmente per formare omo- ed etero- esameri della GDH. In questo lavoro di dottorato, sono state analizzate le variazioni del pattern isoenzimatico durante lo sviluppo della pianta *Arabidopsis thaliana*. In particolare la nostra attenzione si è concentrata sulla regolazione delle isoforme della GDH codificate da *GDH3*. Per fare questo ci siamo avvalsi della disponibilità di singoli e doppio mutanti della GDH, compromessi nell'espressione dei geni *GDH1* e/o *GDH2*. Il ruolo fisiologico dell'isoforma GDH3 è stato analizzato in piante sottoposte a vari trattamenti nutrizionali e ormonali. I nostri risultati suggeriscono per la GDH3 un possibile ruolo durante la senescenza delle piante e /o durante i processi di rimobilizzazione dei nutrienti. Abbiamo analizzato anche le caratteristiche biochimiche degli isoenzimi della GDH, valutando la loro termostabilità: l'espressione in lievito delle isoforme GDH1 e GDH3 WT o mutate ha indicato che il carbossi- terminale delle subunità della GDH è coinvolto nella stabilizzazione della struttura oligomerica dell'enzima.

INTRODUZIONE

1. METABOLISMO DELL' AZOTO

1.1 Importanza dell'azoto

L'azoto rappresenta uno dei quattro elementi organogeni indispensabili per la vita di tutti gli esseri viventi (gli altri sono carbonio, idrogeno e ossigeno).

Sebbene l'azoto sia uno degli elementi più largamente diffusi in natura, esso è spesso scarsamente disponibile per la nutrizione delle piante e pertanto costituisce un fattore limitante per lo sviluppo e la crescita dei vegetali.

La continua richiesta di questo elemento al fine di aumentare la biomassa e la produttività dei raccolti ha consolidato in agricoltura l'impiego di fertilizzanti azotati per integrare l'alimentazione naturale dal suolo. All'incirca, >100 Mt di fertilizzanti azotati sono aggiunti al suolo in tutto il mondo annualmente (Good and Beatty, 2011).

E' tuttavia ormai noto da diverso tempo come l'abuso di queste sostanze da parte di un'agricoltura di tipo intensiva, abbia un impatto negativo sull'ambiente e , di conseguenza, anche sull'uomo. L'uso massiccio di fertilizzanti, in agricoltura, è diventato un grave problema ambientale che minaccia la salute umana e il benessere in vari modi. Riconducibili alla fertilizzazione chimica sono infatti l'inquinamento da nitrati delle falde acquifere e dei corsi d'acqua e l'aumento del riscaldamento globale, dovuto ad un forte incremento di diossido di azoto nell'atmosfera (Foley *et al.*, 2011; Tilman *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012).

In quest'ottica risulta chiaro quale importanza rivesta la messa a punta di strategie che ottimizzino l'efficienza di assimilazione dell'azoto da parte delle piante, non solo per incrementare la produttività delle specie di interesse agronomico, ma soprattutto per limitare o addirittura accantonare l'uso dei fertilizzanti. Ciò potrebbe essere realizzato, almeno in parte, da una migliore comprensione del metabolismo dell'azoto e della sua regolazione con l'identificazione di possibili geni bersaglio.

In ultima analisi, l'obiettivo è quello di migliorare la resa delle colture in modo da soddisfare la richiesta globale di cibo per la popolazione umana in continuo aumento, senza compromettere irreversibilmente la qualità dei suoli e dell'ambiente in generale. Recenti studi hanno infatti suggerito che la produzione agricola dovrebbe essere circa il doppio di quella attuale per poter soddisfare la domanda prevista associata con l'aumento della popolazione mondiale (FAO, 2009).

1.2 Assimilazione dell'azoto nelle piante

L'azoto è uno dei nutrienti base che condizionano la crescita e lo sviluppo delle piante e la sua assimilazione è un processo piuttosto complesso: si articola in diverse vie che vanno dalla riduzione ad ammonio dei nitrati assorbiti dal terreno tramite specifici trasportatori della radice (Mae T., 1997; Salsac L. *et al.*, 1987), alla fissazione dell'azoto atmosferico, alla fotorespirazione, al metabolismo dei fenilpropanoidi e al catabolismo degli amminoacidi. L'ammonio è l'unica forma in cui l'azoto può essere incorporato nei composti organici.

I vegetali superiori sono incapaci del tutto di utilizzare l'azoto molecolare (N_2) presente nell'atmosfera, anche se alcuni di questi sono stati in grado di instaurare relazioni simbiotiche con microrganismi procarioti del suolo, detti azotofissatori, che sono in grado di fissare l'azoto atmosferico. I batteri azotofissatori sono infatti in grado di convertire l'azoto atmosferico in azoto ammoniacale in strutture particolari della radice detti noduli, mediante un processo di riduzione noto come fissazione biologica. Tali piante possono quindi usare questa via per rifornirsi di azoto sottoforma di ione ammonio il quale è rapidamente assimilato all'interno di composti organici che sono trasportati fuori dai noduli.

Le piante possono invece utilizzare l'azoto presente nel terreno assorbendolo dalle radici come ione nitrato NO_3^- o ione ammonio NH_4^+ . I nitrati sono ridotti a nitriti nel citoplasma

grazie all'attività delle nitrato reduttasi (EC 1.6.6.1) e successivamente ridotti a ione ammonio nel cloroplasto ad opera della nitrito reduttasi (EC 1.7.7.1). L'ammoniaca così formata nel cloroplasto è incorporata, passando attraverso la formazione di glutammina, nel glutammato, grazie a reazioni catalizzate dalla glutammina sintetasi e glutammato sintasi e dalla glutammato deidrogenasi. Il nitrato assorbito dalle radici può essere ridotto ed assimilato nelle radici stesse ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{glutammina}$) o essere trasportato alle foglie come NO_3^- per poi essere ridotto ed assimilato in loco (Anderson and Done, 1978; Oaks *et al.*, 1980; Rogoziński *et al.*, 1990). Il nitrato può anche essere immagazzinato come riserva nei vacuoli delle cellule di ambedue gli organi. In particolari condizioni le piante possono anche assorbire l'azoto dei nitriti (NO_2^-) e quello di sostanze organiche semplici come amminoacidi.

In aggiunta a questo influsso costante di N, c'è un ricircolo di composti azotati che producono ammonio che richiede che questo sia riassimilato. Vi sono diverse reazioni metaboliche interne che producono ammonio tra cui le reazioni del ciclo fotorespiratorio, idrolisi di proteine di riserva e di acidi nucleici.

Nel tessuto fotosintetico delle piante C_3 , come il tabacco (*Nicotiana tabacum*), la quantità di ammonio rilasciato nel ciclo fotorespiratorio, prodotto dalla decarbossilazione ossidativa della Glicina, eccede di circa 10 volte la quantità di ioni originati dalla riduzione primaria del nitrato nelle foglie vegetative (Keys *et al.*, 1978, Givan *et al.*, 1988). Un'altra fonte di NH_4^+ endogeno nelle piante è il processo di deaminazione degli amminoacidi durante l'idrolisi delle proteine (Hörteinstainer and Feller, 2002). L'intensità di questi processi aumenta negli organi senescenti della pianta (in particolare le foglie) e in carenza di zucchero (Brouquisse *et al.*, 1992, Peeters and Van Laere, 1992; James *et al.*, 1993).

Tuttavia è essenziale che l'ammonio, essendo tossico, sia immediatamente riassimilato all'interno di molecole organiche che possono esser utilizzate per il metabolismo della

pianta. Ciò avviene incorporando l'ammonio negli scheletri carboniosi con conseguente formazione di amminoacidi.

Sebbene molti studi biochimici hanno aumentato le nostre conoscenze sul metabolismo dell'azoto nelle piante, gli specifici enzimi coinvolti e i fattori che controllano questo processo sono ancora sconosciuti. Molti enzimi coinvolti nell'assimilazione dell'ammonio si trovano in molteplici forme enzimatiche che si trovano spesso localizzate in differenti compartimenti subcellulari o all'interno di differenti organi o tessuti. Una questione importante è capire se questi enzimi svolgono ruoli sovrapponibili (ridondanti) o distinti. Sempre più frequentemente compaiono dati che cercano di gettare luce su questo problema (Lancien *et al.*, 2000; Hodges, 2002).

Come riportato in precedenza, nelle piante superiori ci sono diversi pathway di assimilazione dell' NH_4^+ che portano alla comparsa di amminoacidi.

La via più importante di organizzazione dello ione negli amminoacidi pare essere rappresentata dal sistema GS/GOGAT, ovverosia quel sistema che vede combinate le attività rispettivamente degli enzimi glutammina sintetasi (EC 6.3.1.2) e glutammato sintasi [presente nelle due forme: Fd_{red} dipendente (EC 1.4.7.1) o NAD(P)H dipendente (EC 1.4.7.14)] per formare la glutammina a partire da NH_4^+ e glutammato, trasferendo poi il gruppo amminico della glutammina all' α -chetoglutarato formando due molecole di glutammato (Lea and Mifflin, 1974; Fentem *et al.*, 1983; Joy *et al.*, 1992; Ireland and Lea, 1999). Una volta incorporato nella glutammina e nel glutammato l'azoto viene incorporato in tutti gli altri amminoacidi attraverso reazioni di transaminazione che richiedono come cofattore il piridossal fosfato. Tuttavia, sembra che altre vie metaboliche potrebbero essere

coinvolte nell'assimilazione dell'ammonio, svolgendo così una funzione complementare al pathway GS/GOGAT.

Una strada alternativa potrebbe essere quella dipendente dall'attività della glutammato deidrogenasi (GDH, EC 1.4.1.2-4), che catalizzando l'aminazione reversibile dell' α -chetoglutarato a glutammato in presenza di NAD(P)H si propone come punto di interconnessione tra il metabolismo dell'azoto e quello del carbonio (Kwinta and Bielawski, 1996; Dubois *et al.*, 2003; Skopelitis *et al.*, 2006; Setien *et al.*, 2013).

2. GLUTAMMATO DEIDROGENASI NELLE PIANTE SUPERIORI

2.1 Localizzazione e pattern isoenzimatico della GDH

L'enzima glutammato deidrogenasi (GDH), coinvolto nell'assimilazione dell'ammonio, è presente in molti organismi. La GDH può presentarsi sia con una struttura tetrameric, tipica degli eucarioti inferiori, come *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Candida albicans* (Britton *et al.*, 1992), sia in forma esamerica presente prevalentemente in batteri, funghi, animali e piante. La forma tetrameric (NAD-dipendente), è costituita da quattro subunità identiche di 115 kDa, mentre quella esamerica, è formata da sei subunità di circa 48 kDa.

La GDH è stata caratterizzata, da un punto di vista biochimico in diverse specie vegetali e nelle piante superiori si presenta in due forme: una forma NAD(H) dipendente, localizzata nei mitocondri delle cellule compagne del floema, ed una NADP(H) dipendente, localizzata nei cloroplasti delle cellule compagne del floema degli organi fotosintetici (Srivastava and Singh, 1987).

Nelle piante superiori sono stati descritti diversi geni che codificano per una glutammato deidrogenasi NAD(H) dipendente (GDH; EC 1.4.1.2) (Dubois *et al.*, 2003).

Grazie ad evidenze genetiche, immunologiche e molecolari (Cammaerts and Jacobs, 1983; Loulakis and Roubelakis-Angelakis, 1990; Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Turano *et al.*, 1997; Ficarelli *et al.*, 1999) si è potuto proporre un modello secondo il quale l'oligomero della GDH, avente peso molecolare compreso tra 208 e 270 kDa, è formato dalla casuale associazione di due subunità α e β di circa 42-45 kD (Turano *et al.*, 1997), codificate rispettivamente, nel caso di *Arabidopsis thaliana*, dai geni *GDH2* e *GDH1* localizzati sullo stesso cromosoma (Turano *et al.*, 1997; Ficarelli *et al.*, 1999; Pavesi *et al.*, 2000; Restivo, 2004). Queste due subunità possono associarsi casualmente e in diverse proporzioni per

formare sette distinti isoenzimi composti da omoesameri o eteroesameri α e β , in base all'organo esaminato o allo stato fisiologico della pianta (Turano *et al.*, 1997; Restivo *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2007).

Le forme isoenzimatiche, che derivano da tale associazione, sono evidenziabili in un profilo nativo a sette bande su un gel di poliacrilammide (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991) in cui il segnale più catodico corrisponde all'omoesamero β , quello più anodico all'omoesamero α mentre le cinque isoforme intermedie si distribuiscono nel mezzo.

Un'analisi filogenetica (Pavesi *et al.*, 2000), che includeva l'allineamento di alcune sequenze GDH di diverse specie di piante (tra cui *A. officinalis*, *A. thaliana* e *N. plumbaginifolia*), ha suggerito che i due geni GDH di *Asparagus officinalis* (*GDHA* e *GDHB*) derivano da un antico evento di duplicazione genica. E' stato evidenziato, nello stesso studio, che i geni *GDH1* e *GDH2* di *A. thaliana*, esibivano un alto livello di similarità con i geni *GDHA* e *GDHB* di *Asparagus officinalis* evidenziando la presenza di due gruppi di geni derivanti da un evento di duplicazione genica a partire da un gene ancestore comune.

Variazioni nelle condizioni colturali e di crescita (presenza/assenza di luce, acqua, azoto e saccarosio) hanno dimostrato di essere in grado di modificare sia la composizione relativa delle isoforme enzimatiche nei diversi tessuti e durante lo sviluppo della pianta, sia il valore dell'attività specifica dell'enzima in *A. thaliana* e in altre specie vegetali (Srivastava and Singh, 1987; Loulakakis *et al.*, 1994; Dubois *et al.*, 2003). Un esempio di tale affermazione, e della esistenza di una molteplicità di forme dell'enzima, è riportato da studi condotti su *Lupinus luteus* in cui la mancanza di saccarosio nel mezzo di coltura sembra essere la causa dell'incremento di attività GDH accompagnato da una modificazione del profilo

isoenzimatico che mostra la presenza di 6 - 7 isoenzimi in più rispetto al normale spettro caratterizzato da 15 - 16 isoenzimi (Lehmann *et al.*, 2010).

Un altro lavoro sempre in *Lupinus luteus* (Lehmann *et al.*, 2011) mostra come il profilo isoenzimatico e l'attività della GDH possano variare a seconda dello stadio di sviluppo della pianta e dell'organo analizzato. In particolare si sono osservati alti valori di attività nei primi stadi di germinazione che decrescono negli ultimi stadi. Nella pianta matura si osservano alti livelli di attività solo nelle radici. Per quanto riguarda il cambiamento del profilo enzimatico si è osservato che sono presenti due isoforme nelle foglie, sei nello stelo, diciassette nei fiori e solo una nelle radici. Questi profili differiscono non solo per il numero di isoenzimi inducibili, ma anche per la mobilità elettroforetica di questi ultimi.

La variabilità isoenzimatica della GDH nel lupino giallo potrebbe infatti essere spiegata o dall'intervento di modificazioni post-traduzionali o dalla presenza di diversi isogeni. Tuttavia, il clonaggio per omologia dei cDNA della GDH ha rivelato l'esistenza di tre tipi di mRNA, due dei quali codificano per subunità di tipo β e uno che codifica per la subunità α dimostrando l'esistenza di tre geni : *GDH1*, *GDH3* e *GDH2* (Lehmann *et al.*, 2011).

Uno studio condotto su *Oryza sativa* mostra la presenza di quattro geni *GDH* nel genoma di tale pianta, tre dei quali codificano per GDH-NADH dipendenti. A differenza di *Arabidopsis thaliana* (come verrà spiegato successivamente), *GDH3* di *Oryza sativa* codifica per una subunità α rendendolo più simile a *GDH2*. I livelli di espressione dei diversi membri della famiglia GDH nel riso, sono stati valutati attraverso analisi di microarray. Il pattern d'espressione mostra che OsGDH1, OsGDH2 e OsGDH4 sono espressi in tutti i tessuti, mentre OsGDH3 è espresso in maniera specifica negli stami e nelle glume (Qiu *et al.*, 2009).

2.2 Presenza di un terzo gene *GDH* in *Arabidopsis*

Il modello generale - derivato inizialmente da osservazioni condotte su *Arabidopsis* - che prevede per la GDH (NADH dipendente) l'esistenza di due geni è quindi difficilmente riconducibile alle evidenze sperimentali sopra riportate. Rappresenta infatti una visione riduttiva che anche l'analisi bioinformatica (possibile grazie al sequenziamento dei genomi di diverse specie vegetali) sconfessa mostrando, per alcune piante, l'esistenza di più di due geni *GDH*.

Più recentemente, grazie anche alla disponibilità di un database di sequenze di *Arabidopsis* (<http://www.Arabidopsis.org/>), è stato identificato un terzo gene, denominato *GDH3*, localizzato su un cromosoma diverso, che presenta una significativa similarità di sequenza, forte indicatore di omologia con *GDH1* e *GDH2* precedentemente identificati (Fontaine *et al.*, 2012). *GDH3* risulta essere il paralogo del gene *GDH1*, e deriverebbe quindi da un evento recente di duplicazione genica.

Inoltre è stato anche dimostrato che il gene *GDH3* viene trascritto attivamente (Yamada *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2009), ma soprattutto codifica per una proteina attiva enzimaticamente (Fontaine *et al.*, 2012).

In particolare *GDH3* codifica per la subunità γ che può assemblarsi a formare un oligomero 6γ GDH3 attivo, oppure può assemblarsi in eteroesameri con le subunità α e β . L'omoesamero γ nel profilo nativo si trova in una posizione ancora più anodica rispetto all'omoesamero α . In condizioni di crescita idroponica GDH3 si esprime nelle radici, sia in fase di rosetta che durante la fioritura (Fontaine *et al.*, 2012).

Questi ultimi risultati suggeriscono quindi come sia le proprietà biochimiche che la funzione fisiologica della GDH devono essere riesaminate (Fontaine *et al.*, 2013)

Sebbene il genoma di *Arabidopsis thaliana* sia considerato uno dei più compatti tra le piante terrestri (Proost *et al.*, 2011) il fatto che diverse famiglie di geni, cioè gruppi di sequenze di DNA che condividono un elevato livello di somiglianza, sono state mantenute durante l'evoluzione, lo rende interessante. In una specie come questa, una perdita di geni ridondanti, come quelli codificanti per diversi isoenzimi, potrebbe essere prevista. Tuttavia, generalmente si ritiene che la duplicazione genica abbia un ruolo importante nel fornire materiale genetico per nuove funzioni biologiche, e nell' aumentare la resistenza nei confronti delle mutazioni (De Smet and Van de Peer, 2012)

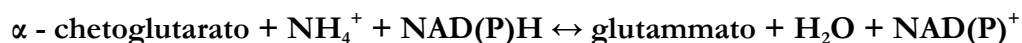
D'altra parte, la conservazione delle copie duplicate dello stesso gene suggerisce che la funzione fisiologica delle proteine o degli enzimi codificati dal gene corrispondente è di grande importanza. Anche se generalmente si fa ricorso agli strumenti della genomica comparativa per far luce sul ruolo dei geni duplicati, risulta necessario condurre un'analisi diretta della regolazione dei geni duplicati e un'analisi del ruolo fisiologico dei prodotti di traduzione corrispondenti, per arrivare a comprendere il motivo della loro permanenza nel genoma della specie studiata.. In *Arabidopsis*, la presenza di tre geni codificanti per la glutammato deidrogenasi NAD(H)- dipendente illustra la complessità di una funzione biologica ridondante.

Inoltre, anche se negli ultimi anni sono stati compiuti progressi significativi nel comprendere il ruolo fisiologico della GDH a livello dell'intera pianta (Turano *et al.*, 1997), è necessario condurre uno studio in più per comprendere appieno la regolazione della sintesi dei diversi isoenzimi che si sospetta possa dipendere da un complesso di segnali interni ed esterni che si originano durante lo sviluppo della pianta.

La presenza di più isoforme e la forte conservazione evolutiva, possono quindi indicare che tale enzima abbia un ruolo non secondario nella fisiologia e nello sviluppo delle piante.

3. RUOLO FISIOLÓGICO DELLA GDH

Questo enzima catalizza l'amminazione reversibile dell' α - chetoglutarato in glutammato:



La GDH costituisce dunque un punto di connessione tra il metabolismo dell'azoto e quello del carbonio (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1996; Srivastava and Singh, 1987; Kwinta *et al.*, 1998) e potrebbe teoricamente sia incorporare l'azoto nei composti organici sia rilasciare NH_4^+ e scheletri carboniosi.

Anche se la funzione e la regolazione della GDH è ben conosciuta nei batteri (Atkinson, 1969), lievito (Magasanik, 1992), animali (Frigerio *et al.*, 2008), e funghi ectomicorrizici (Morel *et al.*, 2006), sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire pienamente il ruolo fisiologico dell'enzima NAD(H)-dipendente nelle piante (Dubois *et al.*, 2003; Tercé-Laforgue *et al.*, 2004a; Jaspard, 2006). In un primo tempo era stata avanzata un'ipotesi che prevedeva per la GDH un ruolo anabolico ridondante in particolari condizioni di stress che portavano ad un aumento dei livelli di ammonio, o durante processi fisiologici come germinazione e senescenza. L'ulteriore possibilità è che la GDH, mediante la conversione dell'amminoacido glutammato in α -chetoglutarato, possa in condizioni di stress nutrizionale, rifornire di scheletri carboniosi il ciclo degli acidi tricarbossilici e quindi svolgere un ruolo catabolico.

3.1 Ruolo anabolico

Sebbene sia ampiamente accettato che oltre il 95% dell'ammoniaca disponibile alle piante superiori è assimilata attraverso il sistema della GS / GOGAT (Lea and Mifflin, 2011), alcuni autori hanno sostenuto che la NADH-GDH potrebbe svolgere un ruolo

complementare a questo pathway GS/GOGAT nell'assimilazione dell'ammonio quando la concentrazione di quest'ultimo nella cellula è notevolmente aumentata, sia in seguito all'applicazione esterna (Yamaya and Oaks, 1987; Oaks, 1995; Melo-Oliveira *et al.*, 1996), o come il risultato di perturbazioni metaboliche causate ad esempio da stress salino (Skopelitis *et al.*, 2006) o ipossia (Limami *et al.*, 2008).

Un altro gruppo di studi (Skopelitis *et al.*, 2006) mostra che l'ammonio esogeno e il suo accumulo nel citosol, in tabacco e vite, provocano la formazione delle ROS (specie reattive dell'ossigeno). Secondo questo studio il gene *GDHA* (omologo del gene *GDH2* di *A. thaliana*) nelle piante verrebbe indotto dalla presenza dei ROS, favorendo la formazione delle isoforme anioniche (arricchite in subunità α) e dell'attività aminante dell'enzima: la GDH quindi detossificherebbe gli alti livelli di ammonio intracellulare generato dall'attività proteolitica indotta da stress. Viene avvalorato il ruolo degli isoenzimi anionici come deputati alla risposta allo stress ossidativo, suggerendo ruoli fisiologici differenti per le diverse forme isoenzimatiche.

In uno studio sulla GDH di *Medicago truncatula* (Limami *et al.*, 2008), attraverso un'analisi di GC-MS, si è potuto stabilire che: fornendo alle piantine ammonio marcato a basse concentrazioni, l'azoto non veniva incorporato negli amminoacidi in presenza di inibitori della GS; ad alte concentrazioni di ammonio, in presenza di inibitori, l'azoto veniva invece incorporato in tre amminoacidi, glutammato, aspartato ed alanina. Questo risultato suggerisce che in assenza dell'attività della GS, a concentrazioni elevate di ammonio, il glutammato potrebbe essere sintetizzato attraverso l'attività aminante della GDH.

Nel 2004 un gruppo di ricerca (Nolte *et al.*, 2004) ha proposto un possibile ruolo anabolico della GDH mettendo in evidenza l'esistenza di una correlazione tra l'espressione della GDH e la resistenza delle piante al glufosinato. Questo erbicida è un analogo all'acido L-

glutammico, che porta alla morte delle piante poichè provoca l'inibizione irreversibile della GS. Le conseguenze di questo blocco comportano l'accumulo di ammonio, l'inibizione della sintesi degli amminoacidi e della fotosintesi. L'attività della GDH e la resistenza all'erbicida risultano essere, secondo questo gruppo di lavoro, correlate in quanto quest'ultima può essere incrementata sovraesprimendo il gene NADP-GDH di *E. coli*. Questa evidenza è quindi a favore di un ruolo anabolico della GDH.

3.2 Ruolo catabolico

Tuttavia la maggior parte degli studi metabolici condotti in vivo hanno dimostrato chiaramente che, in piante superiori, la funzione principale dell'enzima è quella di fornire scheletri carboniosi sotto forma di α -chetoglutarato, in condizione di stress nutrizionale, per il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) al fine di produrre energia, svolgendo così anche un ruolo catabolico (Fontaine *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1995; Glevarec *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Labboun *et al.*, 2009).

Questa ipotesi è supportata da evidenze sperimentali che hanno dimostrato come l'espressione della GDH venga incrementata in piante sottoposte a stress da buio (Srivastava and Singh, 1987) o da privazioni di fonti di carbonio (Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Restivo, 2004). Un recente studio di un gruppo di ricerca canadese (Miyashita and Good, 2008) mette in evidenza che linee mutanti di *Arabidopsis thaliana* (doppio mutante *gdb1-2*) mostrano una maggiore sensibilità alla carenza di fonti di carbonio e alla carenza di luce. La presenza di questo fenotipo condizionale supporta il ruolo catabolico della GDH ipotizzando che essa, in condizioni di deficit di carbonio, sia appunto in grado di rifornire scheletri carboniosi alla via respiratoria al fine di produrre energia. Tuttavia i terreni di coltura utilizzati in tale studio erano ricchi di ammonio il che non permette di escludere che

l'effetto osservato possa dipendere almeno in parte dal suo effetto tossico in condizioni di carenza di fonti di carbonio (alterazione del rapporto C/N).

Anche in *Lupinus luteus* (Lehmann *et al.*, 2010), in mancanza di saccarosio nel mezzo di crescita, l'incremento di attività GDH potrebbe rappresentare una via alternativa per la produzione di energia. L'attività catabolica della GDH sembra incrementare l'accumulo dell' α -chetoglutarato, sopperendo alla mancanza degli scheletri carboniosi richiesti dal ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA).

3.3 Ulteriori studi

Altri ricercatori (Purnell and Botella, 2007) si sono concentrati sul ruolo dell'isoforma 6β dell'enzima: in mutanti di tabacco sovraesprimenti la subunità β è stata valutata la variazione nell'assimilazione di NH_4^+ radiomarcato in presenza di inibitori del sistema GS/GOGAT. Nel corso di questa indagine è stato valutato l'accumulo di NH_4^+ in foglie e radici: nelle foglie lo ione si accumula perché l'isoforma 6β non partecipa alla riassimilazione dell'ammonio fotorespiratorio e nelle radici al contrario perché la stessa catabolizza il glutammato scindendolo e formando ammonio.

In un altro studio, per comprendere la funzione fisiologica della GDH, coinvolta o nell'assimilazione dell'ammonio o nel rifornimento dell' α -chetoglutarato, sono stati utilizzati mutanti di *Nicotiana tabacum* overesprimenti i due geni endogeni *GDHA* e *GDHB* (Labboun *et al.*, 2009). Una tecnica importante per evidenziare il flusso dei metaboliti (spettroscopia a risonanza magnetica nucleare, NMR), ha potuto dimostrare che, quando i due geni *GDH* erano overespressi, individualmente o simultaneamente, le foglie delle piante transgeniche non sintetizzavano glutammato in presenza di ammonio se la

glutammina sintasi (GS) era inibita da inibitori specifici. E' stato confermato che la funzione primaria della GDH è quella di deaminare il glutammato e che l'ammonio rilasciato da tale deaminazione viene riassorbito dalla GS, indicando la presenza di un riciclo di ammonio e glutammato; probabilmente per mantenere il livello stazionario di glutammato, originato dal ciclo GS/GOGAT, occorre la presenza della reazione di deaminazione mediata dalla GDH. L'ammonio rilasciato dalla deaminazione del glutammato viene riassorbito dalla GS contribuendo alla formazione di glutammina, un amminoacido donatore per la formazione di altri amminoacidi come l'asparagina. Questi risultati suggeriscono che l'enzima GDH, in associazione con la NADH-GOGAT, contribuisce al controllo dell'omeostasi del glutammato, amminoacido avente un ruolo metabolico centrale nei pathway di assimilazione del carbonio e dell'azoto.

Inoltre è stato anche dimostrato che la GDH può svolgere un ruolo importante nel catabolismo degli amminoacidi nelle piante durante la senescenza e la rimobilizzazione dei nutrienti (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Fontaine *et al.*, 2012).

La maggior parte degli studi recenti eseguita sulla NADH-GDH nelle piante superiori sono concentrati sul decifrare il ruolo dei 7 isoenzimi formati dalle subunità α e β e pertanto ancora poco si conosce sulla funzione dell'isoforma γ .

