



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED AMBIENTALE

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. GUIDO BARBUJANI

STUDIO SUL RUOLO DELL'ACIDO Δ^1 -PIRROLIN-5-CARBOSSILICO NEI FENOMENI DI
TOSSICITÀ INDOTTA DA PROLINA IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/04

Dottorando
Dott. PETROLLINO DAVIDE

(firma)

Tutore
Prof. FORLANI GIUSEPPE

(firma)

Anni 2007/2009

A Claudia

*che insegnandomi a credere nei sogni
mi ha lasciato il regalo più bello,
non potrò dimenticarti mai...*

“Vola solo chi osa farlo”

Luis Sepúlveda

INDICE

➤ INTRODUZIONE

- Plasticità delle piante nell'adattamento a condizioni di stress
- Metabolismo della prolina
 - *Biosintesi della prolina via Glutamato*
 - *La riduzione del P5C a prolina.*
 - *La via dell'arginina/ornitina*
 - **Il catabolismo della prolina**
 - **La prolina deidrogenasi**
 - **La P5C deidrogenasi**
- Trasporto della prolina
- *Regolazione del metabolismo in Arabidopsis thaliana*
- *Coinvolgimento della prolina nella fase riproduttiva*
- *La prolina nel nettare e importanza per gli insetti.*
- *Fenomeni di tossicità mediati da prolina*
- *Coinvolgimento della prolina e del suo metabolismo nelle interazioni biotiche*
- *Convergenza tra risposta a stress abiotici e biotici: effetto regolativo di ROS e NO*
- *Ingegnierizzare il metabolismo della prolina per potenziare la tolleranza a stress*

➤ SCOPO DEL LAVORO

➤ MATERIALI E METODI

- **Mantenimento delle colture cellulari e condizioni di crescita**
- **Trattamenti osmotici e chimici**
- **Estrazione degli aminoacidi liberi.**
- **Misurazione della prolina con il metodo della ninidrina.**
- **Misurazione degli aminoacidi totali con il metodo della ninidrina.**
- **Separazione e quantificazione dei singoli amino acidi per RP-HPLC**
- **Sintesi chimica e quantificazione dell'acido δ^1 -pirrolin-5-carbossilico**
- **Test di vitalità cellulare di Evans**
- **Test di riduzione dell'NBT.**
- **Esperimenti complementari con diversi genotipi di *S. cerevisiae***
- **Analisi di espressione genica per northern blot.**

- Preparazione degli estratti cellulari per l'analisi proteica.
- Frazionamento con ammonio solfato
- Determinazione del contenuto proteico di un estratto cellulare
- Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE
- Trasferimento delle proteine su foglio di nitrocellulosa
- Immunorivelazione con anticorpo anti-P5CDH di *S. tuberosum*
- Determinazione dell'attività specifica della P5C reduttasi
- Purificazione preparativa della P5C reduttasi di *A. thaliana*
- Purificazione della poli-His-AtP5CR per espressione eterologa in *E.Coli*.
- Induzione di anticorpi di topo contro 6-His-AtP5CR
- Trasformazione di *Saccharomyces cerevisiae* con AtP5CDH.
- Selezione dei trasformanti ed esperimenti di complementazione.
- Saggio enzimatico della P5CDH
- Induzione di ATP5CDH

➤ RISULTATI E DISCUSSIONE

- Solo cellule trattate con un osmolita non permeante non ionico accumulano prolina
- L'aggiunta di prolina determina un accumulo di P5C nel solo genotipo *p5cdh*
- Cellule *p5cdh* sembrano utilizzare prolina esogena quasi esclusivamente per la sintesi proteica, anche se un lieve aumento dei pool intracellulari di arginina suggerisce una parziale metabolizzazione dell'imino acido
- Esperimenti analoghi su genotipi di lievito caratterizzati dalla mancanza di uno dei due enzimi della via catabolica evidenziano una maggiore sensibilità alla prolina esogena del ceppo *prodh* rispetto al ceppo *p5cdh*
- Accumulo di prolina in risposta a condizioni di stress ossidativo
- Espressione indotta da condizioni di stress ossidativo: *OAT* e *ProDH1*
- Purificazione e caratterizzazione biochimica della P5CDH e della P5CR di *A. thaliana*
- Purificazione parziale della P5C deidrogenasi per espressione eterologa in lievito
- Purificazione e proprietà della P5CR di *Arabidopsis thaliana*
- L'attività della P5CR è molto sensibile alla presenza di anioni e cationi
- Il glutamato e gli amino acidi correlati inibiscono l'attività della P5CR
- Ottenimento di anticorpi policlonali contro la P5CR espressa in *E. coli*

➤ CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

INTRODUZIONE

Plasticità delle piante nell'adattamento a condizioni di stress

A causa dell'impossibilità di spostarsi, le piante sono esposte a una vasta gamma di fattori ambientali sfavorevoli. Alcuni fattori, come la temperatura dell'aria, possono diventare "stressanti" in pochi minuti; altri, come il contenuto idrico del suolo, possono richiedere giorni o settimane, altri ancora, come la carenza di minerali nel suolo, possono causare sintomi a distanza di mesi. È stato stimato che, a causa degli stress derivanti da condizioni climatiche e pedologiche sub-ottimali, la resa delle coltivazioni negli Stati Uniti è soltanto il 22% di quella possibile sulla base del potenziale genetico delle colture (Boyer, 1982). Diventa facile intuire l'importanza, per agricoltura e ambiente, di una migliore comprensione dei processi fisiologici alla base dei meccanismi di adattamento o di acclimatazione delle piante a tali condizioni.

Sotto il termine generale di stress ambientale vengono racchiuse sia le condizioni di stress abiotico che quelle legate a fattori biotici, come erbe infestanti, patogeni e insetti fitofagi. Il concetto di stress è associato a quello di tolleranza, cioè alla capacità di far fronte ad un ambiente sfavorevole. Proprio in conseguenza della loro natura sessile, i vegetali hanno sviluppato diversi meccanismi di difesa che limitano i danni indotti da condizioni di stress. L'acclimatazione è la risultante di diversi processi integrati che avvengono a tutti i livelli di organizzazione della pianta, partendo da eventi anatomici e morfologici per arrivare a livello cellulare, biochimico e molecolare.

La carenza idrica è sicuramente la tipologia di stress che più incide sulla crescita delle piante. Proprio la complessità dei sistemi di adattamento alla carenza d'acqua offre un ottimo schema esplicativo dei vari livelli di azione nella risposta allo stress. Ad esempio, l'avvizzimento delle foglie riduce la perdita di acqua e la superficie di luce incidente, riducendo quindi anche lo stress da calore sulle foglie. A livello cellulare la risposta include modificazioni del ciclo e della divisione cellulare, ma coinvolge anche modificazioni dell'architettura della parete così come delle strutture sub-cellulari. A livello biochimico e molecolare le piante alterano il metabolismo in diversi modi. Tra gli adattamenti biochimici, l'aggiustamento osmotico a livello cellulare rappresenta una delle risposte più importanti (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Alcune piante sono in grado di effettuare questo aggiustamento osmotico aumentando la quantità di alcuni soluti e abbassando di conseguenza il potenziale idrico delle cellule radicali: ciò contrasta il richiamo di acqua verso l'esterno. Queste sostanze, chiamate osmoliti compatibili, possono essere accumulate in gran quantità poiché non interferiscono con l'attività enzimatica cellulare, dato che a pH citoplasmatico (7.2) sono in forma zwitterionica, ossia priva di carica netta. Gli osmoliti compatibili più comunemente accumulati dalle piante sono zuccheri, alcoli, ammine quaternarie, prolina o glicina betaina.

La prolina è un aminoacido ciclico, quindi propriamente un iminoacido, non è carico a pH neutro (pI 7) ed è molto solubile in acqua. Tali caratteristiche lo rendono un ottimo soluto compatibile e tra tutti, probabilmente, è quello più diffuso. Oltre a far parte della composizione delle proteine svolge il suo ruolo di osmoprotettore nella cellula in forma libera; si accumula

anche in eubatteri, protozoi e invertebrati marini in risposta a stress (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Le peculiarità che rendono di particolare interesse la prolina ed il suo metabolismo nella fisiologia dello stress risiedono nella sua capacità di conferire resistenza a diverse condizioni avverse (Tabella 1; Kavi Kishor *et al.*, 2005). La prolina occupa da questo punto di vista un posto di rilievo non solo nel mondo vegetale. Il suo accumulo è documentato in praticamente tutti gli organismi viventi.

Tabella 1: Accumulo di prolina in risposta a diverse condizioni di stress.

Stress	Riferimenti bibliografici
Carenza idrica	Delauney e Verma, 1993 ; Heuer , 1994.
Salinità	Delauney e Verma, 1993; Heuer, 1994.
Alte temperature	Chu <i>et al.</i> , 1978; Kuo <i>et al.</i> , 1986.
Basse temperature	Chu <i>et al.</i> , 1978; Draper, 1972; Naidu <i>et al.</i> , 1991.
Tossicità da metalli pesanti	Sharma e Dietz, 2006; Bassi e Sharma, 1993.
Infezioni patogene	Srivastava e Tandon, 1966; Labanauskas <i>et al.</i> , 1974; Meon <i>et al.</i> , 1978; Mohanty e Sridhar 1982; Fabro <i>et al.</i> , 2004; Ayliffe <i>et al.</i> , 2002.
Anaerobiosi	Aloni e Rosenshtein, 1982; Kuo e Chen, 1980; Labanauskas <i>et al.</i> , 1974.
Inquinanti atmosferici	Anbazhagan <i>et al.</i> , 1988; Godzik e Linskens, 1974.
Carenza di nutrienti	Göring e Thien, 1979; Vaucheret <i>et al.</i> , 1992.
Radiazioni-UV	Parada Saradhi <i>et al.</i> , 1995.

L'accumulo di prolina in condizioni di stress osmotico causa un aumento dell'osmolarità della cellula con conseguente richiamo d'acqua o comunque con una riduzione dell'efflusso. Sono stati descritte anche altre possibili azioni protettive legate a tale accumulo. Ad esempio, sembra che formando una sorta di conchiglia di solvatazione attorno a poliribosomi, enzimi e membrane biologiche la prolina riesca a garantirne l'integrità e la funzionalità (Vanrensburg *et al.*, 1993; Chen & Li, 2002; Hare & Cress, 1997).

Altre condizioni avverse, come variazioni di temperatura, l'esposizione a metalli pesanti, stati di anaerobiosi, deficienza di nutrienti, presenza di inquinanti atmosferici ed esposizione a radiazioni UV (Delauney *et al.*, 1993; Kohl *et al.*, 1991), bloccano la normale dissipazione dello stato di alta energia indotto dalla luce e risultano in uno stress ossidativo che causa un aumento della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Praticamente per tutte le condizioni elencate sopra sono stati descritti meccanismi di protezione mediati dalla prolina. Molti di questi sono riconducibili all'azione di "scavenger", che ha questo aminoacido nei confronti dei radicali liberi (Bohnert *et al.*, 1999) e alla capacità di attivare enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS, quali catalasi, perossidasi e polifenolossidasi. Tali azioni, insieme alla capacità di aumentare il trasporto fotochimico di elettroni sulle membrane tilacoidali, si ripercuotono positivamente sui livelli di perossidazione lipidica (Hare & Cress, 1997).

Oltre a queste capacità propriamente protettive, si ritiene che la prolina possa fungere anche da molecola energetica e che il suo metabolismo possa essere coinvolto nella regolazione del potenziale redox della cellula (Hare & Cress, 1997). L'ossidazione di una molecola di prolina fornisce 30 ATP (Atkinson *et al.*, 1977). Il suo catabolismo è considerato la fonte primaria di energia in processi energeticamente intensi, come il volo degli insetti (Mani *et al.*, 2002). Inoltre nelle piante in ripresa dallo stress il catabolismo dell'iminoacido può fornire azoto ammoniacale, carbonio, energia e potere riducente. La sua biosintesi causa un aumento del rapporto $NAD^+/NADH$, provocando un incremento del flusso del carbonio attraverso la via ossidativa dei pentosi fosfati. In questo modo la cellula sintetizza eritrosio-4-fosfato, precursore di importanti metaboliti secondari utili in condizioni di stress. Inoltre dalla via dei pentosi fosfati vengono sintetizzati gli zuccheri costituenti dei nucleotidi, e in questo modo la pianta si assicura una riserva di nucleotidi da poter prontamente usare, una volta terminate le condizioni sfavorevoli, nella fase di recupero dallo stress (Hare & Cress, 1997; Figura 1). La sintesi di prolina è anche implicata nel moderare l'acidificazione del citosol, condizione che è spesso associata a condizioni di stress (Hare & Cress, 1997).

In *Arabidopsis* la prolina può giungere a costituire il 20% degli aminoacidi totali dopo trattamento con NaCl. Sebbene si ritenga che il suo accumulo conferisca una tolleranza allo stress osmotico, il suo ruolo specifico durante la crescita della pianta non è stato completamente chiarito (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Negli ultimi decenni sono state ingegnerizzate diverse specie vegetali con l'intento di aumentare i livelli di prolina accumulata, specialmente trasferendo geni associati alla sua biosintesi. Piante in cui l'iminoacido risulta sovrapprodotta mostrano in effetti una maggiore tolleranza ad alcuni stress abiotici (Roosens *et al.*, 2002; Kavi Kishor *et al.*, 1995). L'accumulo di prolina può essere dovuto ad un trasporto attivo, a una sua sintesi *de novo*, a una diminuzione del suo catabolismo oppure a più processi.

Metabolismo della prolina

La biosintesi di prolina avviene con modalità diverse in piante e batteri (Csonka *et al.*, 1991; Delauney *et al.*, 1993). Se i geni codificanti per gli enzimi associati alla sintesi e al catabolismo della prolina sono stati clonati e parzialmente caratterizzati, ancor poco si sa sugli aspetti regolativi (Kavi Kishor *et al.*, 2005). La sua sintesi avviene prevalentemente a partire da glutamato ma si ritiene possa procedere anche via arginina/ornitina. Pur all'interno di un quadro generale simile, esistono alcune differenze tra procarioti ed eucarioti relativamente alle vie biosintetiche coinvolte (Kavi Kishor *et al.*, 2005).

Figura 1. Interazioni del metabolismo della prolina con altre vie biosintetiche.

La sintesi di prolina provoca un aumento del rapporto $NADP^+/NADPH$, la disponibilità di $NADP^+$ stimola l'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) con conseguente implementazione della via dei pentosi fosfati (PPP). La via dei PPP è connessa al metabolismo secondario (via dello shikimato) e della biosintesi delle purine (da Sarkar *et al.*, 2009).

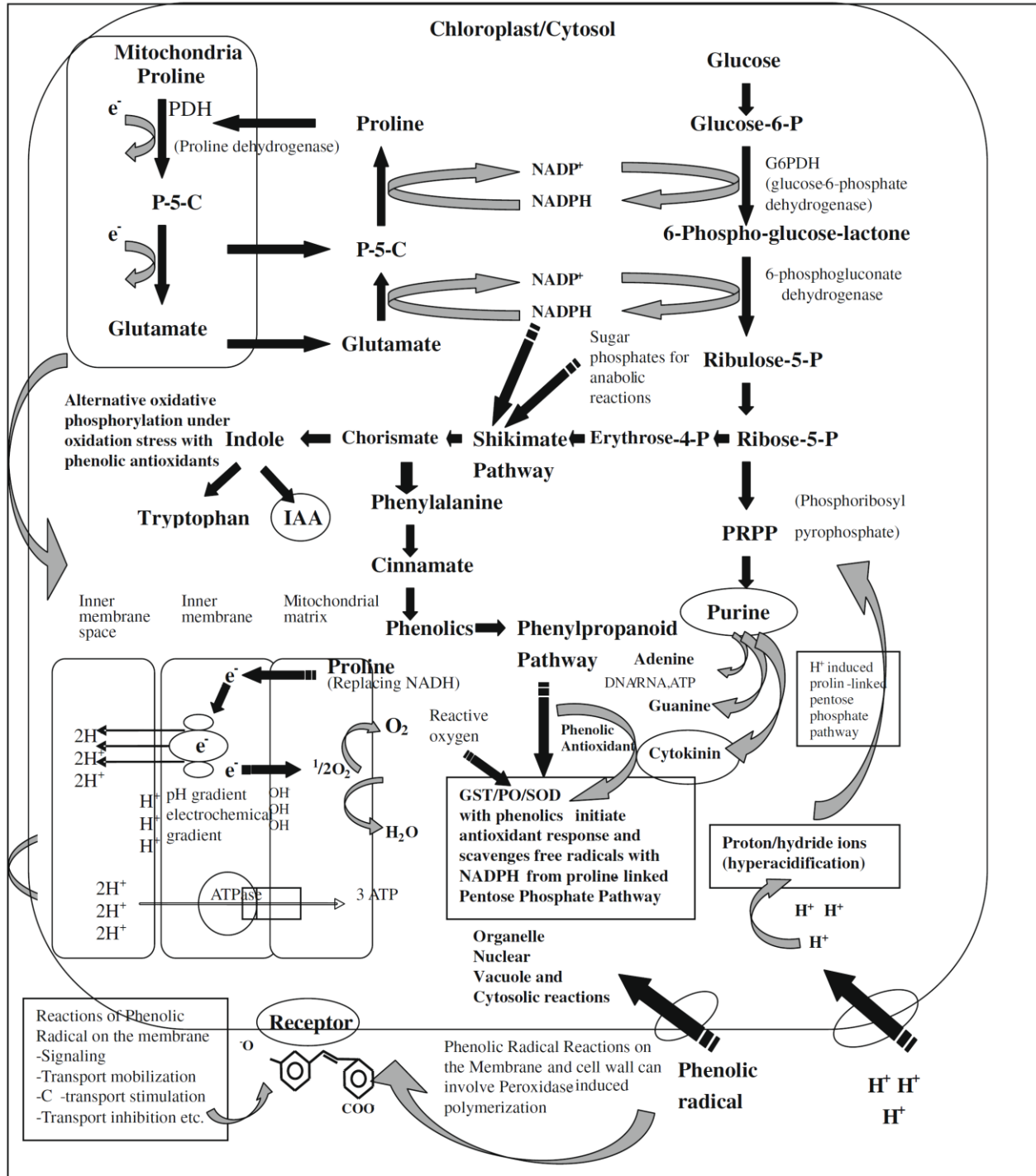
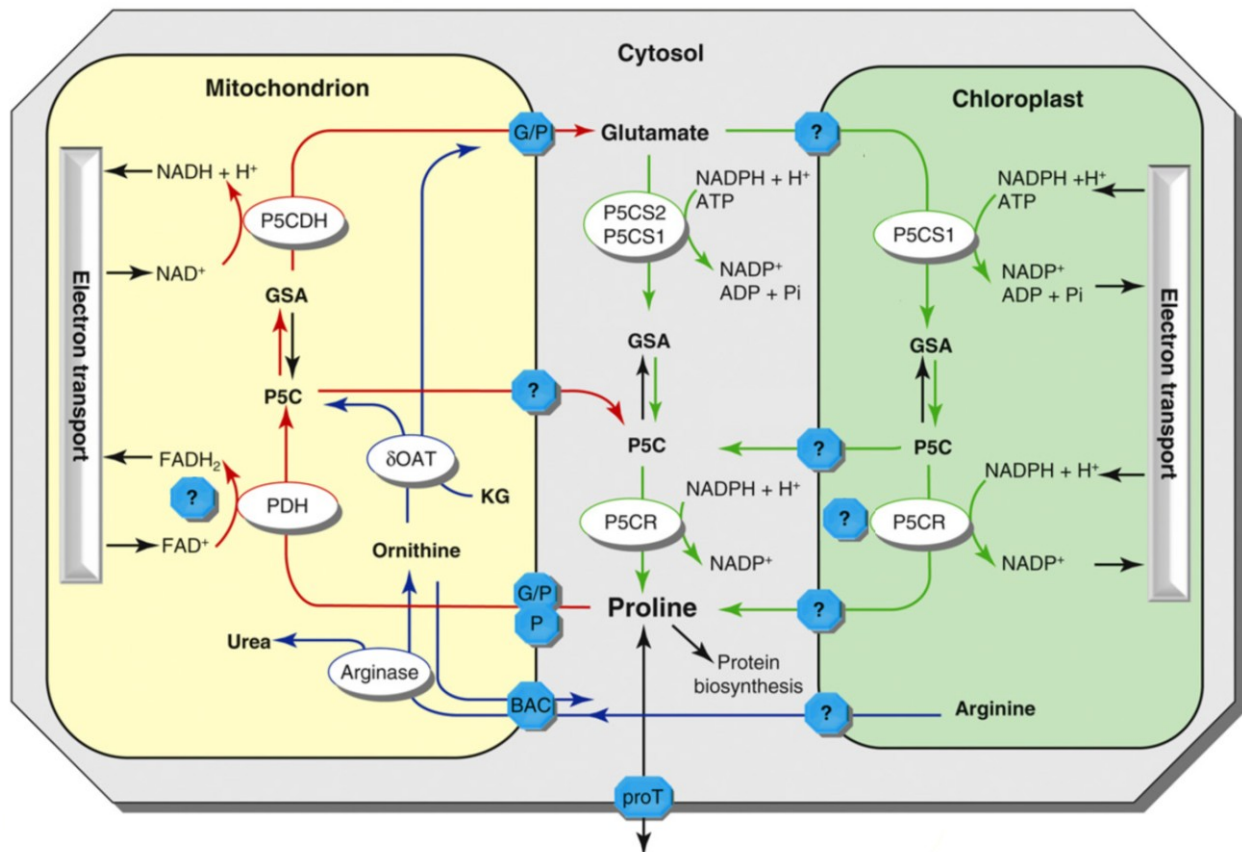


Figura 2. Metabolismo della prolina

Nello schema è messa in evidenza la separazione spaziale della biosintesi e del catabolismo. Come si evince dai punti interrogativi, ancora diversi aspetti restano da chiarire. In particolare l'esistenza di un trasportatore specifico per il P5C, così come la localizzazione della P5C riduttasi e l'accettore finale degli elettroni utilizzato dalla ProDH restano punti critici da chiarire (modificato da Szabados & Savouré, 2010).



La via del glutamato

Nei batteri la biosintesi di prolina da glutamato inizia a opera di una γ -glutamyl-chinasi (γ -GK; EC 2.7.2.11) che catalizza la fosforilazione del substrato a γ -glutamyl-fosfato, che a sua volta viene ridotto a glutamico- γ -semialdeide (GSA) dall'enzima glutamico- γ -semialdeide deidrogenasi (GSADH; EC 1.2.1.41). Per ciclizzazione spontanea della GSA in soluzione si forma l'acido δ^1 -pirrolin-5-carbossilico (P5C). Negli eucarioti, invece, la sintesi di GSA a partire da glutamato viene catalizzata da un unico enzima bifunzionale, la P5C sintetasi (P5CS; EC 2.7.2.11), dotata di attività sia γ -glutamyl-chinasi che glutamil- γ -semialdeide deidrogenasi. I due domini corrispondenti mostrano una buona similitudine con i geni di *E. coli* che codificano per γ -GK e GSDH (Hu *et al.*, 1992). L'enzima usa come cofattore $NADPH$ (Hare *et al.*, 1999). L'attività chinasi risulta limitante la velocità di sintesi della prolina e subisce una regolazione a feed-back negativo da parte di quest'ultima, inibizione che risulta più marcata nei batteri che negli eucarioti (Hu *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995).

In alcune specie vegetali come *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Lycopersicon*

esculentum e *Phaseolus vulgaris* sono state individuate due diverse isoforme enzimatiche della P5CS, i cui geni sono a localizzazione nucleare (Strizhov *et al.*, 1997; Ginzberg *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2010). Nel Fagiolo mat (*Vigna aconitifolia*) sembra esservi invece una sola isoforma (Hu *et al.*, 1992). Riguardo la regolazione delle diverse forme sia in termini trascrizionali che di regolazione a feed-back, esistono differenze tra specie e specie. Ad esempio, il gene *AtP5CS1* di *A. thaliana* è espresso in molti organi e tessuti differenziati e la sua trascrizione è indotta dalla disidratazione, dalla elevata salinità e da trattamenti con acido abscissico (ABA), mentre i suoi livelli sono bassi in colture cellulari in attiva divisione o in assenza di stress abiotici (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Al contrario, il gene *AtP5CS2* è espresso in colture cellulari in divisione e i suoi livelli rispondono maggiormente alle condizioni di stress (Strizhov *et al.*, 1997). In pomodoro, invece, il gene *tomPRO1* è risultato un riassetto dell'operone policistronico procariotico che codifica per i due distinti polipeptidi (γ -GK e GSADH). Un altro gene, *tomPRO2*, codifica per una P5CS del tutto simile a quella degli altri eucarioti (Garcia-Rios *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1998). Studi sulla regolazione della trascrizione di tali geni hanno messo in luce un incremento di solo tre volte dei livelli di mRNA di *tomPRO2* in risposta a stress salino, condizioni in cui non è stato possibile misurare i livelli del messaggero di *tomPRO1*. Sembra dunque che in pomodoro la regolazione della trascrizione di P5CS non sia importante per la regolazione osmotica della sintesi di prolina (Fujita *et al.*, 1998). I due geni P5CS in *Medicago truncatula* mostrano, invece, una regolazione differente nei vari organi e in risposta a stress osmotico. Per quanto riguarda *MtP5CS1* i livelli di trascritto nei vari organi correla bene con quelli di prolina libera, ma la trascrizione non è influenzata dallo stress osmotico. Al contrario i livelli di *MtP5CS2*, bassissimi in tutti gli organi, subiscono una decisa attivazione solo nelle radici delle piante stressate con sale (Armengaud *et al.*, 2004).

L'accumulo di prolina negli acini di uva in maturazione è invece indipendente dai livelli di mRNA e di proteina della P5CS. Infatti l'accumulo di prolina, che è diverso da quello indotto da condizioni di stress osmotico, sembra correlare con una repressione del catabolismo e un aumento dei fenomeni di trasporto piuttosto che una induzione della biosintesi. Questo suggerisce l'esistenza di altri fattori di regolazione (Stines *et al.*, 1999).

L'ultimo passaggio della via biosintetica, che porta alla formazione di prolina per riduzione del P5C, è comune sia ai procarioti che agli eucarioti, ed è catalizzato dall'enzima P5C reductasi (P5CR; EC 1.5.1.2). La P5CR è stata scoperta per complementazione funzionale di un mutante di *E. coli* usando una libreria di cDNA ottenuta da noduli di patata (Delauney & Verma, 1990). Il gene, presente in 2-3 copie nel genoma di patata, risulta osmoregolato. Il gene per la P5CR è stato isolato in seguito anche da *Pisum sativum* (Williamson & Slocum, 1992), *A. thaliana* (Verbruggen *et al.*, 1996) e Kiwi (Walton *et al.*, 1998). L'espressione di *AtP5CR* è generalmente maggiore in quei distretti cellulari che necessitano di aggiustamenti osmotici come nelle cellule di guardia, negli idatodi, nei granuli pollinici e nei semi in maturazione. La sua espressione è alta anche nei meristemi apicali e radicali e nei primordi delle radici laterali (Hua *et al.*, 1997, Figura 3).

La P5CR è presente in spinacio con due forme isoenzimatiche, P5CR-1 e P5CR-2.

Queste sembrano avere una differente localizzazione nella cellula, e solo P5CR-2 è stata isolata da cloroplasti intatti (Murahama *et al.*, 2001). Tuttavia il gene non è stato individuato nel genoma plastidiale, indicando che la proteina è sintetizzata nel citosol prima di essere trasferita nel cloroplasto. Entrambe le isoforme sono omopolimeri di 10-12 subunità. Esse mostrano una maggiore affinità per il NADPH che per il NADH, e sono inibite da ATP e Mg^{2+} . Anche il sale ha un effetto inibitorio. In termini generali, sembra che l'attività di P5CR-1 e P5CR-2 sia inibita da un'alta concentrazione di cationi piuttosto che di anioni (Murahama *et al.*, 2001). Anche per questo enzima la regolazione mostra differenze tra specie e specie. Ad esempio, in spinacio le due isoforme sono inibite da un aumento della salinità del mezzo, mentre in pisello si assiste ad un aumento, anche se modesto, dell'attività enzimatica (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Hua e collaboratori nel 1999 hanno dimostrato l'esistenza di una regione di 69 bp nel promotore del gene *P5CR* responsabile dell'espressione tessuto specifica del gene in *Arabidopsis*.

La P5CR sembra non avere un ruolo importante nel determinare l'accumulo osmoindotto di prolina, dal momento che, come è stato sottolineato, il passaggio limitante è quello controllato dalla P5CS. Potendo in genere usare sia NADPH che NADH come donatore di potere riducente, sembra avere, invece, un ruolo importante nella regolazione del potenziale redox cellulare (Kavi Kishor *et al.*, 2005).

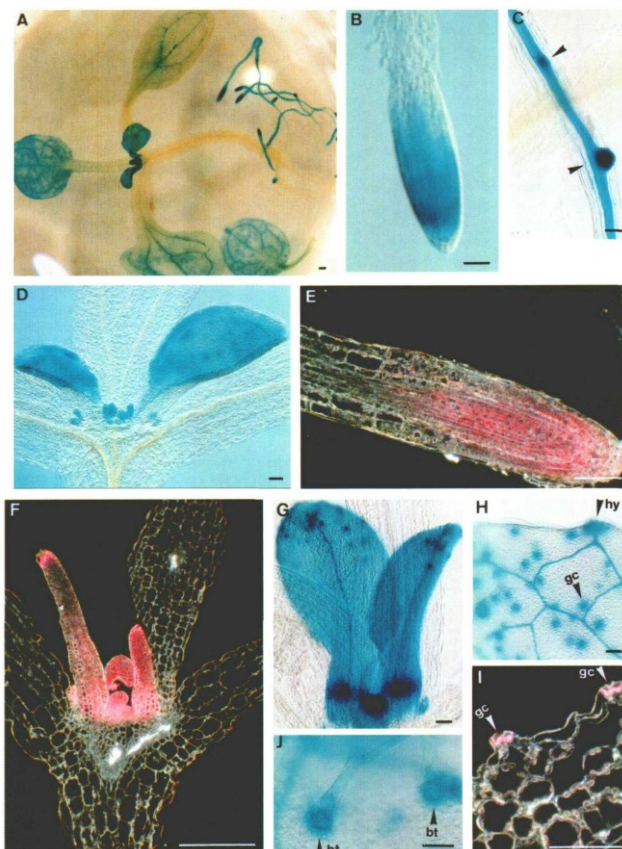


Figura 3. Espressione indotta dal promotore di *AtP5CR* in piantine di *Arabidopsis* di 10 giorni.

(A) Localizzazione dell'attività GUS: la colorazione più intensa si riscontra nelle radici, negli apici e nelle foglie giovani. Attività a livello radicale (B), nei primordi laterali (C) e nelle foglie apicali(D). Sezioni longitudinali (E) di una radice e (F) di una gemma apicale. In quest'ultima è possibile riconoscere la forte espressione localizzata nel meristema apicale e nei primordi foliari. (G e H) Prima coppia di foglie colorate per 6h. (I) sezione trasversale di foglie in cui si evidenzia la localizzazione della attività a livello delle cellule di guardia. (J) particolare di lamina foliare in cui è chiara la colorazione alla base dei tricomi. (gc: cellule di guardia; hy idatodi; bt: base dei tricomi) (da Hua *et al.*, 1997).

La via dell'arginina/ornitina

La sintesi di prolina può, in alternativa, procedere attraverso l'ornitina, a sua volta sintetizzata a partire da glutamato o da arginina. L'arginina, importantissima riserva di azoto, viene convertita dall'enzima arginasi (ARG, EC 3.5.3.1) in ornitina, che viene metabolizzata in modo diverso in batteri e piante. Nei primi viene trasformata dall'enzima ornitina α -amino transferasi (α -OAT, EC 2.6.1.68) a α -keto- δ -aminovalerato, che a sua volta ciclizza spontaneamente in acido pirrolin-2-carbossilico (P2C). Quest'ultimo viene infine convertito in prolina dalla P2C reductasi (P2CR, EC 1.5.1.1). Nelle piante questi passaggi non si ritrovano, ma l'ornitina può essere convertita direttamente in GSA dall'enzima ornitina δ -amino transferasi (δ -OAT, EC 2.6.1.68). Il gene codificante per una δ -OAT vegetale fu per la prima volta clonato per trans-complementazione partendo da una libreria di cDNA di Fagiolo mat (Delauney *et al.*, 1993). L'alta omologia con gli enzimi batterici e animali indica che il gene codifica per una δ -OAT piuttosto che una α -OAT. Recentemente, grazie all'espressione eterologa del gene di *Vigna aconitifolia* in *E. coli*, si è potuto appurare che l'enzima è inibito da serina, isoleucina e valina, mentre è insensibile alla prolina (Sekhar *et al.*, 2007). La δ -OAT di *Arabidopsis* (At5g46180) è stata identificata per omologia di sequenza con quella di *Vigna* e si è visto che è indotta in plantule in risposta a stress salino (Roosens *et al.*, 1998). Piante transgeniche di tabacco e riso overesprimenti la δ -OAT hanno livelli di prolina libera più alti e una maggior resistenza a condizioni di stress osmo-salino, avvalorando il concetto che la conversione dell'ornitina possa contribuire all'accumulo di prolina (Roosens *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005).

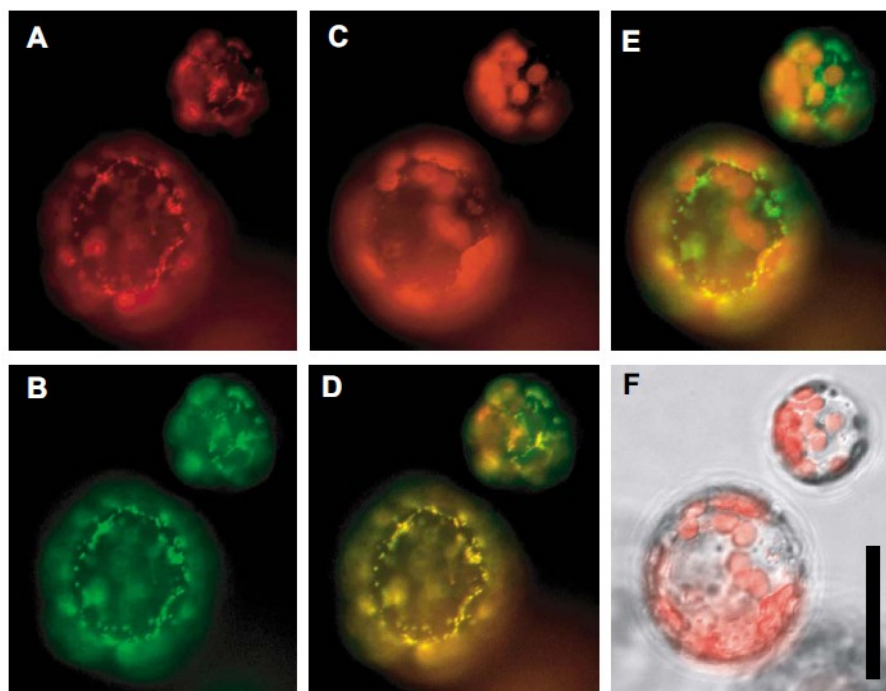
La reazione della δ -OAT determina la formazione di GSA, che è in equilibrio spontaneo con la sua forma ciclica P5C. Ciò ha portato a postulare che l'ornitina possa rappresentare un punto di partenza alternativo per la sintesi e l'accumulo di prolina (Delauney *et al.*, 1993). La via del glutamato sembra comunque essere la predominante in condizioni normo-osmotiche o di carenza di azoto, mentre la via dell'ornitina sembra indotta quando la disponibilità di azoto è elevata (Delauney *et al.*, 1993). In effetti studi condotti su plantule di ravanella (*Raphanus sativus*) trattate con gabaculina, un inibitore della δ -OAT, sembrano confermare il contributo della via dell'ornitina nella sintesi di prolina (Hervieu *et al.*, 1995). Anche in *Arabidopsis* i livelli di mRNA per δ -OAT aumentano in risposta allo stress salino, così come i livelli di P5CS e il conseguente contenuto in prolina libera (Roosens *et al.*, 1998). Ulteriori evidenze in questa direzione vengono dal fatto che piante transgeniche di tabacco (*Nicotiana plumbaginifolia*) overesprimenti la δ -OAT di *Arabidopsis* hanno un contenuto maggiore in prolina rispetto alle piante di controllo e raggiungono biomasse superiori e livelli di germinazione più alti in condizioni di stress osmotico (Roosens *et al.*, 2002). Tutte queste evidenze suggeriscono che la via dell'ornitina, insieme con la via del glutamato, giochi un ruolo importante nell'accumulo osmo-indotto di prolina.

Esistono però evidenze contrastanti. La presenza di un peptide di transito, predetto da undici diversi programmi, e la colocalizzazione di δ -OAT-GFP di *Arabidopsis* con i mitocondri, sono forti prove a favore di una sua localizzazione a livello di tali organuli, che suggerisce che il P5C prodotto dall'ornitina venga immesso nella via catabolica della prolina piuttosto che in

quella biosintetica (Funck *et al.*, 2008). Un trasporto di P5C/GSA dal mitocondrio al citosol non sembra plausibile per via della sua instabilità chimica (Funck *et al.*, 2008), e ad oggi non è stato ancora clonato in nessun organismo un trasportatore specifico per questo metabolita. La via dell'ornitina in foglie di riso sembra contribuire poco all'accumulo di prolina in condizioni di carenza idrica. In questa specie in foglie sottoposte a stress idrico e trattate con gabaculina si verifica una riduzione dell'attività specifica del 75% rispetto ai controlli non trattati, ma il pool di prolina libera decresce solo del 20%. In foglie di riso nelle medesime condizioni ma trattate con cicloeximide (un inibitore della sintesi proteica) pur non assistendo ad una riduzione dell'attività dell' δ -OAT, si registra una forte riduzione dell' accumulo osmo-indotto di prolina (Yang & Kao, 1999). Ulteriore evidenze in questa direzione vengono dalla dimostrazione che la δ -OAT è essenziale per il riciclo dell'azoto immagazzinato nel pool di arginina, ma non per l'accumulo di prolina indotto da stress. Infatti mutanti *knockout* di *Arabidopsis* accumulano intermedi del ciclo dell'urea e non mostrano variazioni significative nel pool di prolina accumulata in risposta allo stress (Funck *et al.*, 2008). Questo fornisce una ulteriore evidenza a discapito dell'idea che esista uno *shortcut* fra arginina e sintesi di prolina che non proceda attraverso la formazione di glutamato e l'attività della P5CS citosolica. In quest'ottica sembra più plausibile che il P5C venga metabolizzato a glutamato (Funck *et al.*, 2008)

Figura 4. Localizzazione della δ OAT a livello mitocondriale

Protoplasti da foglie di *Arabidopsis thaliana* trasformati con un costrutto di fusione δ OAT-GFP posto sotto il controllo del promotore CaMV 35S. (A) Fluorescenza del MitoTracker, sonda che entra specificamente nei mitocondri. (B) Fluorescenza della GFP; (C) auto fluorescenza della clorofilla; (D) sovrapposizione di A e B; (E) sovrapposizione di C e D; (F) sovrapposizione di C con immagine presa in luce bianca. Barra = 20 μ m. (da Funck *et al.*, 2008)



Il catabolismo della prolina

La riossidazione dell'iminoacido procede a glutamato attraverso due soli passaggi. Il primo è catalizzato da una prolina deidrogenasi (ProDH, EC 1.5.99.8) che produce P5C, cui segue quello di una P5C deidrogenasi (P5CDH, EC 1.5.1.12), che converte quest'ultimo in glutamato. Nelle piante il catabolismo dell'aminoacido procede a livello dei mitocondri (Deuschle *et al.*, 2001).

La ProDH è localizzata funzionalmente nella membrana mitocondriale interna (Figura 6; Kiyosue *et al.*, 1996) elemento che sembra favorire la cessione degli elettroni direttamente alla catena respiratoria, anche se sino ad oggi non ne è stato individuato l'accettore fisiologico. L'enzima vegetale non è stato fin qui purificato. Il gene è stato clonato in *Arabidopsis* (Kiyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996) e sono stati caratterizzati dei corrispondenti mutanti (Nanjo *et al.*, 2003). In termini generali si ritiene che la *ProDH* sia repressa in condizioni di stress omo-salino, mentre sia indotta dalla reidratazione e dalla prolina (Figura 5; Kiyosue *et al.*, 1996).

AtProDH è presente con due isoforme (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996; Mani *et al.*, 2002). *AtProDH1* è transientemente indotta durante la disidratazione nella prima ora dall'imposizione dello stress, fino a non essere più rilevabile dopo 5h (Kiyosue *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1998). Secondo alcuni autori l'inibizione della degradazione della prolina riveste solo un ruolo marginale nel determinare il suo reale accumulo (Hare *et al.*, 1999). Il gene è espresso negli organi riproduttivi e nei semi in germinazione (Verbruggen *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1998). In effetti alcuni autori suggeriscono che in *Arabidopsis* la degradazione della prolina rivesta un ruolo nella maturazione e germinazione dei semi (Deuschle *et al.*, 2004). La sua soppressione in linee antisense (Nanjo *et al.* 1999; Mani *et al.* 2002; Deuschle *et al.* 2004) e *knockout* (Nanjo *et al.* 2003; Deuschle *et al.* 2004) non causa effetti evidenti sulla crescita vegetativa in condizioni normali, ma provoca una ipersensibilità alla prolina fornita esogenamente. La seconda isoforma, *AtProDH2* (At5g38710), è stata identificata come gene espresso e con alta omologia con *AtProDH1* (Mani *et al.*, 2002). Weltmeier e collaboratori (2006) hanno dimostrato una induzione diretta della *AtProDH2* a opera di bZIP11, un fattore di trascrizione represso dal saccarosio.

Recentemente il gene *AtProDH2* è stato clonato e la sua attività è stata definitivamente provata. A differenza di *AtProDH1*, espresso principalmente nei granuli pollinici e nello stigma (Nakashima *et al.*, 1998), *AtProDH2* è espressa nel gambo florale immediatamente sotto i fiori, e prevalentemente confinata ai tessuti vascolari. Ciò è in accordo con la sua regolazione da parte del bZIP11, la cui espressione è limitata a tali tessuti. L'induzione di *ProDH2* in piante sottoposte a stress salino lascia pensare che l'accumulo di prolina nel sistema vascolare debba essere evitato durante lo stress, quando la *ProDH1* è repressa nei restanti tessuti (Funck *et al.*, dati non pubblicati). Anche nelle radici e in cellule in coltura fotosinteticamente attive i livelli di *ProDH2* sono determinabili, mentre in cellule in coltura non fotosinteticamente attive solo *ProDH1* è quantificabile (Funck *et al.*, dati non pubblicati). In accordo con il fatto che *ProDH2* è regolata da bZIP11, piante cresciute in terreni privi di saccarosio hanno livelli più alti di

trascritto. I livelli aumentano anche in presenza di 20 mM prolina ma, cosa più sorprendente, anche in presenza di 200 mM NaCl. Tale fatto risulta di particolare rilievo. Dal momento che *ProDH1* è sicuramente repressa durante lo stress iperosmotico, questo rappresenta una forte indicazione di una non ridondanza funzionale delle due isoforme.

In modo analogo Ribarits e collaboratori (2007) hanno osservato una diversa regolazione delle due isoforme presenti in *Nicotiana tabacum*. Le due isoforme, *NtPDH1* e *NtPDH2*, sono espresse in modo differenziale nei diversi organi sia in condizioni normo-osmotiche che in condizioni di disidratazione, mentre sono co-regolate in piantine appena germinate e sottoposte a disidratazione. Dall'analisi delle sequenze emerge una elevata similitudine con un gene di *N. tabacum* (*CIG1*) indotto dalle citochinine (Kimura *et al.*, 2001). In effetti entrambe le isoforme sono fortemente indotte nei meristemi e nel polline, tessuti che contengono un alto livello di questi ormoni (Ribarits *et al.*, 2007). Ad ogni modo sembra che in entrambe le specie una delle due isoforme abbia un ruolo costitutivo, mentre l'altra sia maggiormente coinvolta nella risposta allo stress. Ribarits e collaboratori ipotizzano che *NtPDH1* sia coinvolta nella crescita e nello sviluppo della pianta, fornendo energia e metaboliti dalla degradazione della prolina, mentre *NtPDH2*, fortemente indotta dallo stress idrico, giocherebbe un ruolo predominante in tal senso. Questa ipotesi trova riscontro anche nel fatto che entrambe le isoforme sono co-espresse ad alti livelli nel polline e nei semi, tessuti altamente disidratati ma che richiedono una pronta fonte di energia e di nutrienti. Genotipi in cui uno o entrambi i geni *NtPDH* sono stati silenziati mostrano difetti nella formazione dei semi così come disturbi della germinazione e del normale sviluppo delle plantule (Ribarits *et al.*, 2007).

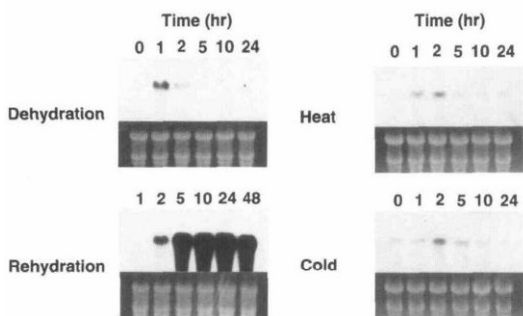
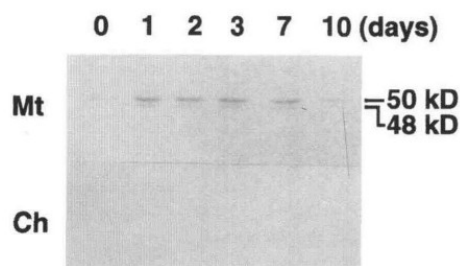


Figura 5: Livelli di mRNA del gene della PDH di *Arabidopsis* in risposta a vari stress abiotici.

Condizioni di stress come disidratazione, calore e freddo reprimono la trascrizione di *AtProDH*, mentre la reidratazione al contrario induce fortemente il gene (da



Kiyosue *et al.*, 1996).

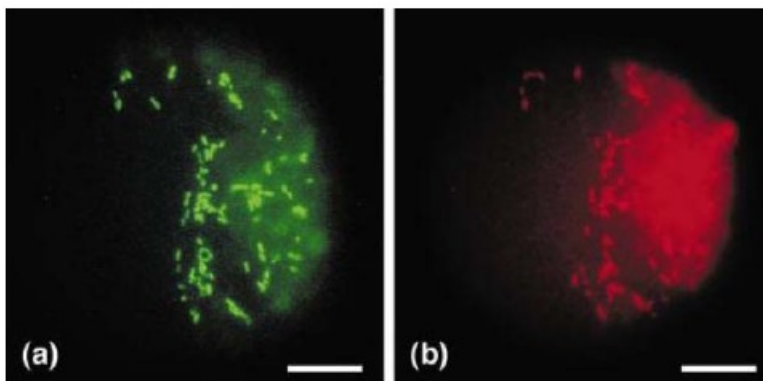
Figura 6: Localizzazione della PDH

La frazione plastidiale non mostra ibridazione mentre in quella mitocondriale sono riscontrabili due bande corrispondenti al precursore e alla forma matura (Kiyosue *et al.*, 1996).

Il secondo e ultimo enzima della breve via catabolica, la P5CDH, è presente in culture cellulari di *Nicotiana plumbaginifolia* con due diverse isoforme, che sono differenzialmente espresse durante le fasi di crescita e modulate in modo diverso in condizioni di stress osmosalino (Forlani *et al.*, 1997b). La proteina, purificata e caratterizzata in *Solanum tuberosum*, usa preferenzialmente NAD⁺ come accettore di elettroni ed è formata da un omotetramero (Forlani *et al.*, 1997a) solubile nella matrice mitocondriale (Figura 7).

Figura 7. Localizzazione subcellulare della P5CDH (da Deuschle *et al.*, 2001)

(A) GFP con peptide di transito della P5CDH
(B) mitocondri evidenziati con Mico Tracker

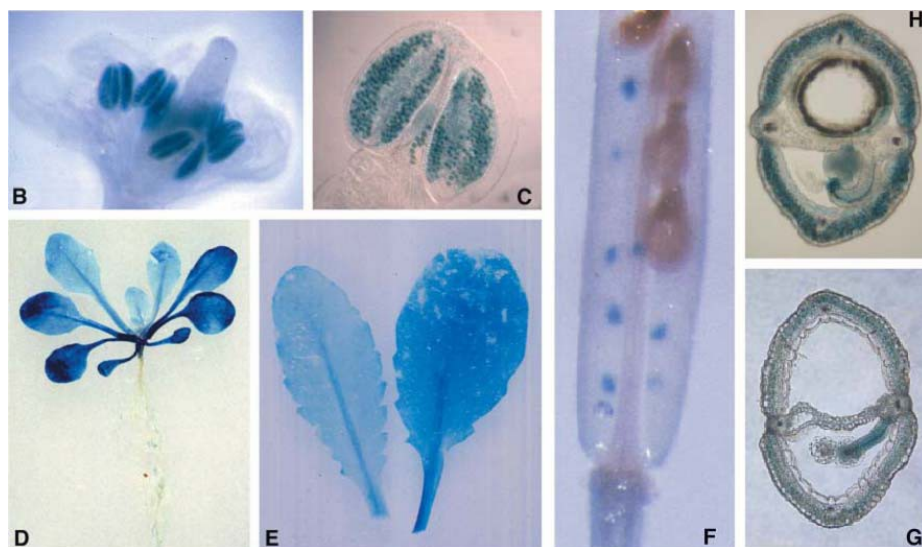


In *Arabidopsis* il pattern di espressione del corrispondente gene, presente in singola copia (Deuschle *et al.*, 2001), è stato analizzato in piante transgeniche trasformate con un costrutto di fusione in cui una β -glucuronidasi è stata posta sotto il controllo del promotore della P5CDH. In normali condizioni di crescita, le piante transgeniche mostrano una bassa espressione costitutiva a livello dei tessuti vegetativi, mentre un'espressione elevata si manifesta solo nel polline. L'espressione costitutiva aumenta con l'età della pianta, indicando un potenziale aumento della richiesta di degradazione della prolina nelle foglie con l'avanzare della senescenza. Nelle siliques, frutti caratteristici delle crocifere, i semi abortivi mostrano una forte espressione del gene reporter, così come le pareti del frutto, i funicoli e gli embrioni in sviluppo (Figura 8). In mutanti privi di questo enzima non si notano differenze fenotipiche rispetto al wild type durante l'emissione del tubetto pollinico e la fuoriuscita dei nuclei germinativi, a indicare che la prolina non è l'unica o la maggiore fonte di energia nel corso della germinazione del polline. Al contrario, la ridotta capacità germinativa dei semi dei mutanti suggerisce che il catabolismo dell'aminoacido giochi un ruolo chiave in questo importante processo fisiologico (Deuschle *et al.*, 2004).

Anche in *E. coli* e negli enterobatteri l'ossidazione della prolina procede mediante gli stessi passaggi, ma entrambe le attività enzimatiche sono presenti su una unica proteina bifunzionale, definita prolina ossidasi (Ling, 1994).

Figura 8. Pattern di espressione di *AtP5CDH*

L'attività galatturonidasi indica una maggiore espressione del gene in polline in sviluppo (B) e maturo (C), in cotiledoni e foglie senescenti (D,E), in una siliqua con semi abortivi (F). Sezione longitudinale di siliqua mostrante l'espressione nei funicoli e nella parete (G,H) (da Deuschle *et al.*, 2004).



Il trasporto della prolina

Il trasporto degli aminoacidi è regolato non solo da segnali endogeni, ma anche da segnali ambientali. La carenza idrica legata alla siccità o alla salinità influenza il trasporto a lunga distanza e risulta in un cambio radicale nella distribuzione di azoto e carbonio nella pianta. Generalmente i meristemi, i tessuti in via di sviluppo e gli organi riproduttivi importano aminoacidi al fine di supportare la crescita e lo sviluppo (Kavi Kishor *et al.*, 2005).

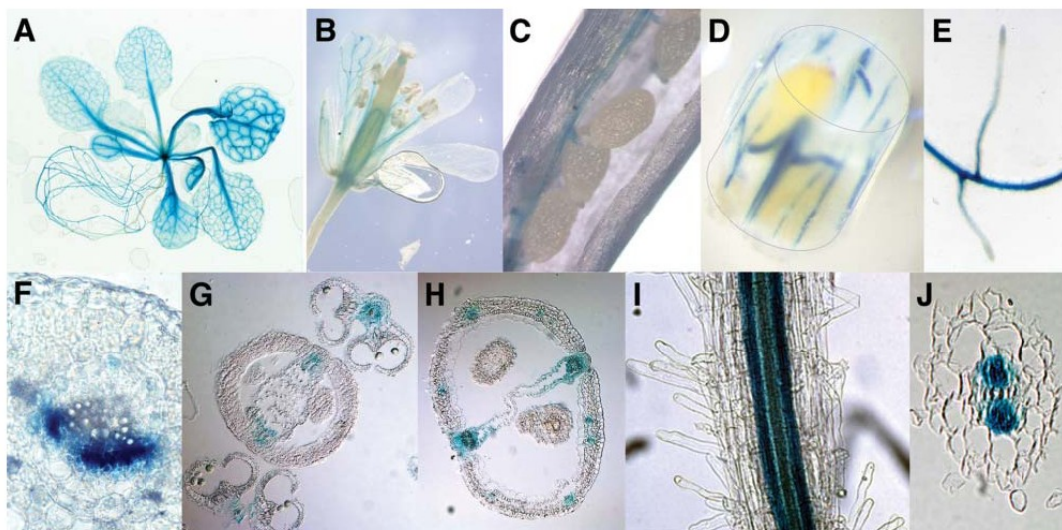
L'aggiunta di prolina esogena a calli di riso sottoposti a stress osmotico ne aumenta la crescita *in vitro* (Kavi Kishor, 1989), suggerendo l'esistenza di trasportatori. Se il metabolismo della prolina nei vegetali è ben caratterizzato, almeno per quanto riguarda la biosintesi, poco si sa sul suo *uptake* e sul suo trasporto all'interno della pianta. Diverse evidenze suggeriscono però che il suo trasporto sia decisivo nel determinare l'adattamento a certe condizioni (Girousse *et al.*, 1996). In *Arabidopsis* sono stati clonati e caratterizzati otto diversi trasportatori per gli aminoacidi e tre di questi codificano per trasportatori specifici della prolina (AtProT1, AtProT2; Rentsch *et al.*, 1996; AtProT3; Grallath *et al.*, 2005). Il trasporto della prolina è importante non solo per l'accumulo mediato da condizioni di stress ma anche durante il normale sviluppo della pianta. L'accumulo di prolina negli acini di uva e nel polline in maturazione avviene indipendentemente dalla regolazione degli enzimi chiave del suo metabolismo. Questo suggerisce che in certi tessuti il trasporto sia più determinante della sintesi *de novo* (Fujita *et al.*, 1998; Stines *et al.*, 1999). Il fatto che alcune mutazioni per la biosintesi di prolina possano essere revertite dalla somministrazione esogena dell'aminoacido è ulteriore indicazione della esistenza di trasportatori (Nanjo *et al.*, 1999).

Negli ultimi anni, diversi geni codificanti per trasportatori della prolina sono stati clonati anche in altre specie, tra cui pomodoro (*Lycopersicon esculentum*; LeProT1–3; Schwacke *et al.*,

1999), riso (*Oryza sativa*; OsProT; Igarashi *et al.*, 2000), orzo (*Hordeum vulgare*; HvProT; Ueda *et al.*, 2001) e mangrovia (*Avicennia marina*; AmT1-3; Waditee *et al.*, 2002). Contrariamente a quelli di *Arabidopsis*, alcuni di questi possono trasportare anche glicina betaina (Schwacke *et al.*, 1999; Waditee *et al.*, 2002) o acido γ -amminobutirrico (GABA, Breitkreuz *et al.*, 1999). I livelli di espressione di questi trasportatori spesso correlano con condizioni di stress e/o con alte concentrazioni di prolina. Ad esempio i livelli di mRNA per *ProT2* di *Arabidopsis* e dei tre omologhi in mangrovia (*AmT1-3*) aumentano in condizioni di stress idrico così come la concentrazione di prolina e di glicina betaina (Waditee *et al.*, 2002). Anche l'espressione del trasportatore di Orzo (HvProT) aumenta in risposta a stress osmo-salino (Ueda *et al.*, 2001), ma in questa specie il trasportatore è estremamente selettivo e trasporta solo prolina. Invece in pomodoro l'espressione di LeProT1 dipende dai livelli di prolina ed è confinata esclusivamente al polline. Al contrario AtProT1 e l'omologo in riso (OsProT) non mostrano alcuna regolazione in risposta allo stress (Rentsch *et al.*, 1996; Igarashi *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* le tre isoforme sono espresse differenzialmente nei tessuti (Figure 9, 10 e 11), indicando una diversa funzione.

Figura 9. Localizzazione dell'espressione di AtProT1

La localizzazione dell'attività di GUS posto sotto il promotore di *AtProT1* in: (A) Piantine, (B) fiori, (C e D) silique e (E) radici. Le sezioni (F) di foglie, (G) fiori, (H) silique mostrano una chiara localizzazione a livello del sistema vascolare. La stessa localizzazione è visibile in (I) radici intere e (J) sezione di radice (Grallath *et al.*, 2005).



AtProT3 è espresso nei fiori, e con più bassi livelli in foglie e fusto, mentre non è rilevabile nelle radici. *AtProT2*, invece, è espresso costitutivamente in condizioni normali solo nei tessuti radicali. *AtProT1* è quello più abbondante e si ritrova in tutti i tessuti vascolari, cosa che suggerisce un ruolo nel trasporto a lunga distanza nella pianta (Rentsch *et al.*, 1996, Grallath *et al.*, 2005). *AtProT2*, che è regolato da condizioni di carenza idrica (Rentsch *et al.*, 1996), possiede nel promotore delle sequenze ABRE (ABA-responsive element), ma la somministrazione di ABA non causa un aumento della proteina. Viene invece espresso in risposta a stress meccanico, e tale induzione è più alta se a questo si aggiunge lo stress salino,

che però da solo sembra non essere in grado di provocare l'induzione (Grallath *et al.*, 2005).

Figura 10. Localizzazione dell'espressione di *AtProT2*.

La localizzazione dell'attività di GUS posto sotto il promotore di *AtProT2* in (A e B) piantine di due settimane cresciute in condizioni axeniche evidenzia una localizzazione dell'attività glucucosinasi a livello radicale e (B) delle stipule. La colorazione delle radici (C) rivela una localizzazione su tutta la radice incluse le radici laterali. (D) Sezione di radice. (E) differenza di induzione in foglie cui è stata praticata una ferita in presenza o in assenza di 200 mM NaCl (Grallath *et al.*, 2005).

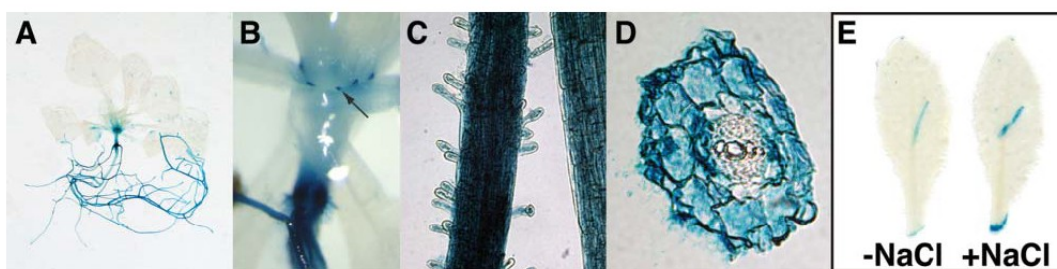
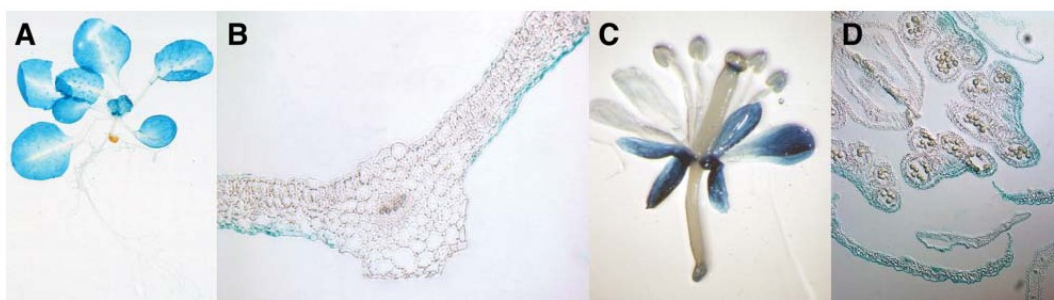


Figura 11. Localizzazione dell'espressione di *AtProT3*.

Localizzazione dell'attività di GUS posto sotto il promotore di *AtProT3* (A) a livello foliare in piantine di due settimane, (C) una sezione rivela la presenza di attività nelle cellule dell'epidermide. (D) anche nei fiori maturi tale attività è presente. (F) Sezione di un fiore (Grallath *et al.*, 2005).

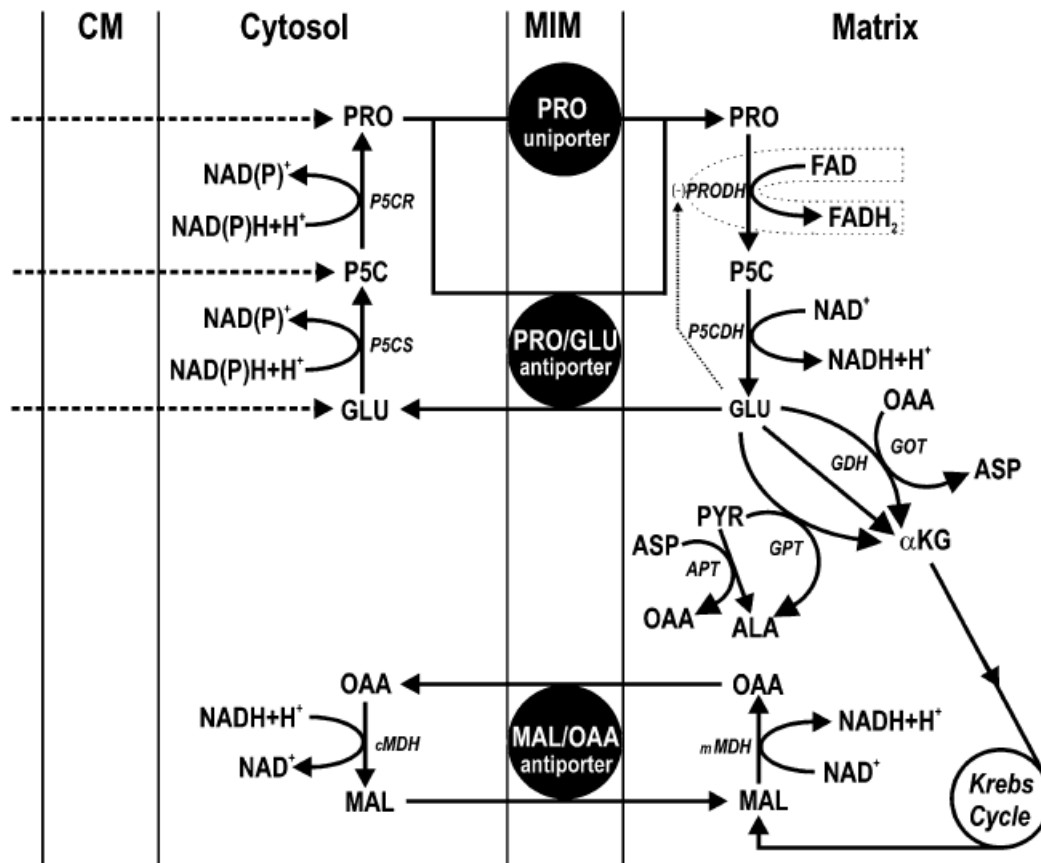


La prolina viene sintetizzata e accumulata nel citosol e nei cloroplasti, mentre la sua degradazione è localizzata esclusivamente nei mitocondri. Questo implica l'esistenza di trasportatori localizzati a livello degli organelli. Nella sequenza dei geni *AtPro* sembra essere assente il peptide di transito (Schwacke *et al.*, 2003). La loro localizzazione negli organelli, tuttavia, non può essere esclusa. Infatti non tutte le proteine sono trasportate con un meccanismo dipendente dalla presenza di un peptide di transito (Miras *et al.*, 2002). In effetti l'esistenza di due carriers responsabili del trasporto mitocondriale di prolina è stata descritta recentemente in mitocondri isolati di grano (Di Martino *et al.*, 2006). In questa specie il trasporto sembra essere mediato da un carrier specifico per la prolina e da un antiporto prolina/glutamato. L'ipotesi fatta dagli autori, e schematizzata in Figura 12, prevede che la prolina entri nel mitocondrio inizialmente grazie all'azione del suo trasportatore specifico; nel mitocondrio la prolina viene ossidata a glutamato, che può essere quindi esportato in cambio di ulteriore prolina grazie all'intervento dell'antiporto (Di Martino *et al.*, 2006). L'esistenza di questi trasportatori avvalorava l'idea che il metabolismo della prolina e la separazione spaziale di

catabolismo e biosintesi costituisca una sorta di sistema *shuttle* per il potenziale redox tra i compartimenti cellulari. I geni codificanti per questi due trasportatori non sono stati sin qui identificati, ma la dimostrazione della loro esistenza restituisce ai fenomeni di trasporto un ruolo importante nella regolazione del suo accumulo anche all'interno della cellula.

Figura 12. Trasporto della prolina in mitocondri di grano

Un trasportatore specifico trasporta prolina dal citosol al mitocondrio, dove la prolina viene ossidata a glutamato. Un antiporto glutamato/prolina esporta il prodotto di ossidazione e concorre ad alimentare la via catabolica importando altra prolina (da Di Martino *et al.*, 2005).



Regolazione del metabolismo della prolina in *Arabidopsis thaliana*

La maggior parte degli studi sono stati sin qui condotti utilizzando *A. thaliana* come pianta modello. Questa è stata la prima specie vegetale il cui genoma, di piccole dimensioni, è stato interamente sequenziato, rendendo disponibili e facilmente reperibili una vastità di dati biochimici e molecolari. Il fatto che la pianta abbia un ciclo di vita molto rapido insieme alle ridotte dimensioni e alla facilità con cui si può coltivare e trasformare la rendono ideale per gli studi genetici. Inoltre *Arabidopsis* accumula prolina in risposta allo stress osmotico (Verbruggen *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1997).

In *A. thaliana* ci sono due isoforme della P5CS che rivestono ruoli specifici nel controllo della biosintesi di prolina (Fabro *et al.*, 2004; Székely *et al.*, 2008). Anche in altre specie vegetali questo enzima è codificato da due geni a localizzazione nucleare che si ritiene non

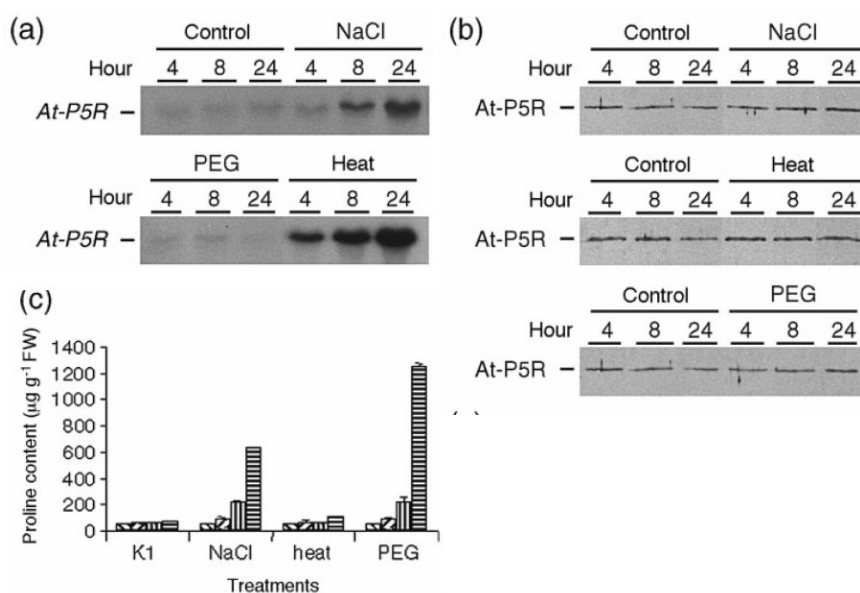
siano ridondanti funzionalmente (Ginzberg *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1998). La P5CS rappresenta l'enzima limitante la biosintesi di prolina ed è controllato sia a livello trascrizionale che allosterico mediante inibizione a feed-back (Savouré *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Questo appare però in contrasto con l'accumulo dell'iminoacido in condizioni di stress osmotico, quando la sua concentrazione citosolica può superare 130 mM, un livello a cui la P5CS è completamente inibita. Per spiegare questo apparente paradosso è stato suggerito che le condizioni di stress osmotico possano indurre dei cambiamenti conformazionali della P5CS tali da rendere l'enzima meno sensibile all'inibizione a feedback da parte del prodotto finale (Hong *et al.*, 2000). Per quanto riguarda le due isoforme, si ritiene che la P5CS1, ma non la P5CS2, sia necessaria per l'accumulo di prolina indotto da stress (Fabro *et al.*, 2004; Székely *et al.*, 2008). Durante lo stress osmotico e quello salino intervengono diverse vie di segnale che sono responsabili dell'attivazione della P5CS1. Ad esempio la via che coinvolge la fosfolipasi C agisce sull'espressione della *AtP5CS1* durante lo stress salino ma non durante la disidratazione (Parre *et al.*, 2007). L'ABA e lo stress salino attivano la trascrizione di *AtP5CS1* grazie alla presenza su questo gene di ABREs (Strizhov *et al.*, 1997; Savouré *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 2003). Il ruolo dell'ABA nel determinare l'accumulo di prolina è stato ben investigato da Verslues e Bray (2006). Questi autori avvalendosi di mutanti nella biosintesi e nella percezione dell'ABA hanno potuto evidenziare non solo la dipendenza dell'accumulo di prolina dai livelli di ABA ma che questa dipende anche dalla sensibilità o dalla capacità delle piante di rispondere a questo ormone. Risultati successivi supportano l'idea che l'H₂O₂ sia parte integrante del segnale e delle risposte regolate dall'ABA (Verslues *et al.*, 2007).

Recentemente la non ridondanza delle due forme di *AtP5CS* è stata avvalorata a sottolineare l'importanza di una compartimentalizzazione del metabolismo della prolina. Infatti a seconda degli organi, della fase di sviluppo e delle condizioni di crescita, costrutti GUS fusi con *P5CS1* e *P5CS2* mostrano una differente localizzazione cellulare ritrovandosi in plastidi, vescicole o citosol. Nelle cellule del mesofillo di foglie mature sia lo stress osmotico che quello salino inducono inoltre una rilocalizzazione della P5CS1 nel cloroplasto, mentre la distribuzione del pool di P5CS2 nel citosol e nel cloroplasto non cambia (Székely *et al.*, 2008).

Durante lo stress i livelli della P5CS, ma non della P5CR, aumentano e correlano con l'accumulo di prolina (Savouré *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995). La P5CR infatti sembra subire una regolazione non convenzionale che rende non lineare la relazione tra quantità di trascritto e quantità di proteina in condizioni di stress (Figura 13). Ad esempio, durante uno stress termico si assiste ad un aumento della trascrizione del gene che però non correla con i livelli di proteina e di prolina, che invece restano bassi (Hua *et al.*, 2001). *AtP5CR* subisce una regolazione post-trascrizionale che dipende da una regione 5' UTR non codificante ma localizzata sull'mRNA (Hua *et al.*, 2001), che sembra da una parte conferire una maggiore stabilità al messaggero ma dall'altra ostacola l'attacco dei ribosomi impedendo la traduzione (Hua *et al.*, 2001).

Figura 13. Livelli di trascrizione di *At-P5CR* e rispettivi livelli di proteina e di prolina libera in piante sottoposte a stress salino (1% NaCl), termico (35°C) e osmotico (20% PEG)

(A) Northern blot per *At-P5CR*. (B) Western blot contro *At-P5CR*. (C) livelli di prolina libera nei vari trattamenti a 0-4-8 e 24 h dall'imposizione dello stress (da Hua *et al.*, 2001).



Durante lo stress osmotico la disponibilità di CO_2 decresce a causa della chiusura degli stomi e questo comporta una riduzione dell'attività del ciclo di Calvin con conseguente diminuzione del consumo di NADPH. L'attività della P5CS nel cloroplasto può in qualche modo tamponare questo fenomeno, consumando NADPH e ripristinando NADP^+ . Questo consente una riduzione della produzione di ROS a livello del fotosistema I. Anche la G6PDH, enzima limitante del PPP, richiede NADP^+ ed è inibito dal NADPH. Nel 1985, Phang propose un modello in cui l'interconversione di prolina/P5C potesse modulare di riflesso lo stato redox della cellula mantenendo un corretto rapporto $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Ad avvalorare tale modello vi è l'evidenza che il PPP è localizzato nel citosol e nei cloroplasti, cioè i due compartimenti cellulari in cui può avvenire la sintesi di prolina. Il modello di Phang è stato successivamente applicato da Kohl *et al.* (1988, 1990) ai noduli radicali di patata, in cui si assiste alla fissazione dell'azoto e a un accumulo di prolina. Nei noduli l'accumulo di prolina avviene come conseguenza di un aumentata sintesi che mantiene alto il rapporto $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Tale rapporto, secondo Phang, comporta un aumento del PPP che supporta, tra l'altro, la biosintesi di purine. In effetti derivati delle purine possono fungere da molecole di trasporto dell'azoto fissato. Inoltre sembra che anche la stessa prolina funga da molecola di trasporto, contribuendo al trasferimento di potenziale redox dalla cellula vegetale ai batteroidi. Infatti in quest'ultimi si verifica un forte aumento della trascrizione della *ProDH* (Kohl *et al.*, 1988; Hare & Cress, 1997).

Il catabolismo della prolina ed in particolare modo l'espressione di *ProDH*, invece, è regolato positivamente dalla prolina (Verbruggen *et al.*, 1996). A fronte dell'aumentata sintesi in condizioni di stress iperosmotico, ci si aspetterebbe quindi un aumento della via catabolica, che finirebbe per innescare un ciclo futile. Ciò però non avviene se non al ripristino di condizioni

permissive, suggerendo un meccanismo di repressione della via mediato dalle condizioni di stress. D'altra parte in mutanti *knockout* o antisenso per *ProDH* non si assiste ad un incremento significativo dei livelli citosolici dell'iminoacido in condizioni permissive, mentre in condizioni di stress si rilevano livelli significativamente più alti che nel *wild type* (Mani *et al.*, 2002). In mutanti privi di una P5CDH funzionale ci si aspetterebbe un effetto simile, in quanto l'interruzione della via catabolica dovrebbe arrestare il procedere della reazione di ossidazione della prolina. Inaspettatamente, in mutanti *p5cdh* non si è osservato un incremento dell'osmolita in risposta a condizioni di stress salino, ad indicare l'esistenza di un probabile meccanismo a feedback a carico del primo enzima. L'ipotesi formulata per spiegare questo risultato è che la degradazione e la sintesi dell'intermedio P5C/GSA funga da segnale limitante la biosintesi della prolina. Deve dunque esistere un trasportatore specifico che ne consenta la diffusione, o deve essere generato un segnale che possa essere trasdotto e percepito dall'interno dei mitocondri al citosol (Deuschle *et al.*, 2004). Un'ulteriore indicazione del fatto che il P5C possa essere coinvolto in un meccanismo di trasduzione del segnale viene dal pattern di espressione dei mutanti *p5cdh*. Esiste infatti una differenza di soli 4 geni espressi nei mutanti non trattati e repressi nei wild-type trattati con prolina esogena, contro i 111 espressi in entrambi i casi. Mentre su un totale di 309 geni repressi, solo 67 sono repressi nei mutanti ed espressi nel wild-type (Deuschle *et al.*, 2004). Diventa quindi plausibile pensare ad un meccanismo di comunicazione tra la via biosintetica e quella catabolica che utilizzi il P5C come segnale.

Anche se si ritiene che i livelli di prolina dipendano principalmente dalla regolazione dei geni *P5CS* e *ProDH*, sembra che anche la regolazione di *P5CDH* rivesta un ruolo importante. Questo gene in *Arabidopsis* è parzialmente sovrapposto con un altro gene, sull'elica complementare, chiamato *SRO5*. La funzione di questo gene non è nota, ma si è visto che in risposta allo stress salino, ma non osmotico, la sua trascrizione è indotta. Come conseguenza dell'induzione di *SRO5* si assiste alla formazione di dsRNA con il trascritto di *P5CDH*. L'RNA a doppia elica formatosi viene quindi rapidamente processato, dalla sua degradazione si formano dei piccoli RNA denominati "natural silencing RNA" che a loro volta bloccano la trascrizione di *P5CDH* e potrebbero regolare altri geni (Borsani *et al.*, 2005). Questo contribuisce all'accumulo di prolina, ma anche ad un aumento di ROS. Gli autori propongono, in via del tutto speculativa, che la proteina *SRO5* sia in grado in qualche modo di ridurre la produzione di ROS.

Diversi studi condotti prevalentemente sulla trascrizione dei geni biosintetici della prolina suggeriscono una regolazione dipendente dalle fasi di sviluppo. Dal momento che esiste un trasporto attivo di prolina, si ritiene che questo aminoacido serva anche al trasferimento di azoto, carbonio e potenziale redox tra vari organi, come ad esempio dal fiore ai semi. In effetti durante lo sviluppo di *A. thaliana* e in assenza di stress, i livelli di prolina libera cambiano da organo ad organo indipendentemente dal pool di aminoacidi. I livelli più alti si ritrovano nei fiori, in particolare nei granuli pollinici, e nei semi, mentre nelle radici il livello di prolina è decisamente più basso. La quantità di aminoacido libero sembra anche correlare con l'età della pianta e delle foglie (Verbruggen *et al.*, 1993; Chiang & Dandekar 1995). Per *P5CS* e *P5CR* in condizioni fisiologiche i livelli di mRNA e di proteina correlano con i livelli di prolina, fatta

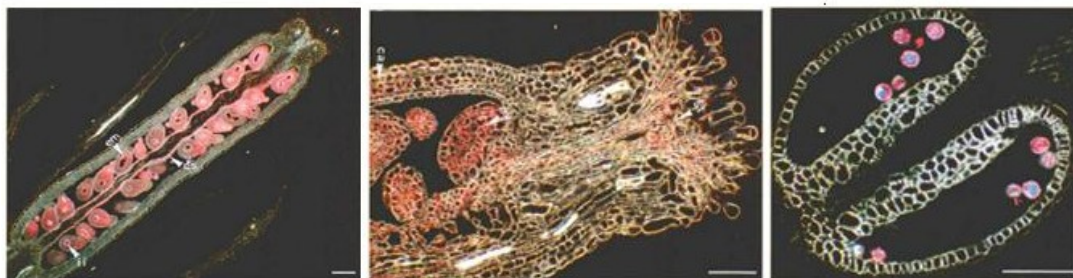
eccezione per le radici. L'apparente discrepanza in quest'ultimo caso può essere dovuta ad un trasporto dell'aminoacido dalle radici a altri organi (Mattioli *et al.*, 2009a).

Per quanto riguarda la P5CR, a fronte di un solo gene codificante l'enzima sembra attivo in cloroplasti e citosol (Rayapati *et al.*, 1989; Szoke *et al.*, 1992; Verbruggen *et al.*, 1993). Un'analisi basata un gene reporter posto sotto il controllo del promotore di *AtP5CR* ha rivelato un'alta espressione nei meristemi apicali e radicali, così come nelle foglie giovani e nei primordi radicali. Nelle foglie giovani l'espressione di *P5CR* è diffusa su tutta la superficie mentre nelle foglie più vecchie è ristretta alle venature, alle cellule di guardia e alla base dei tricomi (Hua *et al.*, 1997). Nelle piante in fioritura alti livelli di *AtP5CR* si ritrovano nelle cellule in rapida divisione come i meristemi radicali e nelle cellule o tessuti che vanno incontro a cambiamenti nel potenziale idrico come idatodi, cellule di guardia, ovuli, semi e granuli pollinici in formazione (Figura 14; Hua *et al.*, 1997).

Anche la degradazione della prolina è regolata durante le normali fasi di sviluppo della pianta, ma con un pattern diverso che nelle condizioni di stress. In *A. thaliana* normalmente l'espressione di *ProDH* è bassa ad eccezione che nei fiori e nelle silique in formazione, organi che però contengono anche livelli di prolina più alti che radici e foglie. In effetti si sa che la somministrazione esogena di prolina comporta una induzione di *ProDH*. Infatti sia i livelli di trascritto che di proteina decrescono durante lo stress per poi tornare a crescere nella fase di recupero dallo stress (Kiyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996).

Figura 14. Localizzazione dell'attività glucuronidasi in piante di *Arabidopsis* in piena fioritura trasformate con il gene GUS posto sotto il controllo del promotore di *AtP5CR*.

Partendo da sinistra: sezione longitudinale di una silique matura, di una gemma florale e antere e granuli di polline (da Hua *et al.*, 1997).



Coinvolgimento della prolina nella fase riproduttiva

Sin dagli anni '80 numerose pubblicazioni hanno riportato un accumulo di prolina in organi riproduttivi di diverse specie vegetali. Questo lascia pensare che il ruolo di questo aminoacido in forma libera non sia solo legato alla risposta allo stress, ma che il suo accumulo possa essere implicato anche nei processi di sviluppo e differenziamento (Mattioli *et al.*, 2009a). In tessuti riproduttivi di *Arabidopsis* come polline, silique e semi, questo aminoacido può arrivare a costituire il 26% del pool totale di aminoacidi liberi, mentre nei tessuti vegetativi il suo contenuto si attesta attorno all' 1-3% (Chiang & Dandekar, 1995). Molto più spiccato è l'accumulo nei fiori di pomodoro, dove il contenuto in prolina è 60 volte più alto degli altri organi (Schwake *et al.*, 1999). Si ritiene quindi che la prolina nei tessuti riproduttivi non svolga semplicemente un ruolo a supporto della sintesi proteica.

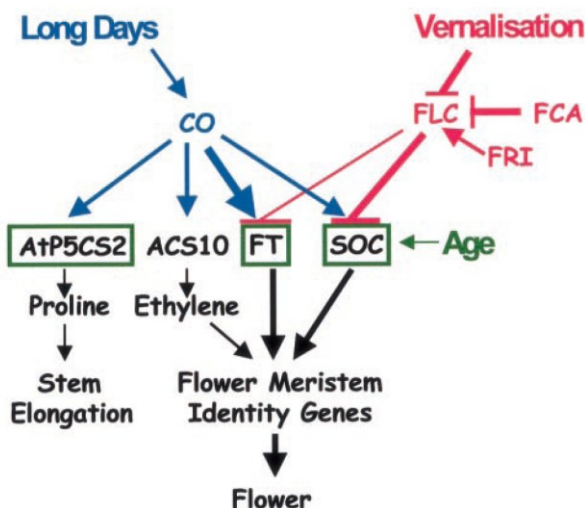
A livello molecolare questo accumulo sembra dovuto principalmente a una induzione della biosintesi, specialmente della *P5CS*, e ad un suo trasporto attivo mediato da trasportatori specifici (Schwake *et al.*, 1999; Rentsch *et al.*, 1996). Per quanto riguarda il catabolismo, esistono delle sostanziali differenze tra tessuti che accumulano prolina in risposta ad uno stress e tessuti che accumulano l'aminoacido in condizioni normali. Nel primo caso, infatti, *ProDH* e *P5CDH*, vengono repressi (Nakashima *et al.*, 1998; Borsani *et al.*, 2005), mentre nel secondo non sono rari gli esempi di induzione della via catabolica (Kiyosue *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1998; Deuschle *et al.*, 2001).

Se è comunemente accettato che un accumulo di prolina possa essere in relazione con la fisiologia del differenziamento e dello sviluppo, non è altrettanto chiaro quali siano le sue reali funzioni e implicazioni. Una spiegazione ovvia potrebbe risiedere nella capacità della prolina di proteggere quei tessuti che vanno in contro ad una disidratazione naturale come conseguenza della loro maturazione. Analogamente a quanto avviene nello stress osmotico causato da fattori ambientali, il processo di disidratazione che ha luogo in alcuni tessuti riproduttivi potrebbe seriamente compromettere la vitalità delle cellule. La prolina verrebbe dunque accumulata, anche in questi casi, per contrastare la perdita d'acqua. La correlazione tra contenuto idrico di un tessuto e accumulo di prolina, però, non è così stretta e lascia spazio a obiezioni (Mattioli *et al.*, 2009a). Una funzione alternativa potrebbe essere legata alle richieste energetiche di questi tessuti. Dalla riossidazione dell'aminoacido essi potrebbero ricavare energia e azoto. In modo analogo la prolina è utilizzata ad esempio per sopperire alla elevata richiesta di energia durante la prima fase di volo degli insetti (Mani *et al.*, 2002; Micheu *et al.*, 2000).