E' importante sottolineare che la maggior parte dei dati raccolti fino ad ora sono basati su esperimenti "*in vitro*" e che questi potrebbero quindi non rispecchiare la situazione "*in vivo*".

4. REGOLAZIONE DELLA SINTESI E DELL'ATTIVITA' DELLA GDH

Con l'uso di mutanti singoli (*gdb1* e *gdb2*) e doppio (*gdb1-2*) mutanti GDH in cui è compromessa l'espressione della/e subunità β e/o α è stato in precedenza evidenziato che la regolazione della trascrizione dei geni è coinvolta nella determinazione del pattern isoenzimatico osservato nei diversi organi di *A. thaliana* (Fontaine *et al.*, 2013).

Studi condotti dal nostro gruppo di ricerca in collaborazione con quello Francese su foglie e steli di *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana plumbaginifolia* (Fontaine *et al.*, 2006) hanno portato a ipotizzare un meccanismo compensatorio per mezzo del quale vi è una maggiore espressione della subunità α negli steli quando l'espressione della subunità β è impedita nelle foglie, e, viceversa, una maggiore espressione della subunità β nelle foglie nel momento in cui l'espressione della subunità α viene repressa a livello degli steli. E' stato ipotizzato che esista un segnale che, circolando nel floema, modula la composizione isoenzimatica della GDH in foglie e stelo. La regolazione delle diverse isoforme sarebbe quindi più complessa e modulabile in funzione delle diverse esigenze della pianta.

Più recentemente si è ipotizzato che i meccanismi di compensazione, che coinvolgono la reciproca regolazione tra GDH1, GDH2 e GDH3 modulino l'attività complessiva della GDH e determinino la specificità del profilo isoenzimatico (Fontaine *et al.*, 2013, 2012). Tuttavia la regolazione dell'attività delle isoforme GDH può anche dipendere da differenti (ad esempio post-trascrizionali) meccanismi di regolazione.

Un esempio rappresentativo della copresenza di molteplici meccanismi regolativi è fornito dalla GDH umana (hGDH) che, come nelle piante, ha una struttura esamerica (Shashidharan *et al.*, 1997). Le subunità hGDH sono codificate da due geni, *hGDH1* e *hGDH2*, dando luogo a diverse isoforme con localizzazione tessuto specifica e stabilità

termica differente (Shashidharan and Plaitakis, 2014). Inoltre nel cervello umano sono stati rilevate diverse isoproteine GDH differenti in massa molecolare e punto isoelettrico (Plaitakis *et al.*, 2000).

Le hGDH sono soggette ad una regolazione allosterica complessa attraverso vari ligandi come ADP, GTP e L-leucina dipendente anche (ma non esclusivamente) dalla presenza di una particolare struttura, denominata "antenna", non presente nella GDH di piante e batteri (Li *et al.*, 2012). Inoltre è stato ipotizzato un diverso tipo di interazione all'interfaccia delle subunità dell'enzima hGDH, in grado di fornire un sito allosterico nuovo per la L-leucina che porta ad un più fine meccanismo per controllare l'attività enzimatica (Li *et al.*, 2012).

Nelle piante, non è stata fino ad ora riportata alcuna prova di regolazione allosterica dipendente da ADP, GTP o leucina. Tuttavia, nei batteri, la cui GDH è priva di una struttura simile ad un'antenna, sono stati riportati esempi di regolazione allosterica omo- ed etero-tropica dell'enzima (Tomita *et al.*, 2010).

È interessante notare che, sequenze amminoacidiche della GDH di pianta sono più simili a quelle degli archeobatteri che alle controparti eucariotiche (Pavesi *et al.*, 2000; Syntichaki *et al.*, 1996). Di conseguenza è stata osservata una maggiore stabilità termica delle GDHs di pianta rispetto a quella degli eucarioti inferiori e superiori (Pavesi *et al.*, 2000; Syntichaki *et al.*, 1996).

Così non si può escludere che le piante possano avere sviluppato, oltre che ad un controllo trascrizionale dell'espressione genica, un meccanismo post-traduzionale (anche se diversi da quelli precedentemente descritti per hGDH) per regolare l'attività enzimatica della GDH.

In uno studio sulla GDH di *Medicago truncatula* (Limami *et al.*, 2008) è stato evidenziato che l'espressione del *GDH1* endogeno veniva up-regolata in condizioni di ipossia, mentre l'attività enzimatica determinata in vitro o attraverso un gel nativo (PAGE), era down-

regolata comparata al controllo. Questa discrepanza indica che la GDH è soggetta ad una down-regolazione post-traduzionale in condizioni di ipossia.

Inoltre è stato ipotizzato che la GDH richieda una regolazione più fine di quella che può essere fornita dal controllo trascrizionale dei geni e di un meccanismo di risposta rapido (e quindi a livello post-traduzionale) per far fronte al passaggio dallo stress ad una fase di recupero post-stress (Limami *et al.*, 2014, 2008). Un possibile bersaglio per un meccanismo di regolazione post-traduzionale ad esempio, può essere, l'assemblaggio delle subunità della GDH per formare un esamero attivo e la sua successiva stabilità in un ambiente cellulare specifico.

In questo senso, anche se una molteplicità di dati sperimentali riguardanti l'attività di vari effettori sulla variazione del pattern isoenzimatico della GDH sono stati riportati in letteratura, ancora poco si sa nelle piante relativamente ai meccanismi biochimici che permettono l'assemblaggio delle subunità della GDH. Infatti, a parte alcune interessanti eccezioni, (Osuji *et al.*, 2003, 1999, 1997), non sono disponibili sufficienti informazioni che possano permettere di formulare delle ipotesi non meramente speculative su questi meccanismi.

SCOPO DEL LAVORO

Come si evince da quanto descritto precedentemente nell' *Introduzione*, l'incertezza circa il ruolo fisiologico che la GDH riveste nel metabolismo è in parte dovuta al fatto che la stragrande maggioranza degli studi effettuati nel tentativo di chiarirne la funzione, sono stati condotti sui germogli di piante (Cammaerts and Jacobs, 1985; Turano *et al.*, 1997; Miyashita and Good, 2008), mentre studi successivi hanno rilevato che i valori più alti di attività enzimatica si riscontrano nelle radici della maggior parte delle specie vegetali, tra cui *Arabidopsis* (Fontaine *et al.*, 2012). Inoltre, si è mostrato che gli studi effettuati precedentemente in *Arabidopsis* utilizzando sia i singoli mutanti *gdb1* e *gdb2* (Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Fontaine *et al.*, 2006) o sul doppio mutante *gdb1-2* (Miyashita and Good, 2008), non avevano tenuto in considerazione l'esistenza di un terzo gene (*GDH3*) la cui espressione determina la sintesi di una ulteriore subunità (γ) che assemblandosi nell'oligomero da origine all'attività di una terza isoforma (6γ ; *GDH3*) nelle radici, come messo in evidenza recentemente da Fontaine e collaboratori nel 2012 (Fontaine *et al.*, 2012). Questi autori avevano suggerito che la presenza dell'isoforma 6γ nei differenti organi, tessuti o cellule potesse essere regolata da segnali nutrizionali e di sviluppo non ancora completamente compresi.

L'obiettivo del mio lavoro di tesi durante il dottorato è stato quello di contribuire a fornire dati utili a chiarire il ruolo del sistema isoenzimatico della GDH nelle piante e in particolare il ruolo dall'isoforma 6γ di *Arabidopsis*, considerando che, al momento in cui ho iniziato il mio lavoro, era nota unicamente l'esistenza della sequenza genica (*GDH3*) nel genoma di *Arabidopsis thaliana* ed erano disponibili solo evidenze preliminari della presenza di una

nuova isoforma (che si rivelerà successivamente essere l'isoenzima 6γ) nelle radici di piante senescenti.

Ho pertanto analizzato le modificazioni del profilo isoenzimatico della GDH di *Arabidopsis thaliana*, tenendo conto che la subunità γ può assemblarsi in eteroesameri con le subunità α e β (Fontaine *et al.*, 2013), e la sua regolazione durante le fasi di sviluppo. Inoltre la regolazione dell'attività dell'isoforma 6γ è stata esaminata, osservando cambiamenti nella sua distribuzione nei diversi organi in risposta a segnali metabolici e ormonali. Si è cercato inoltre di ottenere informazioni sulla stabilità delle interazioni tra le subunità, in quanto possibile bersaglio di un meccanismo di regolazione post-traduzionale, usando come parametro la maggiore o minore sensibilità al trattamento termico del complesso oligomerico.

È stato inoltre condotto un tentativo di analisi filogenetica preliminare valutando la presenza dell'isoforma 6γ in alcuni ecotipi e specie del genere *Arabidopsis* e in alcune altre specie strettamente correlate appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*.

MATERIALI e METODI

1. MATERIALE VEGETALE E CONDIZIONI DI CRESCITA

1.1 Materiale vegetale

Oltre alla linea WT di *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia), sono state utilizzate le due linee *gdb1* (Accession Number: N542736) e *gdb2* (Accession Number: N602709) di *Arabidopsis thaliana*, fornite dal Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). Queste due linee sono dei mutanti inserzionali rispettivamente nel sesto esone del gene *GDH1* e nel quinto esone del gene *GDH2*. E' stata inoltre utilizzata la linea doppio mutante *gdb1-2*, ottenuta mediante incrocio dei due mutanti singoli e quindi mutante inserzionale sia in *GDH1* che in *GDH2*.

Inoltre sono state utilizzate diverse specie di *Brassicaceae*, elencate nella **Tabella 1** (nel *Materiale Supplementare*).

1.2 Condizioni di crescita "in serra"

Le piante sono state coltivate in vasi di plastica, contenenti una miscela di terreno/vermiculite in rapporto 3/1, fornita da un rivenditore locale (Consorzio Agrario, Parma, Italia). La miscela è stata preventivamente autoclavata (121°C; 20 minuti), e i vasi posti in una cella climatizzata (camera di crescita) a 25°C con un'umidità relativa del 50-70% con fotoperiodo estivo (cicli luce/buio di 16/8 ore) e intensità luminosa di 200 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Le piante sono state regolarmente irrigate con acqua demineralizzata per mantenere l'umidità del suolo.

Prima della semina, la superficie dei semi è stata sterilizzata per 20 min in una soluzione acquosa diluita di ipoclorito di sodio (concentrazione finale 0,5% (v/v)) contenente 0.1% (v/v) Tween20. I semi sono poi stati lavati tre volte con acqua sterile demineralizzata e posti per due giorni al buio a 4°C. I campionamenti dei diversi tessuti/organi delle piante (*A. thaliana* L, ecotipo Columbia è stata la più usata per gli esperimenti relativi allo studio

dello sviluppo e degli effetti nutrizionali) sono stati effettuati a diversi tempi durante la crescita della pianta da 7 DAS (Days After Sowing) allo stadio in cui i fiori sono completamente sviluppati (35 DAS). I materiali raccolti, sono stati pesati, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Per quanto riguarda le radici, gli eventuali residui di suolo sono stati rimossi grazie ad una serie di lavaggi con acqua demineralizzata. Le radici sono state prima asciugate su un foglio di carta assorbente e poi congelate in azoto liquido e conservate a -80°C. Gli steli fiorali sono stati raccolti a diversi stadi di differenziamento; 1) quando i boccioli fiorali erano ancora chiusi, 2) quando 3-5 fiori erano completamente aperti e 3) quando le silique erano completamente formate.

Per poter campionare gli organi interni del fiore, i boccioli sono stati raccolti dalle piante cresciute in terreno e vermiculite, dissezionati allo stereomicroscopio e poi congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

Per ottenere la fioritura di *A. halleri*, piantine di 28-35 giorni sono state incubate per due settimane in camera termostata a 4°C con luce fornita da lampade fluorescenti. Alla fine di questo periodo di vernalizzazione, le piante sono state trasferite in una camera con ambiente controllato usando le stesse condizioni di crescita usate per *A. thaliana*.

I differenti stadi di sviluppo della pianta sono stati definiti in accordo con quanto riportato nell'Arabidopsis electronic fluorescent protein browser;

(http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi).

1.3 Condizioni di crescita “in vitro”

Per lo studio degli effetti delle variazioni delle condizioni nutrizionali, le piante sono state coltivate in condizioni axeniche a 25°C, in terreno ½ MS (Murashige&Skoog; Duchefa; #M0222, Haarlem, The Netherlands), agar 0,8% (w/v) e saccarosio 2% (w/v). La semina è

stata effettuata con una pipetta, appoggiando delicatamente il puntale sulla superficie del terreno così da far scivolare un seme alla volta. Le piante sono state fatte crescere a 25°C con un fotoperiodo di 16/8 ore luce/buio ($150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Dopo 7 giorni dalla semina sono state rimosse dal terreno solido e trasferite in piastre Petri riempite con 20 ml di terreno 1/5 MS contenente 1% di saccarosio (adattamento a condizioni di coltura in liquido).

Dopo 2 giorni le piante sono state rapidamente lavate con acqua bidistillata sterile e trasferite in un terreno contenente o privo della fonte di azoto (NH_4NO_3 e KNO_3) e di carbonio (saccarosio 1%) e fatte crescere per i tempi indicati in ogni esperimento. Lo svolgimento di alcuni esperimenti prevedeva anche l'aggiunta di chinetina ($20 \mu\text{M}$) o glutammato ($50 \mu\text{M}$, 1mM e 5mM) o glutammina ($50 \mu\text{M}$, 1mM e 5mM).

Le condizioni di crescita al buio sono state ottenute avvolgendo le piastre con un foglio di alluminio.

Per l'analisi dei campioni, le piante sono state rimosse dalle piastre Petri e trattate come descritto per le piante cresciute in suolo.

1.4 Esperimenti “Split Root”

Subito dopo la germinazione dei semi, usando un metodo descritto in letteratura (Hubberten *et al.*, 2012), sono stati tagliati gli apici della radice primaria e le piante sono state fatte crescere in verticale fin quando le radici non hanno raggiunto la lunghezza desiderata. Questo metodo permette di accelerare la crescita e la biforcazione dell'apparato radicale.

Una volta raggiunta la lunghezza desiderata, le piante sono state lavate con acqua e posate a cavallo di 2 piastre come mostrato in **Figura 1** per permettere ad una parte di radice di

crescere in un terreno contenente N e l'altra parte in un terreno privo. Entrambi i terreni contengono saccarosio 1% (w/v).

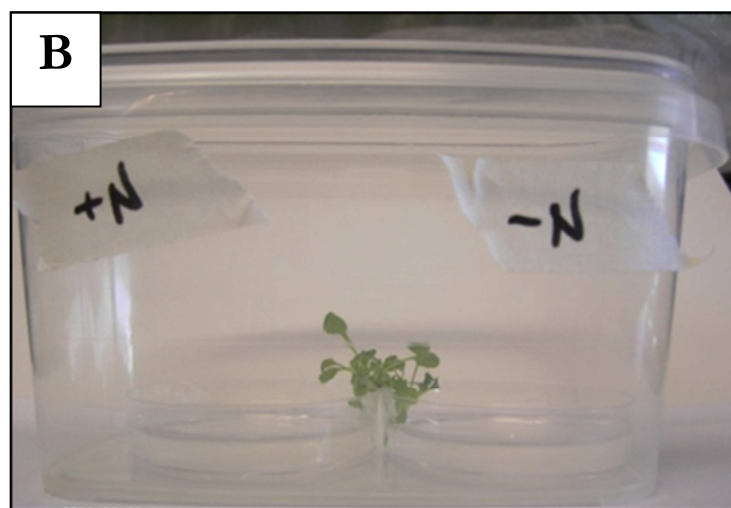
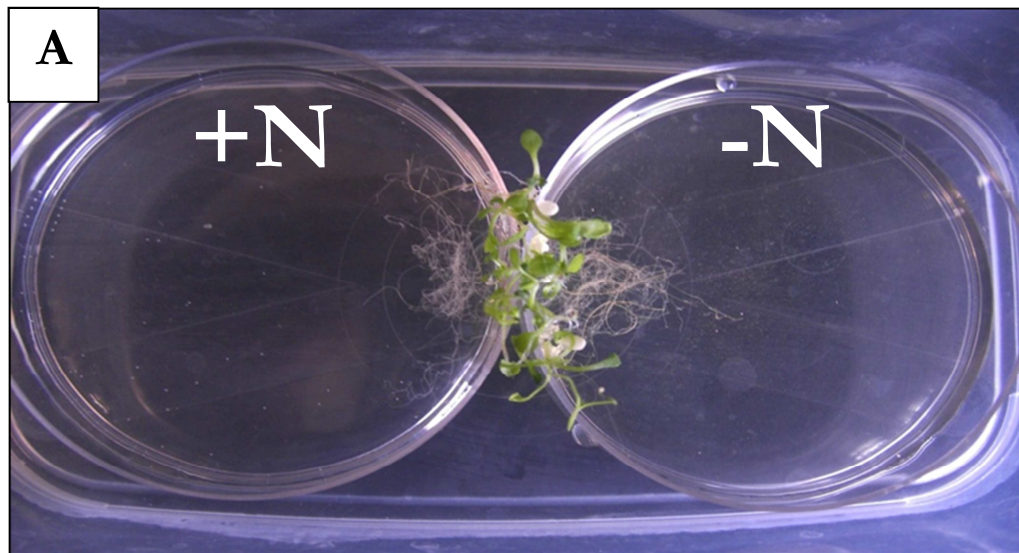


Figura 1: Vista dall'alto (A) e frontale (B) del sistema Split Root

2. ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DAI TESSUTI VEGETALI ED

ANALISI ELETTROFORETICA

2.1 Preparazione degli estratti

Le proteine sono state estratte dai differenti tessuti con un metodo già descritto (Restivo *et al.*, 2004; Fontaine *et al.*, 2006). Brevemente 100 mg di tessuto, già campionati e congelati in azoto liquido, sono stati polverizzati in provetta Eppendorf da 1.5 ml con appositi micropestelli di plastica, precedentemente raffreddati in azoto liquido ed omogeneizzati con 200 µl di tampone specifico per l'estrazione della GDH così composto: Tricina 100 mM (pH 8.0), MgSO₄ 10 mM, β-mercaptoetanololo 0.2% (v/v), PMSF (Phenylmethanesulphonyl fluoride) 0.5 mM, CaCl₂ 40 mM, PVP (Polyvinylpyrrolidone) 0.5% (w/v), EDTA 1 mM, Triton X-100 0.05% (v/v). L'omogenato tenuto in ghiaccio è stato centrifugato a 15.000 x g per 20 minuti a 4°C e il surnatante utilizzato per rilevare l'attività della GDH in gel o conservato a -80°C fino al momento dell'uso.

2.2 Elettroforesi nativa su gel di poliacrilammide (PAGE)

La rilevazione in gel dell'attività della NAD-GDH è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Loulakakis (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990), apportando alcune piccole modifiche.

Il gel utilizzato, di tipo discontinuo, si compone di due parti: uno stacking-gel superiore, che compatta le proteine e un running-gel sottostante, che permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare e al loro punto isoelettrico.

	RUNNING GEL (5%)	STACKING GEL (4%)
Acqua bidistillata	2265 μ l	1515 μ l
Tris-HCl 1 M(pH 8.8)	1870 μ l	-
Tris-HCl 0.5 M(pH 6.8)	-	625 μ l
Acrylamide (30%T; 2,67%C)	835 μ l	335 μ l
AmmonioPersolfato10% (APS)	25 μ l	20 μ l
TEMED	5 μ l	3 μ l

I campioni (10 μ l del surnatante ottenuto dall'estrazione del tessuto, come descritto nel paragrafo 2.1 dei *Materiali e Metodi*) da caricare sono stati colorati con Sample Buffer 6X (Tris HCl 0.5M pH 6.8; glicerolo 10%; bromofenolo blu 1%).

La corsa elettroforetica è stata condotta in una cella Mini-PROTEAN III (BIORAD) utilizzando un running buffer TrisGlicina (Tris-HCl 25 mM, glicina187 mM) raffreddato in ghiaccio per prevenire il surriscaldamento del gel in seguito al passaggio di corrente. Il voltaggio, inizialmente mantenuto a 80 V, viene portato a 120 V non appena il fronte di migrazione è entrato nel running-gel. La corsa viene arrestata dopo 30 minuti dall'uscita del colorante dal gel.

Terminata la corsa il gel, privato dello stacking, è stato sottoposto al trattamento per la rilevazione dell'attività GDH.

2.3 Determinazione “in gel” dell'attività della GDH (Zimogramma)

L'attività enzimatica della GDH-NADH è stata rilevata sottoponendo il gel ad una opportuna soluzione di colorazione contenente Tris-HCl 100 mM pH 8.8; glutammato di sodio 53 mM; NAD 0.7 mM; Nitro Blu Tetrazolium (NBT) 0.3 mM; Phenazina

metasolfato 0.03 mM. A questa miscela è stata aggiunta una soluzione di agarosio (BioRad, Hercules, CA, USA) alla concentrazione finale di 0.4% (w/v). Dopo aver mescolato, il tutto è stato versato su gel in modo da coprirne tutta la superficie. La reazione di colorazione è avvenuta in un termostato a 37°C al buio per il tempo necessario ad ottenere un profilo soddisfacente. Il gel è stato fotografato con una fotocamera digitale.

Per la quantificazione del segnale, è stato utilizzato un sistema di analisi di immagine costituito da macchina fotografica digitale Kodak EDAS 120 e dal relativo programma informatico 1D Image Analysis Software.

Sia il PAGE che la rilevazione dell'attività in gel della GDH sono state eseguite almeno in tre repliche con piante differenti per ogni esperimento. Sono stati ottenuti risultati comparabili per ogni replica.

2.4 Saggio di immunoinattivazione della GDH

Per verificare la specificità della reazione di colorazione per la GDH, estratti proteici sono stati preincubati, prima del caricamento su gel, con uno specifico anticorpo anti-GDH. L'anticorpo anti-GDH (0.15 µl) diretto contro la GDH di vite (gentilmente fornitoci dalla Prof.ssa Roubelakis-Angelakis K.A. (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990), è stato incubato in ghiaccio per 1 h con 20 µl di estratto proteico di pianta. Prima di essere caricata su gel, questa miscela è stata centrifugata a 12000 x g per 5 min.

2.5 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)

Il gel utilizzato, di tipo discontinuo, si compone di due parti: uno stacking-gel superiore e un running-gel sottostante.

	RUNNING GEL (12%)	STACKING GEL (4%)
Acqua bidistillata	1068 μ l	1512 μ l
Tris-HCl 1M (pH 8.8)	1870 μ l	-
Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	-	625 μ l
Acrylamide (30%T; 2,67%C)	2000 μ l	333 μ l
Sodio Dodecil Solfato 20% (SDS)	25 μ l	12,5 μ l
Ammonio Persolfato 10% (APS)	30 μ l	15 μ l
TEMED	7 μ l	5 μ l

I campioni, dopo aggiunta del Sample buffer 6X (400 μ l Tris-HCl 0.5 M PH 6.8, 300 μ l glicerolo 100%, 300 μ l β -mercaptoetanol, 20 μ l Bromofenolo blue, 120 mg di SDS), sono stati trattati per 4 min a 95°C, centrifugati per 1 min a 12000 x g e infine caricati su gel, avendo cura di caricare anche un marcatore di peso molecolare.

La corsa è stata condotta in una cella Mini-PROTEAN III (BIORAD) in un running buffer Tris-Glicina (come per la corsa nativa) con l'aggiunta di 1.5 ml di SDS 20% ogni 300 ml.

Il voltaggio, è stato mantenuto costante a 200 V durante tutta corsa (~ 45 minuti) fino alla fuoriuscita del colorante. A questo punto in base all'utilizzo successivo si può procedere con la colorazione del gel per rilevare il profilo proteico o con la sua preparazione per il Western blotting.

2.6 Western blotting

2.6.1. Trasferimento

Terminata la corsa elettroforetica il gel, privato dello stacking, è stato trasferito in un tampone di blotting, composto da Tris-Glicina 1X e metanolo al 20%, per almeno 10 min.

Nel caso di un gel nativo, questo prima del lavaggio nel tampone di blotting, deve essere immerso nel tampone di corsa contenente SDS per 10 min.

Si è proceduto poi con la fase di blotting, che prevede il trasferimento delle proteine dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa, alla quale aderiscono in seguito all'applicazione di un campo elettrico trasversale (orizzontale). La membrana di nitrocellulosa è stata posta per 10 min in acqua bidistillata per attivarla.

L'assemblaggio del sandwich di blotting avviene all'interno di una vaschetta contenente il blotting buffer in modo da saturare con il tampone tutte le componenti del sandwich.

E' stato posto il lato nero del supporto sul fondo della vaschetta e il lato chiaro appoggiato alla parete e in sequenza sono state messe la spugna sul lato nero, un pezzo di carta Whatman 3MM, il gel, la membrana, un altro pezzo di carta Whatman 3MM bagnato di tampone e infine un'altra spugnetta satura di tampone. Ad ogni passaggio è stato rullato il sandwich con una provetta di vetro per eliminare le bolle d'aria. E' stato chiuso il tutto facendo scorrere il fermo così da bloccare il sandwich. E' stato inserito il sandwich nel suo alloggiamento nella cella insieme ad un elemento raffreddante, ad un'ancoretta magnetica e al blotting buffer precedentemente raffreddato. La cella è stata posta su un agitatore magnetico. Il trasferimento è stato condotto a 100 V per un'ora. Dopo aver smontato il sandwich, la membrana è stata prelevata e colorata utilizzando il Rosso Ponceau 0.1% (w/v) in Acido acetico 5% per verificare il trasferimento delle proteine.

2.6.2 Immunodetection

La membrana è stata incubata per 1 ora in 20 ml di blocking solution [Phosphate buffered Saline (PBS) 1X, latte in polvere no fat al 5% (w/v) e Tween 0,1% (v/v)], poi incubata con anticorpo primario diretto contro la GDH di Vite (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990) (1/2000) per un'ora. Successivamente sono stati fatti due lavaggi da 15 min con PBS

1X e Tween 0,1%(v/v). La membrana è stata poi incubata con anticorpo secondario anti-rabbit (1/5000) per un'ora e successivamente sono stati fatti due lavaggi da 15 min con PBS 1X e Tween 0,1% (v/v). Si è proceduto poi con la rilevazione con chemiluminescenza in camera oscura, utilizzando un Kit commerciale SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate.

3. COSTRUZIONE DI PROTEINE GDH CHIMERICHE ED ESPRESSIONE ETEROLOGA IN LIEVITO

3.1 Estrazione dell'RNA e retro-trascrizione

RNA totale è stato estratto da piante cresciute in vitro usando il reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordo con quanto indicato nel protocollo del prodotto. Due µg di RNA sono stati poi retro-trascritti usando il kit di retro-trascrizione ImProm-II® (Promega, Madison, WI, USA) seguendo il protocollo indicato dal fornitore.

3.2 Reazione di amplificazione (PCR)

Le proteine chimeriche sono state ottenute introducendo le sostituzioni amminoacidiche desiderate (A411S per GDH1 e I397V, I406L e S411A per GDH3) nelle sequenze cDNA di GDH1 e GDH3 tramite PCR, usando specifici primer (**Tabella 2**). Per facilitare il clonaggio è stato aggiunto, tramite PCR, un sito di restrizione BamHI all'estremità 5' dei cDNA di GDH1 e GDH3.

Tabella 2: Primers utilizzati

Nome Primer		Gene	Sequenze Primer (5'→3')
FARA1	Fw	<i>GDH1</i>	GCGGATCCAAGAAGAAGAAGAAGTTG
RARA1	Rev	<i>GDH1</i>	CGAGCTCGCATAAGAGATTAGATAATCT
FARA3	Fw	<i>GDH3</i>	GCGGATCCCCAAAATAAAGAAGAGAGAAG
RARA 3	Rev	<i>GDH3</i>	CGAGCTCTTGTTCCTTAGCTTCCCATG
gdh1S	Rev	<i>GDH1</i>	GCCGCGAATTCTTAAGATCCCCAGCCTCTGAGA
gdh3VLA	Rev	<i>GDH3</i>	CGAGCTCTCAAGCTCCCCAGCCTCTGAGAATGGTAGCTTG AGCCACACGATTAACAC
gdh3LA	Rev	<i>GDH3</i>	GCCGCGAATTCTCAAGCTCCCCAGCCTCTGAGA
gdh3A	Rev	<i>GDH3</i>	GCCGCGAATTCTCAAGCTCCCCAGCCTCTGATA

I primer FARA3 e gdh3VLA o gdh3LA o gdh3A sono stati usati per amplificare rispettivamente le sequenze codificanti per GDH3-VLA , GDH3LA e GDH3A.

I primer FARA1 e gdh1S sono stati usati per amplificare la sequenza codificante per GDH1-S.