Ulteriori prove a supporto di un possibile ruolo della prolina e del suo metabolismo nella fase riproduttiva della pianta viene dall'analisi di alcuni mutanti di *Arabidopsis* con alterata sintesi di prolina. L'espressione di un costrutto antisense per *P5CS1* causa una riduzione del contenuto in prolina e parallelamente si osserva una riduzione della fase di crescita rapida dello stelo florale che tipicamente avviene, in molte specie vegetali, immediatamente dopo la transizione florale. Tali mutanti antisense mostrano alterazioni anche a livello foliare e nel portamento (Nanjo *et al.*, 1999). Il possibile *cross-talk* tra metabolismo della prolina e fioritura diventa ancora più evidente alla luce di uno screening eseguito per identificare i primi bersagli di

un fattore di trascrizione chiamato CONSTANS (CO), considerato il maggior promotore della fioritura indotta da fotoperiodo. È infatti emerso che *P5CS2* rientra tra i quattro geni indotti in fase precoce da tale fattore di trascrizione (Samach *et al.*, 2000; Figura 15).

Figura 15. Convergenza delle vie che promuovono la fioritura



In seguito all'esposizione ad un fotoperiodo lungo il rilascio del fattore di trascrizione CO promuove la fioritura in *Arabidopsis*. In blu sono evidenziati i processi direttamente associati al fotoperiodo. CO può direttamente agire sull'espressione di *FT*, *SOC1*, *ACS10* e *AtP5CS2*. *FT* e *SOC1* promuovono la transizione fiorale. *ACS10* codifica per una proteina coinvolta nella biosintesi di etilene, *AtP5CS2* è responsabile del primo step biosintetico della prolina. *FT*, *SOC1* e *AtP5CS2* aumentano anche con l'età indipendentemente da CO (riquadri verdi) (da Samach *et al.*, 2000).

Oltre al coinvolgimento nell'allungamento rapido dello stelo, la prolina è stata associata anche ad altri processi di rapida crescita, come l'allungamento del tubo pollinico (Schwacke *et al.*, 1999; Bathurst *et al.*, 1954; Zhang *et al.*, 1982) e delle radici avventizie nelle dicotiledoni infettate da *Agrobacterium rhizogenes* (White *et al.*, 1985; Trovato *et al.*, 2001) o della radice primaria in piante di mais esposte a un basso potenziale idrico (Voetberg *et al.*, 1991; Verslues *et al.*, 1999; Spollen *et al.*, 2008).

La possibilità che la fioritura possa essere influenzata dalla presenza di prolina è una ipotesi supportata ancora da poche evidenze sperimentali, anche se è stata proposta per diverse specie vegetali come kiwi (Walton *et al.*, 1991), tabacco (Trovato *et al.*, 2001; Kavi Kishor *et al.*, 1995; Mauro *et al.*, 1996), pomodoro (Bettini *et al.*, 2003) e *Vigna aconitifolia* (Saxena *et al.*, 2008). Tuttavia anche se esiste un cross-talk fra condizioni di stress e fioritura, una correlazione positiva tra stress e induzione della fioritura è stata dimostrata solo per stress che coinvolgono la via dell'acido salicilico come nelle infezioni patogene e stress da UV-C (Martinez *et al.*, 2004) o negli stress termici moderati su piante poste in condizioni di short-day (Balasubramanian *et al.*, 2006). Al contrario stress salino e somministrazione di ABA, che notoriamente causano un netto accumulo di prolina, sembrano ritardare la transizione fiorale (Razem *et al.*, 2006).

In piante di *Arabidopsis* overesprimenti *P5CS1* si osserva una fioritura precoce sia in short che in long day, mentre linee *knock-out* per lo stesso gene hanno un ridotto contenuto in prolina e un ritardo nella fioritura (Mattioli *et al.*, 2008). Generalmente si ritiene che *P5CS1* e *P5CS2* non abbiano funzioni ridondanti, ma nel caso della fioritura sembra che esse svolgano lo stesso ruolo. Infatti nei doppi mutanti si osserva un effetto cumulativo della mutazione sul

ritardo nella fioritura (Mattioli *et al.*, 2009 b). Recentemente mutanti *knock-out* per la *P5CS1* hanno mostrato livelli più bassi di prolina in condizioni di stress, accumulano ROS e sono risultati ipersensibili allo stress salino. La perdita di *P5CS2* causa invece un aborto embrionale nella tarda fase di sviluppo del seme, suggerendo un coinvolgimento di questa isoforma e quindi della prolina nello sviluppo dell'embrione (Mattioli *et al.*, 2009b; Székely *et al.*, 2008).

Sembra quindi che la prolina intervenga anche nello sviluppo embrionale. In effetti Mattioli e collaboratori (2009b) hanno confermato che la letalità embrionale è legata alla mancanza di *P5CS2* osservando anche alterazioni dei piani di divisione cellulare negli embrioni aberranti. Gli stessi autori hanno potuto constatare che la somministrazione esogena di prolina è in grado di accelerare la crescita degli organi e la formazione dei meristemi, e di stimolare l'espressione di *CYB1*, una importante proteina correlata alla regolazione del ciclo cellulare. Ciò suggerisce un coinvolgimento della prolina o del suo metabolismo nella divisione cellulare, in coerenza con l'effetto stimolante sui meristemi e sulla transizione fiorale. Sembra dunque plausibile credere che questo aminoacido possa fungere da substrato metabolico per sostenere la richiesta delle cellule in rapida divisione, e allo stesso tempo fungere da molecola segnale in grado di regolare vari processi fisiologici.

La prolina nel nettare in relazione agli insetti impollinatori

Anche se a concentrazioni molto inferiori a quelle degli zuccheri, gli aminoacidi sono presenti nel nettare delle angiosperme. Il significato biologico di questa presenza non è stato completamente chiarito, e ancora oggi è oggetto di dibattito nella comunità scientifica. Alcuni autori hanno evidenziato come piante impollinate dagli insetti contengano una maggiore concentrazione di aminoacidi rispetto a quelli che sfruttano gli uccelli come impollinatori (Gardener & Gillman, 2001). Si ritiene che la quantità e la qualità dell'alimentazione possa influenzare fortemente la longevità e la fecondità degli insetti. In particolare si sa che le femmine adulte di farfalla trasferiscono gli aminoacidi assunti dall'alimentazione direttamente alle uova e che preferiscono pollini artificiali ricchi in aminoacidi rispetto a quelli che ne sono privi. Tale comportamento non è riscontrabile nei maschi (Mevi-Schutz & Erhardt, 2005).

Tra gli aminoacidi che si ritrovano comunemente nel nettare, la prolina ha una caratteristica unica: gli insetti sono in grado di riconoscerne il gusto (Carter *et al.*, 2006). I livelli di prolina nel polline possono raggiungere il 70% degli aminoacidi totali grazie all'espressione di trasportatori specifici per questo aminoacido (Schwacke *et al.*, 1999). Anche in alcuni nettari si riscontrano alti livelli di prolina. In piante di tabacco può essere accumulata fino a raggiungere concentrazioni intorno ai 2 mM e rappresentare il 45-60% di quelli totali (Carter *et al.*, 2006). Sia le api che le farfalle preferiscono soluzioni zuccherine arricchite con prolina rispetto a quelle in cui l'aminoacido è stato omesso. Tra le dosi di prolina testate sembra che quelle comprese tra 2 e 6 mM, quindi le più vicine alle concentrazioni fisiologiche, siano le più appetibili (Carter *et al.*, 2006).

La prolina è particolarmente importante per gli insetti, tanto da essere il più abbondante aminoacido nell'emolinfa di molte specie, api comprese. Non è stato ancora chiarito se anche

altri aminoacidi possano fungere da attrattori, ma la prolina e l'idrossiprolina sembrano essere gli unici tra gli aminoacidi naturali capaci di stimolare i chemorecettori nei chemosensilli labellari di alcuni insetti (Hansen *et al.* 1998; Wacht *et al.*, 2000). Diversi studi suggeriscono che una ampia gamma di insetti è in grado di usare la prolina come substrato energetico per i muscoli del volo. La mosca tse-tse (*Glossina morsitans*), *Drosophila*, la dorifora della patata (*Leptinotarsa decemlineata*), il coleottero giapponese (*Popillia japonica*), *Pachnoda sinuata* e *Decapotoma lunata* sono solo alcuni degli insetti che possono usare questo aminoacido durante il volo. Anche l'*Apis mellifera carnica* è in grado di "bruciare prolina" (Scaraffia & Wells, 2003). Si ritiene che questo aminoacido venga consumato nelle fasi di volo intenso o in quelle iniziali di preriscaldamento dei muscoli (Auerswald *et al.*, 1998; Micheu *et al.*, 2000; Gade & Auerswald, 2002). In individui tenuti a digiuno per 14 giorni, quando i carboidrati nell'emolinfa e nei muscoli del volo sono completamente esauriti, la prolina può essere usata come unica fonte energetica. Questo aminoacido, inoltre, è soggetto a fluttuazioni circadiane con un massimo nelle ore mattutine. Queste fluttuazioni sono sotto il controllo di un neuropeptide ormonale (AKH). Negli insetti esistono diversi tipi di questi peptidi che si è visto poter regolare alternativamente una via piuttosto che un'altra. Infatti durante le fluttuazioni circadiane di prolina nell'emolinfa non si assiste ad un cambiamento dei livelli di carboidrati e nonostante ciò gli insetti usano l'aminoacido come substrato energetico (Gade & Auerswald, 2002). La funzione della prolina nel volo sembra quella di trasportare unità acetile dai corpi grassi ai muscoli. In questo modo l'acetil-CoA, derivante dal metabolismo di acidi grassi, glucosio o aminoacidi, è convertito in α -ketoglutarato nel ciclo dell'acido citrico a livello dei corpi grassi. Quando necessario, l' α -ketoglutarato viene convertito in prolina per essere trasportata ai muscoli. Una volta nei muscoli la prolina viene riconvertita in α -ketoglutarato per entrare nel ciclo dell'acido citrico e produrre ATP (Scaraffia & Wells, 2003).

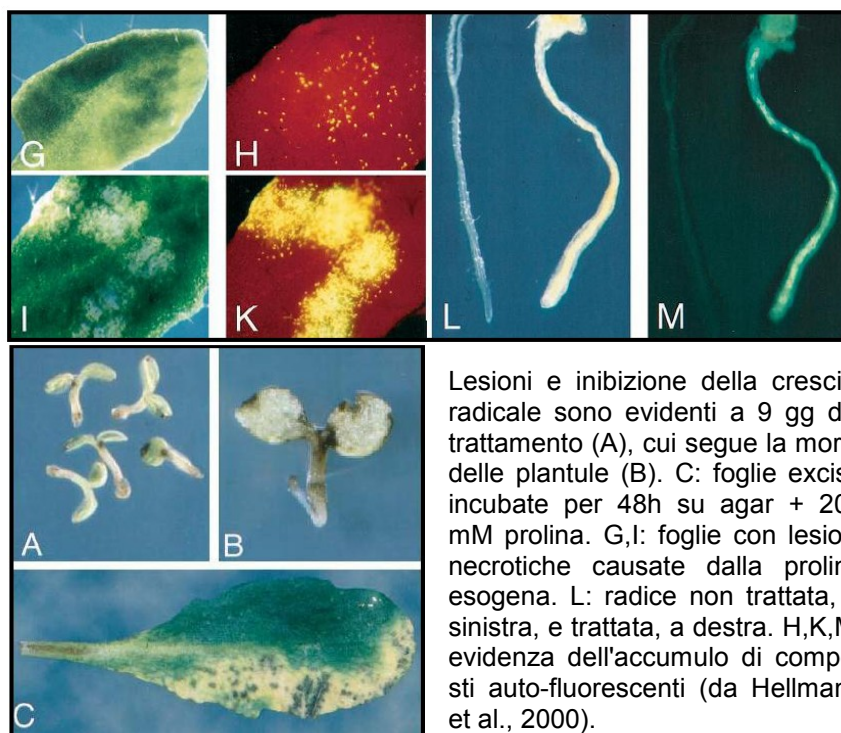
Ad ogni modo per la pianta la produzione di prolina è metabolicamente più onerosa di quella del glucosio. Infatti la prolina contiene azoto, che è un nutriente limitante. L'accumulo di entrambi nel nettare fornisce due tipi di "carburante" agli insetti: la prolina per i voli brevi e il glucosio per quelli più lunghi. La presenza di prolina in alcuni nettari e l'abilità di alcuni insetti di percepirla suggeriscono una relazione evolutiva che mira ad incrementare l'impollinazione delle piante che producono nettare ricco in prolina da parte di insetti che preferiscono il "gusto" di tali nettari (Carter *et al.*, 2006).

Fenomeni di tossicità mediati da prolina

Alcuni autori hanno osservato come l'accumulo di prolina nelle cellule vegetali sottoposte a condizioni di stress sia spesso associato anche ad un aumento del contenuto in zuccheri. Piante transgeniche di tabacco, capaci di accumulare carboidrati solubili perché trasformate con un'invertasi di lievito, hanno mostrato un incremento del contenuto in prolina. Nel tentativo di delucidare questa interrelazione, venne notato che la somministrazione esogena di prolina può risultare tossica per piante di *A. thaliana* (Hellmann *et al.*, 2000). In un mutante (*srs1*) in cui il promotore della patatina era insensibile allo zucchero, il trattamento con

varie combinazioni di prolina e glucosio ha messo in evidenza un effetto tossico dell'iminoacido già alla concentrazione di 15 mM. La tossicità, come mostrato in figura 16, si manifesta con la comparsa di macchie necrotiche nei tessuti delle radici, del gambo e delle foglie, simili a quelle che si formano nel corso della risposta ipersensibile all'attacco patogeno, associata alla produzione di composti fenolici e a un aumento della lignificazione. Tale fenomeno è sembrato del tutto incoerente con l'effetto protettivo solitamente esercitato dalla prolina nei confronti delle cellule. La presenza di sale è risultata d'altra parte inibire l'azione tossica dell'iminoacido. Infatti se le piante venivano fatte crescere in presenza di concentrazioni di NaCl comprese tra 50 e 100 mM le aree necrotiche non comparivano, e anzi la presenza di prolina favoriva la crescita delle piante (Hellmann *et al.*, 2000; Figura 17). Il fatto che la tossicità della prolina venga notevolmente ridotta da condizioni di stress salino, condizione in cui il suo catabolismo è represso, fa pensare che i suoi effetti tossici possano essere legati alla sua degradazione. Somministrando l'intermedio della via, il P5C, anche a concentrazioni molto basse, venne osservata entro pochi giorni la comparsa di aree necrotiche, con i primi sintomi evidenti già poche ore dopo il trasferimento in un mezzo contenente il metabolita. Questi risultati vennero interpretati come una forte indicazione del fatto che l'effettore della morte cellulare indotta da prolina fosse il P5C (Hellmann *et al.*, 2000).

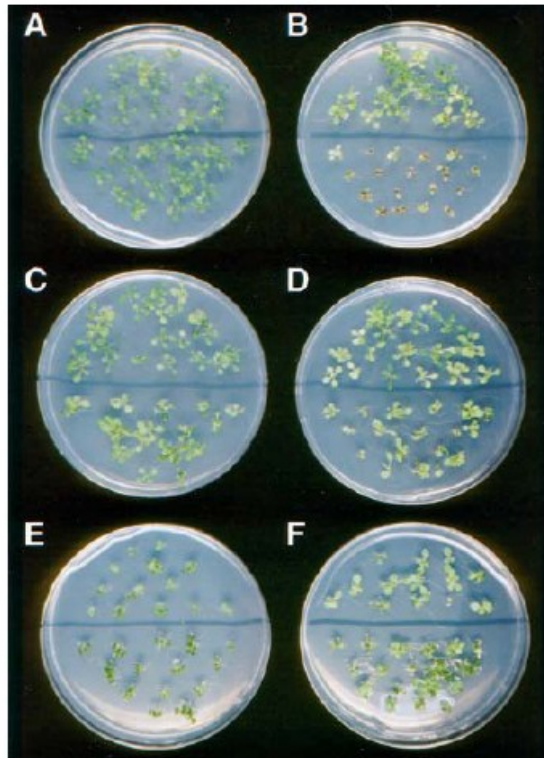
Figura 16. Effetto della prolina esogena su plantule di *A. thaliana*



Lesioni e inibizione della crescita radicale sono evidenti a 9 gg dal trattamento (A), cui segue la morte delle plantule (B). C: foglie excise incubate per 48h su agar + 200 mM prolina. G,I: foglie con lesioni necrotiche causate dalla prolina esogena. L: radice non trattata, a sinistra, e trattata, a destra. H,K,M: evidenza dell'accumulo di composti auto-fluorescenti (da Hellmann *et al.*, 2000).

Figura 17. Riduzione della tossicità della prolina in condizioni di stress salino

Controlli sopra la linea e mutanti sotto. A e B non trattati, C e D trattati con 50 mM NaCl, E ed F con 100 mM NaCl. Nelle piastre di destra è stata aggiunta prolina al terreno di coltura (da Hellmann *et al.*, 2000).

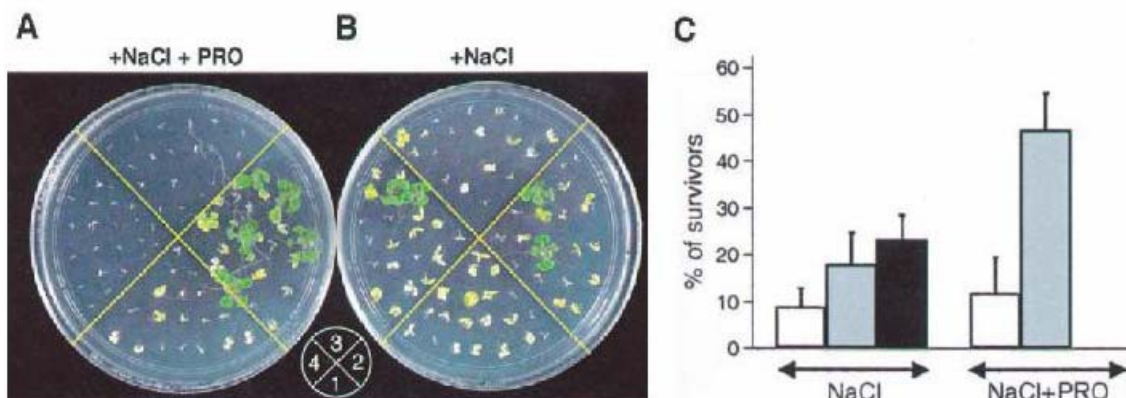


L'applicazione contestuale di concentrazioni crescenti di glucosio riduce la tossicità dell'iminoacido, cosa che non avviene usando un derivato non metabolizzabile dello zucchero, a suggerire che l'effetto protettivo è legato al metabolismo di quest'ultimo. La trascrizione di *PRODH* risulta fortemente ridotta dalla presenza di zucchero, evidenza che avvalorata ulteriormente la possibilità che la tossicità della prolina sia legata al suo catabolismo. Secondo questi autori il gene *AtRSR1* entrerebbe a far parte di una cascata di trasduzione del segnale che prende inizio con la degradazione della prolina e che porta da una parte all'induzione del promotore della patatina e di altri geni, e che dall'altra riduce l'espressione di *ProDH*. Questo potrebbe costituire un valido meccanismo di controllo a *feedback* in grado di proteggere la pianta dall'effetto tossico indotto dalla degradazione della prolina durante la fase di recupero da condizioni di stress.

Risultati contrastanti sono stati però descritti in seguito. La tossicità della prolina esogena e di un suo analogo sono state misurate su linee transgeniche di *A. thaliana* con un'augmentata (PDHS) o diminuita (PDH-AS) espressione di *ProDH*, ottenuta per trasformazione con costrutto orientato in senso per aumentarne l'espressione o in antisenso per silenziare il gene. Se fatte germinare in presenza di NaCl, sia le linee transgeniche che i controlli mostrano una spiccata sensibilità al sale (Figura 18). L'aggiunta al terreno di prolina 10 mM causa un'ulteriore diminuzione della percentuale di germinazione della linea PDH-AS, mentre le piante PDHS sono in grado di crescere meglio del controllo, che non sembra beneficiare della presenza di prolina (Mani *et al.*, 2002). A questo livello non è chiaro se l'effetto sia dovuto ad una specifica richiesta di degradazione della prolina durante il processo germinativo, o alla tossicità dell'accumulo dell'aminoacido in quelle linee che non sono in grado di metabolizzarlo.

Figura 18. Germinazione di piante di *A. thaliana* transgeniche per At-PDH

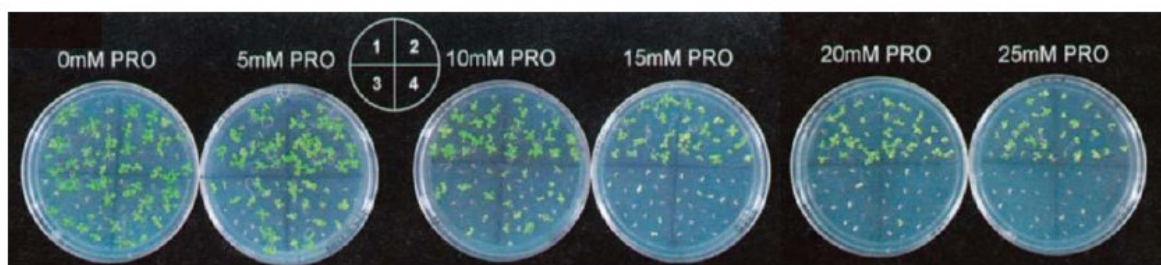
La prova è stata condotta in presenza di 100 mM NaCl e 10 mM prolina (A) o di 100 mM NaCl (B). 1, controlli, 2 linee senso, 3 e 4 linee antisenso. C, percentuale di sopravvissuti, barre bianche per i controlli, grigie per PDH-S e nere per PDH-AS (da Mani *et al.*, 2002).



Da ulteriori esperimenti condotti sulle linee transgeniche è emerso che le linee PDH-AS sono sensibili alla prolina esogena mentre quelle PDH-S non risentono della presenza dell'aminoacido (Figura 19), ma vengono inibite dall'aggiunta di suoi analoghi. Se la tossicità della prolina esogena fosse legata alla formazione di P5C, ci si aspetterebbe una ipersensibilità verso la prolina delle linee PDHS, che hanno livelli più alti dell'enzima, e una maggiore resistenza delle linee con bassi livelli di ProDH. Ulteriori evidenze hanno però rafforzato l'ipotesi di un ruolo causale del P5C nella tossicità della prolina esogena. Ceppi di lievito privi di un gene *P5CDH* funzionale sono risultati ipersensibili alla somministrazione esogena di prolina se posti in condizioni di eccesso di azoto (Figura 20). La tossicità è stata messa in relazione alla produzione di ROS (Deuschle *et al.*, 2001).

Figura 19. Effetto di dosi crescenti di prolina sulla germinazione di piante di *A. thaliana* transgeniche per At-PDH

1 controllo, 2 linee senso, 3 e 4 linee antisenso (da Mani *et al.*, 2002).



La tossicità della prolina è stata d'altra parte ben descritta anche in cellule animali. È noto infatti che la ProDH è indotta dalla p53, proteina che ha molteplici funzioni nella cellula, tra cui quella di indurre e regolare l'apoptosi. Sono stati riportati dei dati che suggeriscono che l'effetto inibitorio su vari tipi di cellule animali sia dovuto proprio al P5C (Maxwell & Davis, 2000). Con ogni probabilità tale effetto è dovuto *in vivo* anche alla produzione di ROS da parte della

ProDH (Donald *et al.*, 2001). Anche la P5CDH umana è uno dei bersagli precoci della p53 ma, contrariamente alla ProDH, la sua attivazione sembra poter proteggere le cellule dallo stress ossidativo e quindi bloccare la morte cellulare che ne deriverebbe (Figura 21; Yoon *et al.*, 2004). A tal proposito va sottolineato come due disturbi ereditari della via degradativa del metabolismo della prolina provochino quella che è comunemente chiamata iperprolinemia. L'iperprolinemia di tipo I (HPI) è causata dal deficit di ProDH, e l'iperprolinemia di tipo II (HPII) è dovuta a un deficit della P5CDH. I livelli di prolina sono aumentati di 3-5 volte nella prima condizione, e di 10-15 nella seconda. La caratteristica biochimica distintiva della HPII sono gli alti livelli plasmatici e l'escrezione urinaria di P5C. Tale disturbo determina problemi al sistema nervoso, con comparsa di disturbi mentali, ed è associato alla schizofrenia e all'Alzheimer (Black *et al.*, 2009).

Figura 20. Tossicità della prolina in lievito

In presenza di urea come fonte di azoto, al contrario del wt il mutante forma colonie di dimensione ridotta (a) e produce H₂O₂ (b) quando viene aggiunta prolina nel mezzo (Deuschle *et al.*, 2001).

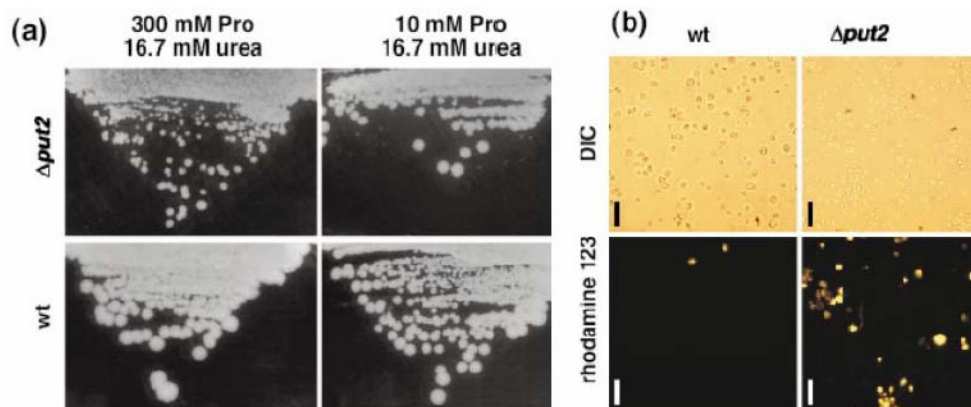
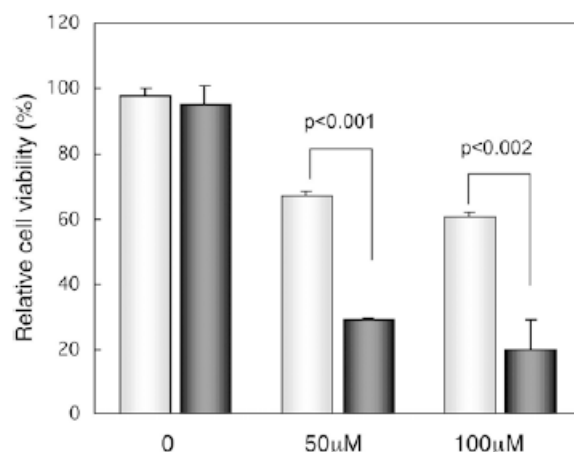


Figura 21. Ruolo protettivo della P5CDH contro lo stress ossidativo

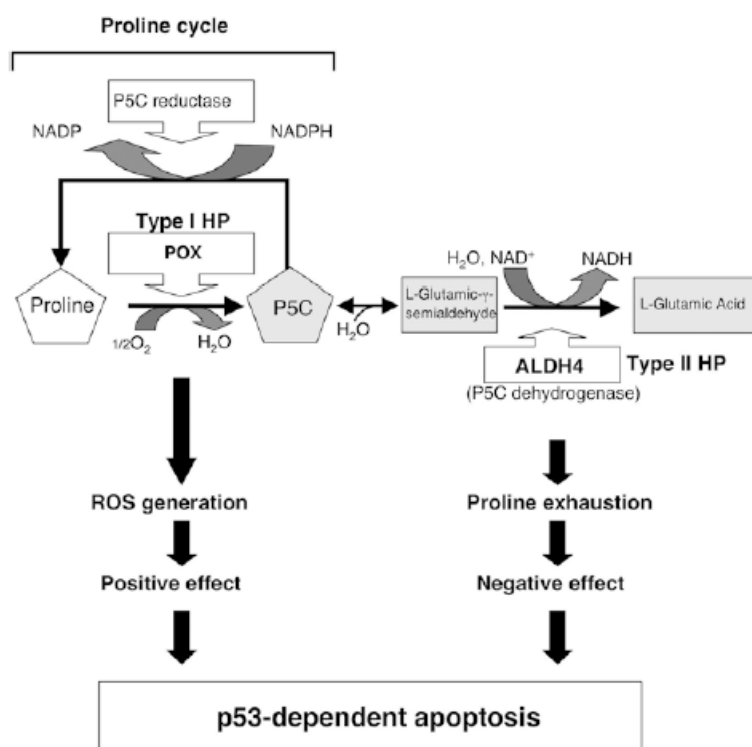
Cellule umane sovraesprimenti la P5CDH (barre bianche) e cellule di controllo non trasformate (barre grigie) sono trattate con 50 e 100 μ M H₂O₂. La vitalità cellulare è misurata mediante saggio dell'MTT dopo tre giorni di trattamento (da Yoon *et al.*, 2004).



Una possibile spiegazione di questo quadro complesso è stata ipotizzata da Yoon e collaboratori (2004). Secondo questi autori l'induzione della ProDH può coincidere con l'attivazione di quello che è chiamato ciclo della prolina (Phang, 1985), un ciclo apparentemente futile a cui è associata la produzione di ROS da parte della ProDH. L'attivazione della P5CDH permetterebbe di evitare l'instaurarsi di tale ciclo grazie alla conversione del P5C in glutamato (Yoon *et al.*, 2004). Quindi l'equilibrio tra l'attività della P5CDH e della ProDH sarebbe critico nel determinare i fenomeni apoptotici mediati da p53 (figura 22). Resta da capire come si esplichino l'effetto protettivo della P5CDH anche sulla somministrazione di H₂O₂ esogeno.

Figura 22. Meccanismo proposto per il ruolo di ProDH e P5CDH nei fenomeni apoptotici mediati da p53

La trascrizione di *ProDH* e *P5CDH* è regolata da p53. La ProDH catalizza la conversione di prolina in P5C con il concomitante trasferimento di elettroni al citocromo c, che supporta la generazione di ROS donando potere riducente alla catena di trasporto degli elettroni (Donald *et al.*, 2001). Il P5C può essere convertito in prolina dalla P5CR chiudendo il ciclo. Dall'altra parte il P5C può essere convertito in L-Glu dalla P5CDH, in un processo irreversibile che consuma il pool di prolina libera. Questo potrebbe negativamente controllare la produzione di ROS da parte della ProDH. Gli autori speculano proponendo che la regolazione della produzione di ROS attraverso l'espressione di ProDH e P5CDH possa essere uno dei meccanismi apoptotici mediati da p53 (Yoon *et al.*, 2004).



Questi aspetti non sono stati ancora pienamente delucidati in sistemi vegetali. Un contributo a tal fine è stato ottenuto attraverso un lavoro su mutanti inserzionali *p5cdh* di *A. thaliana*. Tali mutanti, che in condizioni normali appaiono indistinguibili dal *wild type* se non per una ridotta capacità germinativa, sono risultati ipersensibili alla somministrazione esogena sia di prolina che di P5C. L'utilizzo di isotopi radioattivi ha permesso di escludere che la prolina, accumulata sotto stress in ugual misura da mutanti e wt, possa essere nei primi metabolizzata attraverso altre vie (Deuschle *et al.*, 2004). Nei mutanti trattati con prolina è stato possibile rilevare livelli di P5C di circa tre volte superiori il limite di rilevabilità per questo composto, che nel *wild type* non risulta evidenziabile verosimilmente a causa della sua rapida conversione a

glutamato. I mutanti germinati in tali condizioni assumono un fenotipo eziolato, non sono in grado di sviluppare l'apparato radicale e foliare e accumulano ROS (Figura 23, A e B). Effetti simili, anche se meno severi, sono stati ottenuti con ornitina o arginina esogena, catabolizzate anch'esse a glutamato via P5C (Figura 23, C e D).

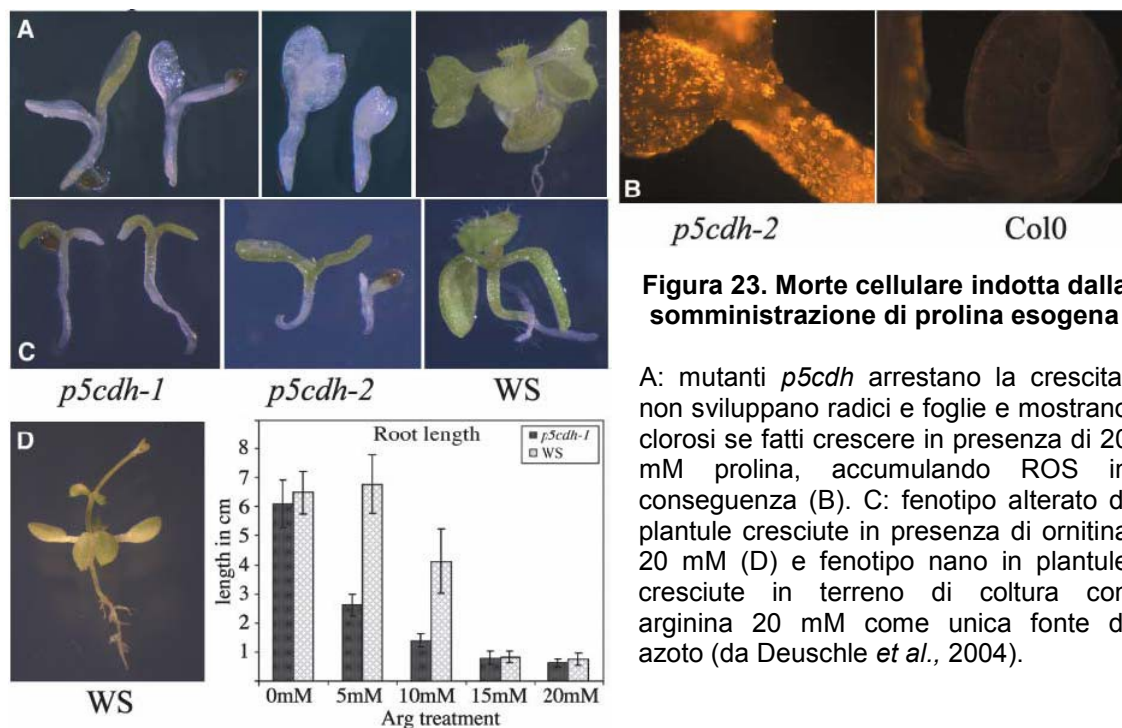


Figura 23. Morte cellulare indotta dalla somministrazione di prolina esogena

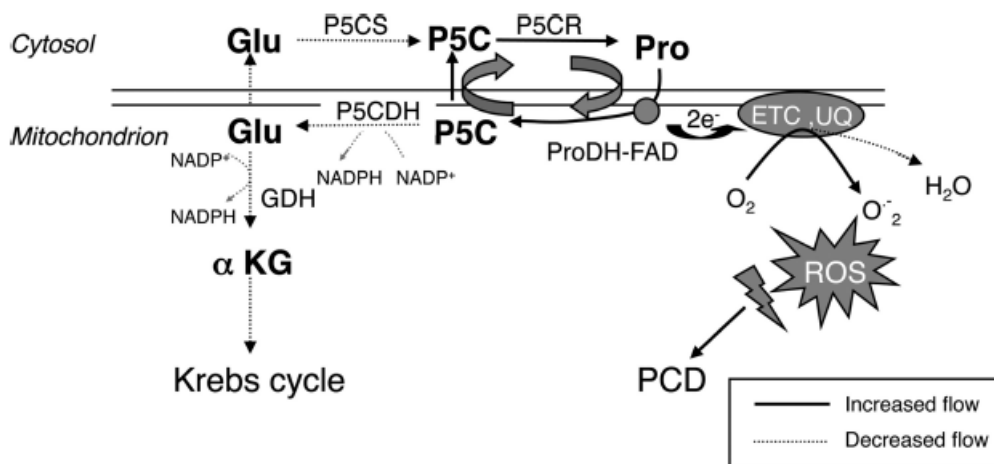
A: mutanti *p5cdh* arrestano la crescita, non sviluppano radici e foglie e mostrano clorosi se fatti crescere in presenza di 20 mM prolina, accumulando ROS in conseguenza (B). C: fenotipo alterato di plantule cresciute in presenza di ornitina 20 mM (D) e fenotipo nano in plantule cresciute in terreno di coltura con arginina 20 mM come unica fonte di azoto (da Deuschle *et al.*, 2004).

L'ipersensibilità dei mutanti *p5cdh* nei confronti della prolina e degli altri aminoacidi che sono degradati via P5C, insieme con la dimostrazione di un suo accumulo nei mutanti dopo somministrazione di prolina esogena, è stata interpretata come evidenza del fatto che sia l'accumulo di P5C ad indurre la morte cellulare (Deuschle *et al.*, 2004). In lievito, la sovra-espressione di PUT1 (omologo di ProDH in lievito) induce apoptosi (Maxwell & Davis, 2002; Liu *et al.*, 2006). Inoltre, alti livelli di P5C in ceppi di lievito mutanti per *put2* (omologo di P5CDH) sono stati associati alla produzione di ROS. Per questo è stato proposto che la tossicità della prolina in lievito sia dovuta all'aumento dei livelli di P5C (Nomura & Takagi, 2004).

Recentemente anche per le piante è stato proposto un ciclo analogo (Miller *et al.*, 2009; figura 24). Gli autori partono dall'assunto che il P5C possa in qualche modo attraversare la membrana mitocondriale e passare nel citosol. Sovraesprimendo la ProDH e la P5CR in mutanti *p5cdh* di *Arabidopsis* gli autori sostengono di non osservare cambiamenti significativi nel rapporto prolina/P5C. Questi dati sono in disaccordo con quelli di Deuschle e collaboratori. In questo quadro generale, la P5CDH sembra rivestire un ruolo chiave, analogamente a quanto proposto per cellule umane, nel determinare il destino del P5C prodotto a livello mitocondriale e regalarne i fenomeni di PCD.

Figura 24. ciclo P5C-prolina nelle cellule vegetali

Durante la risposta agli stress abiotici, la prolina è accumulata come conseguenza di una aumentata sintesi e della soppressione della sua ossidazione. Al termine delle condizioni di stress la prolina è ossidata a P5C, che a sua volta è ulteriormente ossidato a glutamato. Quando la prolina è fornita esogenamente in eccesso e la trascrizione e l'attività della ProDH è indotta, l'attività della P5CDH non aumenta allo stesso modo, rendendo l'ossidazione della prolina disaccoppiata. Il P5C in eccesso può essere quindi trasportato nel citosol e ridotto a prolina dalla P5CR. La prolina così formata può essere nuovamente trasportata nel mitocondrio contribuendo a chiudere il ciclo proposto. Secondo questo schema l'intensificarsi del ciclo P5C-prolina comporta un flusso eccessivo di elettroni nella catena di trasporto mitocondriale che determina la generazione di ROS. Nei mutanti *p5cdh* il ciclo risulta particolarmente attivo e la produzione di ROS si associa alla comparsa di PCD (da Miller *et al.*, 2009).



Nel quadro proposto esistono aspetti ancora non del tutto chiariti, specialmente riguardo a chi sia l'effettore della tossicità e con quale o quali meccanismi questa si espliciti. Infatti secondo alcuni autori la tossicità risiede nella capacità della ProDH di generare superossido o di immettere elettroni direttamente nella catena di trasporto degli elettroni. Tale meccanismo potrebbe essere legato a un ciclo di interconversione tra P5C e prolina, che presuppone l'esistenza di un trasporto del P5C attraverso la membrana mitocondriale. Altre prove d'altra parte suggeriscono un ruolo causale diretto del P5C, che sembra essere in grado di attivare specificamente geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e che quindi potrebbe fungere da secondo messaggero, o a dosi più elevate, divenire tossico per la cellula.

Altri dati suggeriscono che la prolina possa regolare di per sè certe funzioni, come lo sviluppo della pianta, o possa agire da molecola segnale. Piante di *Arabidopsis* con un contenuto inferiore di prolina in conseguenza di una alterata biosintesi presentano anomalie nella morfologia delle foglie, problemi nella fioritura e letalità embrionale. Tali aberrazioni possono essere revertite attraverso la somministrazione esogena dell'iminoacido. Questo fatto suggerisce che un certo contenuto in prolina sia essenziale per l'embrione e lo sviluppo della pianta (Székely *et al.*, 2008). In effetti è stato proposto che la P5CS2 e la prolina possano regolare la divisione cellulare e l'embriogenesi nei vegetali (Mattioli *et al.*, 2009b). Anche in lievito sembra che la prolina possa esercitare una funzione regolativa sul ciclo cellulare. Maggio

e collaboratori (2002) descrivono che la crescita e il contenuto intracellulare in prolina sono inversamente proporzionali. Nei ceppi iperproduttori di prolina si assiste a un aumento dei livelli di poliploidia e alla formazione di vacuoli. In effetti la riduzione della velocità di crescita, così come fenomeni di endopoliploidia associata anche alla formazione di vacuoli multipli sono fenomeni osservati comunemente in risposta allo stress iperosmotico sia in lievito (Bone *et al.*, 1998) che nelle piante (Chang *et al.*, 1996, Kononowicz *et al.*, 1990).

Sembra plausibile anche che la prolina possa fungere da molecola segnale capace di influenzare diversi aspetti della biologia della cellula come la vitalità, il ciclo cellulare e l'attivazione di risposte multiple. In effetti in lievito e in cellule umane la poliploidia è indotta dall'attivazione di geni specifici, e può regolare processi fondamentali incluso la differenziazione sessuale, la biologia dei tumori e il controllo della morfologia cellulare (Maggio *et al.*, 2002). Ad avvalorare la visione secondo cui la prolina potrebbe fungere sia da molecola capace di conferire protezione verso diverse tipologie di stress sia da secondo messaggero, vi è la descrizione di mutanti di *Arabidopsis* ipersensibili alla salinità o al freddo ma comunque capaci di accumulare alte concentrazioni di aminoacido (Wu *et al.*, 1996, Liu & Zhu, 1997).

Coinvolgimento del metabolismo della prolina nelle interazioni biotiche

Oltre a condizioni ambientali sfavorevoli, le piante sono continuamente esposte all'attacco di patogeni fungini, batterici e virali. In risposta all'invasione da parte del patogeno, la pianta è in grado di evocare meccanismi di difesa capaci di limitarne la diffusione. L'induzione di tali difese (come il rinforzamento della parete, la produzione di fitoalessine e l'accumulo di sostanze ad attività antimicrobica) e la loro regolazione spaziale e temporale sono decisive nel determinare il risultato dell'interazione tra pianta e patogeno. Si parla di interazione compatibile quando l'agente infettante prevale determinando l'insorgenza della patologia, viceversa l'interazione è detta incompatibile.

Nelle interazioni incompatibili si assiste alla morte programmata di un ridotto numero di cellule nel sito d'infezione, meccanismo noto come risposta ipersensibile (HR). L'inizio di una risposta da parte della cellula implica il riconoscimento di una molecola segnale che può essere sintetizzata dal patogeno o rilasciata dalla parete cellulare a seguito dell'invasione. Tali molecole vengono indicate con il termine "elicitori" e possono essere specifiche per un particolare sistema ospite-patogeno, oppure generiche. Il contatto con gli elicitori causa una serie di cambiamenti a livello cellulare che iniziano con l'attivazione di componenti preesistenti, e procedono poi con la biosintesi di nuove proteine coinvolte nella risposta all'attacco del patogeno. Tra i primi si annoverano lo scoppio ossidativo, che porta alla produzione di ROS, cambiamenti nel pH esocellulare, nel potenziale di membrana, nel flusso di ioni e nel pattern di proteine fosforilate (Wojtaszek, 1997). Durante lo scoppio ossidativo la rapida produzione di ROS può inibire direttamente la crescita del patogeno, oppure impedire la sua diffusione attraverso un meccanismo di morte cellulare programmata (PCD) intorno al sito d'infezione. A loro volta i ROS, insieme all'ossido nitrico, inducono l'accumulo di fitoalessine, l'espressione dei geni legati alla difesa (defense-related genes) e l'attivazione della biosintesi di acido salicilico,

che funge da segnale sistemico per l'espressione di proteine correlate alla patogenesi (PRP, pathogen-related proteins) (Yoshoka *et al.*, 2003).

La ricerca nel campo della patologia vegetale si è principalmente concentrata sulle basi molecolari della resistenza, e su come incrementare la capacità di controllo dei patogeni. Poco è stato fatto in confronto per la comprensione dei meccanismi con i quali piante e funghi interagiscono durante le interazioni di tipo compatibile. Il modello meglio studiato in tal senso è forse quello della ruggine del lino (*Melampsora lini*), un fungo patogeno biotrofico obbligato del lino (*Linum usitatissimum*). Durante l'infezione le ife del fungo penetrano attraverso la parete cellulare, causano un invaginamento della membrana plasmatica della cellula ospite e formano un setto, detto austorio, ma il citoplasma fungino e quello della cellula ospite restano separati. Il meccanismo del processo infettivo non è stato del tutto chiarito, ma sembra coinvolgere un complesso di comunicazioni tra pianta e fungo basate su segnali sia chimici che fisici.

Con l'intento di delucidare i meccanismi che portano ad un'interazione di tipo compatibile, ricercatori del gruppo del dott. Pryor, a Camberra, isolarono da piante di lino sensibili alla ruggine un gene che chiamarono *FIS1* (da Flax Inducibile Sequence; Roberts & Pryor, 1995). Tramite analisi di ibridazione del DNA (Southern Blot) venne dimostrato che tale gene appartiene al genoma della pianta e non a quello del fungo patogeno. Inoltre si notò come nel corso della interazione compatibile i livelli di tale trascritto decuplicavano mentre quelli delle perossidasi anioniche, tipiche PRP, restavano a livelli molto bassi. Uno scenario opposto si manifestava invece in cultivar resistenti, in cui i livelli di PRP aumentano rapidamente già a stadi precoci della risposta, ad indicare che il gene non era ascrivibile al vasto gruppo delle PRP. *FIS1* non risultò espresso costitutivamente se non a livelli bassi nel gambo, mentre nelle foglie infette raggiungeva livelli molto alti. Tramite analisi di sequenza si pose in evidenza una omologia con alcuni geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi, e con geni della famiglia delle aldeidi deidrogenasi. Venne ipotizzato che tale gene potesse essere indotto dal patogeno per volgere il metabolismo della pianta a suo favore, ipotesi avvalorata dal fatto che il fungo, biotrofico, non causa necrosi cellulari nelle infezioni compatibili.

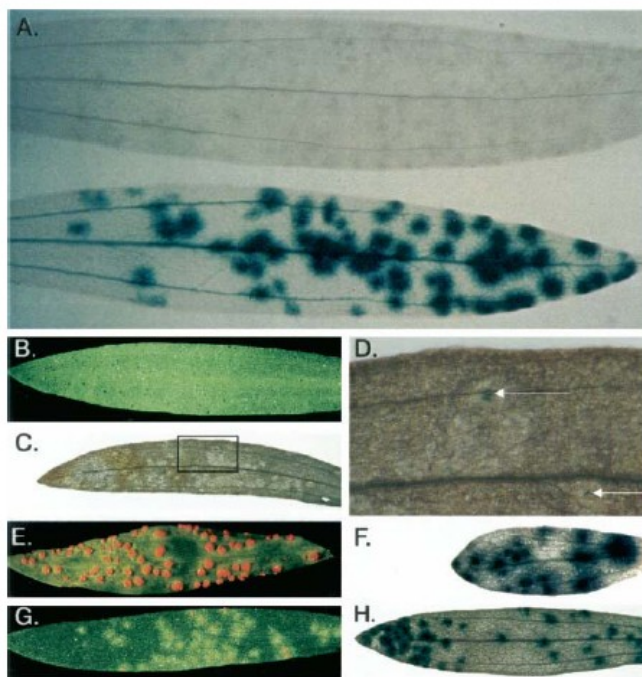
Tramite l'espressione di una β -galatturonidasi posta sotto il controllo del promotore di *FIS1*, è stata in seguito confermata l'espressione di tale gene a livello del mesofillo foliare di piante di lino infettate con ceppi virulenti di *M. lini* (Figura 25 A; Ayliffe *et al.*, 2002). È stato inoltre provato che l'espressione di *Fis1* è proporzionale alla crescita del patogeno, ed è riscontrabile anche nelle prime fasi dell'interazione incompatibile. Linee di piante transgeniche emizigoti per *FIS1-GUS* ed eterozigoti per due geni di resistenza, *L6* e *P3*, sono state infettate con un ceppo fungino verso il quale sia *L6* che *P3* sono attivi, ed è quindi stata osservata l'espressione del gene reporter per determinare il sito e i livelli di espressione del promotore in risposta a diverse interazioni. La risposta mediata dal gene di resistenza alla ruggine *L6* è rapida e blocca completamente la crescita del patogeno, impedendone la sporulazione. A livello del sito d'infezione, 8 giorni dopo l'infezione nelle piante transgeniche *FIS1-GUS/L6* si notò però una, se pur debole, attività β -galatturonidasica (Figura 25 B,C e D). Quando le stesse piante vennero trattate con un ceppo non riconosciuto da *L6*, quindi una interazione compatibile, si

evidenziò un'alta ma sempre localizzata induzione di GUS (Figura 25 E ed F). L'altra linea transgenica (*FIS1-GUS/P3*), invece, quando trattata con il ceppo avirulento non mostrò una completa risposta al patogeno e l'effetto fu quello di una parziale resistenza cui corrisponde un'espressione di GUS intermedia a quanto osservato nei due casi precedenti (Figura 25 G ed H). L'induzione di *FIS1* appare dunque correlata al grado di diffusione della crescita fungina, e avviene nelle prime fasi della sola interazione compatibile.

Una svolta nella comprensione di tali aspetti venne con la disponibilità della sequenza aminoacidica dedotta di *AtP5CDH*, che mostrò una elevatissima omologia con *FIS1* (Deuschle *et al.*, 2001). Geni con alta omologia per *FIS1* vennero trovati in molte altre piante di interesse agrario, quali mais (*Zea mays*), orzo (*Hordeum vulgare*), frumento (*Triticum aestivum*) e pomodoro (*Lycopersicon esculentum*). In tutti i casi tali omologhi sembrano essere attivati dall'infezione compatibile con l'agente eziologico della ruggine (Ayliffe *et al.*, 2002).

Figura 25. Foglie di lino a 6 giorni dall'infezione con *Melampsora lini*

A: wild-type. B, C: foglie di *FIS1-GUS/L6* infettate con un ceppo avirulento. D: ingrandimento di C. E e F: foglie di *FIS1-GUS/L6* infettate con un ceppo virulento. G e H: resistenza parziale in foglie di *FIS1-GUS/P3* (Ayliffe *et al.*, 2002).

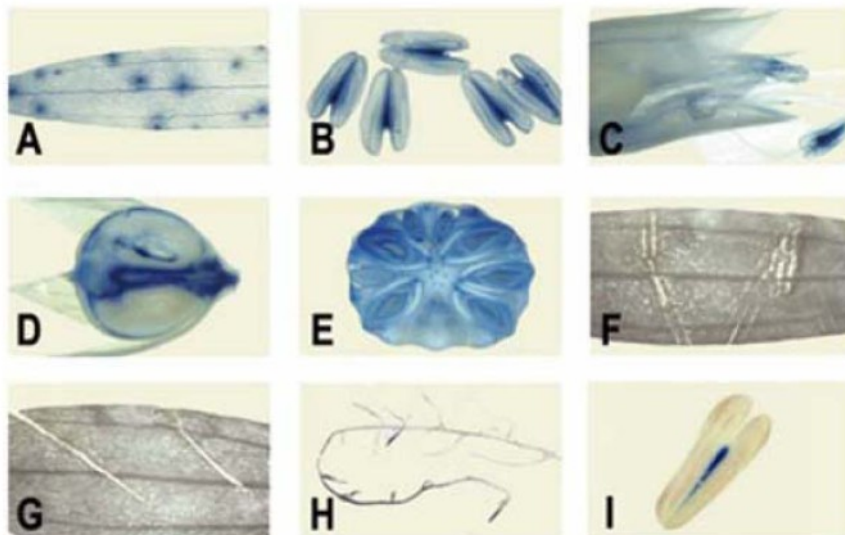


In realtà, come mostrato in figura 26, il gene *Fis1* viene espresso costitutivamente in alcuni tessuti. In piante transgeniche *FIS1-GUS* non infettate con il fungo, il gene reporter è espresso nel tessuto vascolare delle foglie, nei fiori e nelle capsule in formazione. A livello dei fiori l'attività della β -galatturonidasi è localizzata nella regione connettiva tra due lobi delle antere, ma non nei filamenti. Nelle capsule l'espressione è localizzata nel tessuto al centro della capsula e in quello che circonda i semi in formazione. Una debole attività GUS è riscontrabile anche a livello dell'apice radicale (Mitchell *et al.*, 2006). Tale *pattern* di espressione è molto

simile, anche se non perfettamente sovrapponibile, a quello della *P5CDH*. È noto del resto che i geni coinvolti nel metabolismo della prolina sono espressi costitutivamente negli organi riproduttivi e germinativi in associazione sia alla richiesta energetica (rottura della dormienza, maturazione del polline) sia alla particolare condizione di disidratazione di alcuni tessuti (Hare e Cress, 1997; Kavi Kishor *et al.*, 2005). D'altronde la tossicità indotta da prolina produce i tipici segni della PCD indotta nel corso della HR. Questi dati avvalorano la possibilità che il metabolismo della prolina abbia un ruolo nella risposta di difesa delle piante a stress biotici.

Figura 26. Livelli e siti di espressione di FIS1-GUS in piante di lino

A: foglie infettate dalla ruggine. B: espressione concentrata nel connettivo delle antere. C: fiori di piante non infettate, l'espressione di GUS è localizzata a livello del connettivo tra due lobi delle antere, mentre è assente lungo il filamento. D ed E: nelle capsule contenenti i semi in formazione l'attività è localizzata al centro delle capsule e intorno ai semi. F e G: stress meccanici non inducono l'espressione. H: debole espressione a livello dell'apice e del tessuto vascolare della radice in piante cresciute in terreno. I: espressione a livello delle antere (da Mitchell *et al.*, 2006).



L'identità tra *P5CDH* e *FIS1* è stata avvalorata da esperimenti di complementazione su lieviti deleti del gene *PUT2* e privi della capacità di crescere su un mezzo contenente prolina quale unica fonte di azoto. Questo ha condotto gli autori a proporre una rivisitazione della nomenclatura dei geni omologhi indotti dalla ruggine rinominandoli, più correttamente, con il nome dell'enzima per cui codificano, cioè la *P5CDH* (Ayliffe *et al.*, 2005). Dall'insieme di questi dati sembra dunque plausibile che il patogeno, inducendo l'espressione della *P5CDH*, riesca a prevenire l'accumulo di P5C o l'instaurarsi del ciclo P5C/prolina e quindi ad evitare l'induzione della PCD da parte della pianta. Inoltre l'espressione dell'enzima attorno alle aree necrotiche nel corso della HR potrebbe contribuire a restringere la risposta solo alle aree di infezione, prevenendo una diffusione incontrollata della morte cellulare (Deuschle *et al.*, 2004). Tale ipotesi viene avvalorata dal fatto che linee silenziato di lino (trasformate cioè con un costrutto

disegnato per sopprimere l'accumulo del trascritto per silenziamento mediato da RNA, fis1IR), mostrano una accresciuta sensibilità a somministrazioni di prolina esogena, fenotipo che ricorda quello dei mutanti *p5cdh* (Deuschle *et al.*, 2004) e *srs1* (Hellmann *et al.*, 2000) (Figura 27). Proprio come tali mutanti le linee fis1IR esprimono un fenotipo normale e indistinguibile dal *wild-type*, mentre a fronte della somministrazione esogena di prolina si assiste all'accumulo di composti autofluorescenti, callosio in particolare, e alla produzione di perossido d'idrogeno (Hellmann *et al.*, 2000; Deuschle *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2006).

Il fatto che nè stress meccanici nè l'infezione con altri funghi patogeni necrotrofici o biotrofici attivi la trascrizione del gene *FIS1* consente però di ipotizzare che tale gene sia specificamente indotto da questo fungo piuttosto che da una alterazione del metabolismo della cellula ospite causata dallo sviluppo di una generica infezione fungina (Mitchell *et al.*, 2006). Va però sottolineato che negli esperimenti condotti con altri patogeni (*S. linicola*, *O. lini* e *F. oxysporum lini*) solo *M. lini* produce austeri che penetrano nel mesofillo fogliare della cellula ospite. Quindi è possibile che questo fungo alteri diversamente il metabolismo della cellula vegetale. Dati derivanti da analisi di microarray mostrano comunque che i livelli di trascritto di *AtP5CDH* variano di poco in oltre 230 diverse condizioni sperimentali, tra cui l'infezione con il virus del mosaico del tabacco, con *Erysiphe cichoracearum* e *Pseudomonas syringae*, tutti patogeni di particolare rilevanza (Ayliffe *et al.*, 2002).

Ad avvalorare un coinvolgimento del metabolismo della prolina nelle interazioni pianta-patogeno è recentemente comparso un lavoro che riporta il suo accumulo nei siti di infezione nel caso di interazione incompatibile. L'accumulo è conseguente all'attivazione dell'enzima chiave della via biosintetica, la P5CS (Fabro *et al.*, 2004). In questo sistema sperimentale a 72 h dall'infezione il pool di prolina quintuplica a fronte di una attivazione specifica della *P5CS2*, la cui espressione aumenta di più di dieci volte. Anche se poco enfatizzato nel lavoro, si assiste anche all'attivazione della *ProDH* che, in assenza di una contestuale induzione della P5CDH, potrebbe essere collegata alla necessità della pianta di produrre ROS o accumulare P5C per attivare la risposta ipersensibile.

Già in passato erano stati documentati casi di interazioni pianta-patogeno che in qualche modo si ripercuotevano sul metabolismo della prolina. Ad esempio durante le interazioni compatibili in alberi di limone (*Citrus limon*) o di arancio (*Citrus sinensis*) infettati con *Phytophthora* o con *Botryodiplodia theobromae* si assiste ad una riduzione della prolina libera (Labanauskas *et al.*, 1974; Srivastava & Tandon, 1966). Nel pomodoro infettato sia con il nematode *Meloidogyne javanica* che con *Agrobacterium tumefaciens* la prolina libera al contrario aumenta nelle galle e nei tumori formati in conseguenza (Meon *et al.*, 1978). Anche in foglie di riso infettate con il Tungro virus sembra che l'accumulo di prolina sia in relazione alla riuscita dell'infezione (Mohanty & Sridhar, 1982).

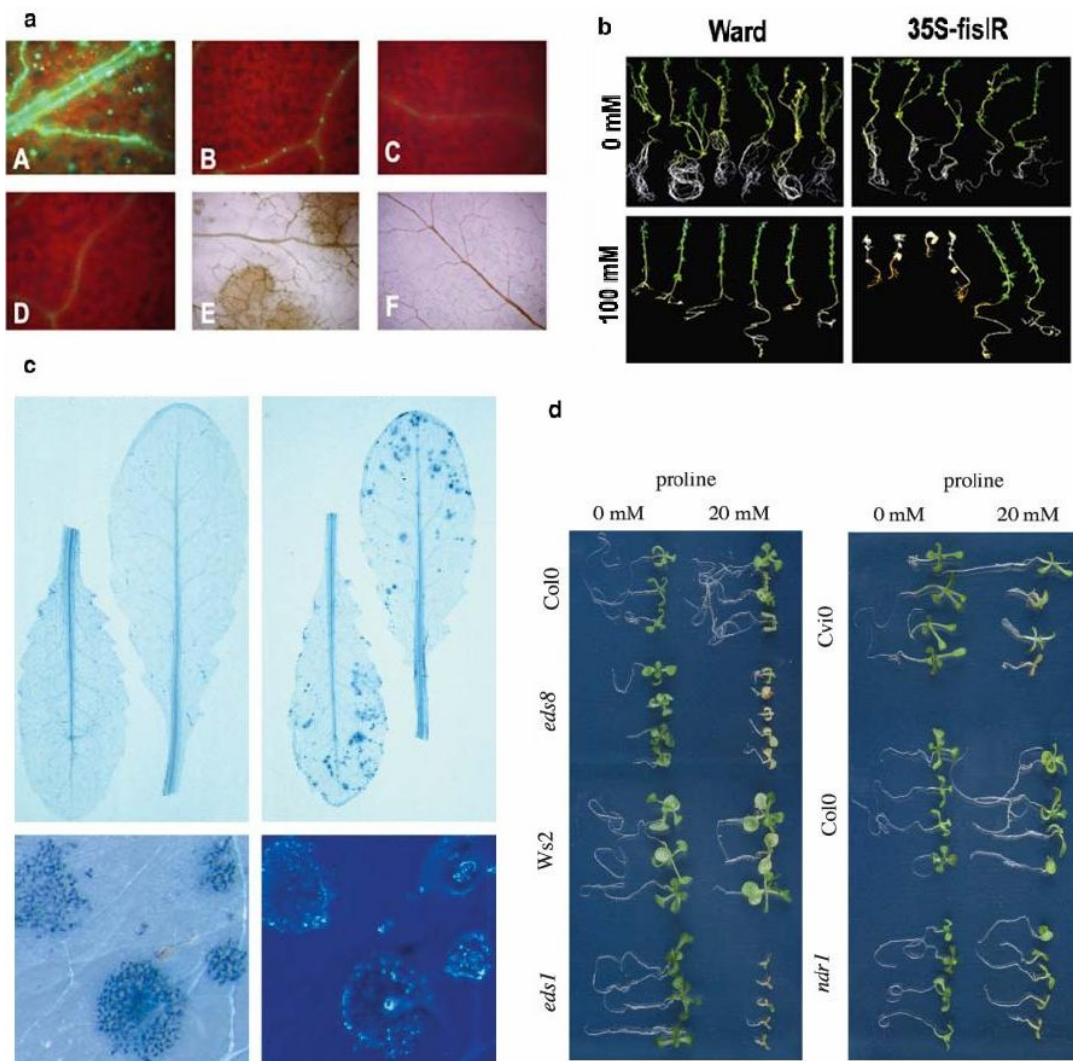
Figura 27. Confronto tra gli esperimenti su *P5CDH* (c,d, Deuschle et al., 2004) e quelli con *FIS1* (a,b, Mitchell et al., 2006)

(a) deposizione di callosio e produzione di H_2O_2 in *fis1*-IR (A) in risposta alla somministrazione esogena di 200 mM prolina. (B) wild-type. (C) *fis1*-IR - prolina. (D) wild-type - prolina. I tessuti sono stati trattati con blu di anilina ed osservati agli UV. (E ed F) produzione di H_2O_2 (evidenziata con 3,3-diaminobenzidina) in *fis1*-IR trattato o non trattato con prolina.

(b) le linee *fis1*-IR muoiono se fatte crescere in medium contenente 100 mM prolina (pannello inferiore) mentre le linee wild-type restano vitali (pannello superiore). Le due piantine sopravvissute, nel riquadro in basso a destra, hanno perso il costrutto. Da notare il fenotipo praticamente indistinguibile dei controlli e dei mutanti non trattati.

(c) foglie di *A. thaliana* spruzzate o meno con 20 mM prolina. Le tipiche aree di PCD sono evidenziate con blu trypan. Nel pannello inferiore a sinistra un particolare ingrandito di aree necrotiche. A destra deposizione di callosio nelle zone interessate dalla PCD, evidenziata dalla fluorescenza dopo trattamento con blu di anilina.

(d) suscettibilità nei confronti della prolina esogena di due ecotipi *Cvi0* e *Col0* e di tre varietà, *eds1*, *eds8* (enhanced disease susceptibility) e *nds1* (non-race specific disease resistance), con alterata capacità di esprimere la risposta ipersensibile, confrontate con il wild-type resistente, *Ws2*.



L'accumulo di prolina nei tumori sembra essere in grado di antagonizzare l'effetto del GABA. L'accumulo di GABA in piante di tabacco riduce il numero di tumori emergenti (Zhang *et al.*, 2002), mentre l'alta concentrazione di prolina ha un effetto stimolante (Haudecoeur *et al.*, 2008). Si ritiene che l'accumulo di prolina sia direttamente indotto da *A. tumefaciens*. Infatti alcuni plasmidi Ti codificano per almeno tre enzimi che catalizzano il catabolismo a arginina dell'opina più abbondante, la nopalina. L'arginina viene convertita in ornitina che, a opera di una ornitina ciclodeaminasi [EC 4.3.1.12], viene trasformata direttamente in prolina (Sans *et al.*, 1988; Ferrand *et al.*, 1986; Trovato *et al.*, 2001). La presenza dell'ornitina ciclodeaminasi contribuisce alla virulenza del patogeno con un meccanismo non ancora ben delucidato (Mauro *et al.*, 1996). Uno dei modi sembra essere proprio la capacità della prolina di competere con il trasporto del GABA all'interno della cellula microbica. La produzione di GABA fa parte della risposta di difesa della pianta. Una delle sue funzioni è quella di attivare un pathway degradativo per un importante fattore di virulenza (OS) che regola il numero di copie di plasmide e il suo trasferimento (Haudecoeur *et al.*, 2008). Il batterio, inducendo la produzione di prolina, riuscirebbe ad antagonizzare l'ingresso del GABA nella cellula e quindi controbattere il sistema di difesa sviluppato dalla pianta.

Se il coinvolgimento del metabolismo della prolina nelle interazioni pianta-patogeno è ancora da dimostrare in modo incontrovertibile, sicuro è il suo ruolo nell'interazione di alcune piante con microrganismi simbiotici (Hare & Cress, 1997). Noduli radicali di diverse leguminose accumulano ingenti quantità dell'iminoacido. La sua produzione è legata al trasferimento di energia sotto forma di potenziale redox dalla cellula ospite al batteroide, e quindi alla riuscita della simbiosi (Kohl *et al.*, 1987). In accordo con questo quadro, sovente si assiste ad una regolazione positiva della biosintesi dell'iminoacido nel citoplasma dell'ospite e del suo stesso catabolismo nel batteroide (Figura 28). In questo modo la pianta supporta la fissazione dell'azoto fornendo energia, scheletri carboniosi e azoto alla cellula batterica. L'induzione della biosintesi e, in particolare, della attività della P5CR può influire sul bilancio redox della cellula aumentando il rapporto $NAD^+/NADH$. Questo, inducendo la G6PDH e quindi il PPP, stimola anche la produzione di purine e ureidi, sostanze comunemente usate per il trasporto dell'azoto (Phang, 1985, Kohl *et al.*, 1988, Hare & Cress, 1997).

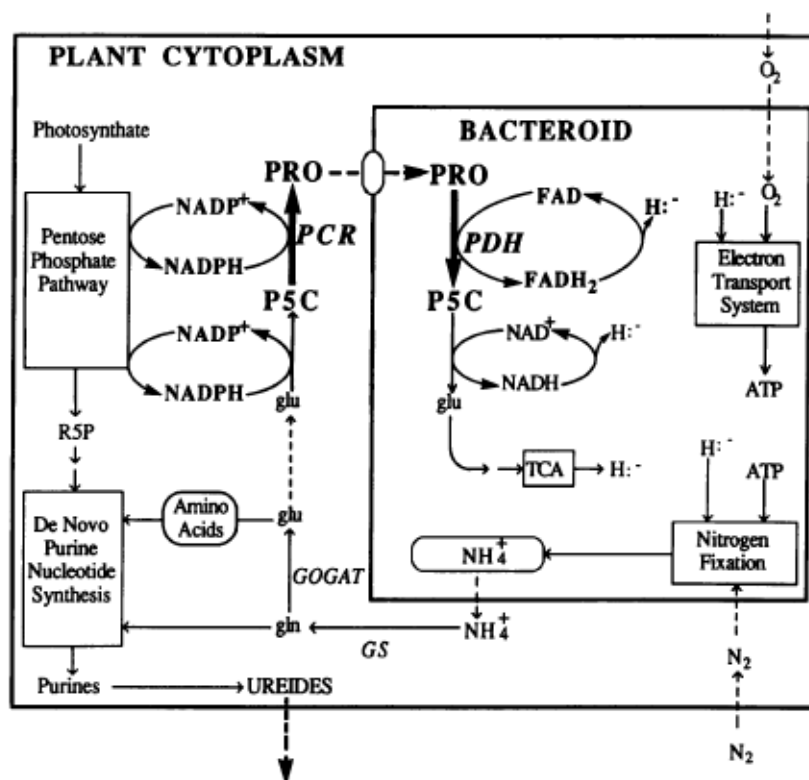
Piante di soia inoculate con *Bradyrhizobium japonicum*, il tipico simbiote di questa leguminosa, sviluppano più noduli radicali se le piantine sono precedentemente esposte ad un blando stress idrico. Questa evidenza è stata appunto messa in relazione all'accumulo di prolina e la conseguente disponibilità di questa per il simbiote. Infatti se le piante vengono inoculate con ceppi batterici privati di una ProDH funzionale, la velocità di fissazione dell'azoto nei noduli viene ridotta sostanzialmente (Curtis *et al.*, 2004). Inaspettatamente, anche l'attività della P5CR sembra fondamentale per la simbiosi. Infatti ceppi *p5cr* di *B. japonicum* hanno una bassa percentuale di nodulazione e sembrano non trarre beneficio dalla interazione con la pianta. La prolina fornita direttamente dalla pianta ai batteroidi non sembra essere sufficiente per sopperire alla mutazione (King *et al.*, 2000).

D'altra parte esistono molte similitudini tra la risposta all'infezione da parte di un

patogeno e l'interazione con un simbionte. Infatti nelle prime fasi dell'interazione simbiotica si assiste a una produzione di ROS, in particolare SO e H₂O₂, che ricorda molto il burst ossidativo indotto dal patogeno (Fester & Hause, 2005; Santon *et al.*, 2001). Il batterio simbionte sembra quindi sostanzialmente percepito come un invasore dalla pianta ospite, ma esso ha sviluppato una serie di meccanismi che gli permettono di aggirare le difese e volgerle a proprio vantaggio (Torres, 2010).

Figura 28. Ruolo proposto per la P5CR e la ProDH nei noduli radicali

La biosintesi della prolina, localizzata nel citosol della cellula ospite, attiva la via dei pentosi fosfati regolando il rapporto NADP⁺/NADH. La disponibilità di ribulosio-5-fosfato (R5P) promuove la sintesi di purine e di ureidi, che vengono trasportate al resto della pianta. Dall'altra parte la prolina entra nei batteroidi. Il suo catabolismo a glutamato (glu) fornisce potere riducente per la fissazione dell'azoto. L'azoto fissato viene trasportato nella cellula vegetale e immediatamente convertito a glutamina (gln) e glu, che entrano a loro volta nella sintesi delle purine (da Kohl *et al.*, 1988).



Convergenza tra stress abiotici e biotici: effetto regolativo di ROS e NO

Per coordinare la risposta a stress abiotici e biotici le piante hanno evoluto meccanismi complessi di percezione e di trasduzione del segnale. L'esistenza di una tolleranza crociata a diverse tipologie di stress è un fatto comunemente accettato, anche se per molti aspetti non delucidato a livello molecolare (Cheong *et al.*, 2002, Orsini *et al.*, 2010). Uno stress abiotico determina in genere un aumento dei livelli intracellulari di ROS. Quindi tutti gli stress abiotici risultano in ultima istanza in uno stress ossidativo. Ma anche la HR, attivata quando la pianta riesce a resistere all'attacco di un patogeno, è caratterizzata da un "burst" ossidativo capace di

indurre la PCD. In un certo senso, dunque, la produzione di ROS è un punto di congiunzione tra la risposta a stress biotici e quella a stress abiotici (Torres 2010; Jaspers & Kangasjärvi, 2010).

Per molto tempo la produzione di ROS è stata considerata come un evento sostanzialmente negativo per l'integrità cellulare. Oggi si sa invece che queste specie altamente reattive si comportano come segnali capaci di influenzare la risposta ormonale e regolare l'espressione di geni coinvolti sia nella risposta agli stress che nel controllo dello sviluppo e del differenziamento (Chen *et al.*, 1993; Wrzaczek *et al.*, 2010; Swanson & Gilroy 2010). In questa ottica anche i sistemi scavenger dei ROS non sono più considerati come semplici meccanismi di protezione, ma come determinanti nel regolarne la produzione e la localizzazione e quindi nel modulare le molteplici risposte ad essi associate. La comprensione dei meccanismi alla base della percezione dei ROS, dei loro effetti e dei determinanti della loro localizzazione costituisce un settore di ricerca di estrema attualità (Wrzaczek *et al.*, 2010).

Anche l'accumulo di prolina si manifesta in risposta a una vasta gamma di stress abiotici e biotici. Numerosi dati, come visto, suggeriscono d'altra parte la possibilità che il metabolismo della prolina sia connesso alla produzione di ROS o al loro *scavenging*. Un'ipotesi che emerge dallo studio del suo metabolismo in piante, funghi e animali è che la prolina possa avere effetti opposti sul bilancio redox della cellula. Il suo catabolismo, attraverso la ProDH, viene attivato dalla proteina p53, coinvolta nel processo apoptotico (Donald *et al.*, 2001). Quindi la prolina può fungere da pro-ossidante nel segnale apoptotico e rappresentare un importante meccanismo per controllare la carcinogenesi. Si ritiene che un meccanismo simile possa esistere anche nella cellula vegetale.

All'opposto, l'iminoacido funge da proteggente nei confronti dei danni indotti da varie condizioni di stress abiotico, a loro volta mediati dai ROS. Anche in cellule umane la prolina esercita un effetto protettivo nei confronti dello stress ossidativo attraverso la modulazione degli enzimi biosintetici, P5CS e P5CR. In diverse tipologie cellulari (HEK 293, HeLa, HepG2e BJAB) il trattamento con concentrazioni fisiologiche di H₂O₂ determina una induzione di P5CS e di P5CR e una repressione dell'OAT, anche se la regolazione è più o meno marcata a seconda della linea in esame (Figura 29). Nell'uomo si ritiene che l'OAT catalizzi la conversione di P5C a Orn, quindi la sua repressione servirebbe a incanalare il flusso verso la sintesi di prolina. Altre tipologie cellulari non rispondono significativamente allo stimolo con perossido (Krishnan *et al.*, 2008).

Se da una parte la funzione protettiva della prolina verso condizioni ambientali avverse è stata dimostrata, poco si sa sui meccanismi e i segnali che ne regolano i livelli endogeni nelle cellule vegetali. Diverse molecole segnale, come ABA e Ca²⁺, sono stati suggeriti come possibili regolatori (Kavi Kishor *et al.*, 2005; Ashraf & Foolad, 2007). Anche H₂O₂ gioca un ruolo chiave nelle risposte agli stress, fungendo da molecola segnale in grado di regolare l'espressione di alcuni geni (Hung *et al.*, 2005; Quan *et al.*, 2008). Ozden e collaboratori (2009) hanno descritto che il contenuto in prolina in foglie di vite aumenta in seguito all'applicazione di H₂O₂, e Verslues e collaboratori (2007) hanno dimostrato che il perossido d'idrogeno funge da segnale nel determinare l'accumulo di prolina mediato da ABA. In coleoptili e radici di mais il trattamento

con H_2O_2 è accompagnato da un rapido accumulo di prolina determinato da una induzione dei geni per gli enzimi biosintetici (Figura 30; Yang *et al.*, 2009) indicando che questa molecola possa partecipare alla trasduzione del segnale coinvolta nella regolazione della sintesi di prolina anche nelle piante.

L'ossido nitrico (NO), una piccola molecola gassosa, è coinvolta come i ROS in molteplici funzioni in tutte le specie viventi (Moreau *et al.*, 2010). In alcuni batteri l'NO è coinvolto nella patogenicità o nella protezione dal danno ossidativo (Sudhamsu & Crane, 2009). Nelle piante la scoperta dell'NO fu messa in relazione alla capacità di difesa da patogeni virali e batterici (Delledonne *et al.* 1998, Durner *et al.* 1998). Oggi si ritiene che nelle piante l'NO abbia molte più funzioni e sia coinvolto anche in processi di sviluppo e crescita della pianta, come la germinazione e la maturazione dei frutti (Beligni & Lamattina, 2000, He *et al.*, 2004, Villarreal *et al.*, 2009). La sua generazione è stata documentata anche in risposta a stress abiotici come disidratazione e salinità (Neill *et al.*, 2008).

Figura 29. Profilo di espressione di P5CS, P5CR e OAT in diverse linee tumorali umane trattate con H_2O_2 ed effetto protettivo dell'aggiunta di prolina

L'RNA totale è stato estratto a diversi tempi in assenza e in presenza di H_2O_2 . Nella figura sono riportati i livelli dei prodotti di RT-PCR per *P5CR*, *P5CS*, *OAT*, e *GAPDH*. In basso a destra cellule HEK293 trattate con 1 mM H_2O_2 in assenza (sinistra) o in presenza (destra) di prolina 5 mM. La morte cellulare è evidenziata dalla colorazione con tripan blu (da Krishnan *et al.*, 2008).

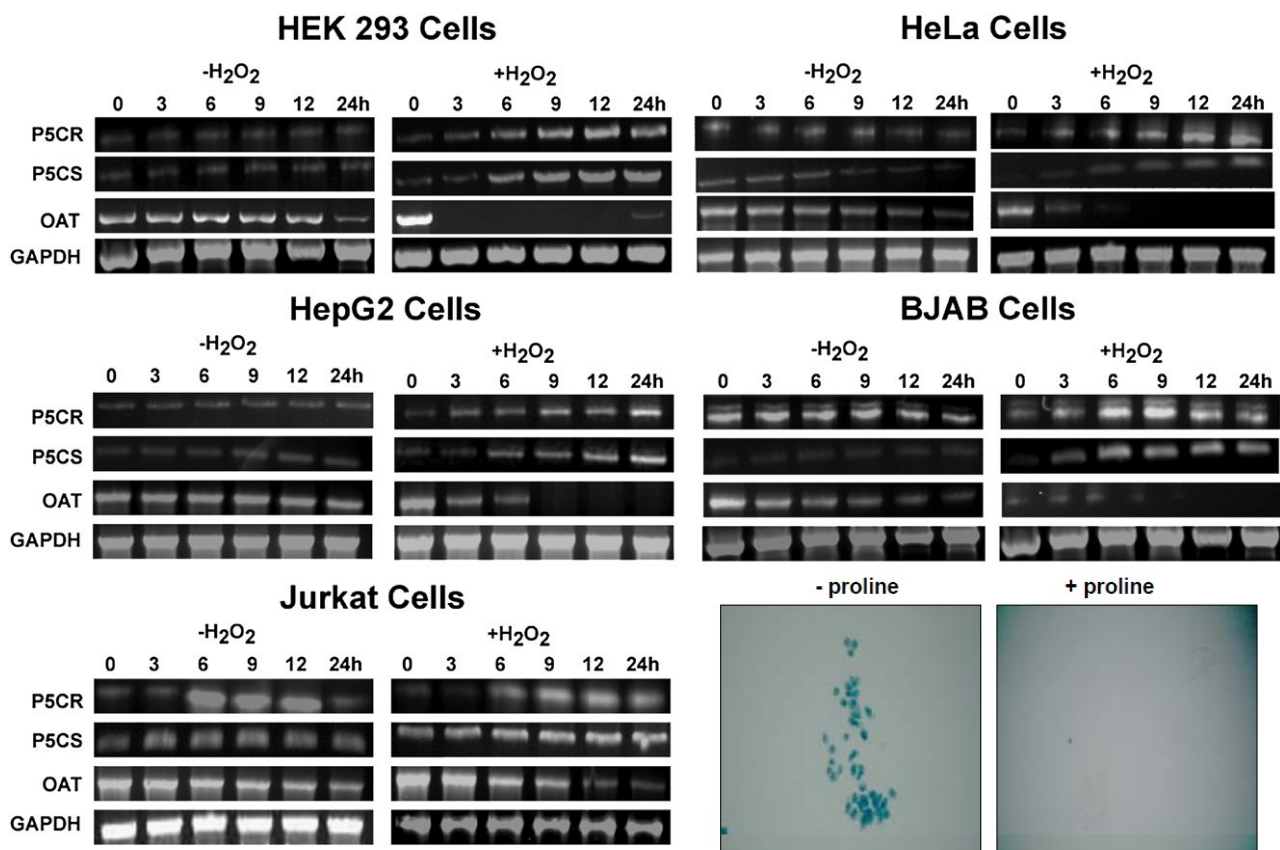
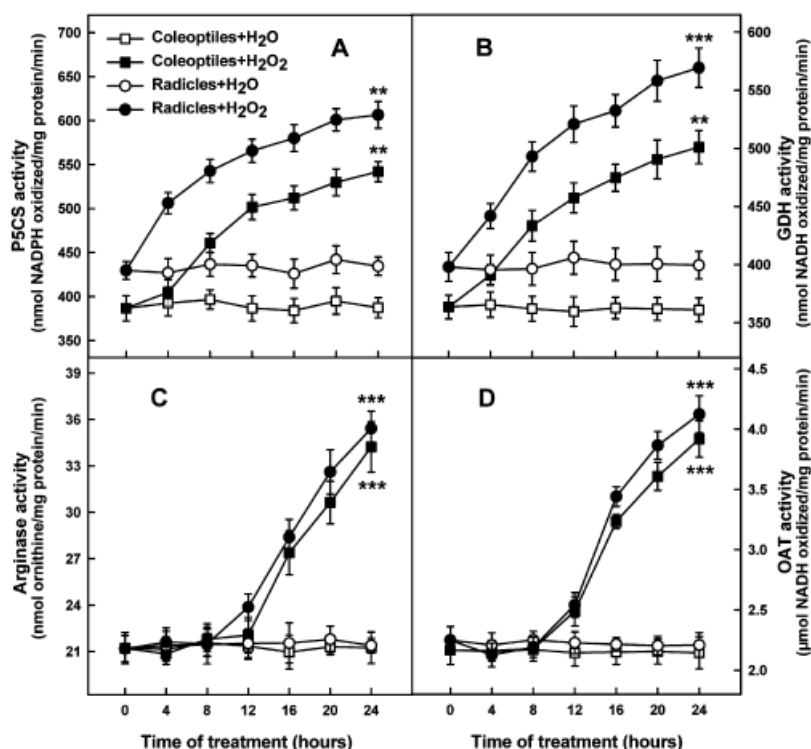


Figura 30. Attività specifiche in coleottili e radici di mais trattati con H₂O₂

In piantine di mais trattate con acqua o con 20 mM H₂O₂ le attività enzimatiche confermano l'attivazione della biosintesi da glutamato (Yang *et al.*, 2009). Si osserva anche una discreta attivazione della via dell'arginina/ornitina, che tuttavia potrebbe confluire nella via del glutamato come è stato proposto da Funck (2008).

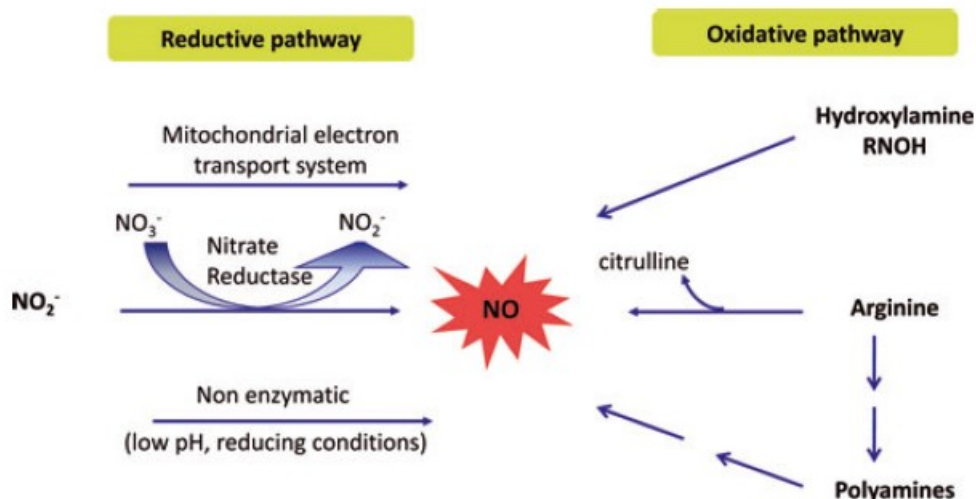


Durante lo stress biotico, la produzione di NO si registra nelle infezioni mediate da patogeni sia biotrofici che neurotrofici, così come in quelle da virus. La sua azione si esplica a diversi livelli, non ancora del tutto delucidati, ed è capace di dirigere diverse risposte: induzione di geni specifici, produzione di ormoni, HR (Asai & Yoshioka 2009, Delledonne *et al.*, 1998, Durner *et al.*, 1998). Nelle piante esistono diversi meccanismi di sintesi dell'ossido nitrico. Anche se non tutti gli enzimi in gioco sono stati individuati e caratterizzati, è stato dimostrato che, analogamente ai sistemi animali, l'NO può essere sintetizzato partendo da arginina (Zeidler *et al.*, 2004, Tischner *et al.*, 2007). Sostanzialmente si possono distinguere due vie: una riduttiva e una ossidativa (Figura 31; Moreau *et al.*, 2010).