La mix di reazione è stata preparata in un volume totale di 20 µl e contiene i seguenti reagenti:

Acqua bidistillata	37.75 µl
Buffer Pfu 1X	5 µl
dNTP mix 5 mM	2 µl
Primer Fw 12.5 µM	2 µl
Primer Rev 12.5 µM	2 µl
Templato	0.5 µl
PfuHF	0.75 µl

La reazione di amplificazione è stata condotta in un Personal Cycler™ (Biometria® Germany) con il seguente ciclo:

	Denaturazione iniziale	95°C per 5'
35 cicli	Denaturazione	95°C per 1'
	Annealing	52°C per 1'
	Estensione	72°C per 1'
	Estensione finale	72°C per 5'

Gli amplificati, sono stati colorati con LB 10X (Loading Buffer: bromofenolo 0.25%, xilene cianolo 0.25%, glicerolo 30%).

3.3 Elettroforesi su gel di agarosio

I campioni così colorati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio. Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio 1.5% in un tampone TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM), e aggiungendo l'intercalante EUROSAFE 0.5 µg/ml. La soluzione si è poi raffreddata nello stampo. Terminata la corsa, il gel è stato osservato su un transilluminatore a luce UV.

3.4 Vettori plasmidici

I prodotti amplificati sono stati clonati nel vettore pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA), sequenziati e sub-clonati nei siti BamHI e EcoRI o SalI del vettore pYEX-BX (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA).

pGEM-T Easy (PROMEGA pGEM®-T Easy Vector System I): vettore commerciale utilizzato per la procedura di clonaggio dei prodotti di amplificazione mediante la

procedura T/A cloning. Contiene promotori per l'RNA polimerasi che fiancheggiano la regione multipla di clonaggio dentro la regione codificante la β -galattosidasi, la cui inattivazione per inserzione permette l'identificazione diretta dei cloni ricombinanti mediante lo screening bianco/blu (**Figura 2**).

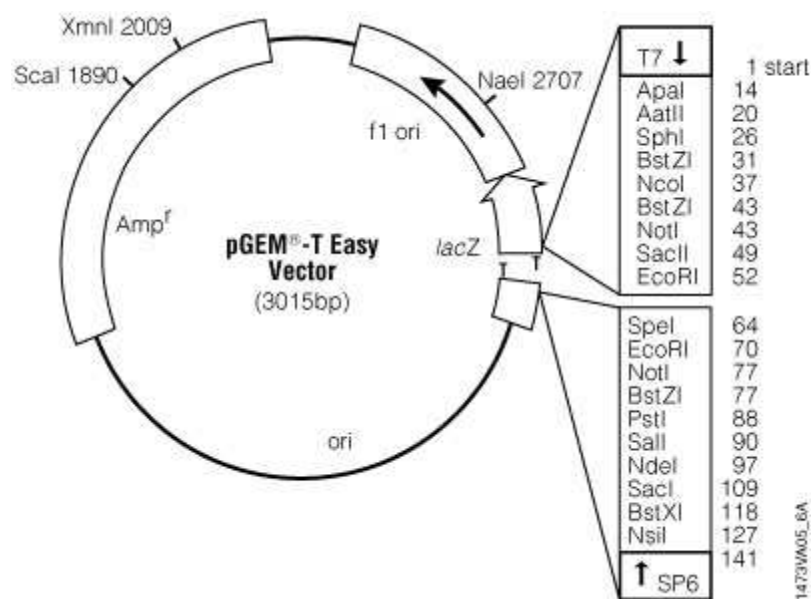
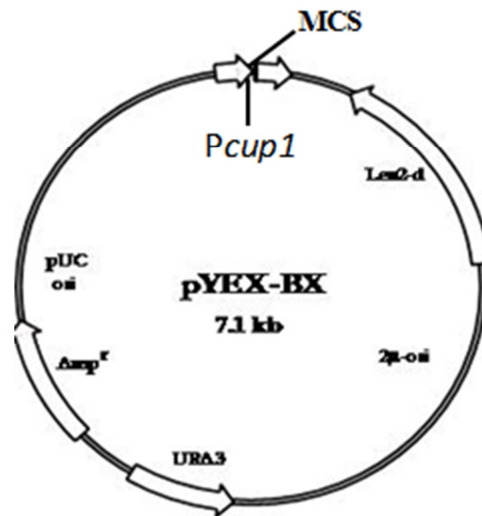


Figura 2: mappa circolare del vettore pGEM®-T Easy.

pYEX-BX: plasmide multicopia episomico. Questo vettore contiene il promotore rame-inducibile del gene CUP1, tale promotore viene regolato positivamente dalla presenza di rame e ciò rende inducibile l'espressione dei geni posti sotto il suo controllo. Contiene inoltre il gene di *E.coli* *Amp^r* e i markers di selezione per il lievito *Len2-d* e URA3. Il vettore non include il sito di inizio della traduzione, quindi il gene inserito viene tradotto a partire dal proprio ATG (**Figura 3**).



(MCS) Multiple Cloning Site:

<u>GGA TCC</u>	<u>GCA GCT</u>	<u>GTC GAC</u>	<u>TGC AGA</u>	<u>ATT C</u>
BamHI	PvuII	SalI	PstI	EcoRI

Figura 3: mappa circolare del vettore pYEX-BX

3.5 Manipolazione del DNA

3.5.1 Reazione di restrizione: sono stati utilizzati gli enzimi della ditta Biolabs e relativi tamponi consigliati secondo le indicazioni della ditta fornitrice. La reazione è stata condotta in un volume di 50 µl con 5µl di Buffer 10X, 1-2 U di enzima, 0.5-2 µg di DNA e acqua bidistillata fino a volume. Se richiesto dall'enzima si aggiunge BSA in concentrazione 1X. L'incubazione è avvenuta a 37°C per almeno due ore.

3.5.2 Defosforilazione: le due estremità del plasmide, prodotte dal trattamento con l'enzima di restrizione sono state sottoposte a defosforilazione prima di effettuare la ligazione.

Prima di effettuare la defosforilazione un'aliquota di plasmide è stata caricata su gel per verificare che il plasmide sia stato completamente digerito.

La defosforilazione è avvenuta in un volume di 50 µl. A 25 µl della reazione di digestione precedente, sono stati aggiunti 5 µl di buffer per la fosfatasi alcalina e acqua fino a 49 µl, poi è stato aggiunto 1 µl di fosfatasi alcalina e si è lasciato il tutto nel thermoblock a 37°C per 20-30 minuti. Per inattivare la fosfatasi alcalina si è raggiunta una temperatura di 65°C per 10 minuti, e infine i plasmidi defosforilati sono stati purificati utilizzando un'apposito Kit (Wizard® Gel and PCR Clean-Up System, Promega).

3.5.3 Reazione di ligazione: per la reazione di ligazione è stata utilizzata la T4 DNA ligase fornita dall'apposito Kit della ditta Invitrogen. Il rapporto molare inserto:vettore è di 1:5 con 0.01-0.1 µg di DNA totale. L'incubazione è avvenuta a 23-26°C per 3 ore circa.

3.5.4 Purificazione del DNA: la purificazione della banda di DNA excisa dal gel di agarosio è stata eseguita con il Kit commerciale "Wizard® Gel and PCR Clean-Up System" (Promega). Dopo la purificazione il DNA è stato precipitato con etanolo.

3.6 Ceppi batterici e condizioni di coltura

Per le trasformazioni in *E.coli* sono state utilizzate cellule batteriche del ceppo DH10B;

NOME	GENOTIPO
DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d DlacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galKλ-rpsL hupG</i>

La crescita dei ceppi batterici è stata condotta in condizioni di aerazione a 37°C.

I terreni utilizzati per la crescita sono stati:

Terreno LB: triptone (DIFCO) 10 g, estratto di lievito (DIFCO) 5 g, NaCl 5 g, acqua bidistillata 1 l, portato a pH 7.5 con NaOH 10 M.

Terreno LBA: terreno LB addizionato di ampicillina (SIGMA) 100 µg/ml.

Ai terreni è stato aggiunto CuSO₄ (0,5 mM) per indurre l'espressione del gene esogeno. Il terreno all'occorrenza è stato fatto solidificare aggiungendo all'occorrenza il 2% (w/v) di Bacto agar (DIFCO).

3.7 Trasformazione di *E. Coli*

La metodica scelta è stata quella della trasformazione chimica con CaCl₂. In un provettina da 1.5 ml sono stati posti 50 µl di tampone TCM (Tris-HCl pH 7 410 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10mM), 100 µl di cellule CaCl₂ competenti e il DNA (da 20 a 40 ng, circa 20 µl di prodotto di ligazione); il tutto è stato incubato in ghiaccio per 40 minuti, trasferito poi in un thermoblock a 42°C per 2 minuti e ancora incubato in ghiaccio per 2 minuti. A questo punto è stato aggiunto 1 ml di terreno LB a temperatura ambiente, incubato a 37°C per 90-120 minuti circa senza agitare e infine i batteri così trasformati sono stati piastrati su terreno solido LBA per la selezione.

3.8 Estrazione del DNA plasmidico batterico

L'estrazione del DNA plasmidico da *E.coli* è stata eseguita mediante un Kit commerciale Wizard ® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

3.9 Ceppi di lievito e condizioni di coltura

Il ceppo di lievito utilizzato per la trasformazione è il BY474-1;

NOME	GENOTIPO	BIBLIOGRAFIA
BY474-1	MATa <i>his3-1, leu2-0</i> <i>met15-0, ura3-0</i>	Collezione Euroscarf

La crescita dei ceppi di lievito è stata condotta in condizioni di aerazione a 28°C.

I terreni utilizzati per la crescita sono stati:

Terreno massimo (MAX): peptone (FORMEDIUM) 10 g/l, estratto di lievito (FORMEDIUM) 5 g/l.

Terreno YNB: KH_2PO_4 1 g/l, MgSO_4 0.5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/l, NaCl 0.1 g/l, CaCl_2 0.1 g/l, H_3BO_3 0.5 mg/l, KI 0.1 mg/l, FeCl_3 0.2 mg/l, MnSO_4 0.4 mg/l, FeSO_4 0.4 mg/l, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 0.2 mg/l, vitamine 10 ml/l, acqua bidistillata.

Terreni YNB + DO – URA: terreno YNB addizionato di una miscela di amminoacidi, DO (drop out; Kaiser *et al.* 1994). Il DO può mancare di uno o più amminoacidi per poter sfruttare i marcatori di selezione. In questo caso manca di Uracile.

A questi terreni è stato aggiunto glucosio al 2%. E' stato anche aggiunto CuSO_4 (0,5 mM) per indurre l'espressione del gene esogeno.

I diversi terreni sono stati fatti solidificare all'occorrenza aggiungendo il 2% (peso/volume) di Bacto agar (DIFCO).

3.10 Trasformazione di *S.cerevisiae*

Per la trasformazione di *S. cerevisiae* con DNA plasmidico è stato utilizzato il “protocollo di trasformazione rapida” seguendo le indicazioni del metodo dell'acetato di litio (Gietz and Woods, 2002). Una volta fissate le condizioni standard dell'esperimento le cellule sono state incubate a 42°C per due ore. Dopo la trasformazione, le cellule sono state risospese in 500 µl di acqua sterile bidistillata e piastrate in terreno di selezione adeguato.

3.11 Colony PCR

Per effettuare un'analisi del clonaggio direttamente su colonia, mediante PCR, è stata eseguita una colony PCR utilizzando come template il DNA contenuto in cellule intere di lievito o batteri, le quali vengono rotte per trattamento al calore in uno step preliminare alla

reazione vera e propria. Le colonie singole, ottenute dopo trasformazione, sono state recuperate con uno stuzzicadenti e stemperate in acqua bidistillata (20 µl per i batteri; 15 µl per lieviti). Le colonie sono state quindi bollite (5 min per i batteri; 15 min per i lieviti), raffreddate e centrifugate per 1 min a 12000 x g. È stato prelevato il surnatante (5 µl per i batteri; 2 µl per lieviti) ed utilizzato come template per la reazione vera e propria.

3.12 Estrazione proteica da *S. cerevisiae*

Le proteine di lievito sono state estratte utilizzando lo stesso protocollo applicato per estratti vegetali ma con alcune modifiche.

Le cellule di lievito sono state raccolte in seguito a centrifugazione a 3500 x g per 20 min. Al pellet così ottenuto è stato aggiunto un volume di micro glass beads, pari al volume di pellet e successivamente è stato congelato in azoto liquido. In seguito è stato aggiunto il tampone di estrazione specifico per la GDH già descritto precedentemente con l'aggiunta di glicerolo alla concentrazione finale 10%. Si è proceduto quindi alla polverizzazione del campione con un amalgamatore dentale (Amalgamator mod. TAC 200/S, Linea TAC srl, Asti, Italia) con una frequenza di oscillazione pari a 4200 colpi/minuto con sei periodi successivi di agitazione da 10 secondi ciascuno intervallati da 1 secondo di raffreddamento in ghiaccio. L'omogenato così ottenuto è stato centrifugato a 15000 x g per 15 min a 4°C e il supernatante recuperato è stato immediatamente utilizzato per la rilevazione dell'attività del GDH oppure conservato a -80° C fino al momento dell'uso. L'attività enzimatica della GDH-NADH è stata rilevata eseguendo uno zimogramma, come descritto per gli estratti vegetali, modificando solamente la concentrazione di poliacrilammide del running gel.

	RUNNING GEL (7,5%)
Acqua bidistillata	1850 μ l
Tris-HCl 1 M (pH 8.8)	1870 μ l
Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	-
Acrylamide (30%T; 2,67%C)	1250 μ l
AmmonioPersolfato10% (APS)	25 μ l
TEMED	5 μ l

3.13 Saggio di stabilità termica della GDH

Gli estratti proteici dalle cellule di lievito sono stati incubati in un bagnetto termostato per differenti tempi e a diverse temperature. Alla fine del periodo di incubazione i campioni sono stati rimossi, posti immediatamente in ghiaccio e centrifugati a 12000 x g per 5 min a 4°C. Il surnatante recuperato è stato caricato in un gel di poliacrilammide. Gli estratti di lievito sono stati pretrattati per 15 min a 65°C per inattivare l'attività della GDH endogena e per eliminare l'attività non GDH-specifica.

4. TECNICHE BIOINFORMATICHE

4.1 Sequence analysis

Le 27 sequenze di GDH di piante sono state estratte dal Plant Genome Database (Altschul *et al.*, 1990) tramite il motore di ricerca BLASTP usando come sonda la sequenza della GDH1 di *A.thaliana* (At5g18170) e allineandole successivamente con il software CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Le sequenze possono essere recuperate nel database GenBank/EMBL utilizzando i seguenti accession number: GDH1 *Actinidia chinensis* ABR45723.1; GDH1 *Arabidopsis lyrata* EFH48065.1; GDH2 *A. lyrata* EFH47531.1; GDH3 *A. lyrata* EFH58577.1; GDH1 *A. thaliana* AED92515.1; GDH2 *A. thaliana* AED91157.1; GDH3 *A. thaliana* AEE74011.1; GDH *Asparagus officinalis* CAA09478.1; GDH *Brassica napus* BAB62170.1; GDH2 *Camellia sinensis* ACH97123.2; GDH1 *Glycine max* CAI53673.1; GDH2 *G. max* CAI53674.1; GDH1 *Lupinus luteus* AAV74197.1; GDHB *N. plumbaginifolia* CAA69601.2; GDHA *N. plumbaginifolia* CAA69600.1; GDH *Nicotiana tabacum* CAD12373.1; GDH1 *Oryza sativa* BAE48296.1; GDH2 *O. sativa* BAE48298.1; GDH3 *O. sativa* BAE48297.1; GDH *Physcomitrella patens* subsp. *patens* EDQ71532.1; GDH *Picea sitchensis* ABK25386.1; GDH *Populus trichocarpa* EEE95085.1; GDH *Ricinus communis* EEF36917.1; GDH *Solanum lycopersicum* AAL36888.3; GDH *Vitis vinifera* CAA60507.1; GDHB *V. vinifera* ABF57085.1; GDH *Zea mays* BAA08445.1.

4.2 Protein modeling

Il modello per la struttura proteica della GDH3 di *A.thaliana* è stato costruito grazie alla tecnica di modeling comparativo, dopo una ricerca di similarità in BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) della sequenza di GDH3 di *A.thaliana* (Uniprot accession number Q9S7A0), contro la Protein Data Bank (PDB). La GDH dell'archea ipertermofilo *Pyrococcus furiosus*

(disponibile in forma trimerica) si è scoperto essere il miglior template, con una struttura completa, che permette di costruire un modello fino al residuo S411 (PDB id: 1GTM). Il modello è stato costruito grazie al server Swiss-model (Guex and Peitsch, 1997), dopo un refinement dell'allineamento effettuato con il programma ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). La qualità del modello è stata verificata grazie a strumenti di valutazione delle strutture disponibili in Swiss-model (incluso PRO-CHECK). Per costruire il modello della GDH3 come struttura esamerica, le coordinate del monomero sono state dapprima sovrapposte a quelle di ogni subunità del trimero della GDH di *P. furiosus* e salvate nello stesso file di struttura. Successivamente, con analogo procedimento, il trimero ottenuto è stato sovrapposto a ciascun trimero della struttura della GDH di *Thermotoga maritima*, che è disponibile in forma esamerica nella banca dati (PDB id: 1B26). L'energia del modello esamerico è stata minimizzata utilizzando il software GROMACS 4.5.5 (Van Der Spoel *et al.*, 2005) e il force field Gromos96 ffG53A6. Le analisi strutturali sono state eseguite utilizzando i software VMD (Humphrey *et al.*, 1996) e Swiss-Pdb Viewer (Guex and Peitsch, 1997) e grazie al webserver FirstGlance in Jmol (<http://firstglance.jmol.org>). L'analisi dell'interfaccia tra le subunità è stata eseguita dal Protein Interfaces, Surfaces, and Assemblies service PISA at the European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html).

RISULTATI e DISCUSSIONE

1. LOCALIZZAZIONE ORGANO-SPECIFICA DELL'ISOENZIMA GDH3

COME FUNZIONE DELLO SVILUPPO DELLA PIANTA

Come anticipato nell'introduzione di questa tesi è stato ormai accertato che il modello genetico della NAD-GDH, che prevede, nelle piante superiori, l'esistenza di due soli geni codificanti per le subunità dell'enzima, non può essere ritenuto valido. Le analisi bioinformatiche condotte sui genomi sequenziati e prove sperimentali dirette, dimostrano infatti che possono esistere più di due geni *GDH* e che i relativi prodotti genici (le subunità formanti la struttura esamerica dell'oloenzima) possono dare origine a un repertorio anche molto numeroso di forme isoenzimatiche in diverse specie vegetali come, ad esempio, in *Oryza sativa* e *Lupinus luteus* (Qiu *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2011).

D'altra parte in letteratura sono stati riportati una pletora di dati che mostrano come l'attività e/o il profilo isoenzimatico della GDH possano variare a seconda dello stato nutrizionale, ambientale e di sviluppo dei tessuti delle specie prese in considerazione (Srivastava and Singh, 1987; Dubois *et al.*, 2003; Skopelitis *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2010, 2011).

Tuttavia il fatto che alcuni autori abbiano riportato evidenze, in alcune specie vegetali, della presenza di un'unica isoforma GDH [in pomodoro (Purnell *et al.*, 1997) e nel nostro laboratorio in spinacio “unpublished results”] potrebbe indicare l'esistenza di un complesso processo evolutivo a carico del sistema genetico in questione caratterizzato da perdite e acquisizione di sequenze.

L'osservazione che *Arabidopsis thaliana* (specie considerata universalmente un sistema modello per lo studio della biologia delle piante) possiede nel suo genoma tre geni distinti per la GDH, ci ha indotto a condurre inizialmente, una analisi più approfondita del suo profilo elettroforetico, andando ad analizzare come esso cambia durante lo sviluppo della

pianta in funzione dell'organo che si sta analizzando. La nostra attenzione si è concentrata in particolare sull'induzione di quelle isoforme riconducibili all'espressione del gene *GDH3*, la cui espressione è stata solo recentemente (e solo parzialmente) analizzata anche da altri gruppi di ricerca (Yamada *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2009; Fontaine *et al.*, 2012).

1.1 Pattern isoenzimatico della GDH durante lo sviluppo della pianta

Inizialmente è stata analizzata la possibile comparsa della isoforma 6γ (omoesamero risultante dall'espressione del gene *GDH3*), in diversi organi durante le varie fasi di sviluppo della pianta *Arabidopsis thaliana*. La comparsa di una banda di attività GDH localizzata al di sotto di quella dell'omoesamero 6α - e quindi nella posizione più anodica del profilo isoenzimatico - è stata considerata come indice della presenza dell'omoesamero 6γ . A conferma della correttezza di questa assunzione, sono stati condotti degli esperimenti di immunoinattivazione che sono riportati successivamente.

Le piantine sono state fatte crescere su terriccio e vermiculite in cella termostata e raccolte a tempi diversi, dividendo foglie e radici.

I dati riportati in **Figura 4** mostrano che non è possibile rilevare attività dell'omoesamero 6γ , negli estratti proteici di foglie sia del wild type (WT), che delle linee mutanti *gdb1*, *gdb2* o del doppio mutante *gdb1-2*, indipendentemente dalla fase di sviluppo della pianta.

Risultati simili sono stati ottenuti quando sono stati testati per la presenza di attività dell'omoesamero 6γ , gli estratti della nervatura centrale della foglia (dati non mostrati).

Sia nelle radici del WT che del mutante *gdb1*, l'omoesamero 6γ non è stato rilevato nei tre stadi di sviluppo selezionati per questo studio (7, 21 e 35 DAS), in cui, va sottolineato, sono

state utilizzate piante coltivate in condizioni ambientali e su un substrato che tendono a riprodurre condizioni più simili a quelle naturali. Al contrario, la presenza dell'omoesamero 6γ può essere individuata nelle radici delle piante del mutante *gdb2* e del doppio mutante *gdb1-2* (**Figura 4**), ma solo a partire da 21 giorni dopo la semina (DAS).

Questi risultati mettono in evidenza come l'induzione della sintesi dell'omoesamero 6γ , sia finemente regolata in funzione dello sviluppo della pianta e confermano la radice-specificità dell'espressione, in accordo con i risultati preliminari che indicavano che l'espressione di 6γ si localizzava in radici di piante senescenti (Fontaine *et al.*, 2013).

Al ventunesimo giorno, nel doppio mutante *gdb1-2* la banda di attività corrispondente all'omoesamero 6γ è chiaramente visibile nelle radici, mentre nel mutante *gdb2*, tale banda non è facilmente individuabile, sebbene la sintesi di una subunità γ funzionale è indirettamente confermata dalla presenza degli eteroesameri formati dalle subunità β e γ . (**Figura 4**), confermando così l'induzione della sintesi della subunità γ a partire da 21 DAS.

Questi risultati inoltre danno una conferma all'ipotesi formulata in precedenti lavori (Fontaine *et al.*, 2006, 2013), che indicano l'esistenza di meccanismi compensatori dipendenti dal bilanciamento delle diverse subunità α , β o γ . Ad esempio 6γ è al limite della rilevazione nel mutante *gdb1*, mentre la presenza di eteroesameri β/γ , indica che la sintesi di subunità γ è up-regolata nel mutante *gdb2*. Si può ipotizzare quindi, che 6α eserciti un controllo negativo su 6γ .

Il trattamento degli estratti proteici contenenti l'omoesamero 6γ e gli eteroesameri β/γ con un anticorpo diretto contro la GDH di vite (vedi *Materiali e Metodi* Sezione 2.4), determina

la scomparsa delle bande degli isoenzimi GDH contenenti la subunità γ , confermando così che le bande osservate, corrispondono ad una proteina GDH (**Figura 5**).

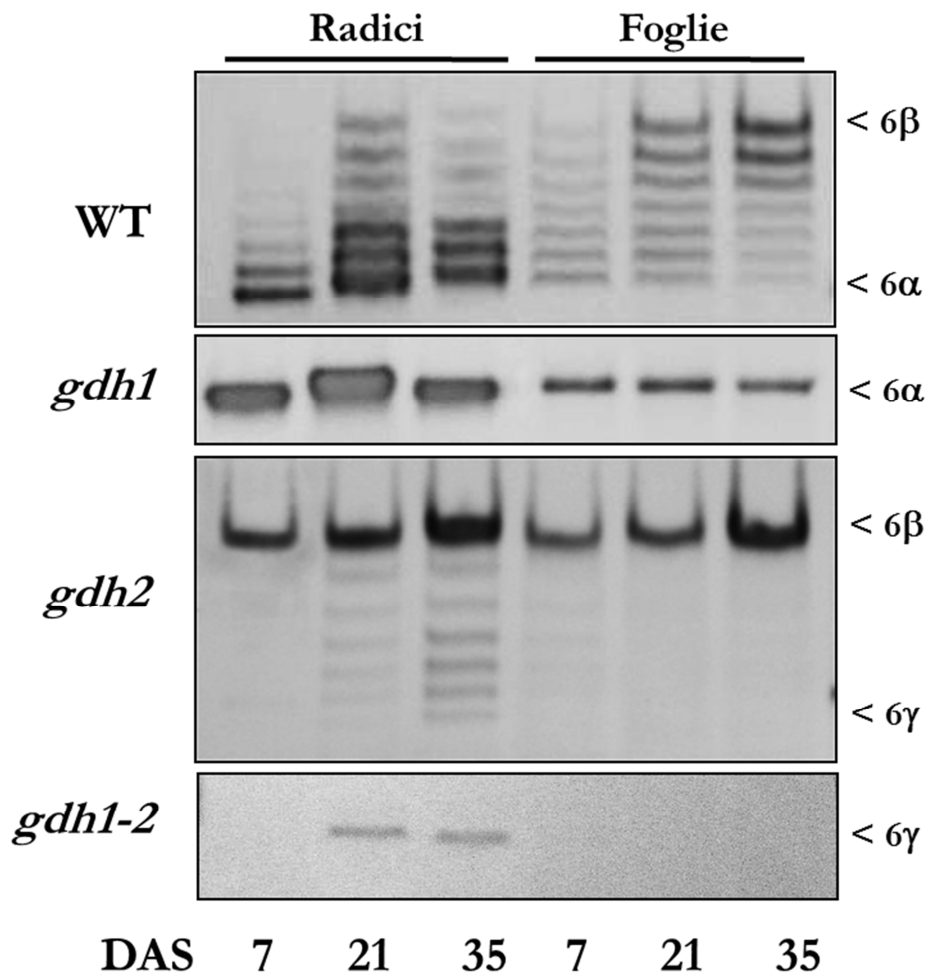


Figura 4: Analisi dei profili di espressione della GDH in foglie e radici durante diverse fasi di sviluppo del WT e dei mutanti di *Arabidopsis thaliana*. Le posizioni degli omoesameri GDH1(6β), GDH2 (6α) e GDH3 (6γ) sono indicate sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

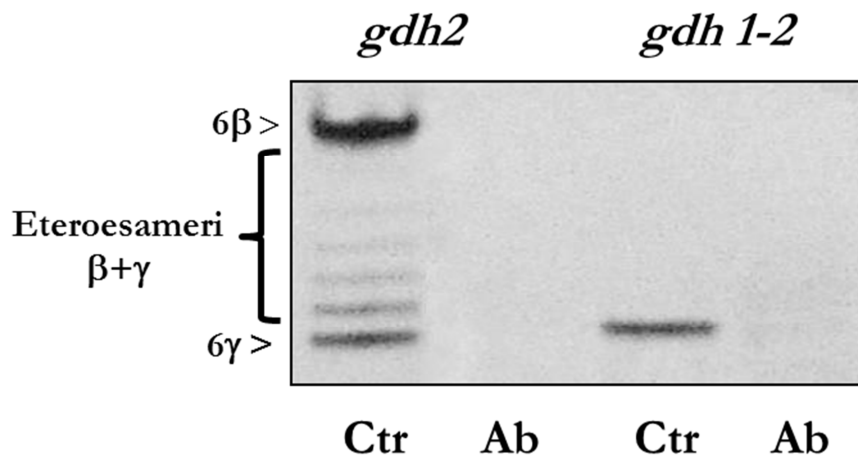


Figura 5: Immunoinattivazione della GDH di *Arabidopsis*. Campioni di radici dei mutanti *gdh2* e doppio mutante *gdh1-2* sono stati pretattati con un anticorpo anti- GDH (**Ab**) prima di essere caricati su gel. **Ctr**= campione non trattato. Le posizioni degli omoesameri GDH1 (6β) e GDH3 (6γ) e degli eteroesameri β/γ , sono indicate sulla sinistra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

1.2 Localizzazione stadio florale- e organo florale- specifica dell'isoforma 6γ di *A.thaliana*

L'attività dell'omoesamero 6γ è stata rilevata anche durante la fase riproduttiva della pianta, in particolare nei boccioli fiorali. Durante lo sviluppo florale infatti, la presenza dell'omoesamero 6γ , è rilevabile nei boccioli dei fiori chiusi (stadio di sviluppo 10-12; **b** in **Figura 6**), di tutte le piante testate, mentre scompare allo stadio 15, quando i fiori sono completamente sviluppati (**f**; **Figura 6**).