Recentemente è stato descritto un accumulo di prolina NO-dipendente. In *Arabidopsis* durante l'acclimatazione al freddo si assiste a produzione di NO e all'accumulo di prolina. Mutanti incapaci di produrre NO in queste condizioni non accumulano prolina. Grazie all'uso di un donatore di NO e un suo scavenger è stato possibile verificare che il mancato accumulo è dovuto specificamente alla deregolazione della *P5CS* e della *PRODH*. Infatti fornendo NO ai mutanti è stato possibile ripristinare il corretto fenotipo, con induzione della *P5CS* e repressione della *ProDH* (Zhao *et al.*, 2009).

Figura 31. Principali vie di sintesi dell'NO

Evidenze dell'esistenza di entrambe le vie, riduttiva e ossidativa, sono state ottenute in piante. L'elettrone necessario per ridurre il nitrito a NO può derivare dalla catena di trasporto degli elettroni ma la sua sintesi può essere mediata anche dalla nitrato reductasi o avvenire spontaneamente in un ambiente acido. Anche se l'enzima responsabile della sintesi ossidativa non è stato fin qui identificato, si ritiene che essa possa procedere a partire da arginina, poliammine e idrossiammine (da Moreau *et al.*, 2010).



Ingegnerizzare il metabolismo della prolina per potenziare la tolleranza a stress

Le conoscenze maturate sino ad oggi sul metabolismo della prolina sono state utilizzate per cercare di incrementare la capacità delle piante di tollerare condizioni di stress. Gli sforzi sono stati indirizzati per lo più alla manipolazione dei livelli di osmoliti compatibili, sulla base dell'assunto che l'aumentata produzione di questi composti possa aiutare la pianta a compiere aggiustamenti osmotici (Hayashi *et al.*, 1997; Holmström *et al.*, 1996; Kavi Kishor *et al.*, 1995; Pilon-Smits *et al.*, 1995; Sheveleva *et al.*, 1997; Tarczynski *et al.*, 1993). L'ingegnerizzazione delle vie metaboliche coinvolte ha, però, restituito successi marginali. Le concentrazioni ottenute, sia costitutive che inducibili, non sembrano essere tali da assicurare un effetto (Morgan, 1984, Kavi Kishor *et al.*, 2005; Maggio *et al.*, 2002).

Nel caso dell'iminoacido, però, considerando che le concentrazioni indotte fisiologicamente a seguito di condizioni di stress sembrano configurare un blando impatto sullo stato d'idratazione della cellula, alcuni autori hanno proposto che il meccanismo alla base dell'effetto protettivo sia in realtà correlato alla capacità di stabilizzare membrane, proteine e strutture subcellulari (Rhodes & Samaras, 1994; Yancey, 1994), o di proteggere la funzionalità cellulare dal danno ossidativo (Bohnert & Shen, 1999). Questo potrebbe consentire l'ottenimento di multiresistenze crociate a stress biotici e abiotici.

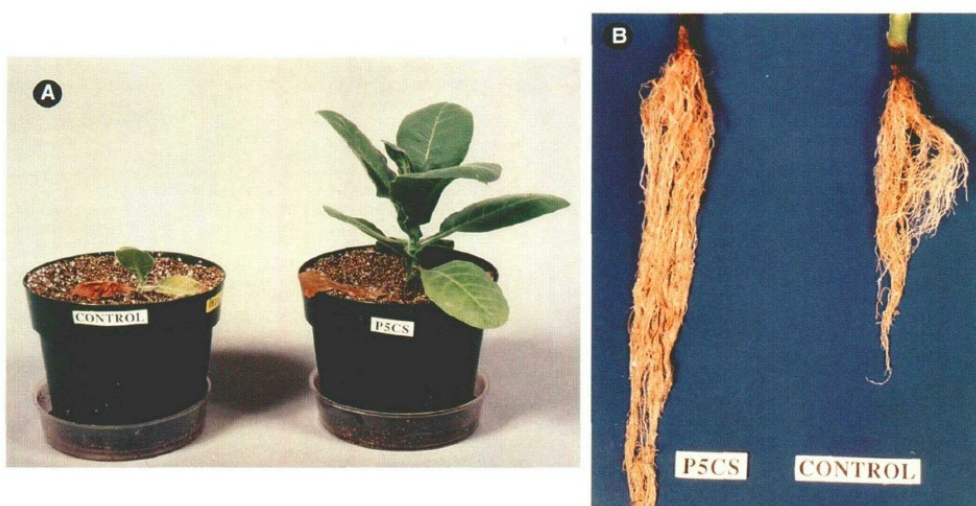
Il primo tentativo volto all'ottenimento di piante transgeniche con alti livelli di prolina e aumentata tolleranza agli stress fu fatta su piante di tabacco ingegnerizzate con il gene per la P5CR di patata. Nonostante che l'attività enzimatica aumentasse di circa 50 volte rispetto al *wild type*, non ne derivò un significativo aumento di prolina libera (La Rosa *et al.*, 1991). Successivamente si capì che l'enzima limitante nella via biosintetica è la P5CS, e che nelle

piante sovraesprimenti la P5CR questo enzima era limitato dalla mancanza di substrato. L'importanza della P5CR venne comunque confermata da esperimenti in cui la sua espressione veniva ridotta tramite tecnologia antisense. Le piante così ottenute avevano un contenuto in prolina più basso e mostravano una maggiore sensibilità allo stress e una più bassa percentuale di produzione di semi (De Ronde *et al.*, 2000).

I primi risultati vennero in seguito ottenuti con il gene *P5CS* isolato da *Vigna aconitifolia* e posto sotto il controllo del promotore 35S del virus del mosaico del tabacco. In piante di tabacco trasformate con il costrutto già in condizioni normo-osmotiche si riscontravano alti livelli di trascritto, accompagnati da un aumento dei livelli di proteina e da un contenuto in prolina libera circa 14 volte più elevato rispetto ai controlli. In condizioni di stress osmotico, però, la differenza diminuiva molto, e le piante transgeniche accumulavano solo il doppio di prolina rispetto al *wild type*, pur essendo più tolleranti al sale (Figura 32; Kavi Kishor *et al.*, 1995). Questo fatto suggeriva l'esistenza di una regolazione stringente del suo accumulo. In effetti studi sull'enzima purificato dimostrarono che la P5CS è regolata allostericamente da prolina, con una concentrazione inibente al 50% pari a 6 mM (Hu *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995). Le piante di tabacco stressate osmoticamente possono però accumulare prolina nel citosol fino a livelli di più di 130 mM (Binzel *et al.*, 1987; Delauney & Verma, 1993). Per spiegare questo paradosso è stato proposto che l'enzima possa subire dei cambiamenti conformazionali e perdere la regolazione a feedback in condizioni di stress (Boggess *et al.*, 1976a, 1976b).

Figura 32. Fenotipo di piante di tabacco *wild type* e sovraesprimenti la *P5CS* di *V. aconitifolia* in condizioni di stress salino

(A) Le piante allo stadio di quattro foglie sono trasferite in vasi di vermiculite contenenti 400 mM NaCl ed esaminate dopo 3 settimane di trattamento. (B) radici di piante di 6 settimane sottoposte a disidratazione fino alla fioritura (da Kavi Kishor *et al.*, 1995).



Piante di tabacco trasformate con il gene di *V. aconitifolia* sottoposto a mutagenesi sito-specifica in modo da eliminare l'inibizione a feedback hanno mostrato di accumulare più prolina rispetto sia al *wild type* che a quelle trasformate con il gene non modificato (Zhang *et al.*, 1995). Anche in altri sistemi, come riso (Zhu *et al.*, 1998), grano (Sawahel & Hassan, 2002) o

pomodoro (Hmida-Sayari *et al.*, 2005), la trasformazione con una *P5CS* posta sotto il controllo di un promotore forte ha prodotto livelli più alti di prolina libera e una conseguente maggiore tolleranza allo stress osmo-salino. Un risultato ancora più marcato è stato ottenuto nel caso della microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. In questo caso l'alga la sovraespressione del gene esogeno induce un aumento dei livelli costitutivi di prolina libera dell'80%, determinando una crescita più rapida e una maggiore resistenza al cadmio (Siripornadulsil *et al.*, 2002).

Se una possibile spiegazione dell'accumulo di prolina inferiore alle attese nelle piante transgeniche può risiedere nell'inibizione da prodotto della *P5CS*, un ulteriore fattore negativo potrebbe essere legato alla sua rapida riossidazione a glutamato (Maggio *et al.*, 2002; Kavi Kishor *et al.*, 2005). Allo scopo di elucidare il ruolo del catabolismo della prolina a questo riguardo, sono state generate linee transgeniche di *Arabidopsis* con aumentata o ridotta ossidazione dell'aminoacido (Mani *et al.*, 2002; Nanjo *et al.*, 1999). Nelle linee trasformate con un costrutto per la *ProDH* in orientamento senso (*AtProDH-S*) non si sono osservati cambiamenti sostanziali nelle concentrazioni di prolina libera, nè nel conseguente livello di osmotolleranza. La somministrazione di prolina esogena migliora però la capacità di tollerare condizioni di stress osmotico (Mani *et al.*, 2002). Dal momento che il catabolismo della prolina potrebbe essere collegato alla respirazione e alla sintesi di ATP, una spiegazione di questo comportamento potrebbe risiedere nella maggiore disponibilità energetica delle linee *AtProDH-S* cui viene fornita prolina esogena. Infatti anche se il catabolismo dell'aminoacido è represso in condizioni di stress, queste linee transgeniche mantengono comunque dei livelli apprezzabili di *ProDH*. Un'altra ipotesi, sulla base di quanto descritto in riso (Iyer & Caplan, 1998), è che nelle piante transgeniche si venga ad accumulare *P5C* e che questo a sua volta funga da secondo messaggero, attivando geni coinvolti nei fenomeni di osmotolleranza. Tali ipotesi al momento, però, non hanno trovato un riscontro sperimentale. Per quanto riguarda piante antisenso, sono stati riportati risultati contrastanti. In esperimenti precedenti (Nanjo *et al.*, 1999) piante *AtProDH-AS* risultavano osmotolleranti. Invece nello stesso studio (Mani *et al.*, 2002) le linee *ProDH-AS* accumulano prolina in condizioni normo-osmotiche a livelli più alti del *wild type* ma non mostrano un aumento dell'osmotolleranza. In uno studio comparativo le due linee antisenso hanno mostrato di accumulare livelli simili di prolina sia in condizioni normo-osmotiche che di stress, ma hanno confermato il diverso comportamento in ambiente salino (Mani *et al.*, 2002).

Oggi, a distanza di quasi venti anni dai primi risultati, non si è ancora arrivati a ottenere piante transgeniche in grado di conciliare una adeguata produttività con una accresciuta tolleranza allo stress. Questo potrebbe essere dovuto al costo metabolico eccessivo di una sovrapproduzione costitutiva di prolina, ma anche all'instaurarsi di un ciclo futile tra sintesi e catabolismo dell'iminoacido. A complicare ulteriormente la comprensione della regolazione del metabolismo della prolina vi sono il complesso e ancora poco conosciuto sistema di trasporto intratissutale e i potenziali effetti tossici legati al catabolismo di questo composto.

SCOPO DEL LAVORO

Con l'intento di arrivare ad una migliore comprensione del ruolo della prolina nella risposta della cellula vegetale allo stress e dei fenomeni di tossicità da essa mediati, si è scelta *Arabidopsis thaliana* come sistema sperimentale. Questa specie è una discreta accumulatrice di prolina e i geni *P5CDH* e *P5CR* sono presenti in singola copia, cosa che semplifica l'analisi di espressione. Inoltre per questa pianta modello sono disponibili una serie di dati molecolari e tutto il suo genoma è stato completamente sequenziato. Esperimenti volti ad approfondire a livello molecolare i meccanismi di tossicità legati alla somministrazione esogena di prolina saranno possibili grazie alla disponibilità di mutanti *p5cdh* di *Arabidopsis* (Deuschle *et al.*, 2001, 2004). In tali sistemi dovrebbe essere relativamente agevole quantificare l'intermedio P5C che, generalmente, è difficilmente quantificabile in campioni biologici a causa della sua breve emivita e alla presenza degli enzimi che lo utilizzano come substrato.

I risultati ottenuti su *Arabidopsis* verranno verificati anche in lievito per cui si dispone di linee isogeniche delete rispettivamente della ProDH (PUT1) o della P5CDH (PUT2). La disponibilità del mutante *put1*, in particolare, dovrebbe permettere di escludere un effetto tossico legato alla prolina di per se. Infatti se la tossicità fosse legata esclusivamente al P5C o al ciclo P5C/Pro questi mutanti, che non possiedono una seconda isoforma della PROD, dovrebbero risultare insensibili.

Puntando al ruolo del P5C come secondo messaggero o effettore della tossicità mediata da prolina, l'indagine biochimica e molecolare sarà prevalentemente incentrata sulla P5CR e sulla P5CDH. In *Arabidopsis* i due enzimi che utilizzano come substrato il P5C sono presenti con una sola isoforma genica. Ad oggi in questa specie vegetale i due enzimi non sono mai stati purificati e caratterizzati. A complicare l'indagine di questi enzimi vi è da una parte una non ovvia corrispondenza tra livelli di trascritto e proteina per la P5CR e dall'altra l'intervenire di meccanismi di RNA *silencing* per la P5CDH (Hua *et al.*, 2001; Borsani *et al.*, 2005). La possibilità di quantificarli con saggi biochimici in estratti grezzi è vanificata dal fatto che i due catalizzano reazioni opposte. Quindi durante il saggio di uno interverrebbe la reazione contraria dell'altro a mascherarne l'attività. Obiettivo intermedio del presente lavoro sarà, quindi, la purificazione e caratterizzazione della P5CR e della P5CDH di *Arabidopsis thaliana*. Se si otterranno quantità sufficienti di proteina pura si intende procedere all'induzione di anticorpi specifici da impiegare in ulteriori indagini.

Se è vero che *Arabidopsis thaliana* ha un ciclo di vita relativamente breve, che le piante di per se occupano poco spazio ed è facile reperire tutta una serie di protocolli ottimizzati, nel presente lavoro si preferisce utilizzare come sistema sperimentale cellule in coltura precedentemente indotte e stabilizzate (Petrollino, 2006). La scelta delle colture cellulari è dettata non solo da problemi di spazio e dalla mancanza di una *green house* presso il nostro laboratorio. Una corretta analisi, infatti, potrebbe essere resa più difficoltosa proprio dalle dimensioni ridotte delle piantine motivo che può, almeno in parte, spiegare

perché le proteine in esame non sono state fin qui purificate. L'uso di piantine, inoltre, renderebbe più difficoltoso indagare la risposta cellulare. In pianta, infatti, esistono meccanismi più complessi responsabili della regolazione dei livelli di prolina nei vari organi (trasporto tra tessuti, meccanismi di esclusione e compartimentalizzazione cellulare) e di conseguenza è difficile se non impossibile conoscere le esatte condizioni (ad es. forza ionica vs osmotica; concentrazioni extra ed intracellulari,) a cui una singola cellula è esposta. Recentemente la disponibilità di sistemi sperimentali alternativi per la quantificazione della resistenza a condizioni di stress realistiche e riproducibili è stata individuata come punto cruciale per gli studi dei meccanismi di tolleranza agli stress (Verslues *et al.*,2006).

La produzione di ROS è un fenomeno che si accompagna in pratica a tutti gli stress. Per questo motivo si indagherà in via preliminare l'effetto di induttori ed *enhancer* dello stress ossidativo sulla trascrizione dei principali geni coinvolti nel metabolismo della prolina nel sistema in esame.

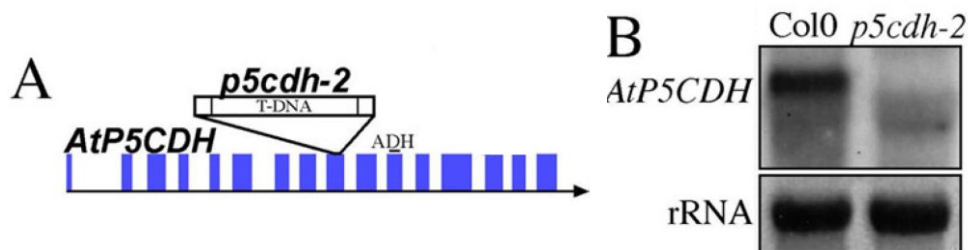
MATERIALI E METODI

Mantenimento delle colture cellulari e condizioni di crescita

I genotipi di *Arabidopsis thaliana* (Columbia) analizzati nel presente lavoro, il ceppo wild type (Col-0; Ath3) e il mutante inserzionale *p5cdh-2* (Salk_018453; Ath4; Figura 32) sono stati gentilmente forniti dal Dott. Dietmar Funck dell'Università di Konstanz (Germania).

Figura 32. Rappresentazione schematica della inattivazione del gene per la P5CDH

A seguito della inserzione del T-DNA di *A. tumefaciens* (A) l'analisi per Northern blot (B) evidenzia la presenza di trascritti a basso peso molecolare, derivanti dall'interruzione del gene (Deuschle *et al.*, 2004).



Le colture cellulari erano state indotte e stabilizzate nel corso di un precedente lavoro (Petrollino, 2006). Esse sono mantenute in beute Erlenmeyer da 500 mL contenenti 100 mL di terreno liquido MS (Tabella 2). Per permettere alle cellule di crescere e di dividersi, le beute sono mantenute in agitazione rotativa a 100 rotazioni al minuto (rpm) con una eccentricità di 3 cm, a una temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e al buio, in quanto l'incubazione in presenza di luce potrebbe determinare la sintesi di pigmenti fotosintetici, causando l'inverdimento degli aggregati cellulari senza che le cellule possano però acquisire un metabolismo autotrofo. Le sospensioni assumono in tal modo un aspetto disperso e omogeneo per la presenza di aggregati cellulari di piccole dimensioni.

Le colture mostrano un accrescimento esponenziale fino a 10-15 giorni dall'inoculo. Oltre questo termine le cellule non si trovano più nelle condizioni ottimali, sia per il progressivo esaurimento dei nutrienti, sia per l'accumulo di cataboliti tossici, e questo provocherebbe prima l'arresto della proliferazione e poi la morte delle cellule, che liserebbero rilasciando nel mezzo metaboliti la cui ossidazione conferirebbe alla coltura un colore brunastro. Le colture sono quindi rinnovate periodicamente ogni 7 giorni, inoculando 25 mL di sospensione in tarda fase di crescita esponenziale in 100 mL di terreno fresco. Nel corso degli esperimenti sono state usate anche beute Erlenmeyer da 100 mL o da 1 L, mantenendo però inalterato il rapporto tra il volume totale e il volume del terreno di coltura per non modificare le condizioni di ossigenazione, e le dimensioni dell'inoculo.

Quando opportuno, le cellule sono state indotte a crescere in terreno in cui, oltre ai composti azotati normalmente presenti (NH_4NO_3 e KNO_3), erano state incluse concentrazioni crescenti dell'amino acido prolina, aggiunto come soluzione 2 M, sterilizzata per filtrazione.

Tabella 2. Composizione del terreno MS per la crescita di cellule di *A. thaliana* (Murashige e Skoog, 1962).

<u>Macronutrienti</u>	mg L ⁻¹	<u>Vitamine</u>	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	Meso inositolo	100
KNO ₃	1900	Glicina	2
KH ₂ PO ₄	170	Tiamina	10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	40	Acido nicotinico	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Piridossina	0,5
Fe-Na EDTA	35	Biotina	0,5
		Acido folico	0,5
<u>Micronutrienti</u>		<u>Ormoni</u>	
H ₃ BO ₃	6,2	Acido 2.4 diclorofenossiacetico	0,5
MnSO ₄ · H ₂ O	22,3	6-benzilaminopurina	0,5
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6		
KI	0,83	<u>Fonte carboniosa</u>	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	Saccarosio	30000
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025		
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,03		

Si porta il pH a 5.8 con KOH e si sterilizza in autoclave a 118°C (0,8 atm) per 20 min

Induzione di condizioni di stress osmotico, salino e ossidativo

T Trattamenti osmotici e salini sono stati ottenuti trasferendo le cellule in terreno di coltura supplementato con concentrazioni crescenti di polietilenglicole (PEG 4000), un composto osmotico non permeante e non tossico, o di NaCl. Il potenziale osmotico risultante dal trattamento è stato calcolato sulle basi delle seguenti equazioni (http://www.brocku.ca/researchers/peter_rand/osmotic/osfile.html#data; Tartari & Forlani, 2008):

$\log P = a + b * (\% \text{ wt})^c$ per il PEG, dove $a = 4.42$, $b = 0.74$, and $c = 0.40$

$P = a + b * m + c * m^2$ per l' NaCl, dove $a = -0.02688$, $b = 1.7045$, and $c = 0.0723$

Per indurre condizioni di stress ossidativo, al terreno è stato aggiunto metil viologeno (MV), anche noto come Paraquat, un potente erbicida che interferisce con le catene di trasporto degli elettroni, e/o acido dietilditiocarbammico (DDC), un chelante degli ioni Cu²⁺ che per questo funge da inibitore delle superossido dismutasi (SOD) Cu/Zn (Bolwell *et al.*, 1998). Questi composti sono stati sciolti in acqua, e le soluzioni sterilizzate per filtrazione.

Estrazione degli aminoacidi liberi

Ai fini della valutazione del contenuto aminoacidico, il materiale cellulare viene filtrato mediante una pompa a vuoto su filtri di nylon con maglie da 50 µm di diametro, pesato, posto in una provetta di vetro temprato (Potter) da 15 mL e risospeso in 1 o 2 mL g⁻¹ di una soluzione al 3% (p/v) di acido 5-sulfosalicilico. L'estrazione delle cellule viene ottenuta per mezzo di un omogeneizzatore meccanico (Teflon-in-glass Potter homogenizer), costituito da un pestello in Teflon mantenuto in rotazione da un motore a velocità variabile, che viene fatto scorrere su e giù nella provetta, di diametro leggermente superiore a quello del pestello. L'estrazione che ne consegue è dovuta principalmente ai fenomeni di cavitazione e agli effetti di vortice che si producono in tal modo all'interno del cilindro. Le cellule sono sottoposte a tre serie di otto colpi

ciascuna; per evitare che subiscano un eccessivo surriscaldamento, provocato dall'attrito esercitato dal pestello sulle pareti interne del tubo, l'omogenato è riequilibrato in ghiaccio al termine di ogni serie. In alternativa, le cellule sono estratte in mortaio con azoto liquido. Una volta ottenuta una polvere molto fine, si aggiunge 1 ml g⁻¹ della soluzione di acido sulfosalicilico.

L'estratto è poi centrifugato per 10 minuti a 14000 g con una centrifuga da banco, ottenendo la sedimentazione delle strutture cellulari e della maggior parte delle proteine che in ambiente acido tendono a precipitare, mentre gli aminoacidi e altre piccole molecole rimangono in soluzione nel supernatante. Quest'ultimo viene prelevato e immediatamente analizzato, oppure conservato a -20°C sino all'utilizzo. Ogni trattamento viene eseguito in triplicato (sono cioè preparati tre estratti indipendenti a partire da cellule cresciute in beute differenti); i dati sono ottenuti calcolando quindi media e deviazione standard per ogni gruppo di campioni.

Misurazione della prolina con il metodo della ninidrina

La determinazione del contenuto in prolina libera è stata eseguita con una modificazione della procedura descritta da Bates e collaboratori (1973), che si basa sulla reazione colorimetrica dell'aminoacido con la ninidrina, con conseguente sviluppo di un prodotto di colore giallo. Una diluizione opportuna di ogni campione, in un volume finale di 75 µL, è trasferita in provette Eppendorf da 1,5 mL e mescolata, in sequenza, con 75 µL di una soluzione 3 M di sodio acetato e 1 mL di reattivo formato da 0,15% ninidrina (p/v) in acido acetico glaciale. La reazione è quindi fatta procedere a 50°C per 15 minuti. I campioni, riportati a temperatura ambiente, vengono letti ad una lunghezza d'onda di 352 nm contro un bianco formato dal prodotto di reazione di 75 µL della soluzione di acido sulfosalicilico. Dai valori di assorbanza ottenuti è possibile risalire alla concentrazione di prolina per interpolazione di una retta di taratura ricavata incubando aliquote contenenti concentrazioni note (da 0.1 a 1.0 mM) dell'iminoacido. Per rendere più accurati i risultati, la procedura è stata ripetuta su almeno tre diverse diluizioni dell'estratto. I valori ottenuti sono stati quindi rapportati all'estratto tal quale, e come dato finale è stata considerata la media dei singoli valori.

Misurazione degli aminoacidi totali con il metodo della ninidrina.

Aliquote diverse in un volume finale di 100 µL di una diluizione opportuna di ogni campione, ottenuto come descritto, sono trasferite in provette Eppendorfs da 1.5 mL e mescolate a 1 mL di reattivo, ottenuto unendo 2 g di ninidrina sciolti in 50 mL di 2-metossietanolo a 80 mg di SnCl₂ in 50 mL di tampone sodio citrato 0,2 M, pH 5.0. Anche questa soluzione deve essere preparata fresca ogni volta, poiché la ninidrina è instabile. Particolare attenzione deve essere prestata inoltre alla sua manipolazione, in quanto alcuni componenti della miscela sono tossici, come il 2-metossietanolo, o possono reagire con le proteine della cute, come la ninidrina; le mani devono quindi essere protette con dei guanti. La reazione viene fatta avvenire a 100°C per 10 minuti. Una volta riportati a temperatura ambiente, i campioni sono letti allo spettrofotometro a 540 nm contro un bianco esatto. Dai valori di assorbanza si risale al contenuto in aminoacidi liberi per interpolazione di una retta di taratura costruita con le

stesse modalità facendo reagire diluizioni opportune di una soluzione equimolare dei 19 aminoacidi proteici. La procedura risulta complicata dal fatto che la miscela deve essere preparata fresca ogni volta, e che anche piccole variazioni di pH possono influire drasticamente sulla sua risposta quantitativa. Il coefficiente di estinzione molare risulta approssimativamente pari a $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Per ovviare a parte di queste difficoltà, se la concentrazione di aminoacidi negli estratti era sufficientemente elevata si è usato il protocollo descritto per la determinazione della prolina. Pur se con minore efficienza, gli aminoacidi reagiscono anche in quelle condizioni con la ninidrina, sviluppando dei prodotti con un massimo di assorbimento a 540 nm. Anche in questo caso la concentrazione è stata estrapolata da una retta di taratura ottenuta con diluizioni note di una miscela contenente 5 mM glutamina, 2 mM aspartico, glutamico e asparagina e 1 mM di tutti gli altri aminoacidi fisiologici (un rapporto quantitativo che si avvicina a quelli riscontrabili all'interno delle cellule vegetali in coltura), con un coefficiente di estinzione molare pari approssimativamente a $2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Anche in questo caso la procedura è stata effettuata ogni volta su almeno tre diverse diluizioni dell'estratto. I valori ottenuti sono stati quindi rapportati all'estratto tal quale, e come dato finale è stata considerata la media dei singoli valori.

Separazione e quantificazione dei singoli aminoacidi per RP-HPLC

Per la determinazione della concentrazione dei singoli aminoacidi si è ricorsi alla loro separazione per cromatografia ad alta pressione (HPLC) a fase inversa (RP) dopo aver proceduto ad una preliminare derivatizzazione al fine di aumentarne la rilevabilità. Dal momento che i livelli intracellulari di numerosi aminoacidi sono comunque inferiori ai limiti di sensibilità del metodo, i campioni sono stati opportunamente concentrati. Aliquote da 1 mL dei diversi estratti in acido sulfosalicilico sono mandati a secco in un apparato (Concentrator 5301, Eppendorf) costituito da una centrifuga collegata ad una pompa da vuoto. Grazie al movimento rotatorio della centrifuga viene aumentata la superficie di evaporazione, permettendo il rapido e completo allontanamento del solvente, diminuendo quindi il rischio di idrolisi per gli aminoacidi labili, quali glutamina e asparagina. Ogni campione liofilizzato è ricostituito pochi minuti prima dell'analisi per risospensione in 0,1 mL di NaOH 2.5 M, così da ottenere un pH compatibile con la successiva procedura di derivatizzazione. Dopo aver centrifugato per 3 minuti a 14000 g con una centrifuga da banco per far sedimentare eventuali residui, un'aliquota da 30 μL del supernatante viene unita ad un uguale volume di reattivo contenente 500 mM o-ftaldialdeide e 500 mM β -mercaptoetanolo in 500 mM borato di potassio, a un pH di 10.4. Dopo un minuto esatto, 20 μL della soluzione sono quindi iniettati in una colonna C-18 Zorbax ODS equilibrata in una miscela costituita dagli eluenti A e B (Tabella 3) in rapporto 59:41. L'eluizione della colonna, mediante un gradiente complesso dal 41 al 100% B (Forlani *et al.*, 2000), viene gestita automaticamente attraverso un apparato (Kontron Data System 450) costituito da un creatore di gradienti, una pompa, una valvola di iniezione e uno spettrofotometro con cella a flusso inserito in serie a valle della colonna, il tutto controllato da un computer. In questo modo è possibile ottenere con precisione il controllo del flusso e il mescolamento dei vari eluenti per la

formazione del gradiente. La separazione dei componenti del campione si ottiene in seguito alla diversa partizione tra la fase stazionaria e la fase mobile della colonna, e i componenti vengono rilevati man mano che fuoriescono per mezzo di un sistema che fornisce e registra le variazioni di voltaggio. In condizioni standardizzate il tempo che intercorre tra l'iniezione del composto nella colonna e la sua eluizione è costante, ed è chiamato tempo di ritenzione. I componenti ignoti di un campione possono essere identificati confrontando i loro tempi di ritenzione con quelli di standard puri analizzati nelle stesse condizioni. È possibile inoltre effettuare un'analisi quantitativa, integrando i picchi corrispondenti e confrontando i valori con quelli ottenuti con concentrazioni note dei vari composti. Tuttavia non è stata utilizzata a questo fine una integrazione automatica, poiché nel cromatogramma compaiono numerosi altri picchi, e l'attribuzione deve essere fatta dal confronto dei profili più che dalla posizione del picco. Spesso inoltre la linea di fondo o la delimitazione dei picchi hanno dovuto essere corrette manualmente.

Tabella 3. Caratteristiche della procedura di separazione degli amino acidi per RP-HPLC

Tipo di colonna:	Zorbax ODS RP-18 da 20 cm, con pre-colonna da 5 mm
Eluente A:	50 mM H ₃ PO ₄ , 50 mM CH ₃ COOH, 2% (v/v) metanolo, 2% (v/v) tetraidrofurano, pH 7.5 con NaOH
Eluente B:	65% metanolo
Flusso:	1.0 mL min ⁻¹
Detector:	analisi diretta per assorbanza a 340 nm

Sintesi chimica e quantificazione dell'acido δ^1 -pirrolin-5-carbossilico.

Dal momento che il P5C non è disponibile commercialmente in forma libera, ma solo come sale di nitrofenilidrazone e a costi elevati, si è proceduto alla sua sintesi chimica da idrossilisina e alla sua purificazione per cromatografia a scambio cationico su colonna di resina Dowex AG50, secondo il protocollo descritto da Williams e Frank (1975). In un tubo di reazione mantenuto a 0°C vengono unite due soluzioni preparate evitando l'esposizione alla luce: la prima è costituita da 600 mg di idrossilisina monocloridrato (insieme di idrossi-DL-lisina e allo-idrossi-DL-lisina) disciolti in 35 mL di acqua; la seconda si ottiene sciogliendo in 50 mL di acqua 664 mg di Na metaperiodato e correggendo il pH a 7.0 con NaOH. Dopo avere mescolato, l'ossidazione dell'idrossilisina viene lasciata procedere per 8 minuti esatti, quindi si elimina il periodato in eccesso mediante aggiunta di 950 μ L di glicerolo 1 M. La reazione è definitivamente bloccata con 5 mL di HCl 1 M, e la soluzione viene portata a un volume finale di 100 mL con acqua. Per purificare il P5C dai composti che permangono dalla miscela di sintesi, il tutto viene caricato su una colonna di Dowex AG50 (WX8, 200-400 mesh).

La resina deve essere preliminarmente riequilibrata attraverso il seguente protocollo:

- ✓ 6 lavaggi con 3 volumi di acqua deionizzata (finché il pH sia maggiore di 6)
- ✓ trattamento con 3 volumi di NaOH 2 N per 30 minuti in agitazione

- ✓ 7 lavaggi con 3 volumi di acqua deionizzata (finchè il pH sia minore di 8)
- ✓ trattamento con 2 volumi di HCl 2 N per 30 minuti in agitazione
- ✓ 7 lavaggi con 3 volumi di acqua deionizzata (finchè il pH sia maggiore di 6).

La resina così trattata viene impaccata in una colonna di 2.5 cm di diametro in modo da ottenere un *bed-volume* di circa 50 mL, lavata con 100 mL di acqua distillata a un flusso di 60 mL h⁻¹ mantenuto mediante una pompa peristaltica in uscita, e riequilibrata a 4°C. La miscela di reazione viene caricata sulla colonna al medesimo flusso. La resina viene quindi lavata con 50 mL di HCl 0.5 N, raccogliendo un'unica frazione, e l'eluizione viene avviata in condizioni isocratiche per passaggio di HCl 1 N, raccogliendo frazioni da 6 mL mediante un collettore automatico di frazioni. Formaldeide e iodato vengono immediatamente rilasciati dalla colonna, seguiti dal P5C, mentre l'ammonio e l'idrossilina che non ha reagito vengono trattenuti.

Analogamente a quanto descritto per la prolina, anche per verificare la presenza di P5C può essere adottata la modificazione del metodo della ninidrina (Williams & Frank, 1975) su aliquote da 5 µL di ogni frazione portate a 75 µL con HCl 1N: il trattamento a 50°C in ambiente acido consente la formazione di un prodotto dal colore rosso brillante, con un massimo di assorbanza a 535 nm e un coefficiente di estinzione molare di 4600 M⁻¹ cm⁻¹. Le frazioni aventi un contenuto di P5C maggiore di 10 mM vengono unite tra di loro e la soluzione così ottenuta sterilizzata per filtrazione e conservata a 4°C. Vista la stabilità del composto in HCl 1 N, questo permette di conservarlo per diversi mesi senza una decomposizione significativa. Immediatamente prima dell'utilizzo, un'aliquota della soluzione viene di volta in volta neutralizzata con quantità opportune di KOH 1 M.

Questo protocollo di quantificazione però non può essere adottato nel caso di estratti cellulari, dove la presenza di elevate concentrazioni di altri aminoacidi interferisce con la lettura a 535 nm. Inoltre il P5C risulta fortemente instabile in ambiente neutro, per cui anche l'estrazione del materiale cellulare deve essere leggermente modificata. È stato pertanto utilizzato un metodo specifico basato sulla reazione dell'iminoacido con l'o-aminobenzaldeide (oAB). Il materiale cellulare viene risospeso e estratto in 1 mL g⁻¹ di HCl 50 mM. Dopo centrifugazione 10 min a 4°C a 14000 g, diluizioni opportune del supernatante in un volume finale di 800 µL sono unite a 400 µL di una soluzione 1 mg mL⁻¹ di oAB in etanolo assoluto. La soluzione deve essere preparata fresca ogni volta, mantenendo in ghiaccio la confezione del prodotto e agendo con rapidità, dal momento che questa sostanza a temperatura ambiente tende a polimerizzare, inattivandosi. Dopo 20 min dall'aggiunta, i campioni sono centrifugati 3 min a 14000 g e letti ad una lunghezza d'onda di 444 nm contro dei bianchi esatti, costituiti da repliche ottenute aggiungendo a ogni campione del solo etanolo. Ai valori così ottenuti viene sottratto quello ricavato leggendo contro acqua una diluizione 1:3 della soluzione di oAB. La concentrazione di P5C viene quindi calcolata sulla base del coefficiente di estinzione molare 2710 M⁻¹ cm⁻¹ (Williams & Frank, 1975).

Test di vitalità cellulare di Evans

Al fine di valutare la quantità di cellule vitali e non vitali presenti in un dato momento in una coltura cellulare, si è impiegato un test di vitalità basato sull'assorbimento selettivo da parte delle cellule morte del colorante Blu di Evans (Delledonne *et al.*, 1998). Aliquote opportune della coltura sono filtrate come descritto, lavate con acqua distillata e pesate. Mentre il resto del materiale viene utilizzato per determinare il rapporto tra peso fresco e peso secco, quantità di cellule corrispondenti a 50-100 mg di peso fresco sono trasferite in provette Eppendorf da 1,5 mL e risospese in 1 mL di tampone 0,2 M potassio fosfato, pH 6.5. A ogni campione vengono aggiunti 20 μ L di una soluzione acquosa al 2.5% (p/v) di Evans' Blue, e si incuba per 15 min a T ambiente, rimescolando di tanto in tanto. Le cellule sono quindi sedimentate per centrifugazione 3 min a 14000 g; il supernatante viene eliminato, mentre le cellule sono risospese in 1 mL di acqua distillata. Il procedimento viene iterato in modo da eliminare l'eccesso di colorante che non si è complessato al materiale cellulare, fino a che il supernatante non risulti più colorato. Il colorante complessato alle cellule morte viene allora solubilizzato risospesando le cellule in 1,2 mL di soluzione decolorante (50% [v/v] metanolo e 1% [p/v] sodio dodecil solfato [SDS]) per 15 min a 50°C. Dopo aver centrifugato, il supernatante ottenuto viene diluito 1:5 con acqua, e letto allo spettrofotometro a 600 nm contro un bianco esatto. Come controllo negativo (cellule vive) vengono usate colture raccolte nella fase di crescita esponenziale. Come controllo positivo (cellule morte) si utilizzano colture trattate per 30 min con NaClO 1%, o trattate per 90 sec in forno a microonde alla massima potenza. I dati, media \pm SD di tre repliche, sono espressi come unità ottiche (UO) di colorante g^{-1} di cellule (peso secco).

Test di riduzione del nitroblu tetrazolio

La vitalità cellulare è stata valutata anche mediante quantificazione dell'attività deidrogenasica, introducendo alcune modificazioni nel protocollo descritto da Csató *et al.* (1980). Da ogni beuta, ai tempi stabiliti, si prelevano 6 mL di coltura che vengono divisi in tre aliquote che sono a loro volta distribuite in tubi prepesati da 10 mL con tappo a vite. Durante il prelievo i tubi sono mantenuti in agitazione nelle stesse condizioni di crescita delle colture. Ai campioni si aggiungono quindi 20 μ L di una soluzione di nitroblu tetrazolio (NBT) 1% (p/v) in acqua distillata, preparata fresca ogni volta e schermata dalla luce. La reazione viene lasciata procedere per 30 min, quindi si eseguono due lavaggi con 10 mL di terreno di coltura, evitando di prelevare le cellule ma mantenendo una elevata velocità di esecuzione. Dopo l'ultimo lavaggio si centrifugano le cellule 2 min a 2000 g e si rimuove tutto il liquido. Sotto cappa chimica, i campioni vengono quindi estratti per almeno 3 h in agitazione a RT in 1,5 mL di cloroformio:metanolo (1:1). Dopo ulteriore centrifugazione per 5 min, il solvente viene letto a 515 nm in uno spettrofotometro appositamente collocato sotto cappa chimica, contro un bianco costituito dalla sola soluzione di estrazione. Una volta estratte, le cellule vengono lasciate asciugare sotto cappa tutta notte prima della determinazione del peso secco. La quantità di NBT ridotto è espressa come UO_{515} per mg di cellule.

Esperimenti complementari con *Saccharomyces cerevisiae*

I ceppi isogenici di lievito in cui i due enzimi della via catabolica dell'imino acido risultano non più funzionali (w.t., *prodh* [MB329] e *p5cdh* [MB331]), cortesemente forniti dalla Dott.ssa Marjorie Brandriss (New Jersey Medical School, USA), vengono mantenuti su terreno YEPD agarizzato (12‰; Tabella 4). A crescita avvenuta, le piastre sono conservate a una temperatura di 4°C per rallentare la perdita di vitalità cellulare. Ogni 3-4 mesi essi vengono rivitalizzati prelevando sterilmente dalla piastra madre un inoculo che viene strisciato con un'ansa sterile su terreno massimo fresco, incubando poi a 30°C per 48-72 h. Ogni volta che si voglia disporre di una coltura in attiva proliferazione, i ceppi vengono rivitalizzati con la seguente procedura. Un inoculo proveniente da una colonia singola isolata sulla piastra madre viene strisciato su terreno massimo agarizzato fresco e incubato a 30°C per 48 ore. Alcune colonie singole isolate in tal modo vengono stemperate in un piccolo volume di terreno liquido YCB (Tabella 4) contenente ammonio solfato come fonte di azoto. Dal momento che oltre alla incapacità di ossidare la prolina i ceppi sono caratterizzati da un genotipo *Ura⁻Trp⁻*, per permetterne la crescita in terreno minimo devono essere aggiunti anche triptofano e uracile, che sono sciolti ciascuno in acqua a 50°C a 5 mg mL⁻¹, e sterilizzati per filtrazione. La soluzione così ottenuta viene aggiunta in ragione di 1/100 del volume finale nel terreno già sterile, in modo da ottenere una concentrazione finale di 50 mg L⁻¹.

Tabella 4. Composizione dei terreni per la crescita di *Saccharomyces cerevisiae*

<u>Terreno massimo (YEPD)</u>		<u>Trace elements</u>	
<i>Composto</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>Composto</i>	<i>µg l⁻¹</i>
Estratto lievito	10	H ₃ BO ₃	500
Peptone	20	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	40
		KI	100
pH automatico intorno a 6.5.		FeCl ₃ * 6 H ₂ O	200
Sterilizzazione 121°C per 20 min;		MnSO ₄ * 1 H ₂ O	400
quindi aggiunta di 40 ml L ⁻¹ di glucosio		Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	200
50% sterilizzato a vapore fluente.		ZnSO ₄ * 7H ₂ O	400
<u>Terreno minimo (YCB)</u>		<u>Vitamine</u>	
<i>Composto</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>Composto</i>	<i>µg l⁻¹</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	Biotina	2
KH ₂ PO ₄	1.0	Calcio pantotenato	400
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.5	Acido folico	2
NaCl	0.1	Inositolo	2000
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.1	Acido nicotinico	400
Istidina * HCl * H ₂ O	0.001	A. <i>p</i> -aminobenzoico	200
Metionina	0.002	Piridossina * HCl	400
Triptofano	0.020	Riboflavina	200
Trace elements	100 µl	Tiamina * HC1	400
Vitamine	100 µl		

Trace elements e Vitamine sono aggiunte come soluzione concentrata 10.000X. Il pH è automatico, intorno a 4-5 (il lievito è acidofilo). Si sterilizza a 121°C per 20 min; quindi si aggiungono 20 ml l⁻¹ di glucosio 50% sterilizzato a vapore fluente.

La sospensione ottenuta è usata per inoculare beutine da 100 mL contenenti 20 mL dello stesso terreno, che sono incubate su un agitatore rotativo (150 rpm), con una eccentricità di 3 cm ad una temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita. Da questa coltura viene prelevato un opportuno volume con cui viene effettuato l'inoculo delle colture richieste per le diverse determinazioni. Dove richiesto, il terreno viene addizionato con concentrazioni crescenti di L-prolina. Le colture sono incubate come descritto fino a quando la crescita cellulare non giunge nella fase di tarda crescita esponenziale, corrispondente ad una assorbanza di 1.3-1.5 a 600 nm. Per la valutazione della costante di crescita e del tempo di generazione nelle diverse condizioni sperimentali, la crescita viene determinata attraverso il prelievo in condizioni sterili di aliquote di coltura di cui viene misurata la densità ottica a 600 nm, ma in modo che il succedersi dei prelievi non influenzi in modo significativo il volume della coltura stessa. Con la trasformata logaritmica dei valori di assorbanza in tal modo ottenuti si costruisce un grafico in funzione del tempo applicando le formule riportate in basso si calcolano il tempo medio (G) e la velocità (K) di generazione.

n =numero di generazioni; t =tempo; N_t = numero di colonie al tempo t ; N_0 = numero di colonie al tempo zero; G = tempo medio di generazione, K = velocità di generazione.

$$N_t = 2^n N_0 \text{ allora } n = \log N_t - \log N_0 / \log 2 \text{ cioè } n = \log N_t - \log N_0 / 0,3010$$

$$G=t/n \text{ e } K=1/G$$

Analisi dei livelli di espressione genica (*Northern blot analysis*)

L'analisi di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina (*P5CS1, P5CS2, P5CR, ProDH1, ProDH2, P5CDH e OAT*) è stata condotta presso l'Università di Konstanz. Le sonde specifiche (Tabella 5), costituite da RNA a singola elica in cui l'UTP è coniugata con la digossigenina (DIG, uno steroide di origine vegetale), sono state gentilmente messe a disposizione dal Dott. Dietmar Funck.

Tabella 5: Schema delle sonde utilizzate negli esperimenti di northern blot.

Le sequenze dei primers sono sottolineate, le sequenze a lettere maiuscole rappresentano le sequenze codificanti mentre le lettere minuscole sono le regioni non tradotte (UTR).

P5CS1-probe (C-terminus + 3'UTR):

AATGAGAGGAAAAGGACAAGTTGTCGACGGAGACAATGGAATTGTTACACCCATCAGGACATCCCA
TCCAAGCTTAAacaagactccgagtgtgtgtgtgtattgttgtagacttgaggagagacacagaggaggatgggctttttgttctcCTCT
GCTTAGTACTCATATCCTATC

P5CS2-probe (3'UTR):

TAGTTCTCTCTTTCTCTGCTGATGcatattatgttttacaattatgattgaagttttcccccTttacataggatatagtgttctctgaggtt
gtaccatcataagaagatctcattacttaagtggtctttgataataGTGAAATGTTTAGCAGCTTCTCTTC

P5CR 5' probe:

gagtcgactagtGGAGATTCTCCGATTCCGGCGGAGAGTTTCAAGGTAGGATTCATCGGAGCTGGTAAAA
TGGCGGAGAGTATAGCTAGAGGTGTGGTTGCTTCCGGTGTGCTTCTCCTAATCGTATATGCACCGC
CGTTCACTCAAATCTCAATCGCCGTGATGTCTTGAATCCTTTGGCGTCAATGTCTTCTCCACTAGCG
AAGAAGTTGTTAAAGAAAGCGATGTTGTCATATTCTCTGTGAAACCTCAAGTTGTTAAGAAGGCTGTCA
CAGAATTAAGTGAAGCTTTCAAAGAATAAGATTCTGGTTTCTGTTGCAGCTGGAATCAAGTTGAATG
ATTTACAGGAATGGTCTGGTCAAGATCGATTCATAAGGGTGTGCTAATACACCTGCCGCTGTTGGT
GAGGCAGCTTCA

ProDH1-probe (N-terminus):

CACCataATGGCAACCCGTTCTCCGAACAACTTTATCCGGCGATCTTACCGTTTACCCGCTTTTAG
CCCGGTGGGTCTCCACCGTGACTGCTTCCACCGCCGTGCTCCCGGAGATTCTCTCTTTGGACAA
CAAGCACCGGAACCACTCTTACCACCCAAAACCACTGAGCAATCTCACGATGGTCTCGATCTCTC
CGATCAAGCCCGTCTTTTCTCTCTATCCCAACCTCTGATCTCCTCCGTTCCACCGCCGTGTTGCATG
CGGCGGCGATAGTCCATGGTGCACCTAGGGACGTGGGTGATGAGCTCTAACTTATGGACGCTTC
CGTGACGCGTGGCATGGTTTTAGGGCTTGTGAAAAGTACGTTTTATGACCAT

ProDH2-probe (N-terminus):

caccataATGGCAAACCGTTTCTCCGACCAAACCTCATCCACCGTTTCTCCACCGTGAGTCCCGTCGGT
CCTCCGACCACCATCATCCAGAAATCCTTCTTTGACCAACCAAACCAGAAAGTTGATCTAGATCT
CTCCGACCAAGCTCGACTCTTTGCTTCTGTCCCAATCTCCACCCTCCTCCGCTCAACCGCAATTCTCC
ATGCCACGTCCATAGGCCCTATGGTGCATCTTGGCTCGTGGTGCATGAGTTCCAAGCTCATGGACAC
GACCGTTACACGCGATCTAGTACTCCGTATCGTGAAGGAACGTTTTACGACCATTTCTGCGCCGGT
AAGACGCGGCTGCCGACGAAGGCGCGTGAGTAGCGTGTATGAGTC

P5CDH-probe (internal part):

TGGACAGAAGTGTTCTGCACAGTCTATGCTTTTTGTTTCATGAGAACTGGTCAAAAACCCCTTTGTTTT
CAAATTAAGAACTAGCGGAAAGACGCAAACCTGGAAGACTTAACCATTGGTCTGTCTTACATTTA
CAACTGAGGCAATGTTGGAGCACATGGAGAATCTGCTTCAGATTCCTGGCTCAAAGCTACTCTTTGGT
GGCAAGGAATTGAAGAATCATTGATTCTTCAATCTACGGAGCTTTGGAGCCAACTGCAGTTTATGT
TCCCATTGAAGAAaTCTTGAAGGATAATAAAACCTACGAACTCGTCACCAAAGAAATCTTTGGACCATT
TCAGATTGTAACGGAATACAAAAGGATCAACTTCCCTCTAGTGTGGAAAGC

Oat-probe (internal part, see Funck et al., 2009):

GCTTTCATGGACGTACATTAGCAATTGTTCCATGAGTTGTGACAATGATGCTACTCGTGGATTCGGG
CCATTGTTGCCAGGGAATCTTAAAGTTGATTTTGGTGATGCGGATTCACCTTGAGAAAATCTTTAAAGAA
AAGGGAGATAGAATAGCGGGATTTCTATTGAGCCTATTCAAGGCGAAGCTGGAGTTATTATTCCTCC
CGACGGTTACTTGAAAGCTGTTAGAGAACTCTGCACAAAATACAATGTTTTGATGATAGCGGATGAAG
TACAAAGCGGTCTGGCTAGATCCGGGAAGATGCTAGCTTGTGATTGGGAAGAAATTCGTCCTGACAT
GGTGATACTTG

Colture cellulari nelle opportune fasi di crescita sono filtrate sotto vuoto e lavate con abbondante acqua distillata per eliminare completamente il terreno di crescita. Aliquote da 50-100 mg di cellule sono immediatamente congelate in azoto liquido. Il materiale cellulare è macinato in mortaio in presenza di azoto liquido fino all'ottenimento di una polvere molto fine. La polvere ancora congelata è trasferita in una provetta Eppendorf da 2 mL contenente 1 mL di TriFast™ (peqLab), soluzione contenente fenolo e guanidina tiocianato. Dopo aggiunta di cloroformio, essa si separa in tre fasi che possono essere utilizzate per separare dallo stesso campione RNA (fase acquosa), DNA (interfase) e Proteine (fase organica). Dopo una incubazione di almeno 5 min a RT, i campioni sono centrifugati per 3 min a 14000 g. Il supernatante viene trasferito in un'altra eppendorf contenente 200 µL di cloroformio, e si rimescola vigorosamente per 15 sec. Dopo centrifugazione per 5 min a 14000 g, la fase acquosa viene recuperata e incubata per 5-15 min in una provetta Eppendorf da 1,5 mL contenente 500 µL di isopropanolo. L'RNA così precipitato viene sedimentato centrifugando per 10 min a 14000 g; il pellet viene lavato due volte con 70% etanolo *RNAase free*, asciugato sotto cappa chimica per un paio d'ore, e infine conservato a -20°C.

Al momento dell'analisi i pellets vengono risospesi in 40-80 µL di tampone Tris₁₀EDTA₁ (TE, 10 mM Tris pH 8 e 1 mM EDTA) *RNAase free* e, per facilitare la completa dissoluzione, trattati per 10 min a 65°C e subito raffreddati in ghiaccio. Una centrifugazione a 4°C per 5 min a 14000 g viene utilizzata per verificare che i pellets si siano completamente dissolti. Per ogni campione si prelevano 2 µL che sono diluiti in 98 µL di H₂O *RNAase free* per determinare la concentrazione e la qualità dei preparati. Per calcolare la prima l'RNA viene letto a 260 nm e si applica la formula:

$$C = A_{260} / (\epsilon * l) = A_{260} * 40 \text{ ug/ml dove } \epsilon = 25 (\mu\text{L} / \mu\text{g} / \text{cm}) \text{ ed } l = 1 \text{ cm}$$

Per valutare la seconda i campioni vengono letti anche a 280 nm, e l'integrità e la mancanza di contaminazione da parte di DNA viene valutata in base al rapporto A_{260} / A_{280} : valori accettabili di questo indice sono compresi tra 1,6 e 2. Sulla base della concentrazione risultante vengono effettuate appropriate diluizioni in TE per standardizzare tutti i campioni a una concentrazione di 1,5 µg µL⁻¹. Una volta eseguite le diluizioni, si determinano nuovamente e accuratamente le concentrazioni reali dei campioni. Sulla base di queste misure si calcola il volume da prelevare per ottenere 15 µg di RNA. Ogni campione viene trattato per 15 min a 55°C in presenza di una miscela di *loading* (tabella 5), riequilibrato in ghiaccio e analizzato su gel di agarosio, preparato come descritto in tabella 5, immerso in tampone MEN e posizionato sotto cappa chimica.

La corsa elettroforetica viene avviata applicando una corrente di 100 V (3V cm⁻¹) e lasciata procedere per circa 3 h. Al termine della corsa il gel viene fotografato agli UV per visualizzare qualità quantità dell'RNA prima del trasferimento per capillarità su una membrana di nylon. Nell'apposito apparecchio (Tuboblotter, Whatman®) si assembla un *sandwich* costituendo prima una base asciutta formata da 4 tovaglioli di carta assorbente comune di dimensioni poco più grandi del gel e da 2 fogli di carta 3M. Tutte le restanti componenti sono equilibrate in tampone 10 X SCC. Su questa base vengono aggiunti 3 fogli sottili di carta 3M e

su di essi è posizionata delicatamente la membrana di nylon (cat.10416085, Whatman®). Su questa viene posizionato il gel, facendolo aderire delicatamente e cercando di evitare la formazione di bolle che ostacolerebbero il trasferimento. Il gel viene ricoperto con altri 3 fogli di carta 3M sottile prima di posizionare il ponte che, in contatto con il tampone di trasferimento presente nella sommità dell'apparecchio, consente il trasferimento per capillarità, che è lasciato procedere per tutta la notte.

Tabella 6: Composizione dell'RNA-Gel e dei tamponi utilizzati nella procedura di Northern Blot.

RNA-Gel

Agar 2,5 g
H₂O 150 mL
10XMEN 20 mL
Formaldeide 40 mL

Mix di loading

15 µL di RNA (15 µg)
15 µL formamide
7,5 µL formaldeide
5 µL 10X MEN
0,2 µL etidio bromuro (1 µg)
4,5 µL Blumarker

Blumarker

50% glicerolo
1mM EDTA
0,25% Blu di bromofenolo

Tampone 10X MEN

MOPS 200 mM
NaAcetato 50 mM
EDTA 10 mM
pH 7

Tampone 20X SCC

NaCl 3 M
Citrato di sodio 0,3 M

Tampone High-SDS-Hybridization

SDS 7%
formammide 50%
SCC 5X
Blocking reagent 2%
Na fosfato pH 7 50 mM
N-Lauroilsarcosina 0,1%

Blocking reagent 10%

10 g di polvere in 100 mL tampone acido maleico sterilizzato a 121°C 20 min

Tampone acido maleico

Acido maleico 100 mM
NaCl 140 mM
pH 7.5 con NaOH, sterilizzato a 121°C 20 min.

Tampone per fosfatasi alcalina

Tris 100 mM
NaCl 100 mM
pH 9,5, sterilizzato a 121°C 20 min.

Al termine del trasferimento, l'RNA viene fissato sulla membrana mediante un trattamento per 1 min con UV a onda corta, che provoca la formazione di legami crociati tra l'RNA e la membrana. A questo punto viene presa una nuova istantanea della membrana per visualizzare la qualità del trasferimento e standardizzare le quantità di RNA. La membrana viene trasferita in un tubo per ibridazione e incubata in rotazione per almeno 5 h a 42°C in presenza di 20 mL di High-SDS-Hybridisation buffer (Tabella 6). Terminata la fase di pre-ibridazione, si rimuove il liquido e viene aggiunta la sonda specifica, precedentemente denaturata per 10 min a 68°C. L'incubazione viene protratta over-night a 42°C in rotazione continua, a eccezione della sonda per la P5CS2 che richiede una temperatura più bassa, 35°C. Terminata l'ibridazione si effettua una serie di lavaggi con modalità che risultano critiche ai fini della buona riuscita dell'analisi, e che sono riassunti in Tabella 7.

La membrana viene trasferita in una piastra di vetro, equilibrata per 2 min in tampone maleico + 0,3% Tween 20, e bloccata per più di 1 h in 25 mL di 1% Blocking reagent in tampone maleico (Tabella 5). Si aggiunge quindi direttamente alla piastra l'anticorpo anti-DIG coniugato con fosfatasi alcalina diluito 1:20000 (1,25 µL della soluzione stock, Roche cat. 11093274910) e si incuba per 30 min a RT in agitazione. Per lo sviluppo la membrana è posizionata tra due foglietti di plastica trasparenti in presenza di 400 µL di tampone per fosfatasi alcalina e 4 gocce di CDP-Star (Roche, il substrato chemiluminescente). Il tutto è sigillato mediante un apparato da vuoto e il foglietto posizionato in una cassetta di sviluppo. In camera oscura una lastra fotografica viene fatta aderire al foglietto ed esposta per il tempo desiderato prima dello sviluppo. Generalmente si esegue una prima esposizione di 10 min e, sulla base del risultato ottenuto, si decide se esporre più o meno le successive lastre. In questa scelta si tiene conto del fatto che la fluorescenza aumenta nei primi 20 min per poi decrescere progressivamente. Una volta ottenuto il risultato, la membrana è lavata 2 min in SCC 2X e conservata a -20°C. Prima di procedere ad una nuova ibridazione si esegue una rapida procedura di *strippaggio* che prevede un trattamento di 5 min a 95°C in tampone 10 mM Tris-HCl, pH 8, contenente 0,1% SDS, cui seguono tre lavaggi in acqua e altri due da 20 min in 2X SCC a RT prima di poter riprendere il protocollo dalla preibridazione.

Le lastre dei vari blots sono state digitalizzate mediante uno scanner: le immagini così acquisite sono state rielaborate con un programma di analisi di immagini (ImageJ 1.42q; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). L'analisi densitometrica è stata eseguita standardizzando i picchi sulla base dell'RNA totale caricato.

Tabella 7. Schema dei lavaggi necessari per le varie sonde

	<i>Primo lavaggio</i>	<i>Secondo lavaggio</i>		
	<i>10 min RT (x2)</i>	<i>T</i>	<i>15 min</i>	
PRODH1	2X SCC	65°C	0,5X SCC	x2
PRODH2	2X SCC	65°C	0,5X SCC	x2
OAT	2X SCC	65°C	0,5X SCC	x2
P5CDH	2X SCC	65°C	0,5X SCC	x2
P5CS1	2X SCC	60°C	0,5X SCC	x2
P5CS2	2X SCC	35°C	2X SCC	x1
P5CR	2X SCC	65°C	0,5X SCC	x2

Preparazione degli estratti cellulari per la valutazione di attività enzimatiche

Colture cellulari nelle opportune fasi di crescita sono filtrate e lavate con abbondante acqua distillata per eliminare completamente il terreno di crescita. Una volta pesato, il materiale viene risospeso in 1 mL g⁻¹ di tampone di estrazione, generalmente tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 0,5 mM EDTA e 0,5 mM ditioneitolato (DTT), e omogenato in Potter come descritto. All'omogenato sono immediatamente aggiunti 20 mg g⁻¹ di polivinil polipirrolidone (PVPP), un composto che adsorbe i polifenoli che possono formarsi a contatto con l'ossigeno atmosferico per polimerizzazione di monomeri presenti all'interno della cellula vegetale, e che sono potenzialmente dannosi poiché possono portare all'inattivazione di molti enzimi. Essendo insolubile, il PVPP può essere in un secondo tempo facilmente rimosso. L'omogenato è quindi centrifugato per 10 minuti a 14000 g in una centrifuga refrigerata a 4°C, in modo da far sedimentare gli elementi di grande dimensione, come cellule ancora integre, pareti cellulari e organuli. Il supernatante ottenuto contiene la frazione proteica solubile e costituisce l'estratto grezzo, che viene frazionato con ammonio solfato.

Frazionamento con ammonio solfato

Grazie alle sue caratteristiche, questo sale consente di effettuare una precipitazione frazionata, ottenendo una parziale purificazione di una proteina di interesse: è infatti molto solubile in acqua, disponibile a un alto grado di purezza, non è costoso ed è privo di effetti indesiderati sulla struttura delle proteine. Quando aggiunto all'estratto grezzo esso provoca un innalzamento della forza ionica del mezzo che favorisce l'interazione proteina-proteina rispetto alle interazioni proteina-acqua o proteina-sale, diminuendone la solubilità e provocandone la precipitazione (fenomeno definito come *salting-out*). Alcune proteine precipitano a basse concentrazioni di sale, altre richiedono concentrazioni vicine a quelle saturanti. Il taglio successivo con concentrazioni opportune di questo sale consente l'eliminazione di buona parte delle proteine presenti nell'estratto e il recupero quasi integrale di quella di interesse.

In alternativa questa metodica può essere utilizzata per allontanare dall'estratto grezzo i piccoli soluti rimasti nel supernatante, ottenendo allo stesso tempo una concentrazione del campione. A questo fine una quantità di ammonio solfato (436 mg mL⁻¹) pari al 70% di quella contenuta nella soluzione satura a 0°C è disciolta negli estratti grezzi mantenuti in ghiaccio, provocando la precipitazione non selettiva della maggior parte delle proteine. Queste sono sedimentate per centrifugazione 10 minuti a 14000 g; il sedimento ottenuto può essere quindi risospeso nel volume di tampone desiderato.

Determinazione del contenuto proteico di un estratto cellulare

Il metodo che è stato utilizzato per valutare il contenuto proteico di un estratto è quello descritto da Bradford (1976), che sfrutta la capacità del reattivo Blue di Coomassie di complessarsi con le proteine secondo modalità non ancora del tutto chiarite, producendo un complesso colorato con un massimo di assorbimento a 595 nm. La variazione di assorbanza a questa lunghezza d'onda permette di risalire al contenuto proteico di una soluzione incognita

mediante una relazione quantitativa che deve essere determinata attraverso la taratura di ogni preparazione di reattivo. La miscela colorimetrica viene preparata sciogliendo 100 mg di Coomassie Brilliant Blue G 250 in 50 mL di etanolo 95%, mantenendo la soluzione in agitazione; sono poi aggiunti lentamente 100 mL di acido fosforico 85% (p/v), e il volume è portato ad 1 L con acqua distillata. Dopo una decina di minuti la soluzione è filtrata su carta da filtro, in modo da eliminare il reattivo in eccesso che non si fosse solubilizzato. La miscela colorimetrica viene quindi tarata aggiungendo a 1 mL della soluzione volumi crescenti, ma inferiori a 20 μL , di una soluzione $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ di albumina di siero bovino (BSA). I campioni sono lasciati per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere il completo sviluppo della colorazione, e quindi letti a 595 nm contro un bianco rappresentato dal solo reattivo. Con i valori di assorbanza così ottenuti viene costruito un grafico di taratura in cui questi valori sono riportati in funzione delle concentrazioni note. Il grafico permette di definire l'intervallo di linearità entro il quale, per interpolazione lineare, è possibile determinare la concentrazione di una soluzione incognita, della quale aliquote crescenti siano state analizzate con la stessa procedura. Di regola per ogni estratto sono analizzati almeno sei differenti volumi, e l'assorbanza risultante è considerata attendibile se compresa tra 0.1 e 0.4. In alternativa, il saggio viene ripetuto su una opportuna diluizione.

Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE

La separazione elettroforetica delle proteine viene effettuata su un supporto costituito da un sottile strato verticale di gel di poliacrilamide, in cui le molecole di dimensioni diverse si muovono secondo l'equazione $v = E \cdot z/f$, dove la velocità di migrazione (v) di una qualunque molecola in un campo elettrico (E) dipende dalla forza del campo, dalla carica netta della molecola (z) e dal coefficiente (f). La miscela da analizzare viene prima denaturata termicamente in presenza di una soluzione di sodio dodecil solfato (SDS), un detergente anionico. Per ridurre i ponti disolfuro viene aggiunto anche mercaptoetanolo. Le forme anioniche dell'SDS si legano alle catene principali in un rapporto di una molecola di SDS per ogni due residui aminoacidici. Il complesso tra SDS e proteina denaturata viene così ad assumere una carica negativa netta proporzionale alla massa della proteina. Questi complessi vengono quindi sottoposti a elettroforesi; al termine dell'analisi le proteine possono essere visualizzate tramite colorazione del gel con argento o blu di Coomassie. Il gel di poliacrilamide è costituito da due parti, uno *stacking gel* superiore e un *running* o *separating gel* che è la porzione più ampia dove avviene propriamente la separazione delle proteine. Lo *stacking gel* oltre ad avere una diversa concentrazione di acrilamide ha un pH di circa due unità inferiori a quello del tampone per la corsa elettroforetica e del *separating gel*. Queste condizioni consentono di focalizzare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione nel *separating gel* nello stesso momento.

Per la preparazione di un *separating gel* all'8% in un tubo sterile da 50 mL si trasferiscono, nell'ordine, 4,8 mL di acqua distillata, 2,25 mL di 4x *separating gel* buffer per SDS-PAGE (1,5 M Tris-HCl pH 8.8), 90 μL di SDS 10% e, dopo aver riscaldato a 37°C in bagno

termostatico, 1,8 mL di soluzione di acrilamide-bis Sigma al 40% (29:1). Dopo aver degasato per 5 minuti, si aggiungono 50 μ L di ammonio persolfato 10% (p/v, soluzione appena preparata) e 10 μ L TEMED. Si versano quindi immediatamente 8,3 mL della soluzione così ottenuta nell'apparato per minigel, ricoprendo il pelo del liquido con 100 μ L acqua distillata per lato. In queste condizioni il gel polimerizza in circa 20-25 minuti. In alternativa per preparare gel a diversa concentrazione vengono variati opportunamente i volumi di poliacrilamide e di acqua lasciando invariati quelli di tutte le altre componenti. Durante la polimerizzazione del separating gel si prepara lo stacking gel, al 5% di poliacrilamide. In un tubo sterile da 15 mL si trasferiscono, nell'ordine, 1,825 mL di acqua distillata, 0,75 mL 4x stacking gel buffer per SDS-PAGE (0,5 M Tris-HCl pH 6.8), 30 μ L SDS 10% e 0,375 mL di acrilamide 40%. Si degasa per 5 minuti, provvedendo nel frattempo a eliminare l'acqua sul pelo del separating gel con della carta bibula. Dopo aver degasato, si aggiungono 25 μ L di ammonio persolfato 10% e 7,5 μ L TEMED, riempiendo immediatamente con la soluzione ottenuta lo spazio residuo tra i vetri e inserendo il pettine. La polimerizzazione avviene in circa 15 min. Il gel è inserito nell'apposito apparato in presenza di SDS-tank buffer (25 mM Tris-192 mM glicina, pH 8.3, 0,1% SDS).

Gli estratti da analizzare vengono uniti 1:1 con dell'SDS-loading buffer (125 mM Tris HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerolo, 10% β -mercaptoetanol, 1 mg mL⁻¹ blu di bromofenolo), in eppendorfs con tappo a vite e guarnizione, e trattati per 5 min a 100°C. Si caricano quindi i pozzetti, in un volume variabile da un minimo di 5 ad un massimo di 30 μ L. Nel corso del presente lavoro per un confronto tra i risultati ottenuti nei diversi esperimenti si è standardizzato il metodo caricando in ogni corsia, se non altrimenti indicato, una quantità di estratto pari a 75 μ g di proteine. La corsa viene fatta procedere a 8 mA costanti per circa 4-4,5 ore, fino a quando il colorante arriva a 1 cm dalla fine del gel.

Analisi immunologica dei livelli di proteina (*Western blot analysis*)

Circa 20 minuti prima del termine della corsa elettroforetica, un foglietto di nitrocellulosa (maneggiato con pinze e guanti) viene posto in tampone di trasferimento (25 mM Tris-192 mM glicina pH 8.3, metanolo 10%) in agitazione per 15 minuti e sottovuoto per 5 minuti; anche il gel, una volta tolto dall'apparato, viene riequilibrato per 5 minuti nello stesso tampone. Quindi si prepara un *sandwich* sovrapponendo nell'ordine: una spugnetta imbibita di tampone, un foglio di carta 3MM, il gel, la nitrocellulosa, un secondo foglio di carta 3MM e la seconda spugna; scorrendo su ogni elemento con una bacchetta di vetro si eliminano accuratamente le bolle d'aria. Quindi il sandwich viene inserito in un apparato per elettrotrasferimento, con il lato del gel verso il polo negativo (nero) e quello della nitrocellulosa verso il positivo (rosso). Il trasferimento viene lasciato procedere overnight (ca 17-18 h) a 10 mV costanti.

La presenza della P5C deidrogenasi di *A. thaliana* è stata valutata immunologicamente grazie alla disponibilità di antisiero di topo immunizzato contro la proteina purificata di patata (Forlani *et al.*, 2000). Subito prima di procedere all'immunostaining, si preparano 235 mL di TBS (Tris Buffered Saline, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) diluendo con acqua sterile del TBS 10X sterilizzato in autoclave. Tolto il sandwich dall'apparato, il foglietto di nitrocellulosa

viene trasferito in un contenitore delle stesse dimensioni e saturato per 50 minuti in 10 mL di TBS contenente 3% BSA. Al resto del TBS viene nel frattempo aggiunto lo 0,2% Tween 20, e si preparano due aliquote da 9 mL del tampone ottenuto contenenti lo 0,5% di BSA. Al termine della saturazione la nitrocellulosa viene sciacquata velocemente tre volte con il TBS, e incubata per 90 minuti nei primi 9ml di TBS-0,5% BSA con 5 μ L di siero (anticorpo primario). Si effettuano quindi due lavaggi da 10 minuti in 20-25 mL di TBS, e si incuba altri 90 minuti con i secondi 9 mL di TBS-0,5% BSA cui è stato aggiunto 1 μ L di anticorpo secondario (rabbit anti-mouse IgG coniugato con fosfatasi alcalina, Sigma A4312). Si effettuano infine 3 lavaggi da 10 minuti in TBS. Durante L'ultimo lavaggio si prepara la soluzione di sviluppo: a 10 mL di tampone per fosfatasi alcalina (0,1 M Tris-HCl pH 9.5 contenente 0,1 M NaCl e 5 mM $MgCl_2$) si uniscono 66 μ L di una soluzione 50 mg mL⁻¹ di NBT in dimetilformammide e 82,5 μ L di una soluzione 50 mg mL⁻¹ di 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) in dimetilformammide. Si pone quindi ad equilibrare a 37°C. Il foglietto di nitrocellulosa viene quindi equilibrato per 5 minuti in 20 mL di tampone per fosfatasi alcalina. Si versa quindi nella vaschetta la soluzione di sviluppo, lasciando in agitazione fino a uno sviluppo soddisfacente delle bande. Al termine, la miscela viene eliminata e la reazione bloccata con 20 mL di soluzione bloccante (20 mL di TBS contenente 20 mM EDTA) per almeno un minuto. Dopo 3-4 lavaggi in acqua distillata il blot viene infine fatto asciugare su carta da filtro e conservato a temperatura ambiente al buio.

Determinazione dell'attività *in vitro* della P5C reduttasi

Il saggio adottato, che misura l'ossidazione P5C-dipendente del NADH a NAD⁺, è una modificazione del protocollo descritto da Chilson *et al.* (1991). A questo fine aliquote da 10 a 100 μ l di un estratto vengono incubate a 35°C in un volume finale di 1 mL in presenza di tampone Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, contenente P5C 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM e NADH 0,25 mM. Dopo un opportuno periodo si determina il decremento di assorbanza a 340 nm, risalendo all'attività attraverso il coefficiente di estinzione molare per il NADH, 6220 M⁻¹ cm⁻¹. Quando è necessario ottenere dei valori più precisi, si ricorre a un saggio continuo, mediante l'incubazione del campione direttamente in una cuvetta posizionata nella cella dello spettrofotometro, termostata a 35°C. La miscela di reazione viene pre-equilibrata a 35°C, e il saggio viene avviato immediatamente dopo l'aggiunta dell'aliquota di estratto. Si effettua in genere una incubazione di 5 min, settando lo strumento in modo che determini il valore di assorbanza a 340 nm ogni 30 sec, calcolando poi l'attività per interpolazione della fase lineare della curva di reazione. La possibile interferenza dovuta alla presenza di altri enzimi in grado di catalizzare l'ossidazione del NADH viene eliminata sottraendo l'attività misurata in campioni paralleli in cui sia stato ommesso il P5C. L'attività enzimatica viene espressa nell'unità di misura consigliata dalla International Union of Biochemistry, il katal, che in questo caso corrisponde dunque alla quantità di enzima che catalizza la ossidazione P5C-dipendente di 1 mole di NADH. Viste le quantità presenti, si utilizza come sottomultiplo il nkat. L'attività specifica è pertanto calcolata in nkat mg⁻¹ di proteine solubili.

Purificazione preparativa della P5C reduttasi di *A. thaliana*

Per poter disporre di una quantità di enzima purificato sufficiente all'esecuzione delle analisi richieste, la P5C reduttasi è stata estratta da almeno 30-50 g di cellule in coltura. A questo fine le modalità di estrazione sono state modificate rispetto a quanto descritto, omogeneando il materiale per 5 min in un mortaio equilibrato in ghiaccio in presenza di 1 g g^{-1} di sabbia di quarzo. Dopo aver aggiunto un altro volume di tampone di estrazione, si estrae per altri 5 min. L'omogenato viene trasferito, per aliquote da 25 mL, in provette Corex da 30 mL e centrifugato per 10 min a 12.000 g . Allo scopo di ottenere un arricchimento dell'enzima, il supernatante viene sottoposto a precipitazione con ammonio solfato al 50% (291 mg mL^{-1}). Le proteine sedimentate per centrifugazione vengono quindi risospese in un volume minimo di tampone di estrazione. Per allontanare l'ammonio fosfato residuo, il campione viene desalato per aliquote da 10 mL su colonna BioGel P6DG (Bio-Rad) da 40 mL di *bed-volume* e 2,5 cm di diametro, equilibrata contro lo stesso tampone.

L'estratto desalato viene caricato su una colonna di DEAE-Sephacel equilibrata in tampone di estrazione, mantenendo un flusso costante in uscita di 60 mL h^{-1} e raccogliendo frazioni da 5 mL. Il materiale non trattenuto dalla colonna viene riequilibrato in tampone 50 mM sodio bicarbonato, pH 10, contenente 0,5 mM EDTA e 0,5 mM EDTA mediante passaggio su colonna desalante, come descritto. Il preparato viene ricromatografato sulla stessa colonna di DEAE-Sephacel, equilibrata in tampone bicarbonato. Le proteine trattenute vengono eluite applicando un gradiente lineare da 0 a 250 mM NaCl, raccogliendo frazioni da 5 mL. Le frazioni attive sono unite e immediatamente riequilibrate in tampone di estrazione.

Il pool ottenuto viene concentrato mediante precipitazione con ammonio solfato e risospensione in 20 mL di tampone di estrazione addizionato con 200 mM NaCl, in modo da evitare la formazione di aggregati che potrebbero interferire con la successiva cromatografia ad esclusione. La colonna utilizzata a tal fine è una Sephacryl S300 (Pharmacia) con un *bed-volume* di 235 mL equilibrata nello stesso tampone. Il flusso imposto mediante pompa peristaltica in uscita è di 30 mL h^{-1} e si raccolgono frazioni da 2,5 mL.

Le frazioni attive sono unite, riequilibrate contro tampone di estrazione, e caricate su una colonna di Blu Sepharose con un *bed-volume* di 10 mL riequilibrata nello stesso tampone, a un flusso di 30 mL h^{-1} . La colonna viene quindi lavata con 20 mL di tampone di estrazione e eluita con 30 mL di tampone contenente 500 mM NaCl, raccogliendo frazioni da 5 mL.

Il preparato ottenuto viene ulteriormente frazionato per cromatografia liquida rapida delle proteine (FPLC) su una colonna monoQ (Pharmacia) da 1 mL di *bed-volume* riequilibrata per passaggio di 10 mL di tampone di estrazione contenente 500 mM NaCl e 20 mL di tampone senza sale. Il campione viene iniettato su colonna mediante un *superloop* da 10 mL (Pharmacia). L'eluzione procede mediante un gradiente da 50 a 250 mM NaCl in 50 min a un flusso di 1 mL min^{-1} , raccogliendo frazioni da 1 mL.

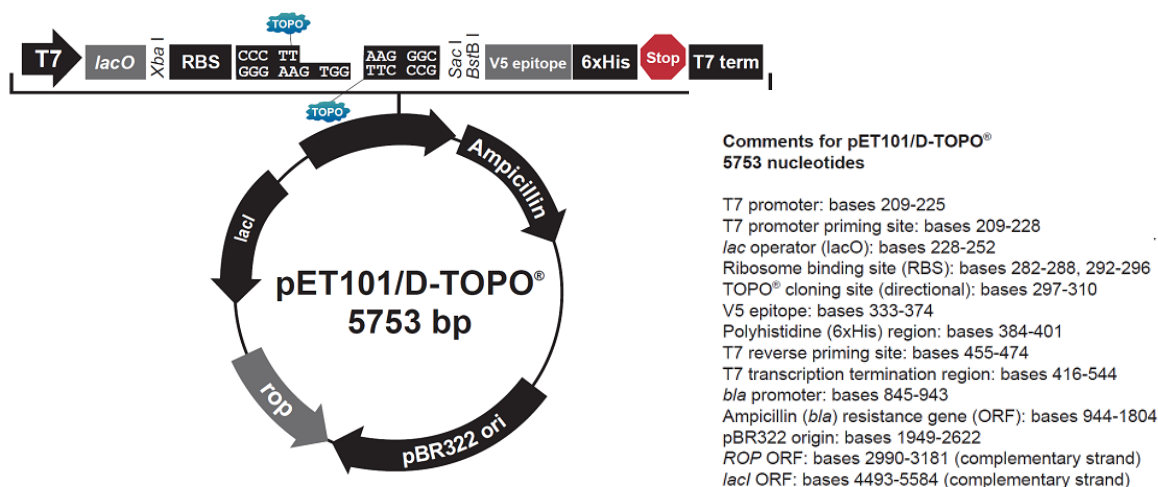
Le frazioni più attive vengono unite e sottoposte a cromatografia per adsorbimento su colonna di idrossiapatite di 15 mL *bed-volume*, che viene pre-equilibrata mediante passaggio di 30 mL di tampone 500 mM K fosfato, pH 7,5, e 150 mL di tampone 10 mM K fosfato. L'eluzione

procede mediante gradiente da 10 a 200 mM fosfato (100 + 100 mL) a un flusso di 30 mL h⁻¹, raccogliendo frazioni da 3 mL.

Purificazione della P5C reduttasi per espressione eterologa in *E. coli*

L'espressione eterologa in *E. coli* del gene *AtP5CR* fuso con una coda di 6 istidine nella porzione C-terminale (6His-*AtP5CR*) è stata ottenuta grazie a un costrutto inserito nel plasmide pET101-D-Topo (Sigma, Figura 33) sotto il controllo di un promotore *lac* inducibile da isopropil-β-tiogalattoside (IPTG), un analogo non idrolizzabile del galattosio, costruito che è stato gentilmente fornito dal Dott. Dietmar Funck (Università di Konstanz).

Figura 33. Vettore pET101-D-TOPO per l'espressione eterologa di 6His-*AtP5CR*



Il prodotto di fusione presenta il vantaggio di poter essere purificato in un unico passaggio usando una colonna per affinità di Nichel agarosio. Il costrutto è stato trasferito in *E. coli* *BI21* (*DE3* Star Invitrogen). Il ceppo batterico viene fatto crescere in 1 L di terreno Luria-Bertani (LB, tabella 7) addizionato con 50 mg L⁻¹ di ampicillina. La coltura è lasciata crescere a 24°C e 100 rpm fino al raggiungimento di una OD₆₀₀ di circa 0,6 prima di aggiungere 1 mM IPTG. Una volta aggiunto l'induttore, si lascia procedere la crescita per 4 h prima di raccogliere le cellule, sedimentandole a 2000 g per 5 min. Determinata la biomassa ottenuta le cellule sono congelate a -20°C. Una volta ottenuta una quantità sufficiente di cellule indotte, il materiale viene trasferito in un mortaio equilibrato in ghiaccio e si aggiunge allumina in misura di 2 g g⁻¹. L'estrazione procede con un pestello fino all'ottenimento di un materiale omogeneo, quindi si aggiungono 10 mL g⁻¹ di tampone di estrazione (50 mM Na-fosfato, pH 7,5, contenente 200 mM NaCl). L'estratto è centrifugato a 14000 g per 5 min a 4°C.

Il supernatante viene caricato ad un flusso di 10 mL h⁻¹ su una colonna di Ni-agarosio precedentemente attivata per passaggio di tampone di estrazione contenente 20 mM imidazolo. Prima di caricare il campione viene aggiunto tampone contenente 500 mM imidazolo in modo

tale che la concentrazione finale sia 20 mM. L'eluizione *step wise* è condotta per passaggio di buffer di estrazione combinato con una soluzione concentrata di imidazolo in modo tale che la sua concentrazione finale sia rispettivamente pari a 50-100-200-350-500 mM. Per eliminare ulteriori contaminanti presenti, il pool ottenuto viene sottoposto a cromatografia ad esclusione su Sephacryl S300, con le modalità precedentemente descritte.

Tabella 7. Composizione del terreno LB per la crescita di *E. coli*

Composto	$g L^{-1}$
Tryptone	10
Estratto di lievito	5
NaCl	10
pH 7 con NaOH	

Induzione di anticorpi di topo contro 6-His-AtP5CR

La proteina purificata è stata utilizzata per l'immunizzazione di due topi, gentilmente messi a disposizione dal Prof. Ottorino Belluzzi (Università di Ferrara), mediante tre cicli di iniezioni sottocutanee praticate alla base della coda di 50 µg di proteina purificata. Nella prima iniezione l'antigene viene diluito in 200 µL di adiuvante completo di Freund (una sospensione di *Mycobacterium butyricum* essiccato [5mg], di olio di paraffina [8,5 mL] e un agente emulsionante, il mono-oleato di mannide [1,5 mL]). Per la seconda e la terza iniezione, praticate a intervalli di 14 giorni, l'antigene è stato diluito in 200 µL di adiuvante incompleto di Freund, cioè privo della polvere batterica. Dopo sette giorni dalla terza iniezione i due topi sono sacrificati dopo anestesia eseguita trasferendo gli animali in una apposita gabbia di plexiglass in cui viene posta dell'ovatta imbevuta di cloroformio. Il sangue viene prelevato mediante una puntura cardiaca e posto separatamente in 2 eppendorfs. Il sangue viene lasciato coagulare per 1 h a 37°C. Quindi il particolato viene sedimentato per centrifugazione a 10.000 *g* per 10 min a 4°C. Il supernatante viene accuratamente recuperato e misurato, diluito con 4 volumi di TBS, e suddiviso in aliquote da 200 µL che vengono conservate a -20°C.