La presenza di subunità γ di GDH3 non è stata rilevata nemmeno nelle silique e negli steli fiorali, qualunque sia il loro stadio di sviluppo (dati non riportati). È interessante notare che, a differenza di quanto osservato nelle radici del mutante *gdh2*, gli eteroesameri β/γ non compaiono nei boccioli chiusi dello stesso mutante, bensì si evidenzia la banda corrispondente all'omoesamero 6γ (GDH3) e quella corrispondente a 6β (GDH1). Si può ipotizzare l'esistenza di un meccanismo regolativo che impedisca la contemporanea espressione dei geni, *GDH3* e *GDH1*, a livello di una stessa cellula dell'organo/tessuto

considerato (**Figura 7**). Ancora una volta abbiamo quindi una evidenza di un possibile meccanismo di regolazione fine del profilo isoenzimatico della GDH che si basa sul bilanciamento della presenza delle singole subunità dell'enzima.

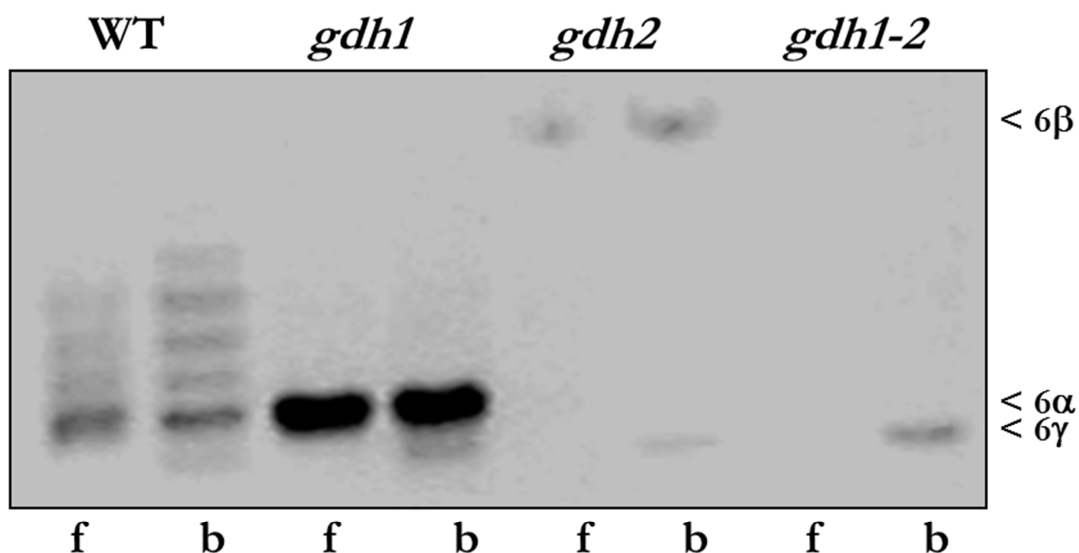


Figura 6: Pattern isoenzimatico della GDH negli organi riproduttivi. Gli organi fiorali corrispondenti a diversi stadi di maturazione [boccioli fiorali chiusi (b; stadio 10-12) e fiori aperti (f; stadio 15)] sono raccolti a 35 DAS.

Le posizioni degli omoesameri GDH1 (6β), GDH2 (6α) e GDH3 (6γ) sono indicate sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

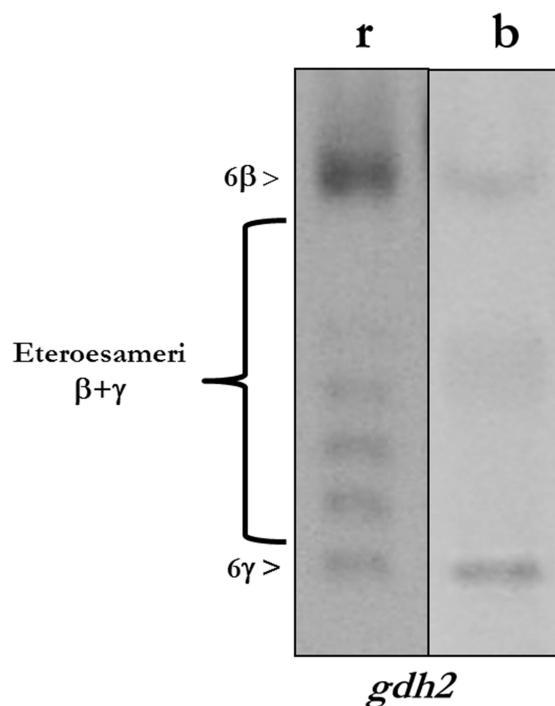


Figura 7: Analisi del profilo elettroforetico di estratti di radici di piante senescenti (r) e boccioli fiorali (b) di mutanti *gdh2* di *A. thaliana*. Le posizioni degli omoesameri GDH1 (6β) e GDH3 (6γ) e degli eteroesameri β/γ sono indicate a sinistra del gel.

Si è quindi deciso di procedere con una analisi dettagliata, dissezionando i boccioli florali e rilevando il profilo isoenzimatico nei diversi organi florali. Nel mutante *gdh2* e nel doppio mutante *gdh1-2*, l'omoesamero 6γ era visibile solo negli estratti proteici degli stami (**st**), ma non dei pistilli (**pi**) (**Figura 8A**); mentre negli estratti di petali e sepali del doppio mutante *gdh1-2* non vi era alcuna evidenza dell'omoesamero 6γ (**Figura 8B**). È interessante notare che l'espressione stame-specifica di uno dei tre geni NADH-GDH è stata descritta anche nel riso (Qiu *et al.*, 2009).

E' possibile inoltre osservare come la formazione degli eteroesameri β/γ sia impedita negli stami del mutante *gdh2*. Attualmente non è possibile affermare se questo sia dovuto ad una regolazione a livello della trascrizione dei due geni (*GDH1* e *GDH3*) o sia il frutto di un meccanismo post-trascrizionale.

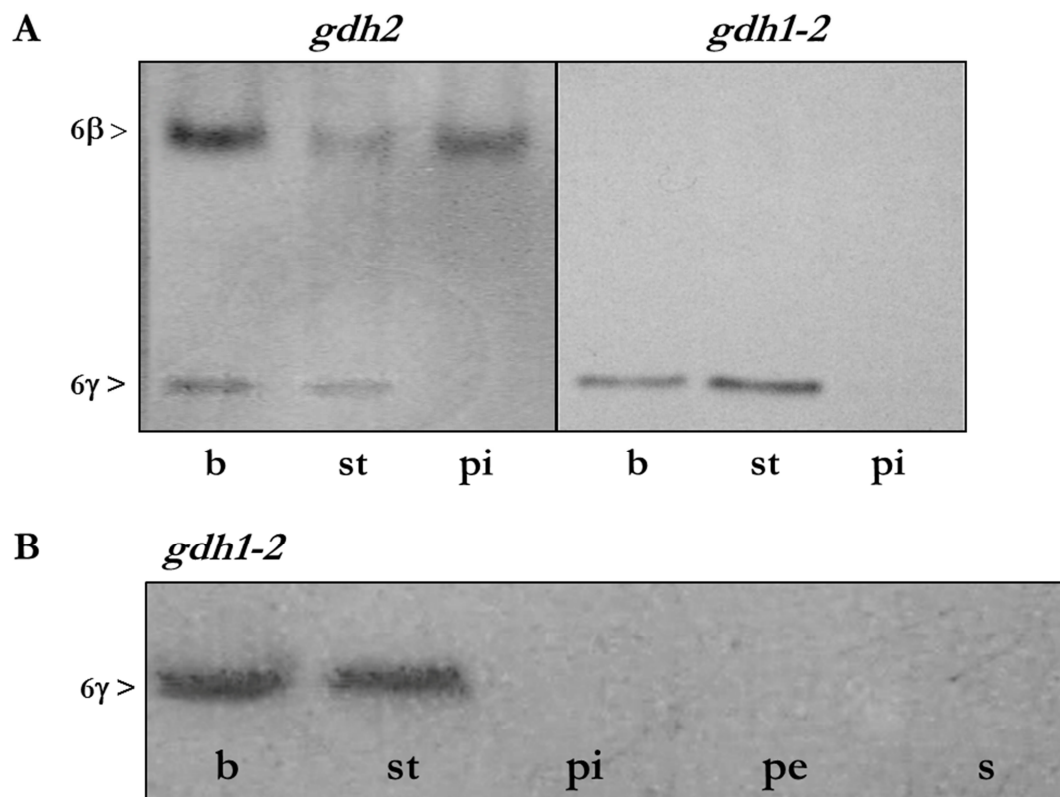


Figura 8: **A)** Analisi dei profili di espressione della GDH in boccioli (**b**), stami (**st**) e pistilli (**pi**) nel mutante *gdh2* e nel doppio mutante *gdh1-2*. **B)** Analisi dei profili di espressione della GDH dei boccioli (**b**) e delle sue componenti sepali (**s**), petali (**pe**), pistilli (**pi**) e stami (**st**) nel doppio mutante *gdh1-2*.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

Possiamo invece cercare di dare una interpretazione del possibile significato dell'espressione del gene *GDH3* durante questa fase di sviluppo della pianta

È noto che le piante dispongono di meccanismi di traslocazione della fonte di azoto, verso gli organi fiorali, durante il passaggio dalla fase vegetativa a quella riproduttiva (Lee Y.-H. and Tegeder, 2004), infatti durante la formazione degli stami è richiesta la disponibilità di grandi quantità di azoto e di carbonio (ed energia), per la produzione dei grani del polline (Schneidereit *et al.*, 2003). Per cui la comparsa dell'isoenzima 6 γ durante la maturazione degli stami suggerisce che questa isoforma della GDH sia coinvolta nei processi di traslocazione delle fonti di carbonio e azoto o, in alternativa, abbia una funzione di segnalazione e monitoraggio dell'equilibrio C/N (C/N status).

In conclusione questi risultati mostrano che in *Arabidopsis thaliana*, in condizioni di crescita colturali standard (simili a quelle tipiche del suo ambiente naturale), vi è una localizzazione stadio di sviluppo- e organo-specifica dell'isoenzima 6 γ ; infatti la sintesi delle subunità γ di GDH3 non è mai stata rilevata né in piante giovani né in foglie ma solo nelle radici di piante adulte/senescenti e nei boccioli fiorali.

1.3 Differente focalizzazione su gel dell'isoforma 6 γ a seconda dell'organo analizzato

Un dato interessante e inaspettato che è emerso in quest'ultimo anno riguarda la differente focalizzazione su gel di poliacrilamide dell'isoforma 6 γ estratto da boccioli fiorali rispetto a quello estratto da radici senescenti (**Figura 9**). Ciò potrebbe essere dovuto a modifiche post-traduzionali differenti a seconda del tessuto in cui avviene la sintesi dell'enzima, in grado di modificare la corsa elettroforetica. Oppure al legame dell'omoesamero 6 γ con

un'altra proteina, a livello dei boccioli, con conseguente formazione di un complesso proteico. Tale punto è ancora oggetto di studio.

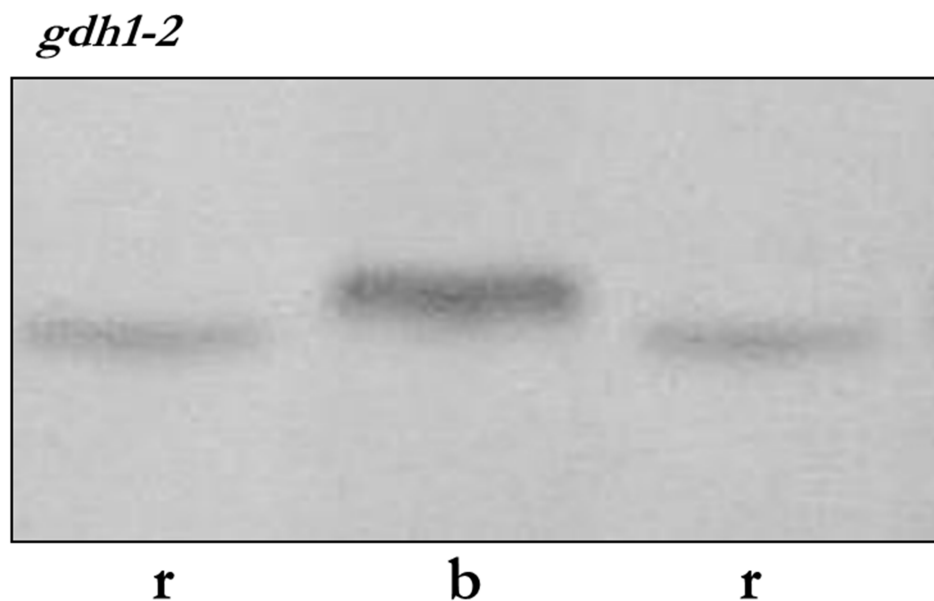


Figura 9: Differente focalizzazione su gel di poliacrilamide dell'isoforma 6 γ estratta da boccioli fiorali (**b**) rispetto a quella estratto da radici senescenti (**r**).

2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI 6 γ IN CONDIZIONI DI STRESS

Al fine di individuare condizioni che avrebbero potuto indurre l'espressione del gene *GDH3*, è stata vagliata una banca dati di espressione condotta mediante microarrays di *Arabidopsis thaliana*. L'analisi del trascrittoma (mediante microarray) permette di verificare se il gene *GDH3* viene trascritto e in quali condizioni. Tuttavia questo non garantisce che il prodotto genico sia funzionale. L'analisi dell'attività in gel è l'unica metodica che permette di verificare l'ottenimento di un prodotto in grado di oligomerizzare dando origine a nuove isoforme dell'enzima.

Allo scopo di verificare se i dati riguardanti l'analisi trascrizionale di *GDH3*, sono correlabili con la presenza di attività 6 γ , si è deciso di prendere in considerazione la condizione più significativa tra quelle riportate nella banca dati di espressione. Questa è risultata essere la starvation d'azoto. Questa osservazione ci è parsa particolarmente significativa in quanto è risaputo che la carenza di azoto può essere una condizione che induce senescenza nelle piante (Schulze *et al.*, 1994). Al fine di disporre di un sistema modello che permettesse un controllo sperimentale più affidabile della disponibilità di N per la pianta, gli esperimenti descritti qui di seguito sono stati effettuati *in vitro*, coltivando le piante in terreni sintetici e in condizioni axeniche (vedi *Materiale e Metodi* Sezione 1.3).

2.1 Effetto della starvation d'azoto sull'attività dell'omoesamero 6 γ

Quando piante WT e doppio mutanti *gdb1-2* coltivate *in vitro* sono trasferite in un terreno liquido privo di azoto, ma contenente saccarosio, si osserva un'induzione dipendente dal tempo e radice- specifica della sintesi dell'omoesamero 6 γ (**Figura 10**).

Questa induzione è facilmente visibile nell'estratto di radici del doppio mutante *gdb1-2* dopo 2 giorni di trattamento, mentre si osserva una debole banda di attività dell'omoesamero 6γ nel WT dopo 3 giorni di trattamento. Nessuna induzione è stata osservata nelle foglie di entrambi i genotipi (**Figura 10**).

Nei mutanti *gdb1* e *gdb2* l'induzione radice-specifica, da assenza di N, del gene *GDH3* anche se meno intensa rispetto a quella mostrata dal doppio mutante *gdb1-2*, è osservabile ed è confermata dalla presenza degli eteroesameri β/γ nel mutante *gdb2* (dati non mostrati).

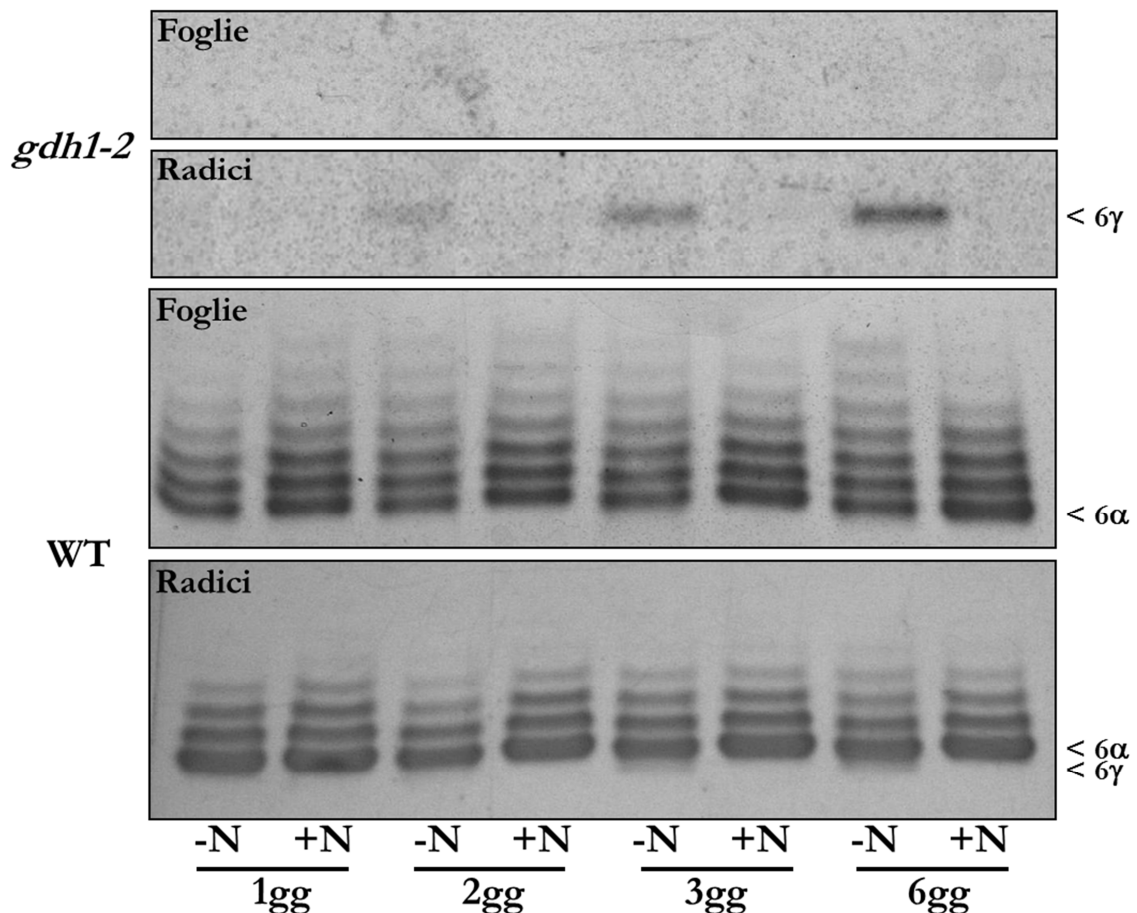


Figura 10: Effetto della starvation d'azoto sull'espressione di 6γ . Piantine di nove giorni di *Arabidopsis* WT e doppio mutanti *gdb1-2* sono state fatte crescere in un terreno liquido contenente saccarosio (1% w/v) in presenza (+N) o in assenza (-N) di azoto inorganico (4 mM KNO_3 e 4 mM NH_4NO_3). I campioni di radici e foglie sono raccolti dopo 1, 2, 3 e 6 giorni (gg).

Le posizioni degli omoesameri GDH1(6β), GDH2 (6α) e GDH3 (6γ) sono indicate sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

I dati riportati in **Figura 11** inoltre mostrano che l'induzione di 6γ dipende dall'assenza totale di azoto e non di una particolare fonte di azoto. Infatti è possibile osservare la presenza di una banda, corrispondente all'attività dell'isoforma 6γ , solamente nell'estratto di radici del doppio mutante *gdh1-2* di piante cresciute in terreno completamente privo di azoto (**Figura 11**).

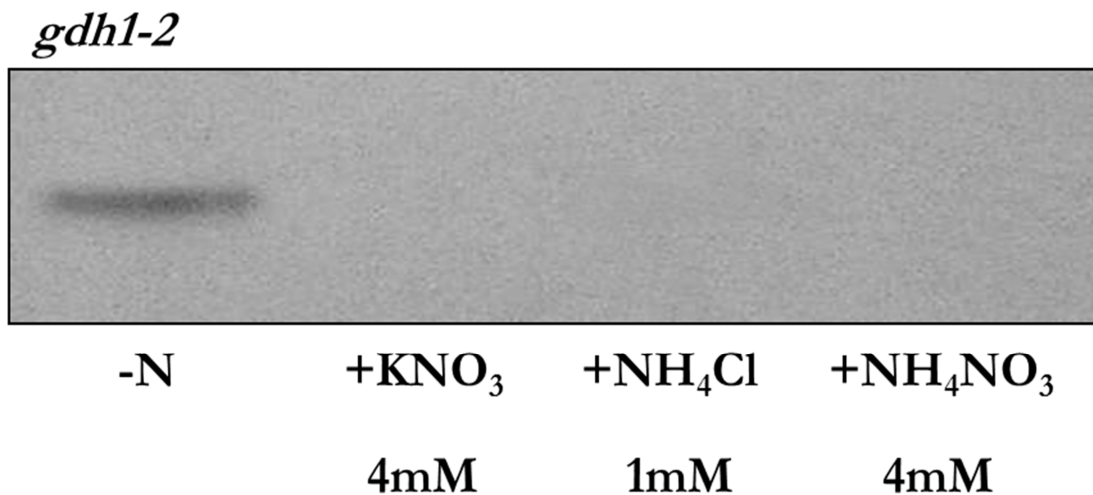


Figure 11: Effetto delle diverse fonti di azoto sull'espressione di 6γ . Piante di doppio mutante *gdh1-2* sono state incubate in un terreno privo di azoto (-N) o contenente 4mM KNO₃ (+KNO₃), o 1mM NH₄Cl (+NH₄Cl), o 4mM NH₄NO₃ (+NH₄NO₃) e contenente saccarosio 1% (w/v). Le radici sono state raccolte dopo 7 giorni.

Per ottenere indicazioni preliminari sui meccanismi che sono alla base del rilevamento della carenza di azoto e della trasmissione del segnale che induce l'espressione di *GDH3* e quindi per distinguere tra un effetto sistemico o localizzato della N-starvation, radici e foglie sono state excise dalle piante e messe in trattamento separatamente. In **Figura 12** si può vedere che l'induzione dell'isoforma 6γ riguarda solo le radici, mentre, come osservato nelle piante intere, non è possibile rilevare attività nelle foglie staccate.

Inoltre l'induzione di 6γ si verifica lungo tutta la radice e non, ad esempio, nel solo apice di questa. Infatti, quando estratti proteici di radici sezionate di piante cresciute in assenza di

azoto, sono stati analizzati separatamente l'attività 6γ risultava essere presente in tutte e tre le sezioni prese in considerazione (Figura 13).

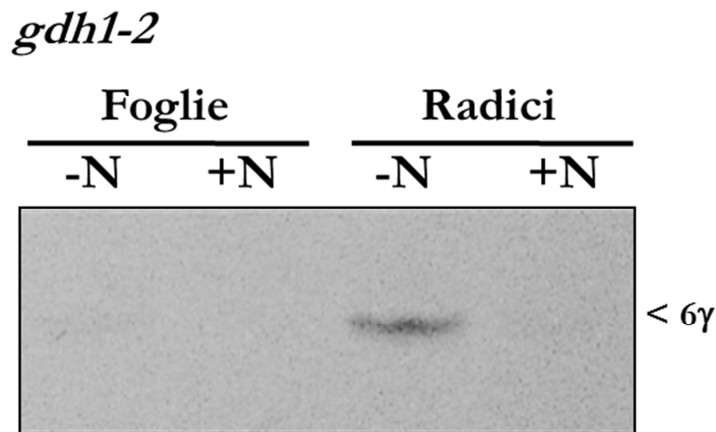


Figure 12: Espressione di 6γ in organi excisi di *Arabidopsis*. Radici e foglie di doppio mutante *gdh1-2* sono state excise e incubate separatamente in un terreno contenente (+N) o privo di azoto (-N) e con saccarosio 1% (w/v) per 7 giorni.

La posizione dell'omoesamero 6γ è indicata sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

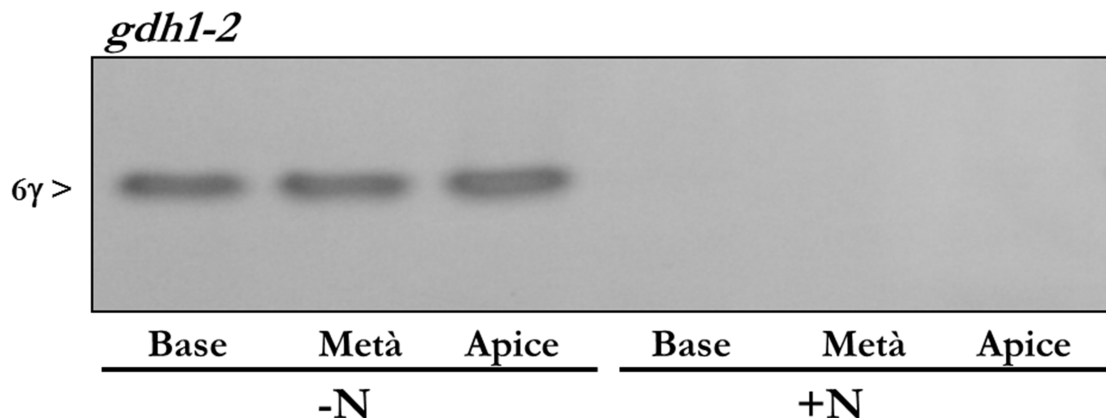


Figura 13: Espressione di 6γ in diverse sezioni delle radici. Piante di doppio mutante *gdh1-2* sono state fatte crescere in un terreno contenente (+N) o privo (-N) di azoto e contenente saccarosio 1% (w/v). Dopo 7 giorni, sono state raccolte le radici e suddivise in tre parti e di queste preparati gli estratti proteici.

La posizione dell'omoesamero GDH3 (6γ) è indicata a sinistra del gel.

2.2 Effetto della fonte di carbonio sull'attività dell'omoesamero 6γ

Un'osservazione interessante che è stata fatta, che ancora una volta evidenzia un possibile ruolo della GDH come elemento di un sistema regolativo o di segnalazione posto all'interfaccia tra il metabolismo dell'azoto e del carbonio, è che l'induzione dell'attività di 6γ , in condizioni di deprivazione di N, dipende dalla disponibilità di una fonte di carbonio. Infatti, quando il saccarosio non è presente nel terreno, non si osserva attività dell'isoforma 6γ (Figura 14).

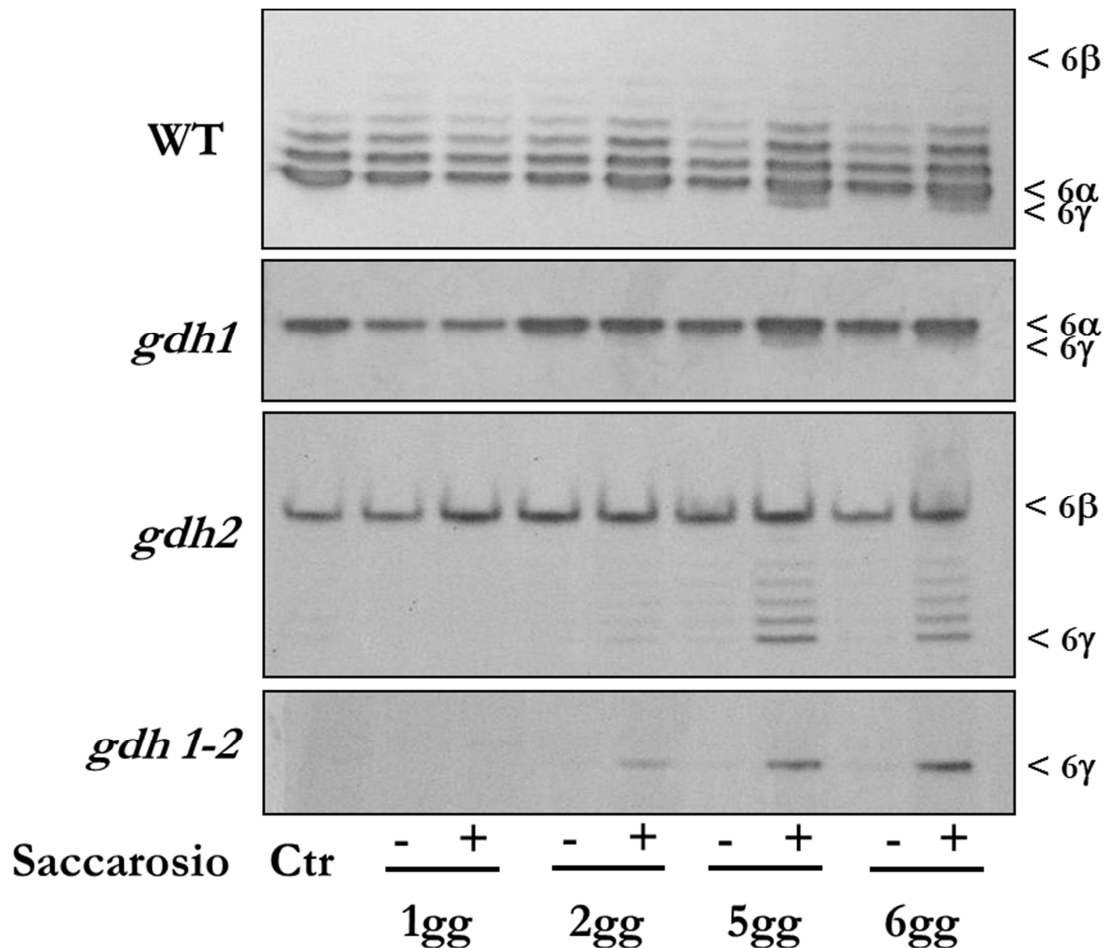


Figura 14: Effetto della fonte di carbonio (Saccarosio 1% w/v) sull'induzione del 6γ in radici di piante di nove giorni WT e mutanti di *Arabidopsis thaliana* in starvation d'azoto. Le radici delle piante cresciute in terreno con (+) o senza (-) fonte di carbonio, sono state raccolte a 1, 2, 3, 6 giorni (gg). Ctr indica il controllo (radici di piante cresciute in presenza di N e saccarosio per 6 giorni).