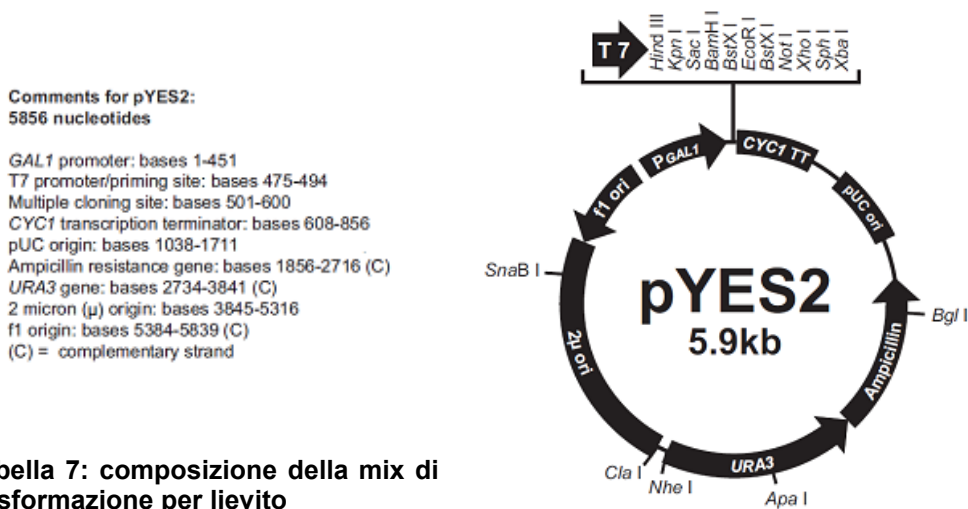
Per le analisi immunologiche (Western blot) sono state impiegate aliquote da 20 µL dei due preparati, corrispondenti a 4 µL dell'antisiero di partenza.

Purificazione della P5C deidrogenasi per espressione eterologa in lievito

Il gene *P5CDH* di *Arabidopsis* (*AtP5CDH*) è stato clonato dal Dott. Dietmar Funck nel vettore di espressione per lievito pYES2 (Figura 34) e posto sotto il controllo del promotore *GAL1* inducibile da galattosio. Il costrutto è stato utilizzato per trasformare il ceppo di lievito *put2*, privo di una P5CDH funzionale, mediante la procedura descritta da Gietz e collaboratori (2002). Il ceppo viene rivitalizzato su terreno YEPD prima di essere incubato overnight a 24 ± 1°C e 100 rpm in terreno minimo YCB supplementato con 2% glucosio e 50 mg L⁻¹ Trp e Ura. Il giorno seguente se ne determina il titolo e sulla base della concentrazione raggiunta si inocula una nuova beuta contenente 20 mL di YCB in modo da ottenere una concentrazione di circa 2,5

x 10⁸ cellule mL⁻¹. Al fine di una buona riuscita della trasformazione è importante che le cellule eseguano almeno due cicli di divisione, quindi si lascia riprendere la crescita per almeno 5 h. Le cellule sono raccolte in una provetta da 50 mL a fondo conico centrifugando 5 min a 3000 g; il sedimento viene lavato in acqua distillata sterile e concentrato a 1 mL. Determinato nuovamente il titolo della sospensione si prelevano aliquote corrispondenti a circa 10⁸ cellule. Sedimentate le cellule a 10000 g per 30 sec ed eliminato il supernatante, si aggiungono 360 µL di mix di trasformazione (tabella 8) agitando vigorosamente con un vortex per risospendere bene il materiale cellulare e si incuba per 40 min a 42°C in un bagnetto termostato. Al termine della trasformazione le cellule sono sedimentate per 30 sec a 10000 g e il supernatante sostituito con 1 mL di acqua distillata sterile.

Figura 34. Vettore pYES2 per l'espressione eterologa di AtP5CDH in lievito



PEG 3500 50% w/v	240 µl
LiAc 1.0 M	36 µl
Boiled SS-carrier DNA	50 µl
Plasmid DNA plus water	34 µl
Total	360 µl

Per selezionare i trasformanti aliquote da 100 µl della sospensione ottenuta sono piastrate su terreni YCB supplementato con 2% glucosio e 50 mg L⁻¹ Trp. La presenza del plasmide complementa l'auxotrofia per uracile, consentendo la crescita dei soli trasformanti. Si piastrano contestualmente in triplicato diluizioni della sospensione anche in terreno non selettivo in modo da calcolare la vitalità cellulare e l'efficienza di trasformazione. La produzione di una P5CDH funzionale è stata indagata verificando la capacità dei ceppi trasformati di crescere, al contrario dei trasformati con il solo plasmide, in terreno YCB contenente 10 mM prolina come unica fonte di azoto e supplementato con galattosio 2% per indurre l'espressione del transgene.

Per la produzione della proteina ricombinante cellule in tarda fase esponenziale del

ceppo selezionato, fatto crescere in terreno YCB senza uracile, sono raccolte e trasferite in terreno YCB in cui la fonte di carbonio è stata sostituita da galattosio 0,5%. Dopo ulteriore crescita per 12-14 h a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100 rpm, le cellule sono raccolte per centrifugazione e congelate. L'estrazione avviene in mortaio con allumina, come descritto, risospesando l'omogenato in tampone 50 mM Hepes-KOH, pH 7.4, contenente 0,5 mM EDTA e 0,5 mM DTT. Dopo centrifugazione 5 min a 10000 g, il supernatante è utilizzato per la diverse prove.

Determinazione dell'attività *in vitro* della P5C deidrogenasi

Il saggio adottato misura la riduzione P5C-dipendente del NAD^+ , che determina un aumento di assorbanza a 340 nm (Forlani *et al.*, 2000). La miscela di reazione contiene tampone 50 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 2 mM NAD^+ , 2 mM DL-P5C e 10 mM MgCl_2 in un volume finale di 1 mL. Per far partire la reazione aliquote opportune dell'enzima sono aggiunte alla miscela di reazione pre-riscaldata a 35°C per 3 min. L'aumento in assorbanza è seguito per 10 min con letture ogni minuto contro un bianco in cui il P5C è stato omesso.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Solo cellule trattate con un osmolita non permeante non ionico accumulano prolina

La caratterizzazione di due linee cellulari indotte da germogli di *A. thaliana* wt e *p5cdh* aveva mostrato alcuni punti critici riguardo la sensibilità delle colture a concentrazioni crescenti di sale e all'effetto della prolina fornita esogenamente. Era ad esempio emersa una spiccata suscettibilità al sale, con una riduzione del 50% della crescita a soli 80-90 mM NaCl (Petrollino, 2006). Come termine di paragone, una coltura di tabacco nelle stesse condizioni sperimentali aveva mostrato un tasso di proliferazione cellulare pari al 35-40% di quello del controllo a una concentrazione di 175 mM (Forlani *et al.*, 2000), mentre quelle di *A. thaliana* mostravano una completa lisi già a 140 mM. Per cercare di approfondire maggiormente questo comportamento, erano state determinate le concentrazioni di prolina e amino acidi totali in cellule cresciute in analoghe condizioni sperimentali. Inaspettatamente sia a concentrazioni di sale permissive che non permissive, non si era identificato alcun innalzamento dei livelli di prolina, il cui contributo percentuale restava costante, intorno al 5%. Tale risultato appariva in netto contrasto con quanto evidenziato in precedenza in plantule di *A. thaliana*, dove a 48 h da un trattamento con NaCl si era notato un significativo accumulo di prolina, dal 2 al 15% circa degli amino acidi liberi totali (Deuschle *et al.*, 2004).

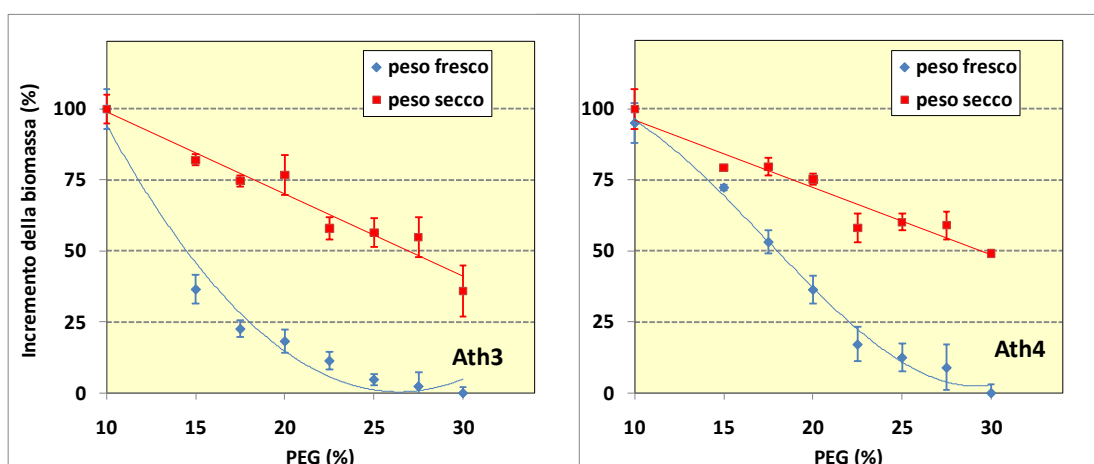
Anche per quanto concerne la sensibilità alla somministrazione esogena di prolina i risultati si discostavano dall'atteso. Infatti in un primo insieme di esperimenti in cui l'aggiunta dell'aminoacido avveniva dopo tre giorni dal reinocolo, una volta ripresa la crescita cellulare, non si osservava alcun effetto tossico. Questo aveva indotto ad ipotizzare che esistesse una sorta di reazione omeostatica che impedisse il raggiungimento di una concentrazione interna sufficiente a innescare i fenomeni di tossicità. Anche se sono stati identificati e clonati alcuni trasportatori per la prolina (Breitkreuz *et al.*, 1999; Igarashi *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2001), molto poco si sa sui meccanismi di regolazione *in vivo* di tale trasporto. A priori, la presenza dell'imino acido avrebbe potuto portare al mantenimento di un livello intracellulare inferiore a quello esterno, al riequilibrio tra la concentrazione interna e quella esterna, o ad un accumulo da parte delle cellule a livelli superiori a quelli presenti nel mezzo di coltura, indicando rispettivamente una diffusione rallentata attraverso il plasmalemma, un trasporto passivo o un trasporto attivo secondario. I risultati ottenuti determinando i pool intracellulari a tempi crescenti dopo l'aggiunta di prolina nel mezzo di coltura indicarono chiaramente un suo accumulo all'interno della cellula (Petrollino, 2006). Tale accumulo si arrestava ad un livello relativamente indipendente dalla concentrazione esterna, suggerendo un meccanismo di trasporto attivo. Il mantenimento di una omeostasi interna ad un livello approssimativamente compreso tra 30 e 40 $\mu\text{mol g}^{-1}$ di cellule potrebbe essere conseguenza sia di un meccanismo inibitorio che blocca l'uptake dell'imino acido quando una concentrazione ottimale interna viene raggiunta, sia dell'equilibrio con un sistema di reflusso che viene attivato in un secondo tempo ad elevate concentrazioni interne. Purtroppo non era stato possibile discriminare tra queste possibilità, la cui elucidazione richiederebbe la disponibilità di prolina marcata radioattivamente.

Ulteriori esperimenti rivelarono, però, che se la somministrazione di prolina avveniva contestualmente al reinocolo, mentre il genotipo selvatico non risentiva del trattamento, la coltura *p5cdh* evidenziava effetti tossici, con una ID_{50} pari a 51.4 ± 5.2 mM. Ad ogni modo la risposta sembrava decisamente inferiore a quanto osservato in plantule. Infatti per le cellule in sospensione erano richieste concentrazioni superiori a 50 mM per ridurre la crescita del 50%, mentre in piantine risultava sufficiente una dose pari a 5 mM di prolina per inibire del 70% la crescita radicale, che a 20 mM era completamente bloccata (Deuschle *et al.*, 2004). Partendo da questa serie di informazioni si è cercato con il presente lavoro di approfondire i fenomeni di tossicità mediati dalla somministrazione esogena di prolina.

Un'alta osmolarità del mezzo di coltura dovrebbe indurre un aumento del flusso carbonioso nella via biosintetica da glutammato, con un progressivo aumento del pool intracellulare. Se questo raggiungesse livelli estremamente elevati, la situazione potrebbe essere paragonabile a quella derivante dalla somministrazione esogena di prolina, a cui il mutante si era dimostrato ipersensibile (Deuschle *et al.*, 2004). Il mancato accumulo di prolina nelle cellule sottoposte ad uno stress salino si accompagnava ad una estrema sensibilità delle colture a queste condizioni ambientali. Questo effetto potrebbe essere spiegato da una tossicità ionica. Per verificare questa possibilità si è utilizzato un osmolita non permeante e non ionico, il polietilene glicole (PEG 4000), per indurre uno stress osmotico non ionico. Quando le cellule in coltura di *Arabidopsis* sono state esposte a concentrazioni crescenti di PEG 4000, la crescita di entrambe le linee è risultata progressivamente inibita (Figura 35), con una ID_{50} , calcolata sul peso secco, di $26 \pm 1\%$ e $28 \pm 1\%$ rispettivamente per il wild type e il mutante.

Figura 35. Sensibilità delle colture dei genotipi wt (Ath3) e *p5cdh* (Ath4) al PEG

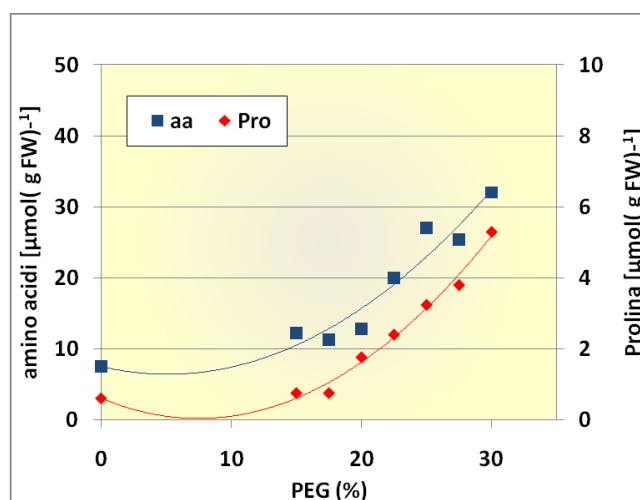
Cellule in tarda fase esponenziale di crescita sono state utilizzate per inoculare beute parallele contenenti terreno fresco, in modo da ottenere una densità cellulare iniziale di circa 25 mg ml^{-1} (FW). Concentrazioni crescenti di PEG4000 sono state aggiunte al terreno di coltura. Dieci giorni dopo l'inocolo, quando i controlli non trattati hanno raggiunto la tarda fase esponenziale di crescita, è stata determinata la biomassa cellulare. I risultati sono espressi come aumento percentuale rispetto al controllo, e sono media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.



Le cellule restano comunque ancora vitali a una concentrazione di PEG (30%) che corrisponde ad una riduzione del potenziale idrico esterno di 1,70 MPa. In queste condizioni le cellule iniziano ad accumulare prolina quando la concentrazione di PEG oltrepassa il 20%, corrispondente a un potenziale idrico di 0,78 MPa (Figura 36), passando dal 5% al 13-14% degli aminoacidi totali.

Figura 36. Accumulo di prolina in cellule sottoposte a stress osmotico indotto da PEG

Il contenuto in aminoacidi e prolina è stato misurato in cellule del genotipo *p5cdh* dopo 48h di trattamento a dosi crescenti di PEG. I risultati sono espressi come media \pm SD di tre repliche. Il comportamento della coltura wt non si discosta significativamente da tale pattern.

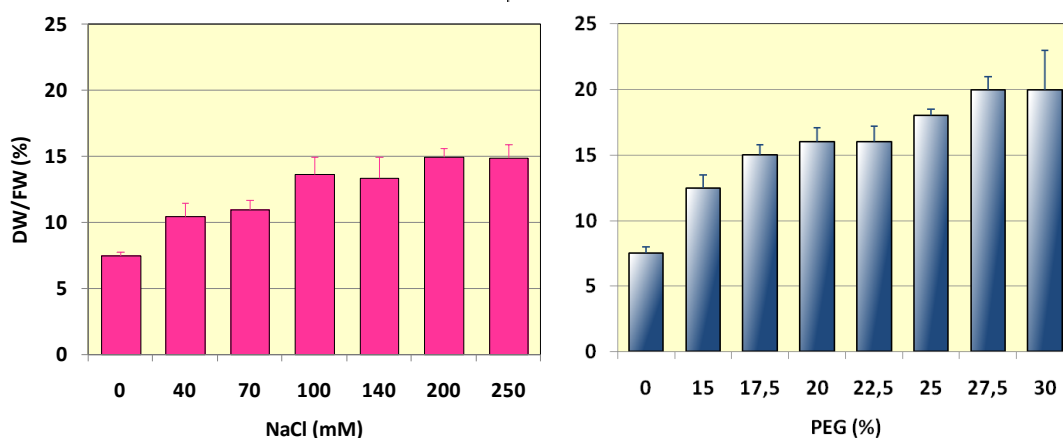


Questi elementi supportano l'ipotesi che la mancanza di accumulo di prolina nelle cellule trattate con NaCl sia realmente dovuta all'instaurarsi di effetti tossici a concentrazioni ioniche non abbastanza elevate da indurre meccanismi di aggiustamento osmotico. Infatti nel caso dello stress salino la crescita cellulare è inibita del 50% ad una concentrazione di sale che corrisponde ad una diminuzione del potenziale osmotico di soli 0,31 MPa. Per avvalorare ulteriormente questa possibilità, è stato determinato il contenuto idrico nei due casi. L'elevata disidratazione delle cellule stressate con il PEG è coerente con tale quadro (Figura 37). Nelle cellule trattate con NaCl il rapporto DW/FW passa dal 7-8% del controllo a un massimo del 13-14%, mentre nel caso del PEG tale rapporto arriva al 20%.

Il fatto che la disidratazione aumenti progressivamente anche nelle cellule che hanno iniziato ad accumulare prolina induce, d'altra parte, a pensare che la concentrazione intracellulare dell'iminoacido non sia sufficiente a contrastare il richiamo di acqua verso l'esterno. Infatti cellule trattate con 20% PEG rispetto a quelle trattate con il 30% di osmolita devono contrastare una ulteriore diminuzione di potenziale idrico di circa 0,9 MPa. Allo stesso tempo il contenuto in prolina libera passa da 10.2 ± 0.2 a $27.2 \pm 1.8 \mu\text{mol}(\text{g DW})^{-1}$.

Figura 37. Disidratazione cellulare indotta da concentrazioni crescenti di NaCl e PEG

A tre giorni dal reinocolo dosi crescenti di NaCl o di PEG sono state aggiunte a colture di *p5cdh*. Dopo 5 giorni dal trattamento la biomassa raggiunta è stata determinata sia immediatamente che dopo essiccazione a 90°C per 48 h. Il rapporto percentuale tra peso secco e peso fresco è stato utilizzato come indice dello stato di idratazione delle cellule. Il comportamento del wt è del tutto analogo.



In cellule in coltura in attiva proliferazione, analogamente alle cellule dei meristemi, l'assenza di vacuoli fa sì che la maggior parte del contenuto cellulare sia rappresentato dal citoplasma (Taiz and Zeiger, 2006; Owens and Poole, 1979). Tuttavia una sua determinazione quantitativa sulla base dell'acqua di idratazione è ostacolata da una significativa presenza di acqua intercellulare, che colma gli spazi pervii nell'apoplasto (Lorences and Fry, 1991). Per cercare di valutare tale apporto si è tentato di quantificare l'acqua di idratazione e per differenza dal contenuto idrico totale risalire ad una buona approssimazione del volume cellulare. La tecnica comunemente utilizzata a questo scopo si basa sull'uso dell'inulina marcata radioattivamente (Rose and Turner, 1997). L'inulina infatti non è metabolizzata e non entra nelle cellule ad una velocità biologicamente significativa. Schematicamente la procedura prevede di riequilibrare le cellule, filtrate, in una soluzione alla stessa osmolarità ma che contiene concentrazioni bassissime e note di inulina marcata. A questo punto la concentrazione di Inulina extracellulare sarà la medesima della soluzione in cui le cellule sono state riequilibrate. Raccogliendo le cellule nuovamente per filtrazione e risospingendole in minimo dieci volumi di una soluzione di uguale osmolarità, ma priva di inulina marcata, si può risalire alla quantità di acqua extracellulare. In queste condizioni, infatti, il recupero di inulina può essere considerato totale. Conoscendo l'acqua totale, per differenza tra peso fresco e peso secco, è possibile, a questo punto, risalire al volume cellulare. Non potendo utilizzare inulina marcata si è tentato un approccio colorimetrico. Quindi si è provveduto a sintetizzare dell'inulina coniugata con una molecola colorata (Remanzol Brilliant Blue, RBB) in modo da poter quantificare l'inulina per via spettrofotometrica (Castro *et al.*, 1995). Sfortunatamente le prove condotte non hanno permesso di eseguire tale determinazione probabilmente a causa delle interazioni dell'inulina coniugata con l'RBB con i componenti della parete cellulare. Sono allo studio possibili protocolli alternativi che impieghino altre molecole colorate.

Pur non essendo stato possibile ottenere una adeguata valutazione dell'acqua intercellulare, la

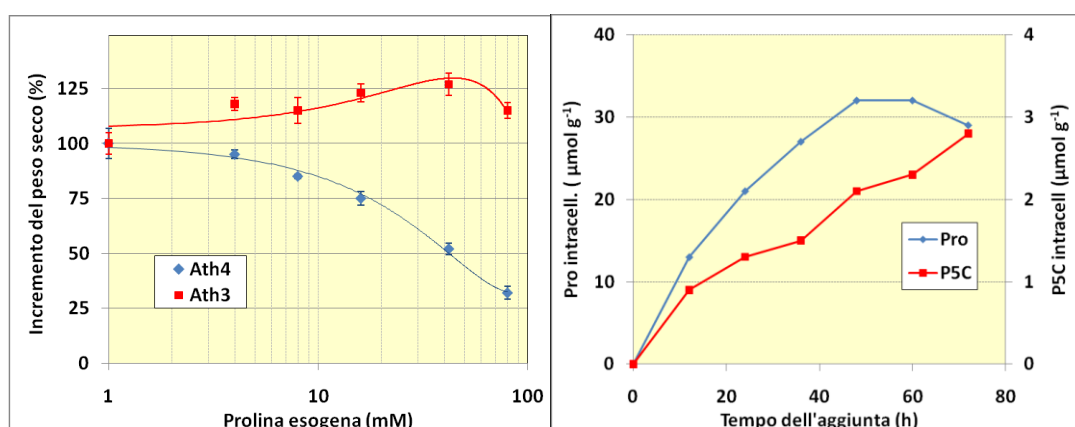
reale concentrazione di prolina nelle cellule stressate con PEG può essere valutata ipotizzando che il citoplasma costituisca l'80% del simplasto, e che l'acqua nell'apoplasto sia il 20% del totale. Se così fosse, la concentrazione di prolina nel citosol varierebbe da 4,3 a 21,6 mM, che corrisponde a una diminuzione del potenziale idrico di soli 0,043 MPa. Tutto questo sembra suggerire che, almeno nel sistema sperimentale utilizzato, il ruolo dell'accumulo di prolina non sia strettamente legato all'adattamento osmotico.

L'aggiunta di prolina determina un accumulo di P5C nel solo genotipo *p5cdh*

Così come evidenziato nel caso di plantule di *A. thaliana* (Deuschle *et al.*, 2004), il trattamento con prolina esogena causa tossicità e si accompagna ad un progressivo accumulo di P5C solo nelle cellule *p5cdh* (Figura 38). Tale elemento sembra dunque avvalorare la possibilità che proprio il P5C sia la molecola che induce l'effetto tossico, dal momento che la prolina accumulata è paragonabile nei due genotipi (Petrollino, 2006). Una verifica sperimentale di questo effetto non può essere ottenuta in quanto il P5C è estremamente instabile a pH neutro. Il fatto che sia possibile evidenziarlo solo nel mutante e non nel wild type non fornisce quindi una evidenza diretta che la tossicità sia legata al suo accumulo.

Figura 38. Effetto inibitorio della somministrazione esogena di prolina sulla velocità di crescita di cellule wt (*Ath3*) e *p5cdh* (*Ath4*), e livelli intracellulari di prolina e P5C in *Ath4*.

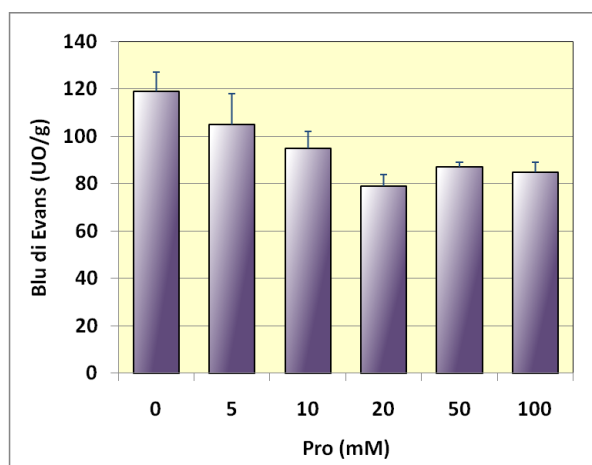
Colture parallele sono reinoculate in terreno contenente concentrazioni millimolari di prolina. Circa 10 giorni dall'inoculo, quando i controlli non trattati hanno raggiunto la fase stazionaria, le colture sono state filtrate ed è stato determinato l'incremento della biomassa cellulare rispetto all'inoculo. I dati, espressi come aumento percentuale in peso secco rispetto al controllo, sono media \pm SD di 3 repliche. Nelle cellule del genotipo mutante parallelamente all'aumento del livello intracellulare di prolina si è evidenziato un accumulo di P5C di un ordine di grandezza minore. Tale accumulo non è risultato riscontrabile nella coltura wild-type.



Tuttavia, quando la vitalità della linea *p5cdh* è stata valutata in risposta alla somministrazione di prolina esogena, si è potuto constatare che la riduzione in termini di biomassa è dovuta a un blocco della crescita più che a una perdita di vitalità cellulare (Figura 39). Quindi l'effetto sembra essere più citostatico che citotossico. Questo dato è inatteso e in apparente contrasto con quanto documentato da Deuschle e collaboratori (2004) che, negli stessi mutanti, osservavano produzione di ROS e *DNA laddering* dopo avere applicato prolina alle piantine. In questo caso il P5C si accumulava a concentrazioni significativamente inferiori, pari a circa 0,5-0,6 $\mu\text{mol g (FW)}^{-1}$. La divergenza tra i risultati ottenuti su plantule e quelli ottenuti su cellule in coltura suggerisce dunque la possibilità che non sia il P5C l'effettore della fitotossicità della prolina, ma che essa dipenda da alterazioni del metabolismo cellulare.

Figura 39. Vitalità di cellule *p5cdh* trattate con dosi crescenti di prolina

Le colture sono state trattate con prolina contestualmente al reinocolo. Dopo 72h la vitalità è stata valutata con il test basato sul legame con il blu di Evans, che si lega proporzionalmente al numero di cellule non vitali. I risultati sono espressi come media \pm SD di 3 repliche.



Cellule *p5cdh* sembrano utilizzare prolina esogena quasi esclusivamente per la sintesi proteica, anche se un lieve aumento dei pool intracellulari di arginina suggerisce una parziale metabolizzazione dell'imino acido

Anche se i medesimi livelli intracellulari di prolina vengono raggiunti in cellule wt e *p5cdh* dopo l'aggiunta esogena dell'imino acido, una differenza significativa era emersa tra i due genotipi relativamente all'utilizzo dell'imino acido. Non avendo la possibilità di eseguire esperimenti con composti marcati, l'entità della metabolizzazione del substrato esogeno era stata valutata determinandone la concentrazione residua nel mezzo di coltura. A seguito della aggiunta di 5, 10 o 20 mmol l^{-1} prolina in colture wt questa veniva completamente assorbita nel giro di pochi giorni, mentre nel caso del genotipo mancante di una P5CDH funzionale dosi residue di prolina erano ancora rilevabili 6 giorni dopo l'aggiunta, quando le colture erano ormai in tarda fase esponenziale di crescita (Petrollino, 2006). Calcoli pur approssimativi portano

dunque a concludere che circa il 35-40% della prolina esogena viene comunque metabolizzata dalle cellule *p5cdh*. Se completamente incapace di ossidarla (Deuschle *et al.*, 2004), tale utilizzo deve con tutta probabilità essere attribuito al suo impiego per la sintesi proteica. Al contrario, il fatto che le cellule wt siano in grado di consumare quantità molto più elevate di prolina sembra suggerire che in esse parte dell'imino acido venga metabolizzata attraverso la via ossidativa, ottenendo potere riducente e glutamato, che può essere a sua volta usato come donatore di gruppi aminici.

Per avvalorare l'effettiva incapacità delle cellule mutanti di procedere a un utilizzo della prolina diverso da quello della sintesi proteica, le concentrazioni intracellulari dei singoli amino acidi in colture di controllo e in colture trattate con l'imino acido sono state determinate per cromatografia liquida ad alta pressione dopo pre-derivatizzazione con *o*-ftaldialdeide. In caso di una via ossidativa funzionale, tale trattamento in cellule in coltura di tre diverse specie di Solanacee era infatti risultato capace di indurre un notevole aumento del *pool* di glutamato libero, e un incremento significativo in quello di altri amino acidi (Forlani *et al.*, 2000; Forlani G. e Corona G., dati non pubblicati). I risultati, riassunti in Tabella 8, mostrano in effetti che a tre giorni dall'aggiunta esogena di livelli anche molto elevati dell'imino acido tali *pools* non subiscono variazioni significative, confermando che in *A. thaliana* vi sia un solo gene codificante per una P5CDH funzionale, essenziale per la conversione della prolina a glutamato (Deuschle *et al.*, 2001, 2004).

L'analisi dei dati ha però messo in evidenza un aspetto interessante: la somministrazione esogena di prolina determina anche un aumento significativo del *pool* di arginina libera, aumento che risulta almeno in parte proporzionale alla quantità del substrato esogeno. Tale comportamento suggerisce che, pur con bassa efficienza, la prolina possa essere convertita in arginina. Questo potrebbe essere realizzato attraverso l'ossidazione iniziale dell'imino acido a P5C a opera della prolina deidrogenasi; il P5C, che non può essere ulteriormente ossidato a causa della mancanza della P5CDH, verrebbe convertito a ornitina a opera della ornitina- δ -aminotransferasi, e da questa ad arginina. Si ritiene che l'OAT catalizzi *in vivo* la reazione opposta, contribuendo alla sintesi di prolina da glutamato attraverso la cosiddetta via dell'ornitina, che risulta prevalente in condizioni normo-osmotiche e di elevata disponibilità di azoto combinato (Delauney *et al.*, 1993a; Yoshida *et al.*, 1997). Se posto nelle opportune condizioni sperimentali, questo enzima è risultato però in grado di catalizzare *in vitro* anche la reazione opposta, da P5C a ornitina (Roosens *et al.*, 1998). Se così fosse, questa sarebbe la prima evidenza sperimentale diretta che la conversione di P5C in ornitina possa avvenire anche *in vivo* all'interno della cellula vegetale. Tuttavia non può essere escluso che l'accumulo di arginina sia dovuto a una riduzione del suo catabolismo nelle condizioni utilizzate. Ulteriori prove, possibilmente supportate dalla caratterizzazione biochimica degli enzimi coinvolti, saranno necessarie per giungere a una completa chiarificazione di questi aspetti.

Tabella 8. Amino acidi liberi in cellule in coltura del genotipo *p5cdh* di *A. thaliana* cresciute per 3 giorni in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di prolina

Le cellule in coltura sono reinoculate in terreno fresco contestualmente al trattamento con concentrazioni crescenti di prolina. Dopo 72 h di crescita il contenuto in amino acidi liberi è stato valutato mediante RP-HPLC. I valori, espressi come $\mu\text{mol g (FW)}^{-1}$, sono media \pm SD di 3 repliche indipendenti. La metodica non consente di rilevare la cisteina, mentre l'istidina, presente nelle cellule vegetali in concentrazioni molto basse, non viene risolta dal picco della glutamina.

	control		+ Pro 20 mM		+ Pro 50 mM	
	$\mu\text{mol (g fw)}^{-1}$	%	$\mu\text{mol (g fw)}^{-1}$	%	$\mu\text{mol (g fw)}^{-1}$	%
Asp	0.551 \pm 0.062	4.3	0.390 \pm 0.015	0.7	0.414 \pm 0.056	0.6
Glu	0.622 \pm 0.074	4.8	0.614 \pm 0.056	1.2	0.516 \pm 0.044	0.8
Asn	0.549 \pm 0.042	4.3	0.313 \pm 0.026	0.6	0.309 \pm 0.031	0.5
Ser	0.590 \pm 0.073	4.6	0.684 \pm 0.044	1.3	0.847 \pm 0.211	1.3
Gln	4.000 \pm 0.866	30.8	4.110 \pm 0.364	7.9	3.885 \pm 0.487	5.9
unknown	0.950 \pm 0.105	7.4	0.945 \pm 0.130	1.8	0.922 \pm 0.104	1.4
Arg	0.154 \pm 0.012	1.2	0.691 \pm 0.020	0.8	0.883 \pm 0.021	0.7
Gly	0.550 \pm 0.052	4.3	0.647 \pm 0.053	1.8	0.697 \pm 0.117	1.7
Thr	0.207 \pm 0.044	1.6	0.232 \pm 0.023	0.4	0.327 \pm 0.112	0.5
Ala	2.030 \pm 0.265	15.7	1.493 \pm 0.157	2.9	1.062 \pm 0.451	1.6
Gaba	0.473 \pm 0.306	3.6	0.318 \pm 0.061	0.6	0.275 \pm 0.050	0.4
Tyr	0.039 \pm 0.009	0.3	0.050 \pm 0.031	0.1	0.066 \pm 0.004	0.1
Trp	0.083 \pm 0.026	0.6	0.050 \pm 0.005	0.1	0.071 \pm 0.031	0.1
Met	0.047 \pm 0.000	0.4	0.033 \pm 0.002	0.1	0.062 \pm 0.049	0.1
Val	0.374 \pm 0.015	2.9	0.224 \pm 0.003	0.4	0.233 \pm 0.006	0.4
Phe	0.318 \pm 0.213	2.5	0.261 \pm 0.022	0.5	0.395 \pm 0.099	0.6
Ile	0.106 \pm 0.005	0.8	0.077 \pm 0.002	0.1	0.093 \pm 0.011	0.1
Leu	0.104 \pm 0.005	0.8	0.079 \pm 0.004	0.2	0.091 \pm 0.003	0.1
Orn	0.010 \pm 0.001	0.0	0.007 \pm 0.002	0.0	0.018 \pm 0.003	0.0
Lys	0.308 \pm 0.022	2.4	0.278 \pm 0.038	0.5	0.423 \pm 0.080	0.6
Pro	0.855 \pm 0.012	6.7	40.719 \pm 2.046	78.0	54.115 \pm 2.966	82.4
All	12.912 \pm 1.257	100.0	52.214 \pm 2.536	100.0	65.703 \pm 3.575	100.0

Esperimenti analoghi su genotipi di lievito caratterizzati dalla mancanza di uno dei due enzimi della via catabolica evidenziano una maggiore sensibilità alla prolina esogena del ceppo *prodh* rispetto al ceppo *p5cdh*

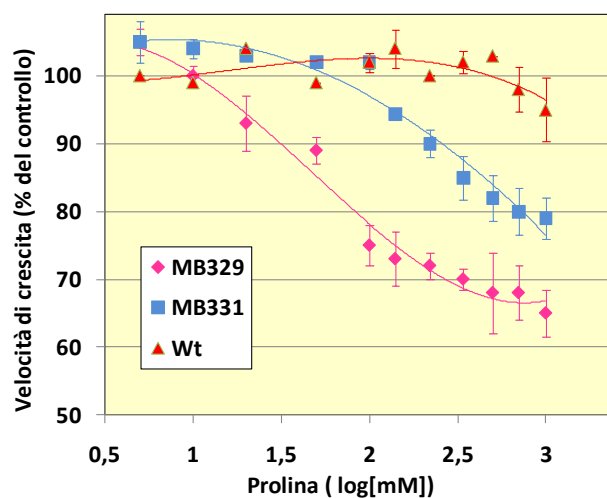
Non disponendo di genotipi *prodh* di *A. thaliana*, né di piante antisense in cui i livelli dell'enzima fossero significativamente inferiori rispetto al wt, si sono effettuate delle prove con tre ceppi isogenici di lievito, cortesemente forniti dalla Prof. Marjorie Brandriss (New Jersey Medical School, USA), che differiscono nella capacità di procedere all'ossidazione della prolina in quanto alternativamente privi di una prolina deidrogenasi (MB329) o di una P5C deidrogenasi (MB331). Dal momento che lievito cresce in terreno acido, a cui il P5C è più stabile, è stato possibile indagare anche l'effetto della somministrazione esogena dell'intermedio. In nessuno dei genotipi in esame si è riscontrato un effetto tossico in seguito a trattamenti con 0,1 o 1 mM P5C. L'analisi della concentrazione residua di P5C nel mezzo di coltura ha però rivelato che

non c'è deplezione del metabolita, indicando che questo composto, fornito esogenamente, non può attraversare la membrana cellulare (dati non mostrati).

Sono stati allora eseguiti trattamenti con prolina esogena. Se il suo effetto fosse realmente mediato dal P5C, il ceppo *prodh* non dovrebbe risentire dell'aggiunta dell'imino acido al terreno di coltura, dal momento che non è capace di catalizzarne l'ossidazione. I risultati ottenuti (Figura 40) mostrano, al contrario, una iper-sensibilità del genotipo *prodh* rispetto a quello *p5cdh*. Pur senza escludere che anche un accumulo di P5C possa determinare a sua volta degli effetti negativi, questo sembra avvalorare la possibilità che il parametro critico risulti proprio la concentrazione di prolina. Il fatto che anche il genotipo *p5cdh* sia più sensibile al trattamento rispetto al wt può essere interpretato in due modi diversi. Una prima possibilità potrebbe risiedere in una tossicità *secondaria* del P5C. In alternativa, però, anche questo comportamento potrebbe essere ricondotto direttamente alla prolina.

Figura 40. Tossicità di concentrazioni crescenti di prolina esogena in genotipi di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) incapaci di procedere all'ossidazione dell'imino acido

Colture parallele di lievito wild-type, *prodh* (MB329) e *p5cdh* (MB331) sono state avviate in terreno minimo supplementato con dosi crescenti di prolina, fino a 1 M. La crescita cellulare è stata seguita come aumento della torbidità delle colture. Per ogni campione dai dati in tal modo ricavati sono stati calcolati la costante di crescita e il tempo di generazione. Il tasso di crescita è stato quindi espresso come percentuale di quello del controllo non trattato. I risultati sono espressi come media di 3 repliche. L'intero esperimento è stato ripetuto 3 volte.



Nel ceppo selvatico la prolina esogena viene in parte usata per la sintesi proteica, in parte ossidata a glutamato come fonte di potere riducente e di azoto combinato. Nel mutante *prodh* l'ossidazione è impossibile (Wang & Brandriss, 1986), e ciò determina il contatto prolungato nel mezzo di coltura con elevate concentrazioni di prolina. Anche nel mutante *p5cdh* questo può verificarsi, anche se inizialmente si assiste a una certa conversione di prolina in P5C. In esperimenti di caratterizzazione biochimica dell'enzima si è visto infatti che a concentrazioni millimolari di P5C la prolina deidrogenasi di lievito subisce una inibizione da prodotto (Forlani G., risultati non pubblicati). Dunque l'accumulo intracellulare di P5C potrebbe

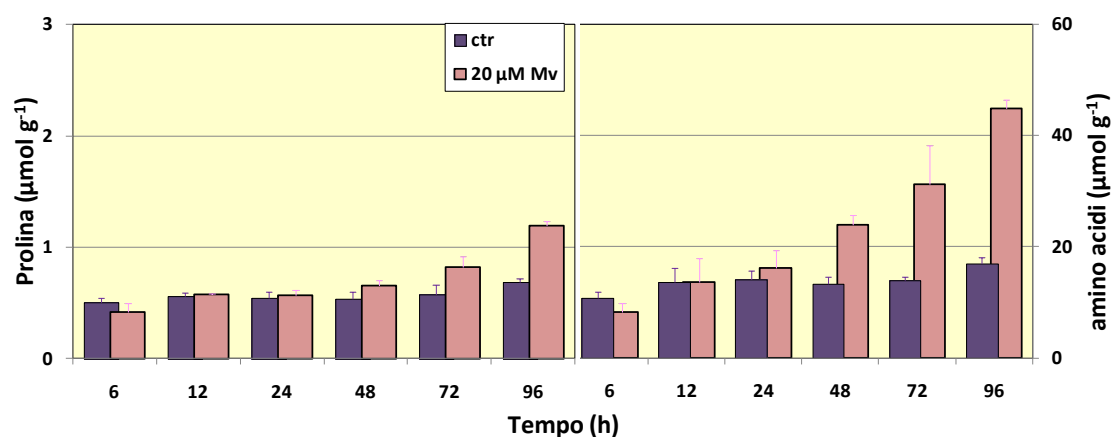
portare rapidamente al blocco dell'attività della prolina deidrogenasi, replicando funzionalmente nei mutanti *p5cdh* la stessa situazione presente in quelli *prodh*. Tale situazione spiegherebbe la maggiore sensibilità dei primi rispetto al wt. Anche in questo caso ulteriori determinazioni sono necessarie per giungere a discriminare tra le diverse possibilità. Dati utili a questo proposito potrebbero derivare dalla determinazione dei livelli intracellulari di P5C e di ROS in cellule trattate con prolina esogena, nonché dalla caratterizzazione biochimica della ProDH di lievito.