Le posizioni degli omoesameri GDH1(6β), GDH2 (6α) e GDH3 (6γ) sono indicate sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

I dati qui riportati mostrano che il saccarosio incrementa l'espressione in quanto soluto assimilabile dalla pianta infatti mentre il glucosio che come il saccarosio è assimilabile dalla pianta esercita un effetto inducente l'attività dell'isoforma 6γ , il mannitolo che è solo uno zucchero osmoticamente attivo, non è in grado di condizionarne l'espressione (**Figura 15**).

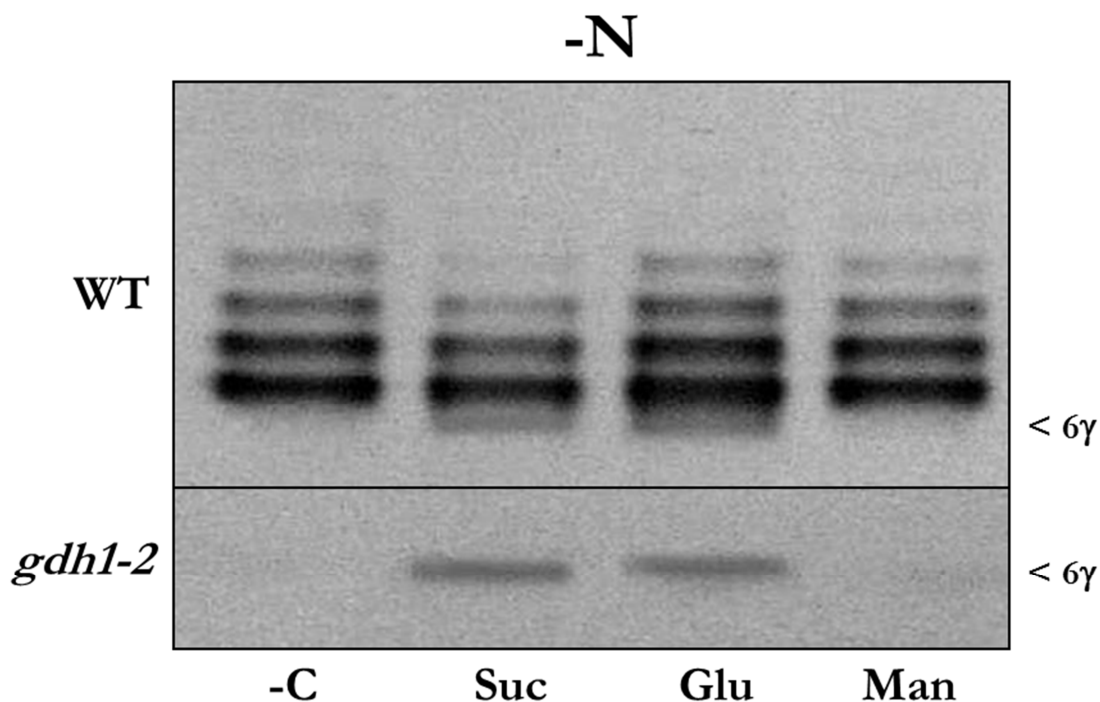


Figura 15: Effetto del saccarosio sull'espressione di 6γ . Piante (WT e doppio mutanti *gdh1-2*) di nove giorni, sono state incubate in un terreno privo di azoto contenente saccarosio (**Suc**; 1% w/v) o glucosio (**Glu**; 1% w/v) o mannitolo (**Man**; 1% w/v) o privo di fonte di carbonio (**-C**). Le radici sono state raccolte dopo 7 giorni.

La posizione dell'omoesaemero GDH3 (6γ) è indicata sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

Esperimenti successivi, hanno inoltre dimostrato che l'effetto positivo dei carboidrati solubili sull'induzione dell'omoesamero 6γ nelle radici del doppio mutante *gdh1-2*, in assenza di azoto, non è modificato quando le piante sono poste in una condizione di buio continuo, purchè sia presente saccarosio. Al contrario, una lieve induzione di 6γ si può notare in assenza di saccarosio, quando le piante vengono fatte crescere per sette giorni sotto un'illuminazione costante (**Figura 16**).

Particolarmente interessante risulta essere la seguente osservazione: quando le piante del doppio mutante *gdh1-2* vengono fatte crescere per 12 giorni in un terreno privo di azoto, ma contenente saccarosio, una debole banda di attività dell'omoesamero 6γ è rilevabile negli estratti fogliari, sia che le piante siano cresciute sotto un'illuminazione costante, sia in una condizione di buio continuo (**Figura 16**). Anche nelle foglie deve quindi arrivare un segnale in grado di attivare la risposta che porta all'induzione del gene *GDH3*. Il ritardo temporale dell'induzione nel tessuto fogliare rispetto a quello radicale potrebbe avere un significato fisiologico che al momento, in mancanza di ulteriori dati, è tuttavia meramente speculativo.

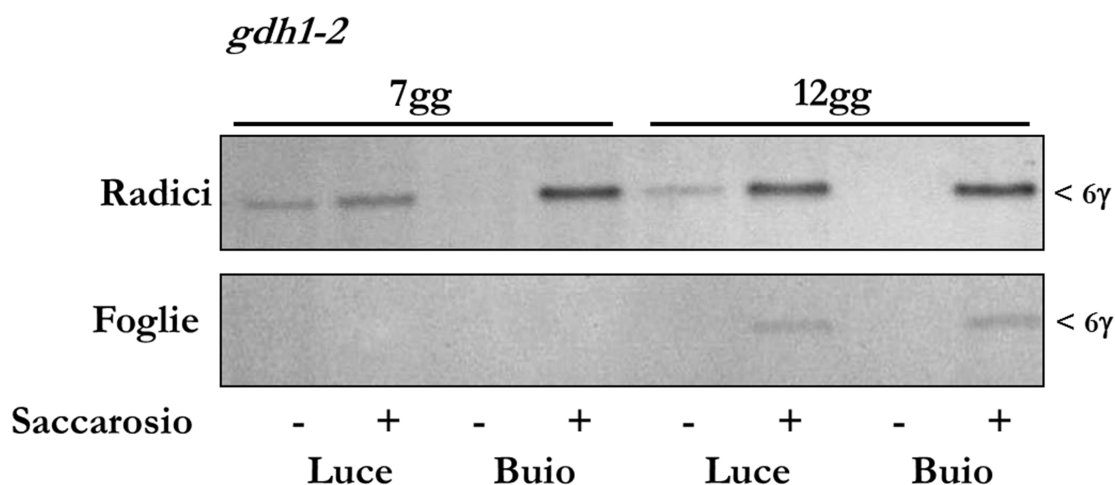


Figura 16: Effetto del regime luce/buio sull'induzione di 6γ nelle radici e nelle foglie di piante cresciute in starvation d'azoto. Piante di doppio mutante *gdh1-2* sono state incubate in un terreno privo di azoto con (+) o senza (-) saccarosio (1% w/v) e fatte crescere sotto un'illuminazione costante o al buio. Radici e foglie sono state raccolte dopo 7 e 12 giorni (gg).

La posizione dell'omoesamero GDH3 (6γ) è indicata sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

La presenza del saccarosio e l'estensione del fotoperiodo, suggeriscono tuttavia che una fonte di energia (carbonio fotosintetico o aggiunto dall'esterno) è necessaria per l'induzione della sintesi della subunità γ sia nelle radici che nelle foglie, in una situazione di carenza di azoto.

2.3 Analisi immunologica

La metodologia sperimentale finora descritta, e fin qui utilizzata, per analizzare la modificazione dell'espressione del sistema genetico della GDH è basato sul rilevamento della presenza/ assenza di bande di attività enzimatica (rilevamento dell'attività dell'enzima “*in gel*”, i.e. analisi dello zimogramma della GDH). Tuttavia questa non permette di discriminare tra l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo di controllo trascrizionale/traduzionale o di uno post-traduzionale (i.e. sull'attività delle isoforme) dell'espressione genica.

È stata quindi condotta una ulteriore analisi per verificare se l'assenza di attività dell'omoesamero 6γ , riscontrata mediante PAGE e colorazione in gel fosse il risultato dell'assenza o meno della corrispondente proteina.

A questo scopo è stato effettuato un PAGE nativo, seguito da colorazione, su estratti proteici di piante di *Arabidopsis* WT utilizzate come controllo e di radici e foglie del doppio mutante *gdb1-2* cresciuti sia in presenza che in assenza di azoto. Come atteso, l'attività dell'omoesamero 6γ è stata riscontrata solo nelle radici in starvation d'azoto del doppio mutante *gdb1-2* (**Figura 17A**).

Lo stesso gel dopo opportuno trattamento (vedi *Materiali e Metodi* Sezione **2.6**) è stato sottoposto a Western blotting utilizzando un anticorpo specifico diretto contro la GDH di vite. Come si può osservare il profilo di attività (**Figura 17A**) e quello di ibridazione con l'anticorpo sono sovrapponibili (**Figura 17B**). Questo risultato permette di asserire che la regolazione del profilo isoenzimatico è basato (anche se non esclusivamente) sul controllo del livello delle subunità proteiche delle isoforme.

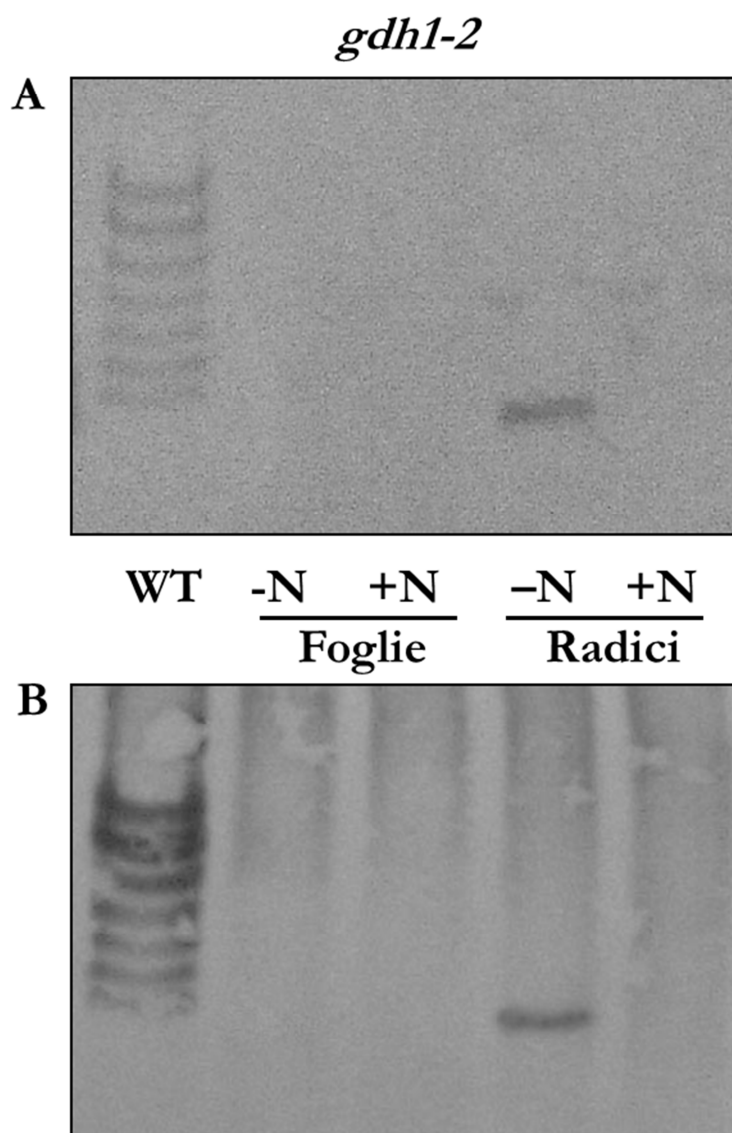


Figura 17: A) Analisi dei profili di espressione della GDH nel WT e nel doppio mutante *gdh1-2* in foglie e radici in presenza e in assenza di azoto e **B)** corrispondente Western blotting con anticorpo anti-GDH.

3. INDUZIONE CHINETINA-DIPENDENTE DELL'ATTIVITA'

DELL'ISOFORMA 6 γ

L'ipotesi che l'isoforma 6 γ possa essere coinvolta nella riallocazione del carbonio e dell'azoto durante gli stadi finali della vita della pianta, ci ha portato ad approfondire alcuni aspetti che regolano la senescenza nelle piante. La senescenza è essenziale per lo sviluppo dei tessuti riproduttivi della pianta, perché è caratterizzata da una transizione dall'assimilazione alla rimobilizzazione dei nutrienti verso le parti della pianta che necessitano di un notevole apporto di energia, come possono essere gli organi riproduttivi. Numerosi studi sono stati condotti per definire i meccanismi di regolazione della senescenza fogliare, ed è stato visto che alcuni segnali ormonali, come citochinine, etilene, acido salicilico, e jasmonato, e vari segnali ambientali sono coinvolti durante questo processo (He *et al.*, 2002; Buchanan- Wollaston *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2005; Zhang and Zhou, 2013).

In particolare le citochinine, una classe di ormoni vegetali che regolano diversi processi di crescita e sviluppo delle piante, hanno un effetto importante sulla longevità degli organi vegetali (Gan and Amasino, 1995; McCabe *et al.*, 2001). Ad esempio, le piante transgeniche che presentano un incremento della biosintesi delle citochinine, mostrano ritardo nella senescenza e maggiore produttività (Gan and Amasino, 1995). Numerosi studi hanno indicato che il metabolismo dell'azoto è controllato dalle citochinine (Takei *et al.*, 2004; Sakakibara *et al.*, 2006), suggerendo che il controllo da parte delle citochinine del metabolismo dell' azoto e degli amminoacidi è importante per la senescenza fogliare e la rimobilizzazione dei nutrienti. Le citochinine infatti regolano l'espressione di diversi geni coinvolti nell'uptake e nell'assimilazione dell'azoto e sono componenti del sistema di percezione dello status nutrizionale della pianta.

Di fronte a queste evidenze ci siamo chiesti se le citochinine fossero coinvolte anche nei processi di induzione dell'attività dell'omoesamero 6 γ in *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Effetto della chinetina sull'induzione dell'attività dell'isoforma 6 γ

Per il seguente esperimento è stata utilizzata la chinetina, un composto sintetico ad azione citochininica.

In questa serie di esperimenti è stato usato il doppio mutante *gdb1-2*, piuttosto che WT o i due singoli mutanti, in quanto in questo contesto genotipico è più facile mettere in evidenza cambiamenti nella quantità di omoesamero 6 γ . Quando piante del doppio mutante *gdb1-2* sono fatte crescere per 6 giorni in un terreno liquido privo di azoto, contenente saccarosio, l'induzione dell'attività dell'omoesamero 6 γ nelle radici è maggiore se è presente chinetina (**Figura 18**). Ancor più interessante è l'osservazione che l'aggiunta di chinetina al terreno contenente azoto e saccarosio, induce anch'essa l'attività dell'omoesamero 6 γ , seppur a livelli più bassi di quanto osservato in condizioni di privazione di azoto. L'induzione chinetina-dipendente dell'omoesamero 6 γ si osserva anche negli estratti di foglie di piante cresciute in un terreno privo di azoto ma con saccarosio. L'insieme di questi risultati mostra quindi che la chinetina 1) è in grado di amplificare gli effetti della starvation d'azoto e 2) che può consentire l'induzione di 6 γ in piante azoto-sufficienti.

Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che le citochinine sono note inibire l'assorbimento degli ioni nitrato e ammonio nelle radici (Krouk *et al.*, 2011; Kiba *et al.*, 2011). Pertanto è possibile che l'applicazione esterna delle citochinine possa simulare la condizione di starvation d'azoto nelle radici, limitando così l'assorbimento dell'N inorganico e inducendo così l'attività dell'omoesamero 6 γ .

Tuttavia, l'induzione è stata completamente abolita quando il saccarosio è stato omesso dal terreno, a prescindere dalla disponibilità di azoto, evidenziando ancor più l'importanza del rapporto C/N come elemento di controllo nel meccanismo di segnalazione che permette l'induzione dell'attività dell'omoesamero 6 γ .

3.2 Rimozione degli organi riproduttivi

E' stato dimostrato in *Arabidopsis thaliana*, che la longevità dell'intera pianta è sotto il controllo delle strutture riproduttive (Nooden and Penney, 2001). Infatti, la rimozione degli organi fiorali immaturi, impedisce il completamento della senescenza.

In un lavoro del 2009 (Igarashi *et al.*, 2009), è stato riportato un esperimento in cui in risposta alla excisione degli organi riproduttivi di *A. thaliana* si è potuto osservare un aumento dei livelli di espressione dei geni per la biosintesi delle citochinine e un aumento del contenuto di citochinine. Ci siamo chiesti: in queste condizioni sperimentali quale sarà la risposta del gene *GDH3* e quindi di 6 γ ? Si è deciso pertanto di ripetere l'esperimento e verificare la presenza di attività 6 γ .

Gli organi riproduttivi del mutante *gdb1-2* sono quindi stati rimossi e quello che si osserva, a 24 e 48 h dopo la rimozione, è una lieve induzione dell'omoesamero 6 γ nella nervatura centrale della foglia (**Nc**), ma non nella lamina fogliare (**Lf**) (**Figura 19**).

Abbiamo ottenuto quindi un'evidenza indiretta del coinvolgimento delle citochinine nell'induzione di 6 γ .

Questi dati suggeriscono che le citochinine regolano la comunicazione tra organi riproduttivi e organi vegetativi, e che 6 γ potrebbe essere uno dei target della regolazione mediata da citochinine del metabolismo dell'azoto.

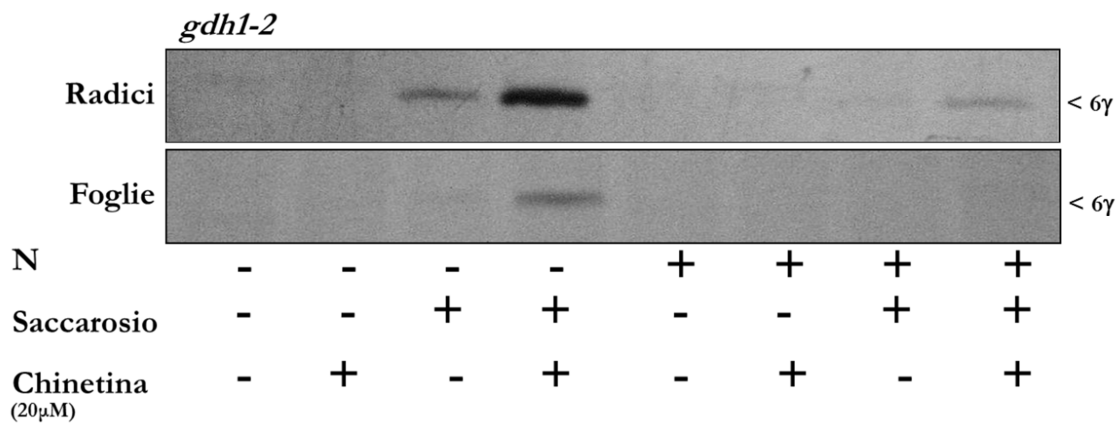


Figure 18: Effetto delle citochinine sull'induzione di 6γ. Piante di nove giorni di doppio mutante *gdh1-2* sono state incubate in un terreno liquido con o senza azoto (4 mM KNO₃ e 4 mM NH₄NO₃), saccarosio (1% w/v) e chinetina (20 mM). Foglie e radici sono state raccolte dopo 6 giorni. La posizione dell'omoesamero GDH3 (6γ) è indicata sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

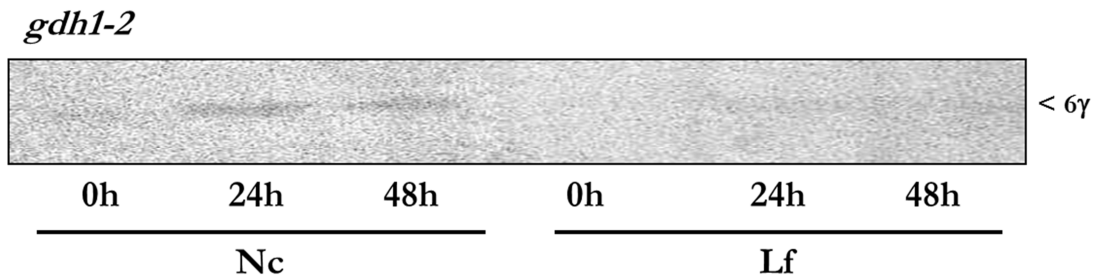


Figure 19: Effetto della rimozione degli organi riproduttivi sull'induzione di 6γ. Piante completamente sviluppate (35 DAS) di doppio mutante *gdh1-2*, sono state private degli steli fiorali. Le foglie sono state raccolte 0, 24 o 48 h dopo la rimozione e la nervatura centrale (Nc) è stata separata dal resto della lamina fogliare (Lf). La posizione dell'omoesamero GDH3 (6γ) è indicata sulla destra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

4. MECCANISMO DI SEGNALAZIONE

4.1 Split Root

Per ottenere ulteriori informazioni sulla natura del meccanismo di segnalazione che porta all'attivazione dell'isoforma 6 γ quando le piante crescono in assenza di N, e capire se faccia parte di un sistema più complesso in grado di consentire alla pianta di scandagliare l'ambiente circostante in modo da ottimizzare l'assimilazione dell'azoto, abbiamo allestito un esperimento di tipo "split root". Questo esperimento consiste nel dividere spazialmente le radici di una stessa pianta, facendole crescere in due terreni diversi: uno contenente azoto ed uno privo (Vedi *Materiali e Metodi* Sezione 1.4) e permette di rispondere al quesito: la risposta alla deprivatione da azoto è tessuto specifica o è invece di tipo sistemico?

Questo esperimento è stato allestito come riportato schematicamente qui sotto includendo gli opportuni controlli:

- Controllo negativo: entrambi i terreni contenenti azoto (NH_4NO_3 4mM + KNO_3 4mM);
- Controllo positivo : entrambi i terreni privi di azoto;
- Condizione da testare: un terreno contenente azoto (NH_4NO_3 4mM + KNO_3 4mM) e uno privo.

I risultati ottenuti a seguito di una corsa elettroforetica nativa degli estratti proteici ottenuti dalle radici delle piante trattate mostrano, come atteso, assenza di attività nelle piante di controllo fatte crescere in presenza di azoto e al contrario presenza di attività nelle piante di controllo fatte crescere in assenza di azoto. Interessante è invece il risultato ottenuto nelle piante cresciute con parte delle radici in terreno con azoto e parte delle radici cresciute in terreno privo di azoto. In questo caso si può notare presenza di attività solo nella parte di radici cresciuta in assenza di azoto (**Figura 20**).

Questo vuol dire che l'induzione dell'isoforma 6γ avviene in risposta ad un segnale di disponibilità locale di azoto e che rimane localizzata al solo tessuto che rileva questa condizione nutrizionale.

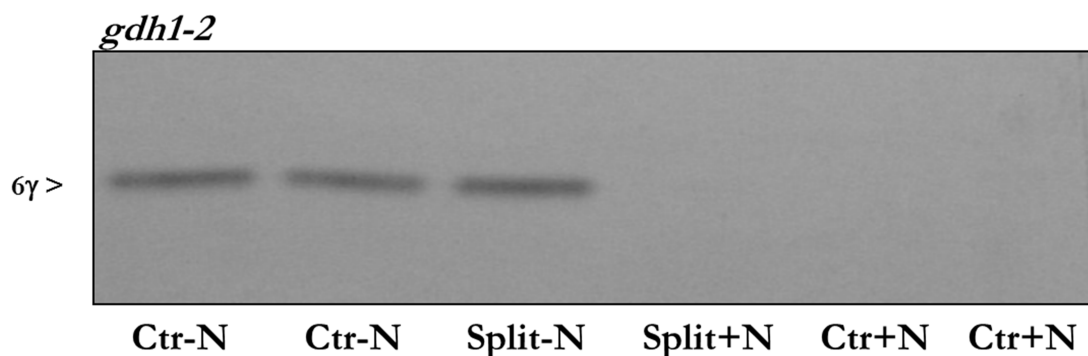


Figure 20: Esperimento “Split Root”. Piante di doppio mutante *gdh1-2*, sono state fatte crescere per 7 giorni, posizionando le radici a cavallo di due piastre. **Ctr-N** rappresenta il controllo positivo: il terreno contenuto nelle due piastre è privo di azoto; **Ctr+N** rappresenta il controllo negativo: il terreno contenuto nelle due piastre contiene azoto (4 mM KNO_3 e 4 mM NH_4NO_3); **Split±N** rappresenta la condizione da testare: un terreno contiene azoto (4mM NH_4NO_3 e 4mM KNO_3) e uno ne è privo.

La posizione dell'omoesamero GDH3 (6γ) è indicata sulla destra del gel.

4.2 Ruolo del glutammato

Un secondo aspetto che occorre tenere in considerazione nel dissezionare il processo di segnalazione della carenza di azoto è chiarire il ruolo di alcuni amminoacidi che in quanto tali possono costituire, una fonte di azoto (anche se non convenzionale) ma anche rappresentare un segnale chimico percepito da recettori localizzati sulla membrana cellulare. Sono stati infatti individuati nelle piante dei recettori per il glutammato (analoghi a quelli presenti nei mammiferi) la cui funzione non è però ancora stata chiarita (Forde and Roberts, 2014). Tuttavia si è potuto dimostrare che il glutammato, a dosi micro molari, è in grado di indurre cambiamenti morfologici delle radici (Forde *et al.*, 2013).

Questi cambiamenti potrebbero essere messi in relazione alla risposta del sistema radicale della pianta alle modificazioni dell'ambiente circostante (disponibilità di azoto) (Forde and Walch-Liu, 2009).

Abbiamo quindi eseguito un esperimento in cui abbiamo fatto crescere le piante in presenza di glutammato e glutammina a diverse concentrazioni. La glutammina è stata scelta perchè, è un amminoacido che, come il glutammato è coinvolto nelle fasi iniziali di assimilazione dell'azoto, ma a differenza del glutammato non induce il cambiamento morfologico della radice (Forde, 2013). Per svolgere questo esperimento sono stati sterilizzati i semi e successivamente sono stati piastrati su terreni contenenti:

- Controllo negativo: +N (NH_4NO_3 4mM + KNO_3 4mM);
- Controllo positivo: -N;
- Glutammato 50 μ M; 1mM; 5mM;
- Glutammina 50 μ M; 1mM; 5mM.

I risultati, ottenuti a seguito di una corsa elettroforetica nativa degli estratti proteici ottenuti dalle radici delle piante trattate mostrano, come atteso, assenza di attività nelle piante di controllo fatte crescere in presenza di azoto e al contrario presenza di attività nelle piante di controllo fatte crescere in assenza di azoto. Inoltre si osserva un decremento dell'intensità dell'attività dell'omoesamero 6γ all'aumentare della concentrazione di glutammina fino a sparire alla concentrazione di 5mM. Invece quando è presente il glutammato come unica fonte di azoto, si osserva attività dell'isoforma 6γ fino alla concentrazione di 5mM, sebbene, anche in questo caso, si osservi un decremento dell'intensità della banda all'aumentare della concentrazione di glutammato (**Figura 21**).

Glutammato e glutammina mostrano quindi un differente comportamento. Per la glutammina, concentrazioni di 5mM sono sufficienti per sopperire al bisogno di N, cosa invece non osservabile per il glutammato il quale, alle stesse concentrazioni, determina la presenza di una, seppur debole, attività dell'isoforma 6γ .

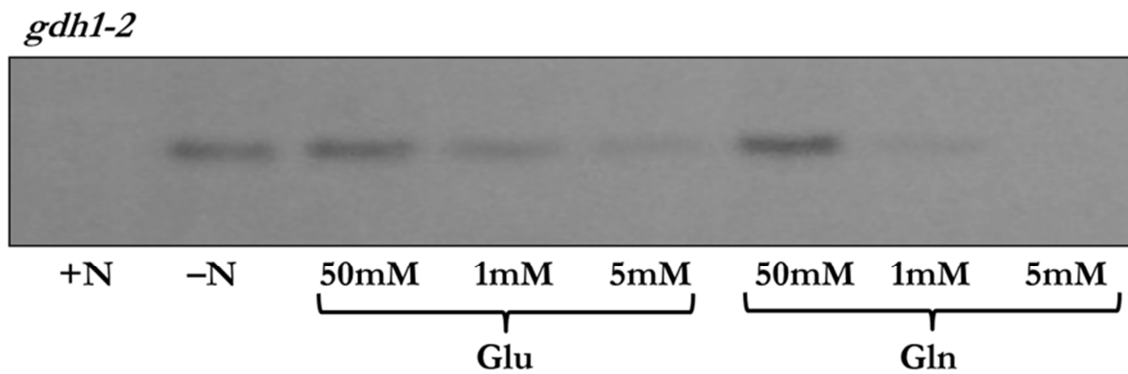


Figure 21: Effetto di diversi amminoacidi sull'espressione di γ . Piante di doppio mutante *gdb1-2* sono state fatte crescere in un terreno contenente saccarosio 1% (w/v), ma privo di azoto in presenza di glutammato (**Glu**) e glutammina (**Gln**) a diverse concentrazioni. **+N** e **-N** rappresentano rispettivamente il controllo negativo e positivo. Le radici sono state raccolte dopo 7 giorni.

Ci siamo chiesti se questa differenza fosse dovuta principalmente al fatto che nella glutammina è presente un gruppo amminico in più rispetto al glutammato e quindi, per tale motivo, potesse costituire una fonte di azoto più ricca rispetto al glutammato, o se invece quest'ultimo amminoacido potesse avere anche il ruolo di molecola segnale nel processo di attivazione dell'isoforma 6 γ . Per approfondire tale aspetto è stato allestito un esperimento in cui abbiamo fatto crescere le piante in un terreno in cui l'unica fonte di azoto fosse rappresentata da glutammina alla concentrazione di 5 mM (concentrazione alla quale non si osserva più attività dell'isoforma 6 γ) + glutammato a diverse concentrazioni (50 μ M, 1mM, 5 mM).

Quello che si osserva è che in nessuna condizione, si osserva induzione dell'omoesamero 6γ (**Figura 22**). Questo risultato avvalorava l'ipotesi che la glutammina sopperisca alla carenza di azoto meglio di quanto possa fare il glutammato e che quindi la differenza che si osserva tra i campioni cresciuti con sola glutammina o glutammato alla concentrazione di 5 mM (del primo esperimento), sia essenzialmente dovuta alla presenza di due gruppi amminici del primo amminoacido, rispetto ad un solo gruppo amminico del secondo. .

Questi risultati sopra riportati non possono comunque ritenersi conclusivi anche perché non è stato osservato, nelle condizioni sperimentali da noi utilizzate, l'effetto morfologico del glutammato sulla radice descritto nei lavori del gruppo di ricerca citato (Forde and Walch-Liu, 2009; Forde, 2013). Ulteriori esperimenti saranno quindi necessari (ad es. del tipo “Split Root”) per stabilire un eventuale ruolo del glutammato nel processo di induzione dell'isoforma 6γ.

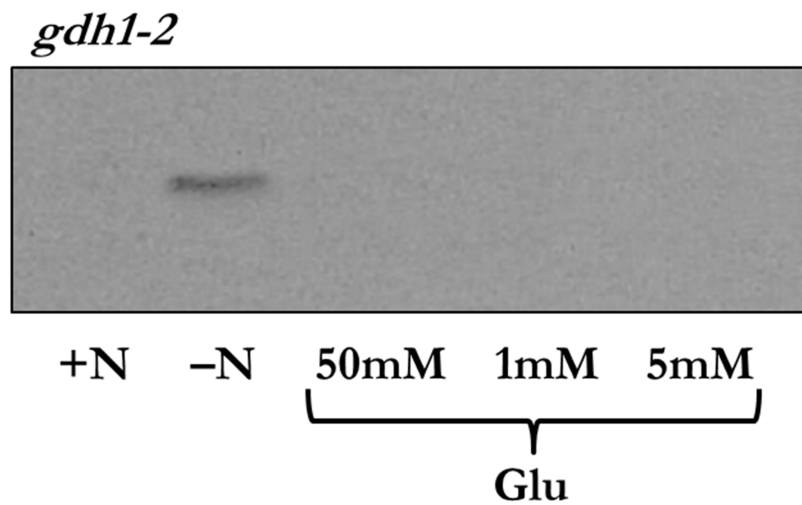


Figure 22: Effetto del glutammato sull'espressione di 6γ. Piante di doppio mutante *gdh1-2* sono state fatte crescere in un terreno contenente saccarosio 1% (w/v), ma privo di azoto in presenza di glutammato (**Glu**) e a diverse concentrazioni + glutammina (**Gln**) 5mM. +N e -N rappresentano rispettivamente il controllo negativo e positivo. Le radici sono state raccolte dopo 7 giorni.

5. ANALISI FILOGENETICA

Per ottenere ulteriori evidenze della rilevanza di questo sistema enzimatico e in particolare della isoforma 6 γ nella fisiologia e nello sviluppo delle piante, ci siamo chiesti se la comparsa di un terzo gene *GDH* sia da considerarsi un evento occasionale avvenuto indipendentemente in diversi momenti della storia evolutiva delle piante terrestri o se il fatto che non sia stato descritto per la maggior parte delle specie sia da attribuire alla mancanza di un'analisi mirata dei profili di espressione dei geni *GDH*.

3.1 Analisi del pattern isoenzimatico della GDH in altre specie appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae

E' stata quindi condotta un'analisi filogenetica su piante appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* (di cui fa parte *Arabidopsis thaliana*).

Piantine di 7 giorni di due ecotipi di *Arabidopsis thaliana* (Wassilewskija e Landsberg erecta), *Arabidopsis halleri*, *Arabidopsis lyrata* e *Capsella rubella*, sono state fatte crescere in un terreno liquido privo di azoto e con saccarosio per 7 giorni. Solamente nelle radici dei due ecotipi di *Arabidopsis thaliana* (Wassilewskija e Landsberg erecta), si osserva l'induzione dell'omoesamero 6 γ (**Figura 23**).

Ciò è sorprendente perché *C. rubella* e *A. halleri* possiedono quello che può essere considerato il cariotipo ancestrale di *Arabidopsis thaliana* (Schranz *et al.*, 2006), è quindi probabile che a seguito di riarrangiamenti dei loro genomi durante l'evoluzione un gene *GDH3* funzionale sia stato perso o comunque spento.

Nel caso di *A. lyrata*, il cui genoma è stato recentemente completamente sequenziato, e che risulta possedere una sequenza nucleotidica omologa a quella di *GDH3* di *A. thaliana*, non è possibile ricorrere a questo tipo di spiegazione. Poiché la sequenza in questione sembra

avere tutte le caratteristiche per essere codificante (non è uno pseudo-gene), si può ipotizzare che il gene possieda delle sequenze regolative differenti da quelle dell'omologo di *A. thaliana* e/o comunque l'isoenzima 6 γ non risponda nello stesso modo, in *A. lyrata*, alla variazione della condizione fisiologica qui analizzata. Questo come conseguenza di uno specifico adattamento evolutivo di *A. lyrata* ad un diverso ecosistema.

Potrebbe essere interessante in questo senso analizzare altre specie del genere *Arabidopsis* che risultano rispondere diversamente alla disponibilità di N (Schranz *et al.*, 2006).

Tuttavia, l'analisi dei pattern isoenzimatici di boccioli fiorali di alcune specie appartenenti alle *Brassicaceae* ha prodotto un risultato analogo a quello sopra riportato: l'induzione dell'omoesamero 6 γ è stata osservata soltanto nei tre ecotipi di *Arabidopsis thaliana* (Columbia, Wassilewskija e Landsberg erecta; dato non mostrato). Ovviamente non è possibile escludere che anche questa risposta sviluppo-dipendente sottintenda differenze specie-specifiche connesse ad una diversa regolazione metabolica durante il processo riproduttivo.

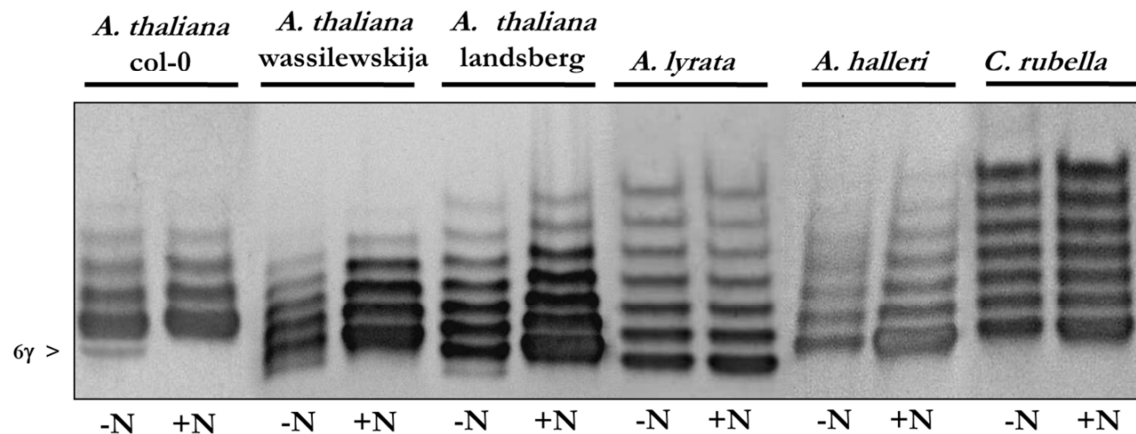


Figure 23: Attività dell'isoenzima 6 γ in diverse specie di *Brassicaceae*. Piante di nove giorni di tre ecotipi di *Arabidopsis thaliana* (Columbia, Wassilewskija e Landsberg erecta), *Arabidopsis halleri* (*A. halleri*), *Arabidopsis lyrata* (*A. lyrata*) e *Capsella rubella* (*C. rubella*), sono state poste in un terreno liquido con o senza azoto inorganico (4 mM KNO₃ e 4 mM NH₄NO₃). Le radici sono state raccolte dopo 7 giorni.

La posizione dell'omoesamero GDH3 (6 γ) è indicata sulla sinistra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2013

6. VALUTAZIONE DELLA TERMOSTABILITA' DEGLI OMOESAMERI

GDH DI *A. thaliana*

Come riportato in precedenza la modulazione del profilo isoenzimatico della GDH potrebbe anche dipendere da meccanismi post-traduzionali. In altre parole, è possibile che le piante, oltre ad affidarsi ad un meccanismo di controllo trascrizionale in grado di regolare l'espressione dei geni che codificano per le diverse subunità dell'enzima, abbiano evoluto un meccanismo di regolazione post-traduzionale in grado di regolare l'attività dell'enzima. Per esempio, l'assemblaggio delle subunità GDH per formare un esamero e la sua stabilità in un ambiente cellulare specifico, possono essere essenziali per l'attività enzimatica e, come tale, il bersaglio per uno step di regolazione.

I meccanismi biochimici che regolano il processo di isomerizzazione delle subunità della GDH nelle piante sono stati scarsamente studiati, con poche eccezioni, e non sono ancora pienamente compresi (Osuji *et al.*, 2003, 1999, 1997).

Un parametro che può essere utilizzato per ottenere informazioni sulla stabilità delle interazioni tra le subunità di un oligomero è la maggiore o minore sensibilità al trattamento termico del complesso.

Un buon esempio in questo senso è fornito dalla GDH umana (hGDH) che, come nelle piante, ha una struttura esamerica (Shashidharan *et al.*, 1997). Le subunità hGDH sono codificate da due geni, *GLUD1* e *GLUD2*, che assemblandosi danno origine a diverse isoforme con localizzazione tessuto specifica e mostrano una stabilità termica differente (Shashidharan and Plaitakis, 2014). In particolare Shashidharan e collaboratori (Shashidharan *et al.*, 1997) hanno mostrato che l'isoforma più termoresistente è GDH1, mentre quella più termosensibile è GDH2. In un lavoro del 2004 (Yang *et al.*, 2004) viene

mostrato come la sostituzione di un solo amminoacido nell'isoforma della GDH termosensibile di uomo, con il residuo corrispondente e quindi localizzato nella stessa posizione, nella sequenza dell'isoforma termoresistente, porti ad un aumento della stabilità termica.

Quando ho iniziato il mio lavoro di ricerca erano già disponibili dati (Pavesi *et al.*, 2000; Syntichaki *et al.*, 1996) che mostravano che l'attività della GDH di pianta (misurata nel suo complesso) presenta una maggiore termoresistenza rispetto a quella di altri eucarioti. Ho quindi voluto verificare se questa proprietà accomunava o meno tutte le isoforme della GDH di *Arabidopsis thaliana*.

6.1 Stabilità termica dei differenti isoenzimi della GDH

Dal momento che il pattern isoenzimatico della GDH non può essere facilmente osservato in una singola corsa elettroforetica, ci siamo avvalsi dell'utilizzo dei diversi mutanti per la GDH di *Arabidopsis*. Infatti grazie all'uso di mutanti della GDH singoli (*gdb1* e *gdb2*) e doppio (*gdb1-2*), si riescono ad osservare le varie omo- e etero- isoforme (Fontaine *et al.*, 2013; Marchi *et al.*, 2013): le isoforme più attive della GDH, gli omoesameri 6α e 6β e gli eteroesameri α/β , sono facilmente visibili negli estratti di piante WT mentre gli omoesameri 6γ e eteroesameri β/γ si osservano meglio negli estratti di radici del doppio mutante *gdb1-2* e del mutante *gdb2*, rispettivamente.

Di conseguenza, per studiare la stabilità termica delle diverse isoforme GDH, estratti proteici di radice di WT, doppio mutante *gdb1-2* e singolo mutante *gdb2* sono stati incubati per 20 minuti a diverse temperature comprese tra 60 e 80° C.

L'attività dell'omoesamero 6γ e degli eteroesameri β/γ è completamente inattivata a 70 ° C, mentre gli omoesameri α e β e gli eteroesameri α/β rimangono attivi anche dopo un trattamento di 20 min a 75° C (**Figura 24**).

L'instabilità termica relativa all'omoesamero 6γ è confermata anche in un esperimento in cui un mix di estratti proteici di radice dei mutanti *gdb1*, *gdb2* e *gdb1-2* è stato incubato per un massimo di 20 minuti a 70 ° C.

L'attività dell'omoesamero 6γ della GDH sparisce dopo 10 min di trattamento termico, mentre quella degli omoesameri 6β e 6α è ancora visibile dopo 20 min di incubazione (**Figura 25**). La termoresistenza degli oligomeri 6α e 6β non è una caratteristica specifica delle isoforme della GDH di *A. thaliana* poiché l'oligomero 6β di *N. plumbaginifolia* mostra una resistenza alla denaturazione termica paragonabile alla controparte in *Arabidopsis* (**Figura 26**).

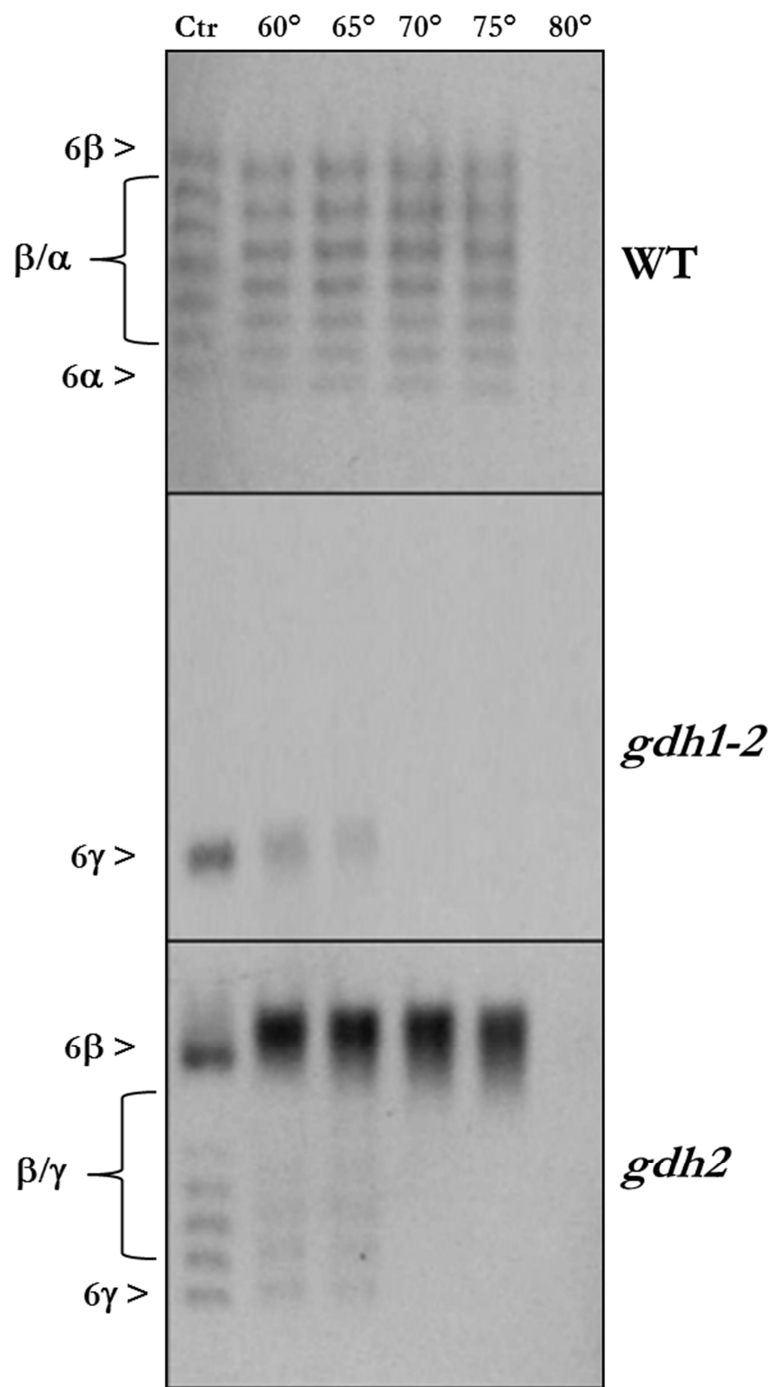


Figura 24: Stabilità termica degli isoenzimi GDH. Estratti proteici di radici di piante di *Arabidopsis* WT e doppio mutante *gdh1-2*, sono state incubate per 20 min a temperature comprese tra 60°C e 80°C. **Ctr:** controllo non trattato.

Le posizioni degli omoesameri GDH1 (6β), GDH2 (6α) e GDH3 (6γ) e degli eteroesameri α/β e β/γ sono indicate sulla sinistra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2014

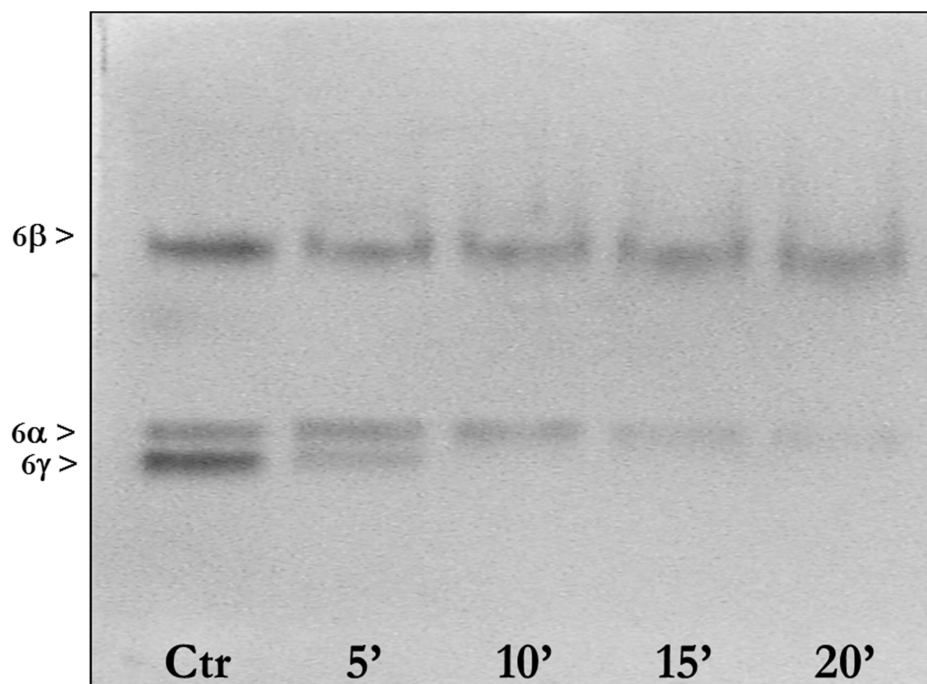


Figura 25: Termostabilità degli omoesameri della GDH. Una mix di estratti di radici dei mutanti *gdb1*, *gdb2* e doppio mutante *gdb1-2* è stata incubata fino a 20 min a 70°C. **Ctr:** controllo non trattato.

Le posizioni degli omoesameri GDH1 (6β), GDH2 (6α) e GDH3 (6γ) sono indicate sulla sinistra del gel.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2014

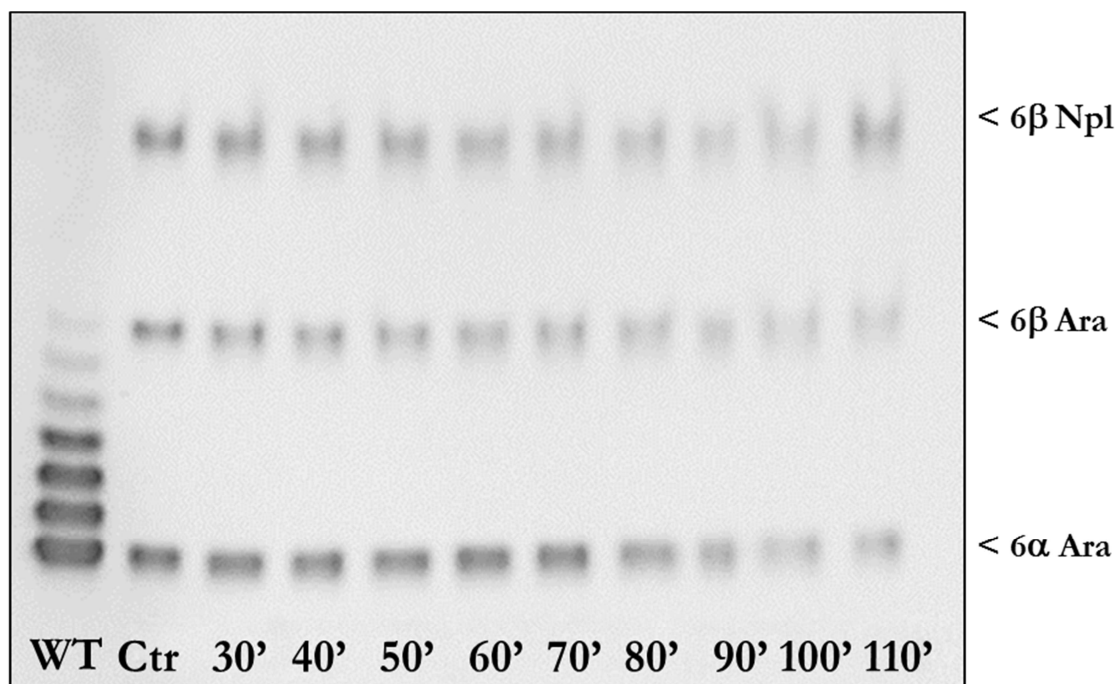


Figura 26: Stabilità termica dell'omoesamero 6β di *Nicotiana plumbaginifolia*. Una mix di estratti proteici dei mutanti *gdb1* e *gdb2* di *A. thaliana* e del trasformatante antisense GDHA di *Nicotiana plumbaginifolia* è stata incubata fino per un massimo di 110 min a 70°C. **Ctr:** controllo non trattato.

Le posizioni dei due omoesameri di *A. thaliana*, GDH1 (6β Ara) e GDH2 (6α Ara), e l'omoesamero di *Nicotiana plumbaginifolia* GDHB (6β Npl) sono indicate sulla destra del gel. L'estratto di *A. thaliana* WT è utilizzato come marker.

Adattata da: Marchi *et al.*, 2014

6.2 Modeling della proteina GDH

Al fine di individuare possibili residui amminoacidici responsabili della differente stabilità termica dell' isoforma GDH3, sono state confrontate le sequenze amminoacidiche dedotte da 27 sequenze nucleotidiche vegetali disponibili in banca dati. Sono stati quindi individuati tre amminoacidi all'estremità C- terminale (I397, I406 e S411), i quali sono conservati in tutte le subunità GDH delle specie analizzate tranne che in quelle codificate dal gene GDH3 di *Arabidopsis thaliana* e *Arabidopsis lyrata* (**Figura 27**).

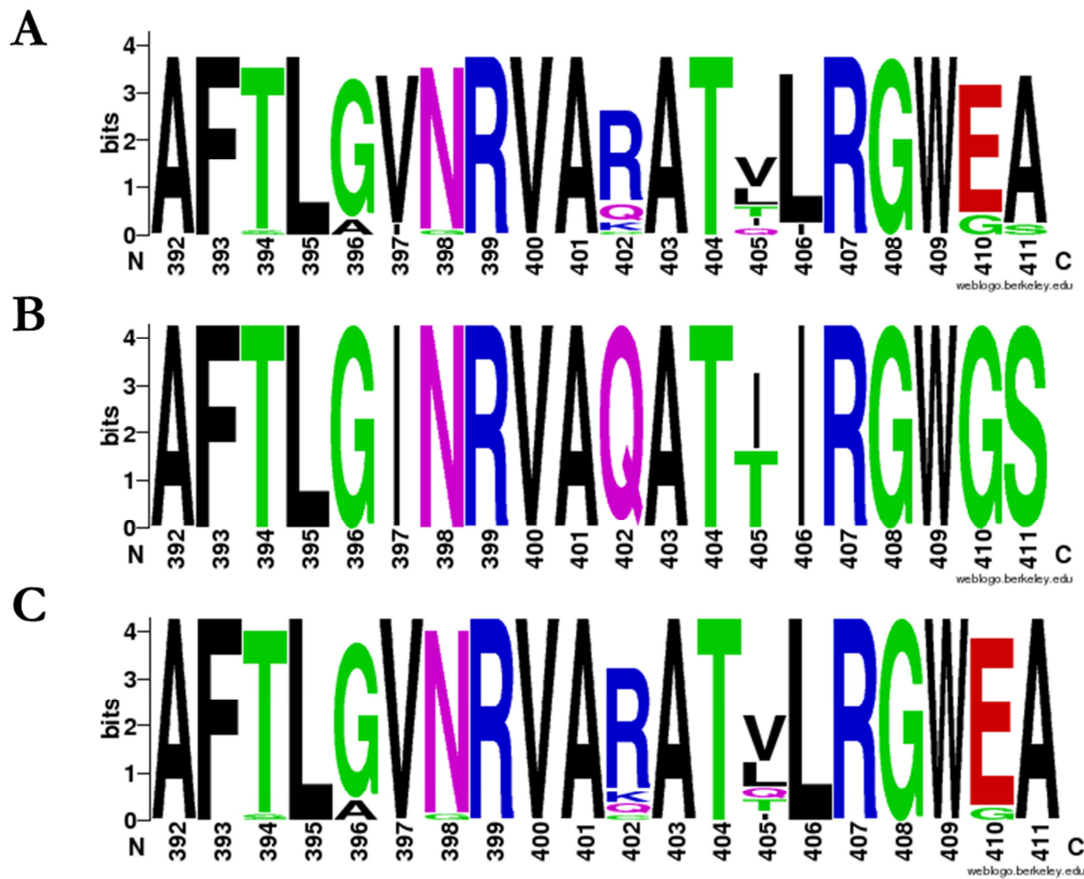


Figura 27: Sequenza di consenso amminoacidica (aa) degli ultimi 20 amminoacidi (carbossi –terminale) della GDH di pianta per **A)** l'intero set (n= 27) di sequenze, **B)** le sequenze GDH3 di *A. thaliana* e *A. lyrata*, **C)** per lo stesso set di sequenze riportato in A, escluse quelle riportate in B. La grandezza della lettera indica la frequenza con cui appare quel particolare amminoacido nelle sequenze analizzate. Più è grande la lettera, maggiore è la frequenza. Questa figura è stata creata usando il programma Weblogo (weblogo.berkeley.edu).

Da: Marchi *et al.*, 2014

La presenza di questi tre residui conservati, anche nelle sequenze di GDH1 e GDH2 di *Arabidopsis*, e la maggiore termostabilità delle loro isoforme rispetto a GDH3, ha dato modo di ipotizzare che la regione C-terminale potesse essere effettivamente coinvolta nella stabilità termica dell'enzima.

Per indagare sul possibile ruolo di questi tre residui amminoacidici nel determinare una minore stabilità termica della GDH3, sono state eseguite analisi sulla struttura degli oligomeri della GDH e sulle interazioni tra le sue subunità. Questo è stato possibile grazie alla costruzione di un modello a risoluzione atomica dell'omoesamero della GDH3, mediante la tecnica di modellazione comparativa ottenuto grazie al contributo della Prof.ssa Eugenia Polverini.

Tale tecnica consiste nel costruire la struttura tridimensionale a risoluzione atomica di una proteina usando come stampo la struttura nota di un'altra proteina della stessa famiglia, sulla base del fatto che, dovendo svolgere la stessa funzione, esse avranno bisogno della stessa struttura; quanto più le sequenze delle due proteine sono simili, tanto più sono evolutivamente correlate e quindi le loro differenze strutturali piccole e di conseguenza il modello risulterà più accurato ed affidabile.

Il modello è stato costruito utilizzando come template la struttura proteica della GDH dell'organismo ipertermofilo *P. furiosus*, che è la struttura risolta con la sequenza amminoacidica più simile a quella di GDH3 (vedi *Materiali e metodi* Sezione 4.2). Tale approccio ha permesso la modellazione della struttura della GDH3 di *Arabidopsis* fino al residuo chiave S411.

Osservando l'intera struttura esamerica dell'isoenzima GDH3, si vede che è altamente simmetrica ed è formata dall'assemblaggio di due trimeri equivalenti con asse di simmetria ternario (ABC e DEF) (**Figura 28A**). Si vede come il residuo I406 si trovi all'interfaccia tra due subunità dello stesso trimero (A: C, C: B e B: A), mentre S411 sia all'interfaccia tra due

subunità, una in ogni trimero (A: F, C : D e B: e). Al contrario, I397 si trova nella stessa elica degli altri due residui, ma in una posizione centrale e non all'interfaccia tra le subunità e quindi quasi totalmente sepolto (**Figura 28A**). Pertanto, I406 e S411 sono i migliori candidati per spiegare la minore stabilità termica della GDH3, che potrebbe essere causata da interazioni più deboli tra le subunità γ .

Nell'allineamento della sequenza amminoacidica di GDH3 con quella di GDH1 e GDH2 di altre piante superiori, si osserva che l'Isoleucina I406 viene sostituita da una Leucina, che è molto simile in dimensione e idrofobicità. Per questo motivo non dovrebbe influenzare in modo sostanziale l'interazione tra le subunità, a meno di piccoli cambiamenti stereochimici che potrebbero influenzare l'impaccamento con i residui idrofobici circostanti, col risultato di una energia di interazione meno favorevole.

Al contrario, la Serina S411 polare viene sostituita, nella GDH1 e GDH2, da una Alanina, amminoacido non polare. L'interfaccia simmetrica contenente S411 è fatta dai due filamenti βA appartenenti a due foglietti β di subunità opposte, che, collegati da diversi ponti salini, formano una grande superficie piatta (**Figura 28B**). Alle estremità della superficie di contatto, la regione C-terminale dell'elica contenente S411 interagisce con il loop contrapposto βA - βB .

L'intorno dell'amminoacido S411, anche se forma alcune interazioni polari, ha prevalentemente una natura idrofobica, soprattutto nella subunità opposta (**Figura 28B**). Pertanto, la sostituzione di una Serina con un'Alanina idrofobica potrebbe rafforzare l'interazione all'interfaccia tra i due trimeri.

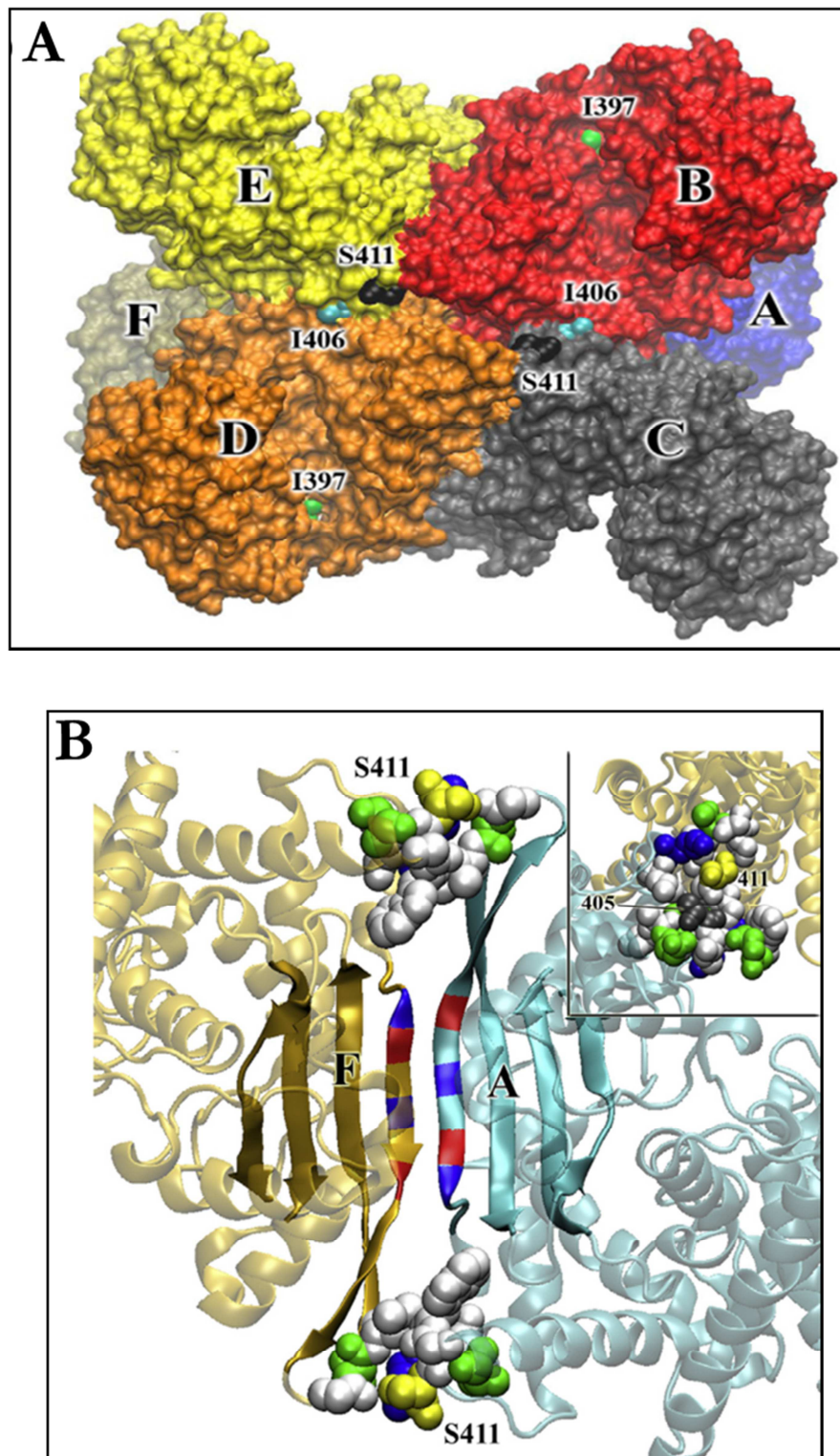


Figura 28: **A)** Modello teorico della struttura della proteina GDH3 di *Arabidopsis thaliana* in rappresentazione spacefill. Con le lettere A, B, C, D, E, F, sono indicate le subunità che compongono l'esamero, mentre i residui I397 sono indicati in verde, in nero i residui S411 e in azzurro i residui I406. **B)** Particolare del modello teorico della struttura della proteina GDH3 di *Arabidopsis thaliana* in rappresentazione ribbons e spacefill, in cui sono indicate le subunità A e F e i residui nell'intorno (6Å) dell'amminoacido S411 (in spacefill). I residui acidi e basici che formano i ponti salini sono colorati rispettivamente in rosso e blu. I residui amminoacidi sono colorati per tipo: bianco= idrofobico, verde= polare, blu= basico. Il residuo S411 è mostrato in giallo. **Inset:** il residuo T405 è rappresentato in grigio.

Da: Marchi *et al.*, 2014

6.3 Espressione eterologa di proteine GDH chimeriche

I tre amminoacidi nella regione C-terminale di GDH3 sono stati quindi sostituiti con quelli corrispondenti e altamente conservati nella sequenza GDH di tutte le specie analizzate.

Proteine GDH3 chimeriche contenenti le diverse sostituzioni amminoacidiche (I397V, I406L e S411A) trovate in GDH1 e GDH2 sono state espresse in un sistema eterologo di lievito (**Tabella 3** nel *Materiale supplementare*). Quando gli estratti proteici dei ceppi di lievito esprimenti l'omoesamero 6 γ WT (GDH3) o le varie forme mutate di GDH3 (GDH3-A = S411A, GDH3-LA = I406L + S411A e GDH3-VLA = I397V + I406L + S411A) sono stati incubati a 68°C, si è evidenziato un aumento della stabilità degli isoenzimi chimerici della GDH3 rispetto all'isoforma WT (**Figura 29A**).

Un esame più attento di questi risultati testimoniano il ruolo prevalente del residuo 411A nel conferire una maggiore stabilità termica all'oligomero chimerico rispetto all'isoforma WT della GDH3: inoltre si può osservare che GDH3-A, GDH3-LA e GDH3-VLA mostrano una termostabilità simile (**Figura 29A**).

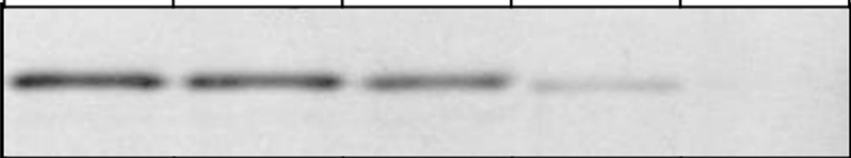
Questi risultati sono in accordo con quanto dedotto dal modelling.

Al fine di ottenere una ulteriore evidenza del ruolo di questo residuo amminoacidico nel conferire stabilità all'oligomero GDH abbiamo deciso di creare un'isoforma chimerica di GDH1 (GDH1-S) in cui l'Alanina presente in posizione 411 della subunità β è stata sostituita con una Serina, amminoacido che normalmente si trova nella posizione corrispondente della subunità γ di GDH3, e di testarne la sua termostabilità (**Tabella 4** nel *Materiale supplementare*).

Quando estratti proteici di ceppi di lievito, che esprimono l'isoforma WT (GDH1) o l'omoesamero GDH1 mutato (GDH1-S), sono stati incubati per 30 min a 68° C o 30 min a 75° C, l'attività della proteina chimerica GDH1-S è significativamente inferiore rispetto a quella dell' isoenzima GDH1 nativo (**Figura 29B**).

L'inattivazione termica di GDH1-S, quando trattata a 75° C, è chiaramente testimoniata dalla diminuzione dell'intensità della banda, da un aumento della mobilità su gel e dalla presenza di strisciate durante la corsa di questa isoforma. L'effetto della sostituzione contraria del residuo 411 in GDH1-S è maggiore rispetto a ciò che si osserva in GDH3-A, -LA o -VLA, in termini di stabilità termica.

Il controllo in questi esperimenti, è rappresentato dall'estratto trattato a 65° C per 15 min per inattivare l'attività della GDH endogena di lievito e per eliminare l'attività non specifica, entrambi fattori che potrebbero interferire con l'identificazione delle bande di nostro interesse.

A	Ctr	10'	15'	30'	45'	
						GDH3
	100	94	73	n.d.	n.r.	
						GDH3-A
	100	115	100	22	n.r.	
						GDH3-AL
	100	82	67	18	n.r.	
						GDH3-ALV
	100	82	70	17	n.r.	

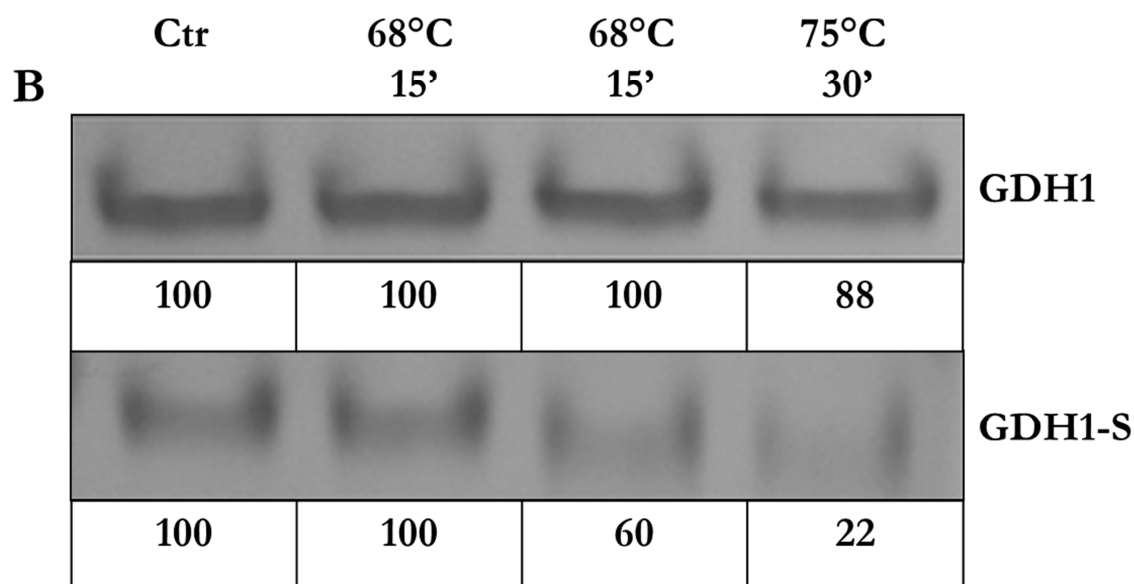


Figura 29: Termostabilità delle forme isoenzimatiche WT e mutate di GDH3 e GDH1.

A) Confronto della termostabilità tra l'isoforma GDH3 e le isoforme modificate GDH3-A (S411A), GDH3-LA (I406L e S411A), GDH3-VLA (I397V, I406L e S411A). Gli estratti sono stati incubati a 68°C per i minuti sopra indicati. **B)** Confronto della termostabilità tra l'isoforma GDH1 e l'isoforma modificata GDH1-S (A411S). Gli estratti sono stati incubati a 68°C per 15 e 30 minuti o a 75°C per 30 minuti. Il controllo, **Ctrl**, è stato incubato a 65°C per 15 min. I valori, che indicano l'intensità delle bande, ottenuti attraverso l'analisi densitometrica, sono riportati come % del controllo. **n.r** (non rilevabile).

Adattata da: Marchi *et al.*, 2014

Per avere una conferma che i dati ottenuti mediante analisi in gel dell'attività enzimatica delle isoforme, fossero una prova della diversa stabilità delle proteine, è stata condotta una analisi mediante Western blotting. Estratti proteici, ottenuti dai ceppi di lievito, sono stati sottoposti a trattamenti termici a 68°C per diversi tempi, centrifugati al fine di recuperare pellets e surnatanti. Questi sono stati quindi caricati su un gel di poliacrilammide denaturante che è stato sottoposto infine a Western blotting e immunorilevazione utilizzando un anticorpo specifico per la GDH (Vedi *Materiali e Metodi* Sezione 2.6).

I risultati mostrano nel caso di GDH1-S un segnale solo nel controllo (campione non trattato) e nel pellet e nessun segnale nel supernatante, indice di una minore termostabilità dell'isoforma chimerica con conseguente denaturazione e precipitazione della proteina che ritroviamo quindi nel pellet. Nel caso dell'analogo trattamento termico dell'estratto GDH1

il segnale è presente, oltre che nel controllo, solo nel surnatante ad indicare una maggiore resistenza termica di questa isoforma (**Figura 30**).

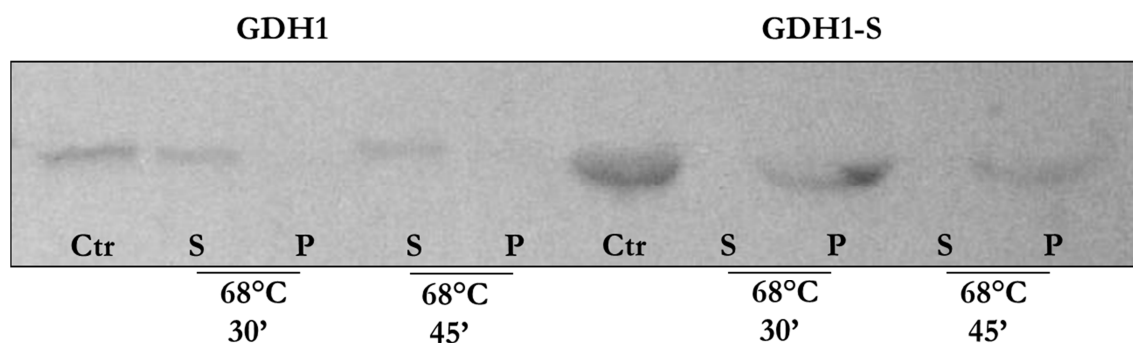


Figura 30: Analisi Western blotting dell'isoforma GDH1 e dell'isoforma modificata GDH1-S. Gli estratti sono stati incubati a 68°C per 30 e 45 minuti. Il controllo (**Ctr**) è il campione non trattato. I pellets (**P**) e i surnatanti (**S**) sono stati ottenuti in seguito a centrifugazione del campione trattato.

6.4 Analisi dell'intorno amminoacidico del residuo 411

Per tentare di capire perchè l'effetto della sostituzione inversa del residuo 411 in GDH1-S sia maggiore rispetto a ciò che si osserva in GDH3-A, -LA o -VLA, in termini di stabilità termica e per chiarire il ruolo dell'amminoacido polare Serina 411, può essere utile analizzare l'intorno di questo residuo nelle due isoforme di GDH. Si può osservare infatti che l'unico amminoacido non conservato è il residuo 405, che nella GDH1 WT è una Isoleucina, mentre nella GDH3 WT è una Treonina.

Nella GDH1 WT, il residuo I405 forma un grande cluster idrofobico con A411 e diversi altri residui che si trovano sia sulla stessa catena (L24, V400, A401, I406, W409, G410, G408) che sulla catena opposta (G46, L48, P42, W152) (**Figura 28B**, nel riquadro). Sostituendo A411, che si trova in un ambiente idrofobico, con un amminoacido polare come la Serina, è probabile che avvenga una destabilizzazione del cluster sia all'interno della propria catena che con le subunità vicine. Questo fenomeno potrebbe aggiungersi all'interazione meno favorevole di S411 che si instaura all'interfaccia tra le subunità.

Questa analisi è quindi in accordo con i dati sperimentali che hanno individuato i tre residui amminoacidici (I397, I406 e S411) e in particolare la Serina in posizione 411, situati all'estremità carbossi-terminale della subunità γ di GDH3, come importanti nel conferire stabilità all'oligomero. Tuttavia non si può escludere – ed anzi è molto probabile – che ci siano altri residui amminoacidici e altri fattori che condizionano la stabilità termica delle diverse isoforme.

I risultati ottenuti finora dimostrano quindi che può esistere un meccanismo di regolazione post- traduzionale in grado di regolare differenzialmente l'attività delle diverse forme isoenzimatiche.

CONCLUSIONI e PROSPETTIVE

1. CONCLUSIONI

1.1 Regolazione dell'espressione dell'omoesamero 6 γ durante lo sviluppo

Una delle osservazioni fondamentali che sono il risultato di questo lavoro di tesi consiste nell'aver mostrato che il pattern di sintesi delle subunità γ dell' isoenzima GDH3 di *Arabidopsis* è più complesso di quello precedentemente descritto da Fontaine (Fontaine *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2013).

Questo potrebbe essere dovuto alla disponibilità di N per le piante, a seconda del tipo di coltura utilizzata per l'esperimento. Gli autori in questione hanno infatti dimostrato che quando le piante di *Arabidopsis* sono coltivate in un sistema idroponico, in cui grandi quantità di azoto inorganico sono disponibili, l'omoesamero 6 γ è preferenzialmente espresso nelle radici di piante in fase di rosetta e ad un livello molto basso a livello degli steli fiorali. Nel nostro studio, piante WT e mutanti *gdb1*, *gdb2* e *gdb1-2* sono state coltivate su una mix di terricio con caratteristiche edafiche più simili a quelle che possono riscontrarsi in un terreno naturale. La coltivazione in vaso ha inoltre permesso di seguire il modificarsi del profilo di espressione dell'omoesamero 6 γ , nei diversi organi per l'intero ciclo di sviluppo della pianta e in condizioni di crescita più vicine a quella dell'ambiente naturale di *Arabidopsis*.

In particolare, abbiamo osservato che l'espressione del gene *GDH3* (da noi rilevata in base alla presenza dell'omoesamero 6 γ o dalle isoforme β/γ) è stata indotta nelle radici solo 21 giorni dopo la semina, prima della formazione dei boccioli fiorali.

Tuttavia, questa induzione è chiaramente visibile nei mutanti *gdb2* e *gdb1-2* ma non è visibile nel WT e nel mutante *gdb1* (**Figura 4**). Tale profilo di espressione, diverso da quello

osservato in condizioni idroponiche, oltre ad avvalorare il ruolo della disponibilità dell'N nel condizionare l'espressione del gene, aggiunge evidenze a favore di un meccanismo di regolazione della attività della GDH basato su un bilanciamento dell'espressione dei singoli geni della GDH in *Arabidopsis* (o, come ipotizzato successivamente, sul bilanciamento dei livelli delle singole sub unità della GDH)

Una seconda e non meno importante osservazione consiste nell'aver mostrato che sia nella linea WT che in tutti i mutanti, la subunità γ viene specificamente espressa a livello degli organi riproduttivi maschili immaturi (stami dei boccioli chiusi; **Figura 8B**).

Viene così evidenziata una localizzazione stadio di sviluppo- e organo-specifica dell'isoenzima 6γ .

La scoperta che l'assemblaggio di subunità β/γ si osserva nelle radici (**Figura 7**), ma non nei boccioli è molto interessante. E' infatti necessario ipotizzare l'esistenza di un meccanismo regolativo, in grado di regolare finemente l'attività enzimatica all'interno dei diversi organi della pianta. Uno studio dell'andamento temporale dell'espressione dei tre geni della GDH durante lo sviluppo dello stame, combinato con esperimenti di immunolocalizzazione potrebbe fornire un quadro più dettagliato del modello temporale e spaziale d'espressione delle subunità γ di GDH3 nell'organo riproduttivo maschile.

1.2 Regolazione azoto- e citochinina- dipendente dell'attività dell'omoesamero 6γ

La scoperta che esiste un'induzione della sintesi di una subunità γ nelle fasi finali dello sviluppo delle piante, suggerisce che sia nelle radici che negli stami l'isoenzima possa essere coinvolto nel riciclaggio di C e N durante questo periodo. Questo riciclaggio potrebbe

venire innescato da segnali che si generano a livello radicale e che vengono successivamente traslocati agli organi fiorali durante le fasi successive dello sviluppo.

Infatti in condizioni sperimentali normali di crescita, la sintesi di subunità γ non è mai rilevata a livello di piantine giovani o foglie. Pertanto, l'induzione dell'omoesamero 6γ nelle radici di *Arabidopsis* sembra essere una risposta radice-specifica, dipendente principalmente dallo stadio di sviluppo della pianta.

Sono stati questi i presupposti per condurre la serie di esperimenti descritti in questo lavoro di tesi e che hanno avuto lo scopo di verificare un possibile coinvolgimento dei sistemi di segnalazione associati alla senescenza nell'induzione dell'attività del gene *GDH3*.

La starvation d'azoto è conosciuta per essere una situazione ambientale che induce la pianta a senescenza (Schulze *et al.*, 1994) e qui abbiamo dimostrato che piante di *Arabidopsis* cresciute su un terreno privo di azoto, rispondono a questa privazione nutrizionale inducendo la sintesi di subunità γ attive nelle radici di piante WT e mutanti *gdb1*, *gdb2* e *gdb1-2* (**Figure 10 e 14**).

È interessante notare che, in queste condizioni nutrizionali l'omoesamero 6γ è stato indotto anche nelle foglie, ma con un notevole ritardo rispetto alle radici (**Figura 16**). Complessivamente questi dati indicano che è necessario un segnale dipendente dall'assenza di azoto proveniente dalle radici per indurre la sintesi della subunità γ nella foglia. Questa situazione contrasta con quella descritta per l'induzione di *GDH1* e *GDH2* (e quindi degli isoenzimi contenenti subunità α e β) nella foglia, per i quali sono richieste sia un'alta concentrazione di azoto che una bassa concentrazione di saccarosio (Miyashita and Good, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Inoltre, gli esperimenti successivi condotti per monitorare il ruolo della fonte di carbonio, in condizioni limitanti di N, nell'indurre

L'attività dell'omoesamero 6 γ , suggeriscono come una fonte di energia sia indispensabile per indurre la sintesi della subunità γ (**Figure 14, 15 e 16**).

Questi risultati sono in accordo con la presenza di diversi meccanismi regolativi di controllo metabolici e biochimici che monitorano costantemente lo stato nutrizionale della pianta per far fronte a qualsiasi squilibrio nel rapporto di C e N (Alvarez *et al.*, 2012; Zheng, 2009). Ad esempio potrebbe essere coinvolto un meccanismo di segnalazione locale dipendente dalla disponibilità di azoto (anche se la presenza di un meccanismo parallelo di segnalazione sistemico non può essere esclusa) poichè un'induzione dell'omoesamero 6 γ è stata osservata in radici staccate incubate in condizioni di starvation d'azoto (**Figura 12**). Questi dati trovano una ulteriore conferma nei risultati ottenuti con l'esperimento di Split Root (**Figura 20**).

Sono state portate inoltre evidenze a supporto dell'ipotesi (Igarashi *et al.*, 2009) che le citochinine (CK) devono avere un ruolo nel processo di segnalazione che porta all'induzione dell'attività dell'isoenzima 6 γ , anche se il meccanismo di intervento di questi ormoni è ancora tutto da chiarire.

Anche se sono necessarie ulteriori ricerche per identificare gli elementi regolatori che controllano i cambiamenti mediati dalle CK nell'assimilazione e il riciclaggio dell'azoto durante la fase riproduttiva, è probabile che l'isoforma 6 γ in *Arabidopsis*, durante questo processo, giochi una funzione metabolica e regolativa specifica.

1.3 Espressione dell'omoesamero 6 γ nelle Brassicaceae

Se l'induzione della sintesi di subunità γ attive della GDH3 fa parte di una risposta generale della pianta alla rimobilizzazione dei nutrienti naturale o indotta in *Arabidopsis*, ci si potrebbe aspettare che la relativa funzione biologica sia presente in specie affini.

L'analisi di alcune specie della famiglia delle *Brassicaceae*, condotta per ottenere evidenze di una possibile conservazione di un terzo gene *GDH* e soprattutto della sua funzione in particolari condizioni fisiologiche e/o di sviluppo, ha mostrato che questo non sembra essere il caso, segno di probabili riarrangiamenti dei loro genomi durante l'evoluzione.

Infatti la presenza dell'omoesamero 6 γ dell'enzima GDH3 è stata rilevata solo nei due ecotipi supplementari di *Arabidopsis* che sono stati analizzati (**Figura 23**), mentre la maggior parte delle specie di *Brassicaceae* esaminate finora (**Tabella 1** nel *Materiale supplementare*) non ha mostrato alcuna attività corrispondente all'omoesamero 6 γ anche in condizioni di starvation d'azoto.

Rimane però ancora da dimostrare, se la presenza di un terzo gene *GDH* sia legata ad uno specifico adattamento ecofisiologico di *Arabidopsis* a particolari condizioni trofiche.

1.4 Termoresistenza

In molti lavori è stato riportato che le proteine GDH di pianta mostrano una maggiore resistenza all'inattivazione termica rispetto alla GDH procariotica, fungina o animale (Pavesi *et al.*, 2000; Syntichaki *et al.*, 1996). È anche noto che la GDH di pianta condivide una maggiore somiglianza nella sequenza proteica con gli archeobatteri termofili piuttosto che con gli enzimi eucariotici (Pavesi *et al.*, 2000; Syntichaki *et al.*, 1996).

L'analisi che abbiamo effettuato su estratti vegetali di diversi mutanti della GDH di *A. thaliana* ha confermato la peculiare stabilità termica della GDH di pianta. Tuttavia, sono state osservate differenze tra le varie isoforme GDH, che provengono dal casuale assemblaggio delle tre subunità GDH. In particolare, le isoforme contenenti la subunità γ (omo- o etero-oligomeri) risultano meno stabili delle isoforme contenenti le subunità α o β . Un modello teorico della struttura della proteina GDH3 suggerisce che la termostabilità di GDH dipende dalla formazione del trimero / esamero, che può essere modificata grazie alla forza di interazione tra le subunità.

L'osservazione che in tutte le proteine GDH (esclusa GDH3 di *A. thaliana* e *A. lyrata*) il residuo 411 sia rappresentato da una Alanina invece che da una Serina (presente in GDH3), porta ad ipotizzare che questo possa favorire le interazioni idrofobiche locali tra le subunità, ed in ultima analisi ad una maggiore stabilità dell'oligomero.

Inoltre, dal momento che l'Isoleucina I406 nella subunità γ della GDH3 di *Arabidopsis* è stata sostituita, negli altri isoenzimi GDH, da una Leucina (che ha caratteristiche idrofobiche simili all'Isoleucina), sembra che ci sia un maggiore contributo di S411 rispetto a I406 nel modificare il pattern di interazione tra le subunità.

L'espressione di forme WT e mutate di GDH1 e GDH3 in un sistema di espressione eterologo di lievito ha confermato che i due omoesameri 6β e 6γ mostrano differente termostabilità (**Figura 29**) e rafforzato l'ipotesi che la differenza di stabilità potrebbe essere dovuta alla posizione del residuo aminoacidico S411 che si trova all'estremità carbossilica della subunità γ di GDH3. Tuttavia, il non completo recupero della stabilità termica nei mutanti GDH3 non esclude che altri residui possono contribuire all'effetto.

La mutazione contraria in GDH1-S, cioè A411S, ha un maggiore effetto destabilizzante probabilmente dovuto al diverso tipo di amminoacido in posizione 405 nel GDH1 WT, che è una Isoleucina idrofobica che forma con A411 e con altri residui non polari un forte cluster idrofobico che viene destabilizzato con la mutazione A411S. Questo effetto va ad aggiungersi al pattern di interazione sfavorevole di S411 all'interfaccia con la subunità opposta.

Come accennato precedentemente (vedi *Risultati e Discussioni* Sezione 6), un approccio sperimentale simile al nostro era stato utilizzato per la GDH umana. Le due diverse forme isoenzimatiche presentano una localizzazione organo e tessuto specifica e una differente stabilità termica (Shashidharan *et al.*, 1997). Inoltre le attività dei due isoenzimi hGDH sono regolati in modo differenziale, da meccanismi allosterici dipendenti dalle interazioni con ligandi e dall'oligomerizzazione delle subunità (Plaitakis *et al.*, 2000).

Sostituendo specifici residui aminoacidici nelle sequenze hGDH, è stato possibile dimostrare la loro rilevanza nel determinare le proprietà allosteriche e la stabilità termica degli oligomeri enzimatici (Yang *et al.*, 2004; Zaganas *et al.*, 2002). Più recentemente, è stato proposto che uno degli isoenzimi hGDH fa parte di un complesso multi-enzimatico, chiamato Metabolon (Clegg *et al.*, 2001). Le interazioni proteina-proteina che si verificano in questo complesso sarebbero in grado di indurre modificazioni allosteriche dell'attività enzimatica inducendo così importanti modificazioni nel metabolismo cellulare (Hutson *et al.*, 2011).

È quindi possibile che interazioni simili si verificano nei diversi isoenzimi GDH di *Arabidopsis*. Tali interazioni variabili potrebbero definire un pattern tessuto o organo specifiche per l'attività dell'oloenzima finale, il quale dipende sia dalle condizioni di sviluppo che ambientali. Varrebbe la pena di testare questa ipotesi confrontando i pattern

degli isoenzimi della GDH di ecotipi differenti di *Arabidopsis* che mostrano una diversa risposta alla disponibilità di azoto (Chardon *et al.*, 2010; North *et al.*, 2009).

Parte dei risultati descritti in questa tesi di dottorato sono stati pubblicati in due lavori:

- **Marchi *et al.*, (2013).** Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin. *Plant Physiology and Biochemistry*, **73**: 368–374.

- **Marchi *et al.*, (2014).** Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is less thermostable than GDH1 and GDH2 isoenzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **83**: 225-231.

2. PROSPETTIVE

Al fine di verificare la possibile interazione tra disponibilità di N e la segnalazione mediata da citochinine nel controllo dell'attività dell'omoesamero 6 γ , sarà interessante studiare la sua induzione in piante di *Arabidopsis* mutanti nei pathways coinvolti nell'assimilazione dell'azoto e nella biosintesi delle citochinine.

Potranno anche essere prese in considerazione condizioni fisiologiche e di stress diverse da quelle analizzate capaci di indurre l'espressione di *GDH3*, al fine di approfondire il ruolo che tale enzima svolge nel metabolismo e nella fisiologia della pianta.

Potranno inoltre essere analizzate altre specie, anche non appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*, per cercare di comprendere quale sia stato il percorso evolutivo che ha segnato la comparsa dell'omoesamero 6 γ nelle piante e le eventuali costrizioni ambientali che hanno

esercitato la forza selettiva responsabile di tale comparsa, del suo mantenimento o della sua perdita.

Una analisi condotta più recentemente in banca dati ha individuato altre specie che presentano sequenze omologhe alla sequenza *GDH3* di *Arabidopsis thaliana*, sarebbe quindi interessante analizzare ulteriormente le specie in questione.

Per quanto riguarda lo studio della interazione tra struttura/funzione nell'enzima GDH sarà importante verificare se vi sono altri residui amminoacidici e altri fattori che condizionano la stabilità termica delle diverse isoforme e quanto questa diversa stabilità possa essere correlata a una diversa funzione delle isoforme e all'esistenza di meccanismi post-traduzionali in grado di regolare più finemente il profilo di attività delle isoforme stesse durante lo sviluppo della pianta e in risposta a modificazioni dell'ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410;
- Alvarez J.M., Vidal E.A., Gutiérrez R.A. (2012).** Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses, *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 185-191;
- Anderson J.W., Done J. (1978).** Light-dependent assimilation of nitrite by isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **61**: 692-697;
- Atkinson D.E. (1969).** Regulation of enzyme function. *Annu. Rev. Microbiol.* **23**: 47–68;
- Berger M.G., Fock H.P. (1983).** Effects of methionine sulfoximine and glycine on nitrogen metabolism of maize leaves in the light. *Aust J Plant Physiol* **10**: 187-194;
- Britton K.L., Baker P.K., Rice D.W. and Stillman T.J. (1992).** Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **209**: 851-859;
- Brouquisse R., James F., Pradet A., Raymond P. (1992).** Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta* **188**: 384-395;
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. (2003).** The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. *Plant Biotechnol. J.* **1**: 3-22;

Cammaerts D. and Jacobs M. (1983). A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* **31**: 65-73;

Cammaerts D., and Jacobs M. (1985). A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **163**: 517–526;

Chardon, F., Barthélémy, J., Daniel-Vedele, F., Masclaux-Daubresse, C., (2010). Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *J. Exp. Bot.* **61**: 2293-2302;

Clegg, J., Kell, D., Knull, H., Welch, G.R., Wilson, J., (2001). Macromolecular interactions: tracing the roots. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 91;

De Smet R. and Van de Peer Y. (2012). Redundancy and rewiring of genetic networks following genome-wide duplication events. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 168-176;

Dubois F., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M.-B., Estavillo J.-M., Sangwan R., Gallais A., Hirel B. (2003). Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme?. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 565-576;

FAO (2009). Global agriculture towards 2050. High Level Expert Forum—how to feed the world in 2050. *Rome: Food and Agriculture Organization (United Nations)*;

Fentem PA, Lea PJ, Stewart GR (1983). Ammonia assimilation in the roots of nitrate- and ammonia-grown *Hordeum vulgare* (cv Golden Promise). *Plant Physiol.* **71**: 496-501;

Ficarelli A., Tassi F., Restivo F.M. (1999). Isolation and characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant and Cell Physiol.* **40**: 339-342;

Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* **478**: 337–342;

Fontaine J.-X., Saladino F., Agrimonti C., Bedu M., Tercè-Laforgue T., Tetù T., Hirel B., Restivo F.M. and Dubois F. (2006). Control of the synthesis targeting of the two GDH genes products in leaves and stem of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **47(3)**: 410-418;

Fontaine JX, Tercè-Laforgue T, Armengaud P, et al. (2012). Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. *The Plant Cell* **24**: 4044–4065;

Fontaine, J.-X., Tercè-Laforgue, T., Bouton, S., Pageau, K., Lea, P.J., Dubois, F., Hirel, B. (2013). Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **8**: 1-5;

Forde B.G. and Walch-Liu P. (2009). Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant Cell. Environ.* **32**: 682-93;

Forde B.G. (2013). Glutamate signalling in roots. *J. Exp. Bot.* **65**: 779-787;

Forde B.G. Cutler SR, Zaman N, Krysan PJ. (2013). Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in *Arabidopsis* root architecture. *Plant J.* **75**: 1-10;

Forde B.G. and Roberts M.R. (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Rep.* **6**: 37;

Fox G.G., Ratcliffe R.G., Robinson S.A., and Stewart G.R. (1995). Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants. *Commentary. Rev. Can. Bot.* **73**: 1112–1115;

Frigerio F., Casimir M., Carobbio S., and Maechler P. (2008). Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**: 965–972;

Gan S. and Amasino R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*. **270**: 1986-1988;

Gietz R.D. and Woods R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**: 87-96;

Givan C.V., Joy K.W., Kleczkowski L.A. (1988). A decade of photorespiratory nitrogen cycle. *Trends Biochem. Sci.* **13**: 433-437;

Glevarec G., Bouton S., Jaspard E., Riou M.T., Cliquet J.B., Suzuki A., and Limami A.M. (2004). Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and postgerminative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **219**: 286–297;

Good A.G. and Beatty P.H. (2011). Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology* **9**: e1001124;

Guex N. and Peitsch M.C. (1997). Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. **18**: 2714-2723;

He Y., Fukushige H., F. Hildebrand D., and Gan S. (2002). Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in Arabidopsis Leaf Senescence. *Plant Physiol.* **128**: 876-884;

Hodges M. (2002). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J. Exp. Bot.* **53**: 905-916;

Hörtensteiner S., Feller U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* **53**: 927-937;

Hubberten H-M., Drozd A., Tran B. V., Hesse H. and Hoefgen R. (2012). Local and systemic regulation of sulfur homeostasis in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **72**: 625-635;

Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph* **14**: 33-38;

Hutson S.M., Islam M.M., Zaganas I. (2011). Interaction between glutamate dehydrogenase (GDH) and L-leucine catabolic enzymes: intersecting metabolic pathways. *Neurochem. Int.* **59**: 518-524;

Igarashi D., Izumi Y., Dokiya Y., Totsuka K., Fukusaki E., Ohsumi C. (2009). Reproductive organs regulate leaf nitrogen metabolism mediated by cytokinin signal. *Planta* **229**: 633-644;

Ireland R.J. and Lea P.J. (1999). The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. *Plant Amino Acid, Biochemistry and Biotechnology* (ed. B.K. Singh). 49-109;

James F., Brouquisse R., Pradet A. , Raymond P. (1993). Changes in proteolytic activities in glucose- starved maize root tips. Regulation by sugars. *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 845-856;

Jaspard E. (2006). A computational analysis of the three isoforms of glutamate dehydrogenase reveals structural features of the isoform EC 1.4.1.4 supporting a key role in ammonium assimilation by plants. *Biol. Direct* **1**: 38;

Jing H-C., Schippers J. H. M., Hille J. and Dijkwel P. P. (2005). Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **56**: 2915–2923;

Joy K. W., Blackwell R. D., Lea P. J. (1992). Assimilation of nitrogen in mutants lacking enzymes of the glutamate synthase cycle. *J. Exp. Bot.* **43**: 139-145;

Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J. Exp. Bot.* **62**: 1399-1409;

Keys A.T., Bird I.F., Cornelius M.J., Lea P.J., Walsgrove R.M., Mifflin B.J. (1978). Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741-743;

Krouk G., Ruffel S., Gutiérrez R.A., Gojon A., Crawford N.M., Coruzzi G.M., et al. (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci.* **16**: 178-182;

Kwinta J. and Bielawski W. (1998). Glutamate dehydrogenase in higher plants. *Acta Physiologiae Plantarum.* **20**: 453-463;

Labboun A., Tercè-Laforgue T., Roscher A., Bedu M., Restivo F.M., Velanis C.N., Skopelitis D.S., Moshou P.N., Roubelakis-Angelakis K.A., Suzuki A. and Hirel B. (2009). Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase. I. in vivo Real Time Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments. *Plant Cell Physiol.* **50(10)**: 1761-1773;

Lancien M., Gadal P. and Hodges M. (2000). Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation. *Plant Physiol.* **123**: 817–824;

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948;

Lea P.J. and Miflin B.J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614-616;

Lea P.J., and Miflin, B.J. (2011). Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. In Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-Genomic Era, C.H. Foyer and H. Zhang, eds (Chichester, UK: Wiley-Blackwell), pp. 1–40;

Lee Y.-H. and Tegeder M. (2004). Selective expression of a novel high-affinity transport system for acidic and neutral amino acids in the tapetum cells of Arabidopsis flowers. *Plant J.* **40**: 60-74;

Lehmann T., Skrok A. and Dabert M. (2010). Stress-induced changes in glutamate dehydrogenase activity imply its role in adaptation to C and N metabolism in lupine embryos. *Physiologia Plantarum.* **138**: 35-47;

Lehmann T., Dabert M. and Nowak W. (2011). Organ-specific expression of glutamate dehydrogenase (GDH) subunits in yellow lupine. *Plant Physiol.* **168**: 1060- 1066;

Li M., Li C., Allen A., Stanley C. A, Smith T.J. (2012). The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**: 69-80;

Limami A.M., Glévarec G., Ricoult C., Cliquet J.-B and Planchet E. (2008). Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings hypoxic stress. *J. Exp. Bot.* **59**: 2325-2335;

Limami A.M., Diab H., Lothier J. (2014). Nitrogen metabolism in plants under low oxygen stress. *Planta* **239**: 531-541;

Loulakakis K.A. and Roubelakis-Angelakis K.A. (1990). Immunocharacterization of NADH-Glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* **94**: 109-113;

Loulakakis K.A. and Roubelakis-Angelakis K.A. (1991). Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consist of two subunits polypeptides and their participation in seven isoenzymes occurs in an order ratio. *Plant Physiol.* **97**: 104-111;

Loulakakis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A, and Kanellis A.K. (1994). Regulation of Glutamate Dehydrogenase and Glutamine Synthetase in Avocado Fruit during Development and Ripening. *Plant Physiol.* **106**: 217-222;

Loulakakis K.A. and Roubelakis-Angelakis K.A. (1996). The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase consist of two subunits polypeptides and their participation in the seven isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. *Physiologia Plantarum.* **96**: 29-35;

Loyola-Vargas V.M., Sanchez de Jimenez E. (1984). Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.* **76**: 536-540;

Mae T. (1997). Physiological nitrogen efficiency in rice: Nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant and Soil.* **196**: 201-210;

Magasanik B. (1992). Regulation of nitrogen assimilation. In *The Molecular and Cell Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression*, Vol. II, E.W. Jones, J.R.

Pringle, and J.R. Broach, eds (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 283–317;

Marchi L., Degola F., Polverini E., Tercé-Laforgue T., Dubois F., Hirel B., Restivo F.M. (2013). Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin. *Plant Physiol. Biochem.* **73**: 368–374;

Marchi L., Polverini E., Degola F., Baruffini E., Restivo F.M. (2014). Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is less thermostable than GDH1 and GDH2 isoenzymes. *Plant Physiol. Biochem.* **83**: 225-231;

Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., et al., (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol.* **140**: 444-456;

McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J., Stoopen G.M., Davelaar E., van Rhijn J.H., Power J.B., Davey M.R. (2001). Effects of P(SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol.* **127**: 505–516;

Melo-Oliveira R., Cinha-Oliveira I. and Coruzzi G.M. (1996). Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrate assimilation. *Proc. Natl.Sci.USA.* **96**: 4718-4723;

Mifflin B.J., Lea P.J. (1980). Ammonia assimilation. In PK Stumpf, EE Conn, eds, The Biochemistry of Plants, Vol V. *Academic Press, London*, pp 169-202;

Miyashita Y. and Good A.G., (2008). NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *J. Exp. Bot.* **59**: 667-680;

Morel M., Buée M., Chalot M., and Brun A. (2006). NADP-dependent glutamate dehydrogenase: a dispensable function in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **169**: 179–189;

Nolte S.A., Young B.G., Mungur R. and Lightfoot D.A. (2004). The glutamate dehydrogenase gene *gdhA* increased the resistance of tobacco to glufosinate. **44**: 335-339;

Nooden L.D. and Penney J.P. (2001). Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *J. Exp. Bot.* **52**: 2151–2159;

North K.A., Ehrling B., Koprivova A., Rennenberg H., Kopriva S. (2009). Natural variation in *Arabidopsis* adaptation to growth at low nitrogen conditions. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 912-918;

Osuji G.O., Wenceslau C., Madu C. (1997). Regulation of glutamate dehydrogenase by methionine sulfoximine. *Phytochemistry* **46**: 817-825;

Osuji G.O., Braithwaite C., Pointer R., Reyes J. (1999). Pesticide inactivation of Peanut glutamate dehydrogenase: biochemical basis of the enzyme's isomerization. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3345-3351;

Osuji G.O., Braithwaite C., Fordjour K., Madu W.C., Beyene A., Roberts P.S., Wright V. (2003). Purification of glutamate dehydrogenase isoenzymes and characterization of their substrate specificities. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **33**: 13-28;

Oaks A., Stulen I., Jones K.E., Winspear M.J., Misra S., Boesel I.L. (1980). Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. *Planta* **148**: 477-484;

Oaks A. (1995). Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. *Can. J. Bot.* **73**: 1116-1117;

Park S., Croteau P., Boering K. A., Etheridge D. M., Ferretti D., Fraser P. J., Kim K-R., Krummel P. B., Langenfelds R. L., van Ommen T. D., Steele L. P. and Trudinger C. M. (2012). Trends and seasonal cycles in the isotopic composition of nitrous oxide since 1940. *Nature Geoscience* **5**: 261–265;

Pavesi A., Ficarelli A., Tassi F. and Restivo F.M (2000). Cloning of two glutamate dehydrogenase cDNA from *Asparagus officinalis*: sequence analysis and evolutionary implications. *Genome*. **43**:306-316;

Peeters K.M.U., Van Laere A.J. (1992). Ammonium and amino acids metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiol. Plant.* **84**: 243-249;

Plaitakis A., Metaxari M., Shashidharan P. (2000). Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J. Neurochem.* **75**: 1862-1869;

Proost S., Pattyn P., Gerats T., Van de Peer Y. (2011). Journey through the past: 150 million years of plant genome evolution. *Plant J.* **66**: 58-65;

Purnell M.P., Stewart G.R. and Botella JR. (1997). Cloning and characterisation of a glutamate dehydrogenase cDNA from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Gene*. **186**: 249-254;

Purnell M.P. and Botella J.R. (2007). Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H). Dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo ^[OA]. *Plant Physiology*. **143**: 530-539;

- Qiu X., Xie W., Lian X. and Zhang Q. (2009).** Molecular analyses of the rice glutamate dehydrogenase gene family and their response to nitrogen and phosphorous deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*. **28**: 1115–1126;
- Restivo F.M. (2004).** Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana glauca*: structure and regulation of their expression by physiological and stress conditions. *Plant Sci*. **166**: 971-982;
- Rhodes D, Sims AP, Folkes BF (1980).** Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor*. *Phytochemistry* **19**: 357-365;
- Rhodes D, Brunk DG, Magalhaes JR (1989).** Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase? In JE Poulton, JT Romeo, EE Conn, eds, *Plant Nitrogen Metabolism*. Plenum Press, New York, pp 191-206;
- Robinson S.A., Stewart G.R., and Phillips R. (1992).** Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol*. **98**: 1190–1195;
- Rogoziński J., Godlewska E., Kączkowski J. (1990).** Nitrate reductase activity in rye, wheat and Triticale seedlings. *Acta Physiol Plant*. **12**: 75-80;
- Sakakibara H., Takei K., Hirose N. (2006).** Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci*. **11**: 440-448;
- Salsac L., Chaillou S., Morot-Gaudry J.F., Lesaint C., and Jolivet E. (1987).** Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem*. **25**: 805–812;

Schneidereit A., Scholz-Starke J., Buttner M. (2003). Functional characterization and expression analyses of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 182-190;

Schranz M.E., Lysak M.A., Mitchell-Olds T. (2006). The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends Plant Sci.* **11**: 535-542;

Schulze W., Schulze E., Stadler J., Heilmeier H., Stitt M., Mooney H. (1994). Growth and reproduction of *Arabidopsis* in relation to storage of starch and nitrate in the wild type and in starch-deficient and nitrate uptake deficient mutants. *Plant Cell Environ.* **17**: 795-809;

Setien I., Fuertes-Mendizabal T., Gonzalez A., Aparicio-Tejo P.M., Gonzalez-Murua C., Gonzalez-Moro M.B., Estavillo J.M. (2013). High irradiance improves ammonium tolerance in wheat plants by increasing N assimilation. *Journal of Plant Physiology* **170**: 758–771;

Shashidharan P., Clarke D.D., Ahmed N., Moschonas N., Plaitakis A. (1997). Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J. Neurochem.* **68**: 1804-1811;

Shashidharan P. and Plaitakis A. (2014). The discovery of human of GLUD2 glutamate dehydrogenase and its implications for cell function in health and disease. *Neurochem. Res.* **39**: 460-470;

Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delisi I.D., Yakoumakis D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G. and Roubelakis Angelakis K.A. (2006). Abiotic stress generates ROS that signals expression of anionic

glutamate dehydrogenase to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine.

The plant cell. **18**: 2767-2781;

Srivastava H.S. and Singh R.P. (1987). Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry* **26**: 597-610;

Stewart G.R., Shatilov V.R., Turnbull M.H., Robinson S.A., and Goodall R. (1995). Evidence that glutamate dehydrogenase plays a role in the oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*. *Funct. Plant Biol.* **22**: 805–809;

Syntichaki K.M., Loulakakis, K.A. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996). The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archael enzymes conforms to its stress-regulated function. *Gene.* **168**: 87-92;

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**: 41866-41872;

Tercé-Laforgue T., Mäck G., and Hirel B. (2004a). New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiol. Plant.* **120**: 220–228;

Thomas H. (1978). Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta* **142**: 161-169;

Tilman D., Balzer C., Hill J., Befort B.L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**: 20260–20264;

Tomita T., Miyazaki T., Miyazaki J., Kuzuyama T., Nishiyama M. (2010). Hetero-oligomeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Microbiology* **156**: 3801-3813;

Turano F.J., Thakkar S.S., Fang T., Weisemann J.M. (1997). Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **113**: 1329-1341;

Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**: 1701-1718;

Watanabe M., Itho Y., Jo Y., Yasuda K., Kamachi K., Watanabe Y. (2007). Redox and translational regulation of glutamate dehydrogenase a subunits in *Brassica napus* under wounding stress. *Plant Sci.* **172**: 1182-1192;

Weber and Flugge 2001

Yamaya T., Oaks A., Rhodes D., Matsumoto H (1986). Synthesis of [^{15}N]glutamate from [^{15}N]H $_4^+$ and [^{15}N]glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots. *Plant Physiol* **81**: 754-757;

Yamaya T., and Oaks A. (1987). Synthesis of glutamate by mitochondria- An anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* **70**: 749–756;

Yamada K., Lim J., Dale J.M., Chen H., Shinn P., Palm C.J., Southwick A.M., Wu H.C., Kim C., Nguyen M., Pham P., Cheuk R., Karlin-Newmann G., Liu S.X., Lam, B., Sakano H., Wu T., Yu G., Miranda M., Quach H.L., Tripp M., Chang C.H., Lee J.M., Toriumi M., Chan M.M.H., Tang C.C., Onodera C.S., Deng J.M., Akiyama K., Ansari Y., Arakawa T., Banh J., Banno F., Bowser L., Brooks S., Carninci P.,

Chao Q., Choy N., Enju A., Goldsmith A.D., Gurjal M., Hansen N.F., Hayashizaki Y., Johnson-Hopson C., Hsuan V.W., Iida K., Karnes M., Khan S., Koesema E., Ishida J., Jiang P.X., Jones T., Kawai J., Kamiya A., Meyers C., Nakajima M., Narusaka M., Seki M., Sakurai T., Satou M., Tamse R., Vaysberg M., Wallender E.K., Wong C., Yamamura Y., Yuan S., Shinozaki K., Davis R.W., Theologis A., Ecker J.R. (2003). Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. *Science* **302**: 842-846;

Yang S.-J., Huh J.-W., Hong H.-N., Kim T.U., Cho S.-W. (2004). Important role of Ser443 in different thermal stability of human glutamate dehydrogenase isozymes. *FEBS Lett.* **562**: 59-64;

Zaganas I., Spanaki C., Karpusas M., Plaitakis A. (2002). Substitution of Ser for Arg-443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine. *J. Biol. Chem.* **277**: 46552-46558;

Zhang H. and Zhou C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* **82**: 539-545;

Zheng Z.-L. (2009). Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signaling Behav.* **4**: 584-591.

MATERIALE SUPPLEMENTARE

Tabella 1: Elenco delle piante analizzate

MATERIALE VEGETALE	SOURCE/ NASC number	PAESE
<i>Aethionema saxatile</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Arabidopsis halleri</i>	N9852	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia (Col-0)	N60000	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia <i>gdb1</i> mutant	N542736	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia <i>gdb2</i> mutant	N602711	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia <i>gdb1-2</i> mutant	Fontaine <i>et al.</i> , (2006)	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Landsberg erecta (Ler)	N1642	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Wassilewskija (Ws)	N1602	
<i>Arabis irsuta</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Barbarea vulgaris</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Brassica napus</i>	Rivenditore locale	Italia
<i>Brassica juncea</i>	Giardino botanico di Ferrara	Italia
<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	Rivenditore locale	Italia
<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	Rivenditore locale	Italia
<i>Brassica oleracea</i> var. gemmifera	Rivenditore locale	Italia
<i>Brassica oleracea</i> var. italica	Rivenditore locale	Italia
<i>Brassica oleracea</i> sabauda	Rivenditore locale	Italia
<i>Brassica rapa</i> subsp. sylvestris var. esculenta	Rivenditore locale	Italia
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Capsella rubella</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Cochlearia officinalis</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Giardino botanico di Ferrara	Italia
<i>Erysimum cheiri</i>	Giardino botanico di Ferrara	Italia
<i>Erysimum metlesicsii</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Hesperis lanciniata</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Iberis pruitii</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Isatis tintoria</i>	Giardino botanico di Ferrara	Italia
<i>Lepidum hirsutum</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Lunaria annua</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Matthiola fruticulosa</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Matthiola incana</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Nasturtium officinale</i>	Rivenditore locale	Italia
<i>Raphanus sativus</i>	Rivenditore locale	Italia
<i>Sysimbrium irio</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia
<i>Thlaspi alliaceum</i>	Giardino botanico di Palermo	Italia

Tabella 3: Tabella illustrativa delle sostituzioni amminoacidiche nella porzione C-terminale di GDH3

Posizione aa	GDH1	GDH3	GDH3-A	GDH3-LA	GDH3-VLA
397	Val	Ile	Ile	Ile	Val
406	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu
411	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala

Tabella 4: Tabella illustrativa della sostituzione amminacidica introdotta al C- terminale di GDH1

Posizione aa	GDH1	GDH3	GDH1-S
397	Val	Ile	Val
406	Leu	Ile	Leu
411	Ala	Ser	Ser

RINGRAZIAMENTI

Grazie al Dipartimento di Bioscienze, per avermi “ospitata” in questi anni, diventando per me come una seconda casa.

Un grazie speciale va al professore Restivo, docente e persona che stimo, per avermi insegnato ad amare questo lavoro e per avermi incoraggiata nei momenti difficili.

Grazie alla professoressa Polverini che mi ha dedicato il suo tempo e ha dato un grosso contributo per la realizzazione di questa tesi.

Un grazie immenso a Francesca..Una buona amica e collega, che mi ha sostenuta in ogni momento e che mi ha insegnato a non arrendermi di fronte alle difficoltà.

Grazie ad Enrico, per avermi aiutata a superare gli ostacoli incontrati lungo questo percorso.

Grazie agli orti botanici dell'Università degli Studi di Ferrara e Palermo, per avermi gentilmente fornito i semi di cui avevo bisogno.

Grazie a tutto il personale della sezione di Botanica del Dipartimento di Bioscienze, per aver ascoltato con pazienza e interesse i progressi del mio lavoro. Un grazie in particolare va alla Prof.ssa Anna Torelli per aver accettato di farmi da tutor.

Un grande grazie va a tutti gli studenti che hanno lavorato con me, con i quali ho condiviso momenti di gioia e piccole e grandi delusioni.

Grazie a nonni, zii, parenti di ogni tipo e amici, per il sostegno e la pazienza che avete avuto nei miei confronti.

Grazie alle mie sorelle, Anna e Paola, per avermi ascoltata e sopportata ogni volta che avevo bisogno.

Grazie a Simone, perché mi ha sempre offerto il suo aiuto e il suo incondizionato appoggio.

Infine grazie ai miei genitori per aver creduto sempre in me. Grazie per avermi permesso di intraprendere questa strada, incoraggiandomi e sostenendomi in ogni mia scelta, non solo materialmente, ma soprattutto moralmente.