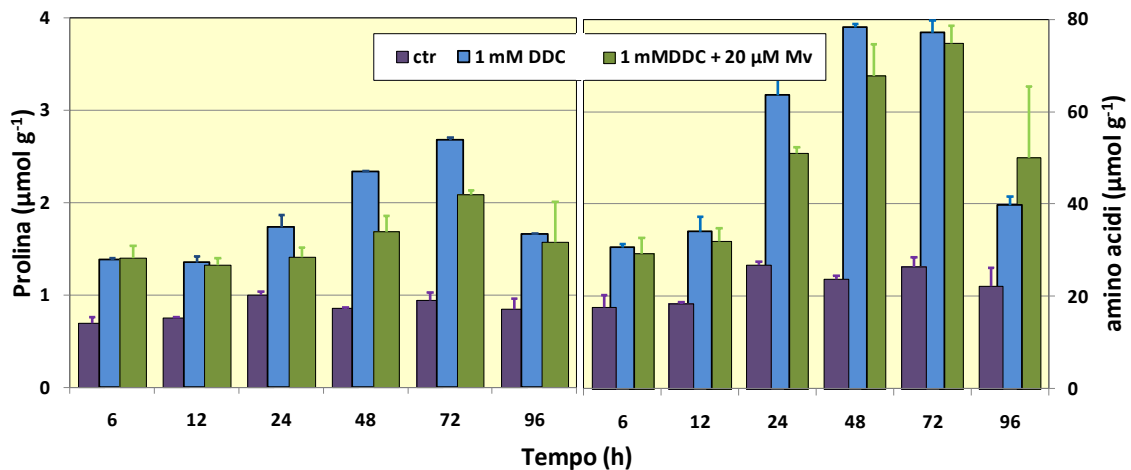
Accumulo di prolina in risposta a condizioni di stress ossidativo

Uno dei meccanismi ipotizzati per spiegare la tossicità della somministrazione esogena di prolina è che la ProDH, ossidando il substrato a P5C e cedendo elettroni direttamente alla catena di trasporto degli elettroni, possa produrre superossido (Donald *et al.*, 2001). Sulla base dei dati ottenuti in questo lavoro, tale possibilità non sembra costituire il meccanismo primario in lievito, visto che il ceppo privo del primo enzima della via catabolica è risultato il più sensibile alla prolina esogena (Figura 40), ma la situazione potrebbe essere significativamente diversa nelle piante. Recentemente, sia in sistemi animali che vegetali, sono stati descritti effetti regolativi sul metabolismo della prolina da parte di condizioni di stress ossidativo (Krishnan *et al.*, 2008, Yanga *et al.*, 2009). Per analizzare se effetti simili si possano verificare anche in cellule in coltura, sospensioni cellulari di *Arabidopsis* sono state trattate con 20 μ M metilviologeno (MV), un composto che interferisce con la catena di trasporto degli elettroni. Nelle piante il MV interferisce prevalentemente con la funzionalità del cloroplasto, tanto da essere comunemente utilizzato come erbicida, ma è in grado di agire anche nei confronti della catena di trasporto mitocondriale (Yoshinaga *et al.*, 2005). Un aumento significativo del contenuto in prolina è stato però osservato solo dopo 72-96 h di trattamento (Figura 41), e di entità molto inferiore all'atteso. Inoltre, tale incremento risulta non specifico, ma rientra in un aumento generalizzato dei *pools* di tutti gli aminoacidi.

Figura 41. Prolina e aminoacidi totali in cellule sottoposte a stress ossidativo

Dopo tre giorni dal reinocolo in terreno fresco, cellule del ceppo wild type di *A. thaliana* sono state trattate con 20 μ M MV e con 1 mM DDC, da soli o in combinazione. Aminoacidi e prolina sono stati quindi quantificati a tempi crescenti dall'aggiunta con il metodo della ninidrina. I risultati, espressi in funzione del peso fresco, sono media \pm SD di tre replicazioni.





Un effetto così modesto potrebbe essere dovuto al fatto che le cellule utilizzate non sono fotosinteticamente attive, e che il solo effetto sulla catena mitocondriale non induca un livello significativo di ROS nella cellula, oppure alla presenza di alti livelli di espressione di sistemi detossificativi dei ROS. In effetti le cellule in coltura sono costantemente sottoposte a condizioni di stress meccanico, ed è plausibile che per questo abbiano un livello basale più elevato degli enzimi *scavenger*.

Con l'intento di innalzare i livelli di ROS, alle cellule è stato allora aggiunto del DDC, separatamente o in combinazione con il MV. Questo composto è un ben noto chelante degli ioni Cu^{2+} e per questo un ottimo inibitore delle Cu/Zn SOD (Bolwell *et al.*, 1998). In *Arabidopsis* sono presenti almeno otto isoforme di SOD. Tra queste le Cu/Zn SOD sono localizzate in cloroplasti, citosol, nucleo e nell'apoplasto mentre le FeSOD sono esclusivamente presenti nel cloroplasto e le MnSOD in mitocondri e perossisomi (Drażkiewicz *et al.*, 2007)

Come riportato nel pannello inferiore di Figura 41, entrambi i trattamenti sono risultati in grado di indurre un rapido e forte accumulo di prolina, con un effetto visibile già a 6 h dall'aggiunta. Evidenze preliminari ottenute con il test di riduzione dell'NBT, specifico per il superossido (Csató *et al.*, 1980), sembrano confermare una relazione tra generazione di superossido e l'aumento del contenuto cellulare di prolina (dati non mostrati) anche se la SOD inibita non è localizzata a livello mitocondriale.

Inaspettatamente, però, la combinazione di DDC e MV non determina un effetto additivo sui livelli di prolina. Inoltre anche in questo caso il suo accumulo si accompagna a un aumento generalizzato degli aminoacidi totali, con una conseguente diminuzione del rapporto Pro/aa. Tale comportamento potrebbe indicare un blocco della sintesi proteica, o dipendere da una disidratazione cellulare. Il rapporto DW/FW nelle cellule sottoposte alle diverse condizioni sperimentali non varia però significativamente (dati non mostrati), consentendo di escludere la seconda possibilità. Per verificare la prima si è effettuata una analisi dei singoli aminoacidi per RP-HPLC. Risultati preliminari indicano non un aumento generalizzato, ma una risposta differenziale da parte dei singoli aminoacidi, con un forte aumento del GABA.

Il GABA è sintetizzato direttamente dal glutammato per azione della glutammato decarbossilasi

(GAD EC 4.1.1.15) nel citoplasma. L'enzima possiede un sito di legame per il Ca^{2+} che ne stimola l'attività (Zik *et al.*, 2006). Nelle piante i suoi livelli intracellulari sono tipicamente bassi ma in risposta a diverse tipologie di stress, come acidificazione del mezzo, ipossia, basse temperature, shock termici, stress meccanici, attacco patogeno e anche disidratazione i suoi livelli aumentano repentinamente (Shelp *et al.*, 1999; Bouche' and Fromm, 2004; Bown *et al.*, 2006). Per di più la GAD che utilizza ioni H^+ è fortemente regolata dal pH e si ritiene che la sintesi di GABA possa controllare l'eccessiva acidificazione del citoplasma che si accompagna generalmente alle condizioni di stress (Crawford *et al.*, 1994).

Per le sue proprietà chimico fisiche è stato ipotizzato che questo derivato del glutammato possa fungere, analogamente alla prolina, da osmolita compatibile (Shelp *et al.*, 1999). Il fatto che i trasportatori per la prolina (ProTs) possa riconoscere anche il GABA come substrato suggerisce un link con la prolina e avvalorare il suo ruolo come osmolita compatibile. Recentemente è stato dimostrato un ruolo attivo del GABA nella comunicazione tra piante e animali, batteri e altre piante (Shelp *et al.*, 2006) e anche la sua capacità di regolare l'espressione di alcuni geni (Laincen and Roberts, 2006). Inoltre come discusso in precedenza la prolina è capace di antagonizzare il GABA durante le infezioni da *Agrobacterium*. Sembra infatti che l'agrobatterio induca specificamente la produzione di prolina e che in questo modo riesca ad antagonizzare l'effetto inibitorio sulla crescita tumorale esercitata dal GABA (Haudecoeur *et al.*, 2008).

Il catabolismo della GABA è localizzato nei mitocondri (Shelp *et al.*, 1999) e si ritiene abbia un ruolo importante nel modulare lo stress ossidativo. Infatti mutazioni nel suo catabolismo si accompagnano a fenomeni di morte cellulare dovuti ad un anomalo accumulo di ROS (Bousché *et al.*, 2003).

Il fatto che non si osservi un aumento generalizzato di tutti gli aminoacidi ma prevalentemente del GABA, suggerisce che anche l'aumento in prolina sia un effetto mediato dallo stress ossidativo. Non è ben chiaro a questo livello perché il GABA aumenti se il suo catabolismo dovrebbe in qualche modo proteggere dallo stress ossidativo. Tuttavia esistono diversi punti di convergenza con il metabolismo della prolina o più generalmente del glutammato. Il fatto che specie nelle interazioni con patogeni GABA e Prolina abbiano ruoli antagonisti rende questo aspetto di particolare interesse per ulteriori approfondimenti sperimentali.

Resta comunque da capire se l'accumulo di prolina sia correlato in qualche modo a quello di GABA, o se si tratti di due fenomeni indipendenti.

Espressione indotta da condizioni di stress ossidativo: *OAT* e *ProDH1*

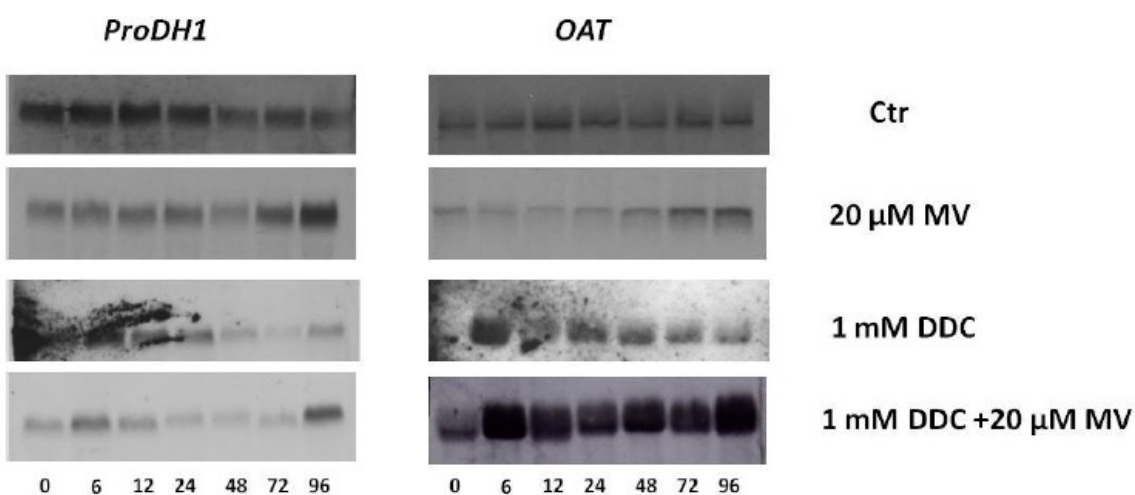
Nell'ambito di una cooperazione scientifica tra l'Università di Ferrara e quella di Konstanz (Germania), i livelli di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina sono stati allora studiati mediante Northern Blot su estratti di cellule trattate con MV e con DDC. L'interpretazione dei dati ottenuti, riassunti in Figura 42, è resa difficile dall'alta variabilità riscontrata tra i diversi esperimenti, che rende difficile discriminare tra un reale effetto e fluttuazioni statistiche. Una chiara induzione può tuttavia essere osservata per *OAT* e *ProDH1*, con una cinetica che sembra coincidere con l'accumulo di prolina. I livelli di *ProDH2* restano sotto i limiti di rilevabilità, un risultato in accordo con la repressione di questa isoforma determinata dalla presenza di saccarosio (Weltmeier *et al.*, 2006), abbondante nel terreno di coltura delle cellule. I dati ottenuti relativamente agli altri geni sono, invece, poco chiari. *P5CS1* sembra essere represso in condizioni di stress ossidativo. *P5CS2* è invece apparentemente indotto nei trattamenti con DDC a tempi brevi, mentre nelle cellule trattate con MV, se un effetto è presente, si registra solo a tempi più lunghi dall'esposizione allo stress. I livelli di espressione di *P5CDH* e *P5CR* sembrano non soggetti a fluttuazioni significative.

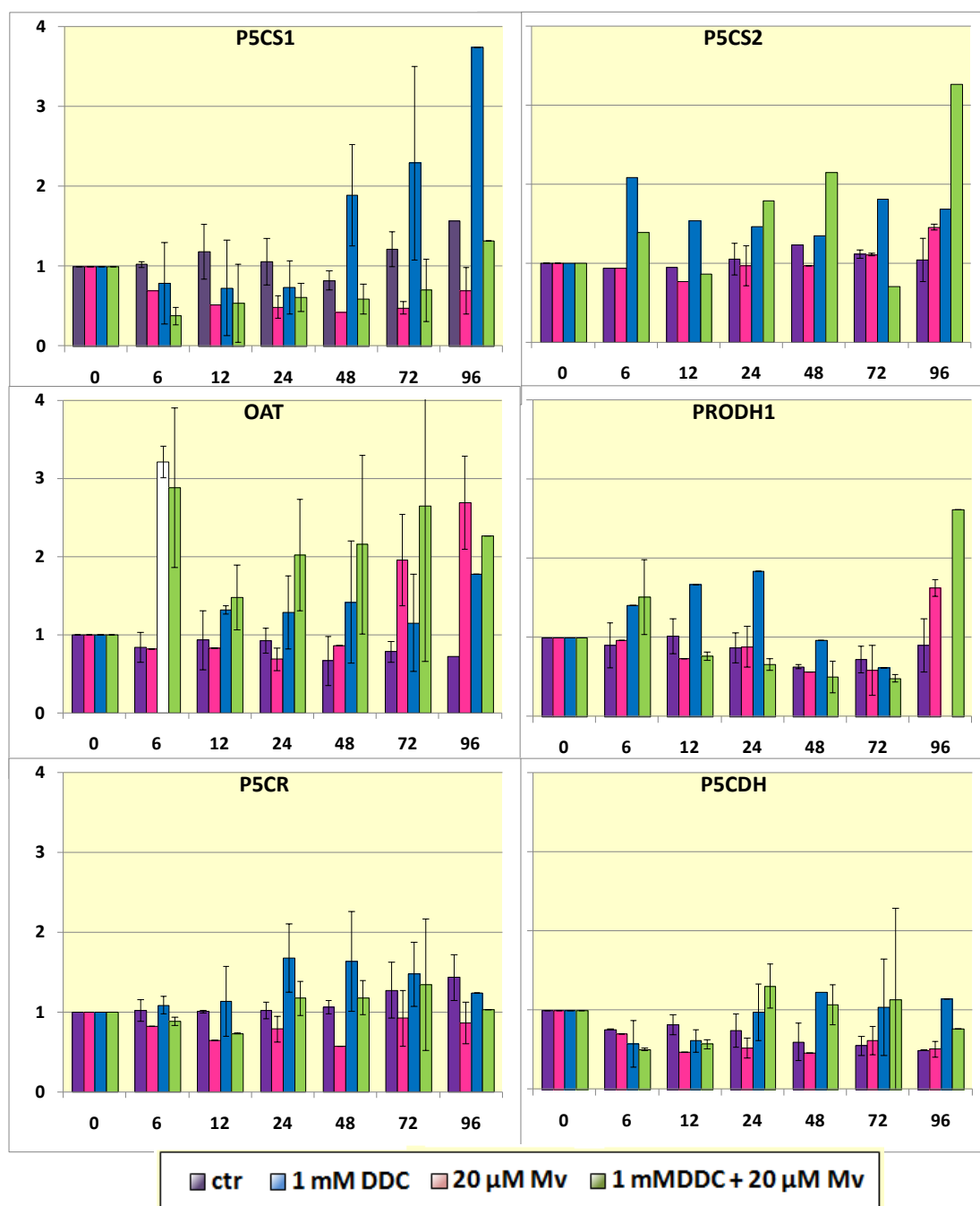
Figura 42. Analisi del pattern di espressione dei geni del metabolismo della prolina durante lo stress ossidativo in *A. thaliana*

L'RNA totale è estratto da campioni raccolti a tempi crescenti dopo l'avvio dei diversi trattamenti. I campioni sono stati sottoposti ad analisi per Northern blot per i geni δ *OAT*, *ProDH1*, *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR* e *P5CDH*. In ogni lane sono caricati 15 μ g di RNA.

Nel pannello superiore sono riportati i dati più significativi, ottenuti per *ProDH1* e δ *OAT*.

Su tutti i blots è stata condotta una analisi densitometrica effettuata utilizzando il programma ImageJ 1.42 q. Le aree dei picchi sono state standardizzate usando l'rRNA come riferimento e normalizzando per il tempo zero. I risultati, riportati nel pannello inferiore, sono media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. Per quanto riguarda *P5CS2* non sono disponibili replicazioni se non per alcuni punti.





Una adeguata discussione dei risultati non può essere formulata allo stato attuale della ricerca. Ulteriori elementi sono necessari per chiarire quale tra le diverse possibilità possa spiegare le reazioni identificate. Un'utile integrazione sarebbe costituita dalla ripetizione degli stessi esperimenti su genotipi mutanti, così come dalla quantificazione dei livelli di superossido, dei singoli amino acidi e del P5C intracellulare. I dati sembrano indicare che, mentre i geni per i due enzimi che producono P5C sono indotti dallo stress ossidativo, quelli per gli enzimi scavenger del P5C, cioè *P5CR* e *P5CDH*, sono apparentemente non regolati.

Tralasciando gli aspetti poco chiari riguardo la regolazione degli altri geni, resta abbastanza evidente l'attivazione di *ProDH1* e *OAT*. Il catabolismo della prolina però può risultare in un aumento di SO ad opera dell'attività della *ProDH* (Donald *et al.*, 2001).

Probabilmente durante gli stress abiotici esistono altri meccanismi regolativi più efficaci che bloccano il catabolismo dell'aminoacido e ne consentono l'accumulo a concentrazioni elevate. In via del tutto speculativa si può ipotizzare che in alcune condizioni possa esistere meccanismo di auto-induzione. Ad esempio durante le interazioni pianta-patogeno si assiste sempre ad un burst ossidativo nell'ospite. Nelle interazioni incompatibili ad un primo scoppio ossidativo segue uno più inteso e di lunga durata cosa che, generalmente, non avviene nelle interazioni compatibili. Così la ProDH potrebbe fungere da enacher dello scoppio ossidativo nella risposta all'attacco patogeno. Il fatto che vi sia anche induzione della OAT che, come la ProDH, catalizza la formazione di P5C è consistente con l'ipotizzata tossicità di questo metabolita e il suo coinvolgimento nei fenomeni di tossicità e di stress biotico. Per cui l'accumulo di SO, di P5C o di entrambi potrebbe mediare i fenomeni di PCD che la pianta attua per bloccare l'infezione dei patogeni. Va precisato a tal proposito che i ROS, ma anche il P5C, possono indurre geni specifici, quindi oltre all'effetto primario sulla vitalità cellulare bisogna tenere in considerazione la possibilità di un effetto legato alla loro funzione di secondi messaggeri.

Purificazione e caratterizzazione biochimica della P5CDH e della P5CR di *A. thaliana*

I dati ottenuti sulle cellule in coltura sembrano indicare che il P5C abbia un effetto citostatico, mentre quelli ottenuti in lievito suggeriscono che la prolina possa esercitare un effetto tossico di per sé. Sembra inoltre possibile che l'OAT in presenza di concentrazioni elevate di P5C catalizzi *in vivo* la reazione di transaminazione a ornitina. Indicazioni preliminari suggeriscono che lo stress ossidativo possa indurre sia la *ProDH1* che l'*OAT*.

Una valutazione della espressione delle vie del metabolismo della prolina esclusivamente basata su analisi Northern non sarebbe però del tutto accurata. Numerosi dati in letteratura hanno evidenziato fenomeni di regolazione post-trascrizionale (Hua *et al.*, 2001, Borsani *et al.*, 2005), e poco si sa relativamente ai meccanismi di regolazione post-traduzionale. Nessuno dei due enzimi che utilizzano il P5C come substrato possono infatti essere saggiati in estratti grezzi, dal momento che prodotti di reazione dell'uno verrebbero immediatamente utilizzati dall'altro, comportando l'instaurarsi di un ciclo futile: il NAD⁺ prodotto dalla P5CR in presenza di una concentrazione di P5C non limitante verrebbe immediatamente ridotto dalla P5C deidrogenasi. In vivo questo non avviene perché i due enzimi sono localizzati in diversi compartimenti subcellulari (Forlani *et al.* 1997). Nessuno di questi enzimi è stato purificato e caratterizzato in *Arabidopsis thaliana*. Non vi è neppure disponibilità di anticorpi specifici, che consentirebbe almeno di dosare la quantità di proteina in risposta a diverse condizioni sperimentali. Si è deciso allora di procedere alla purificazione di P5C reductasi e P5C deidrogenasi da cellule in coltura di *Arabidopsis* così da ottenere sia una loro caratterizzazione biochimica, che la produzione di anticorpi policlonali.

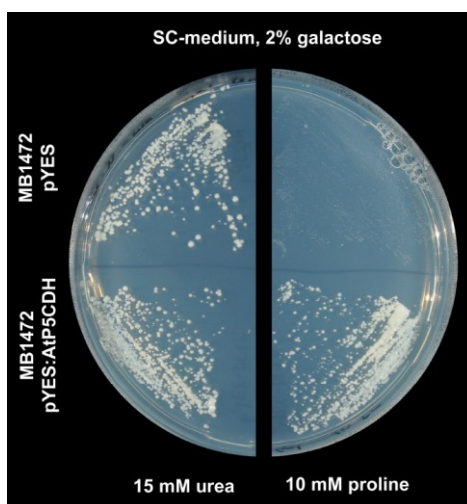
Purificazione parziale della P5C deidrogenasi per espressione eterologa in lievito

Alcuni tentativi preliminari hanno evidenziato livelli della P5CDH troppo bassi, tali da vanificare i vantaggi di un sistema come quello delle cellule in coltura. Si è reso necessario

quindi il ricorso a un diverso approccio, utilizzando l'espressione in un sistema eterologo del corrispondente gene. Per consentire una opportuna localizzazione dell'enzima, mitocondriale, e permettere che eventuali modificazioni post-traduzionali potessero avvenire correttamente si è preferito utilizzare un costrutto ricombinante esprimibile in un sistema eucariotico. Il costrutto, clonato nel vettore di espressione per lievito pYES2 e posto sotto il controllo del promotore *GAL1* inducibile da galattosio, è stato cortesemente fornito dal dott. Dietmar Funck (Konstanz, Germany). L'avvenuta trasformazione e la produzione di una proteina funzionale in lievito è stata confermata con esperimenti di complementazione su genotipi *put2*, privi di una P5CDH funzionale e per questo incapaci di crescere in presenza di prolina come unica fonte di azoto (Figura 43).

Figura 43. Complementazione funzionale di un mutante *put2* di *S. cerevisiae* mediante l'espressione della P5CDH di *Arabidopsis*.

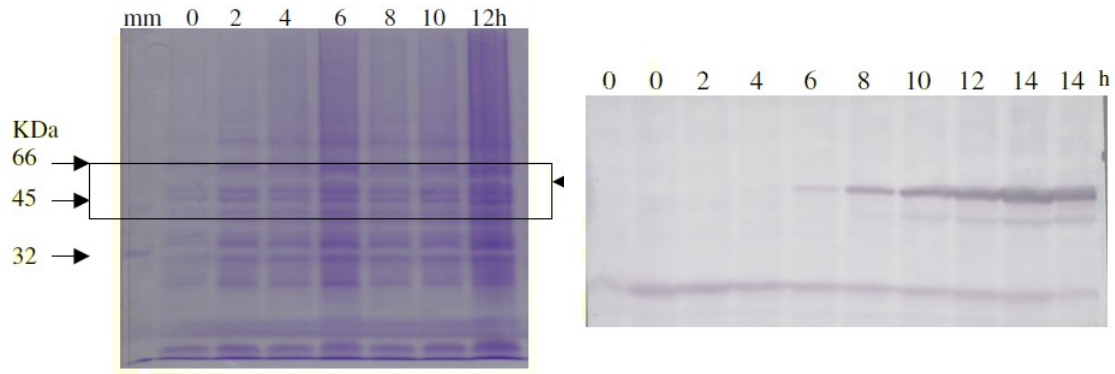
Ceppi di lievito *put2* trasformati con il plasmide pYES vuoto o con il gene di *Arabidopsis* sono stati fatti crescere su terreni contenenti come unica fonte di azoto urea o prolina. In presenza di galattosio, l'induttore, solo i trasformati con il transgene sono in grado di usare prolina.



Estratti grezzi di lievito in cui è stata indotta la trascrizione del transgene, analizzati per SDS-PAGE, hanno sì evidenziato una banda non presente in cellule non indotte e del peso molecolare atteso, ma di entità modesta, molto inferiore all'atteso (Figura 44). Quando gli stessi campioni sono stati però analizzati mediante Western blot, utilizzando anticorpi policlonali contro la P5CDH di patata (Forlani *et al.*, 2000), un intenso segnale ha confermato l'espressione della proteina di interesse (Figura 44).

Figura 44. Espressione della AtP5CDH di *A. thaliana* in *S. cerevisiae*

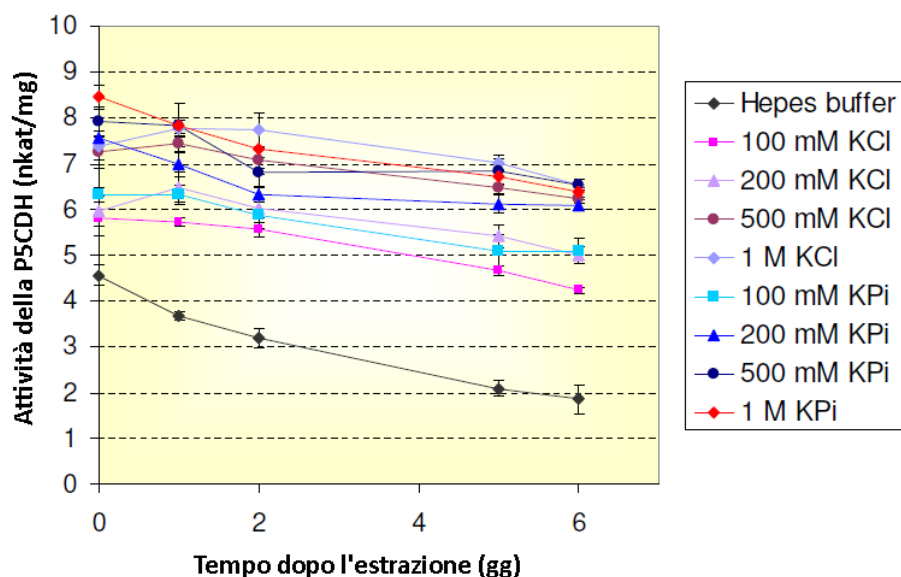
Ceppi trasformati sono stati indotti a produrre la proteina transgenica. A tempi crescenti dopo l'induzione le cellule sono state estratte e gli estratti sono stati analizzati per SDS-PAGE (sinistra) e Western Blot (destra).



Una volta passati alla messa a punto delle condizioni ottimali per la purificazione, si è però dovuto constatare che l'estratto perde completamente attività nell'arco di pochi giorni, e che il semplice frazionamento con ammonio solfato provoca una drastica riduzione della attività. La stabilità di una proteina è un requisito fondamentale al fine di una sua purificazione. Si è reso quindi necessario ricercare parametri in grado di stabilizzare l'enzima. I risultati ottenuti indicano che l'enzima conserva più a lungo la sua conformazione attiva in tamponi con una media forza ionica e in presenza di fosfato inorganico (Figura 45).

Figura 45. Effetto della forza ionica e del fosfato sulla stabilità della P5CDH di *Arabidopsis*

Per valutare l'effetto di diversi tamponi e della forza ionica sulla stabilità dell'enzima, l'estratto grezzo è stata desalato contro diversi tamponi e addizionato di dosi crescenti di KCl, o contro tampone fosfato a diversa concentrazione. Dai risultati ottenuti non si può escludere che il responsabile della stabilizzazione della proteina sia lo ione K^+ .



Visto che il taglio con ammonio solfato determina una eccessiva perdita di attività, si è quindi deciso di avviare il frazionamento cromatografico direttamente sull'estratto desalato. La sequenza di tre passaggi rispettivamente su DEAE-Sephacel, Mono-Q e SUPEROSE-6 hanno permesso di ottenere una purificazione dell'enzima di 188 volte, con una resa del 60% (Tabella 9). L'analisi del preparato per SDS-PAGE ha evidenziato, però, la presenza residua di numerose bande contaminanti (dati non mostrati), rendendo impossibile il suo utilizzo per la induzione di anticorpi policlonali. Nel proseguo del lavoro si tenterà la messa a punto di ulteriori passaggi cromatografici che consentano la purificazione all'omogeneità elettroforetica della P5CDH di *Arabidopsis thaliana*, oltre a procedere a una sua esaustiva caratterizzazione biochimico-funzionale.

Tabella 9. Parziale purificazione della P5CDH di *A. thaliana*

I risultati sono quelli ottenuti in una tipica purificazione da 1 g (FW) di cellule indotte di lievito.

Step	Proteine (mg)	Attività (nkat mL ⁻¹)	Att.Specifica (nkat mg ⁻¹)	Resa (%)	Purificazione (volte)
Estratto crudo	120.00	nd	nd	nd	nd
Desalato	119.21	240.70	2.02	100.0	1
DEAE-Sephacel	7.69	332.95	43.29	138.3	21
Mono-Q	1.84	225.72	122.49	67.8	61
Superose-6	0.53	202.57	380.28	60.8	188

Purificazione e proprietà della P5CR di *Arabidopsis thaliana*

È stato invece possibile ottenere la purificazione all'omogeneità della P5C reductasi partendo da cellule in coltura in precoce fase esponenziale di crescita. Questo risultato è stato conseguito attraverso sei passaggi cromatografici: dopo un taglio con ammonio solfato (0-50%) che ha consentito l'eliminazione di una prima parte delle proteine contaminanti, un doppio passaggio su colonna a scambio anionico, equilibrata prima al di sotto e poi al di sopra del punto isoelettrico calcolato sulla base della sequenza aminoacidica (8.48), ha permesso un forte arricchimento del preparato. Ulteriori passaggi hanno determinato un arricchimento di circa 20000 volte (Figura 46), con una resa di circa il 12% dell'attività iniziale. Il preparato finale è risultato elettroforeticamente omogeneo (Figura 46). L'attività specifica risulta inaspettatamente alta, ma questo implica anche che la proteina è presente in bassissime quantità nelle cellule, con circa 57 µg di proteina in 200 g (FW) di biomassa cellulare.

La P5CR così purificata è risultata sostanzialmente stabile, conservando più del 90% dell'attività dopo 30 giorni a 0-4°C. L'analisi della proteina per gel filtrazione ha indicato un peso molecolare nativo di circa 360 KDa, suggerendo un oloenzima in forma dodecamerica. L'attività

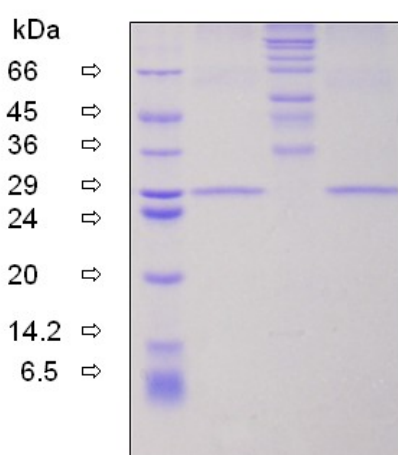
massima si riscontra a 45°C, con un ottimo di pH compreso tra 7.2 e 8.4. L'enzima utilizza preferenzialmente il NADPH, con una Km molto bassa, ma può utilizzare anche il NADH (tabella 10) con cui in condizioni saturanti raggiunge una velocità massima di circa sei volte maggiore. Su queste basi non è dunque chiaro chi dei due ne costituisca il substrato fisiologico.

La disponibilità di un preparato omogeneo ha consentito la ricerca di inibitori specifici per la P5C reductasi vegetale. Trovandosi alla convergenza di entrambe le vie che portano alla sintesi di prolina, il blocco dell'enzima porterebbe alla completa deprivazione dell'imino acido, e tali composti potrebbero rappresentare dei nuovi principi attivi per il diserbo chimico. Lo *screening* di un gruppo di aminofosfonati ha in effetti permesso di ottenere risultati promettenti in tal senso (Forlani *et al.*, 2007; articolo allegato).

Figura 46. Purificazione della P5CR di *Arabidopsis thaliana*.

I risultati si riferiscono a una tipica purificazione da 200 g (FW) di cellule in precoce fase esponenziale di crescita. L'omogeneità del preparato finale è stata verificata mediante SDS-Page (12% poliaccrilamide). Una banda netta è evidente nel range di peso molecolare atteso.

Step	Proteine (mg)	Attività (nkat)	Att.Specifica (nkat mg ⁻¹)	Resa (%)	Purificazione (volte)
Estratto crudo	1235.5	3644.8	2.95	100.0	1.0
0-50% AS	587.3	3183.0	5.42	87.3	1.8
DEAE-Sephacel	67.4	2612.2	38.8	71.7	13.1
Sephacryl S300	13.86	2011.3	145	55.2	49.2
Blu sefarosio	2.44	995.3	408	27.3	138.3
Mono-Q	0.077	584.5	7617	16.0	2582
Idrossiapatite	0.0071	457.1	63982	12.5	21689



⇨ P5C reductasi
28.6 kDa

Tabella 10: Affinità per i substrati della P5CR

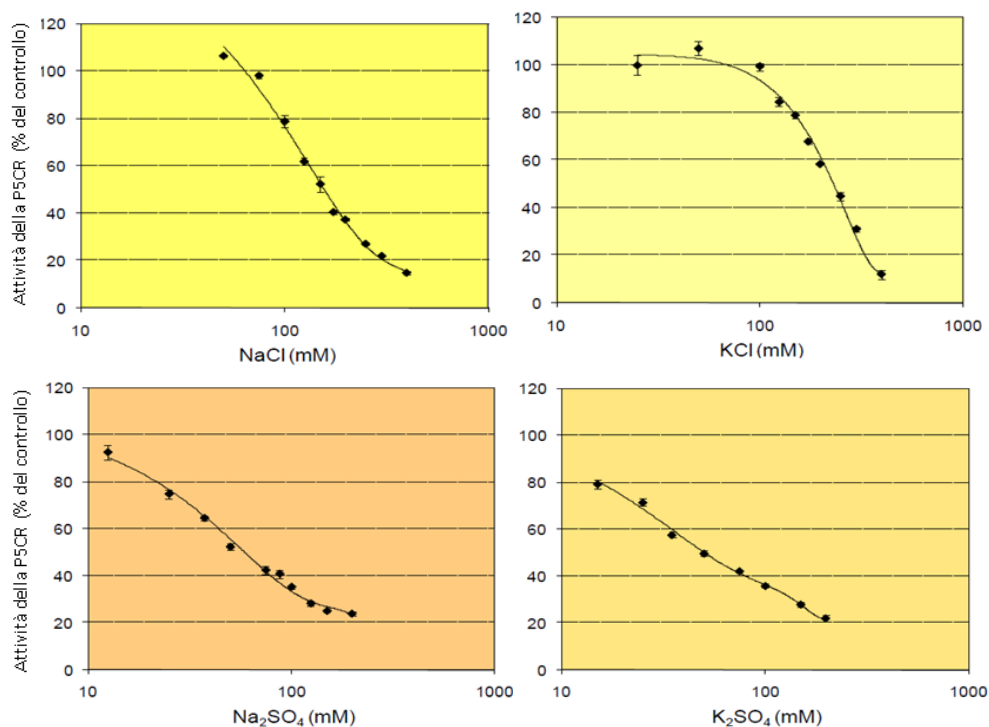
Substrato	Km (mM)
NADH	0.398 ± 0.059
NADPH	0,026 ± 0,002
P5C (NADPH)	0.199 ± 0.048
P5C (NADH)	0.915 ± 0.080

L'attività della P5CR è molto sensibile alla presenza di anioni e cationi

Se la sintesi *de novo* di prolina svolgesse effettivamente un ruolo importante negli aggiustamenti osmotici, ci si aspetterebbe che gli enzimi coinvolti nella sua produzione fossero in grado di lavorare efficientemente anche in presenza di elevate concentrazioni ioniche. Quando l'enzima purificato è stato saggiato in presenza di diversi sali, esso è invece risultato inibito già a basse concentrazioni (Figura 47). L'attività enzimatica è progressivamente inibita da ioni cloruro sopra a 70 mM. Anche se non si hanno informazioni relativamente al contenuto ionico cellulare, questo potrebbe contribuire a spiegare il mancato accumulo di prolina nelle cellule di *Arabidopsis* stressate con sale. Una inusuale sensibilità è stata riscontrata anche nei confronti di altri cationi e anioni. La spiccata sensibilità al solfato lascia pensare che l'enzima possa essere inibito anche in condizioni fisiologiche. Infatti per lo ione SO_4^- si è riscontrata una sensibilità già a 10 mM (Figura 47), e dati di letteratura riportano *in planta* una concentrazione in di questo anione pari a circa 20 mM (Frachisse *et al.*, 1999).

Figura 47. Sensibilità della P5CR a diversi ioni

L'attività della P5CR purificata da cellule in coltura di *Arabidopsis* è stata saggiata in presenza di concentrazioni crescenti di vari sali, come indicato, allo scopo di discriminare l'effetto dei singoli ioni.



Il glutamato e gli amino acidi correlati inibiscono l'attività della P5CR

Si è voluto quindi verificare la possibilità che gli amino acidi correlati biosinteticamente alla prolina possano avere un effetto regolativo sull'attività della P5CR. In effetti si è trovato che glutamato, arginina e prolina inibiscono l'attività dell'enzima purificato, con una ID_{50} inferiore a

100 mM (Tabella 11). Anche l'ornitina risulta inibente, se pur a concentrazioni più elevate. Che non si tratti di un effetto aspecifico è confermato dalla mancanza di inibizione da parte degli amino acidi non correlati al glutamato. L'inibizione esercitata da quest'ultimo mostra poi un andamento del tutto inatteso. A basse concentrazioni, comprese tra 0,1 e 10 mM, esso ha un effetto inibitorio, con una ID_{50} di circa 2mM e un meccanismo di tipo competitivo. A concentrazioni superiori l'effetto sembra revertito (Figura 48). Solo a dosi altissime, superiori a 100 mM, l'attività torna a essere inibita. Contrariamente all'ornitina, all'arginina e (in condizioni normo-osmotiche) alla prolina, i livelli di glutamato nella cellula vegetale sono effettivamente compresi in un ambito di concentrazioni (1-20 mM; Obojska *et al.*, 2004; Mazzucotelli *et al.*, 2006) in cui tali effetti si potrebbero realmente verificare.

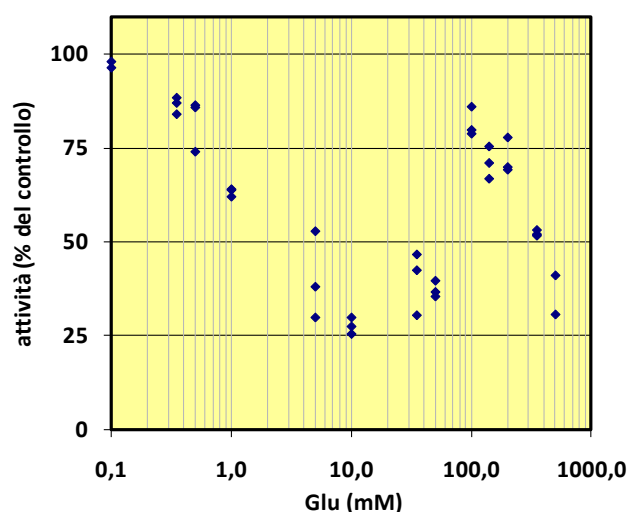
Tabella 11. Inibizione dell'attività della P5CR da parte di alcuni amino acidi

La concentrazione inibente al 50% l'attività della P5CR è stata calcolata utilizzando la regressione lineare dei valori di attività enzimatica espressi come percentuale dei controlli non trattati graficati contro il logaritmo della concentrazione di amino acido.

Amino acido	IC_{50} (mM)
L-Pro	84.3 ± 7.5
L-Ala	533 ± 52
Gly	>1M
L-Ser	>1M
L-Val	315 ± 25
L-Arg	72.3 ± 5.5
L-Orn	153 ± 13

Figura 48. Inibizione dell'attività della P5CR da parte del glutamato

L'attività è stata misurata in presenza di concentrazioni crescenti di acido glutamico. Una diminuzione della velocità catalitica, proporzionale alla concentrazione, è evidente fino a 10 mM. A livelli superiori l'inibizione reverte, ma oltre i 100 mM l'inibizione si manifesta nuovamente. Lo stesso pattern è stato ottenuto con l'enzima ricombinante espresso in *E. coli*.



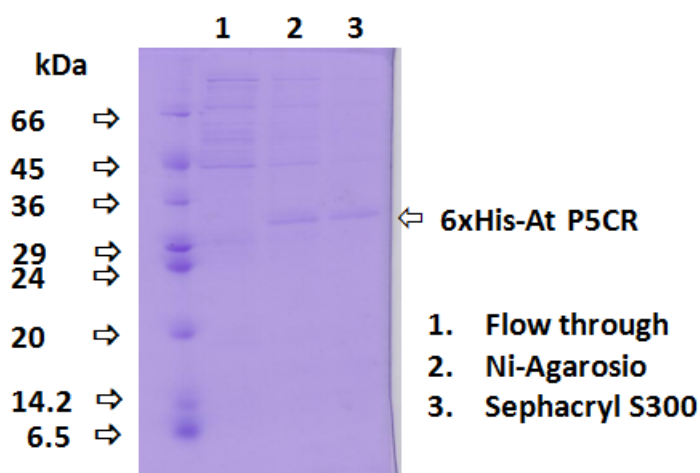
Se così fosse, la P5CR sarebbe costitutivamente inibita *in vivo* a meno che il glutamato non fosse disponibile a concentrazioni più elevate. Ulteriori evidenze sperimentali dovrebbero comunque essere ottenute per delineare un quadro preciso. Bisognerebbe ad esempio riuscire a misurare con precisione la concentrazione di glutamato libero, che può variare all'interno dei compartimenti cellulari, e non è nemmeno del tutto chiarito se l'enzima sia localizzato solo nel citosol o anche nei plastidi. Tali risultati, comunque, suggeriscono la possibilità che la sintesi di prolina venga ridotta quando il pool di glutammato è al di sotto di un livello ottimale. Meno chiaro è il meccanismo molecolare in grado di determinare il profilo bimodale evidenziato.

Ottenimento di anticorpi policlonali contro la P5CR espressa in *E. coli*

I bassi livelli di proteina presente nelle cellule in coltura ha impedito di ottenere la quantità di materiale purificato necessaria all'ottenimento di anticorpi policlonali. Per conseguire questo obiettivo si è allora optato per un sistema eterologo di espressione. Per facilitare la successiva purificazione si è impiegato un costrutto in cui la P5CR è stata fusa con una coda di 6 istidine (6xHis), gentilmente fornito dal dott. Dietmar Funck (Konstanz, Germany). Dopo la purificazione su colonna di Ni⁺⁺ agarosio, si è reso però necessario un ulteriore passaggio cromatografico per gel filtrazione per eliminare completamente le proteine di *E. coli* (Figura 49).

Figura 49. Purificazione della 6xHis-P5CR

La purificazione della proteina ricombinante da estratti di *E. coli* è stata evidenziata caricando su un gel di poliacrilamide al 12% aliquote di ogni preparato derivante dai diversi passaggi.



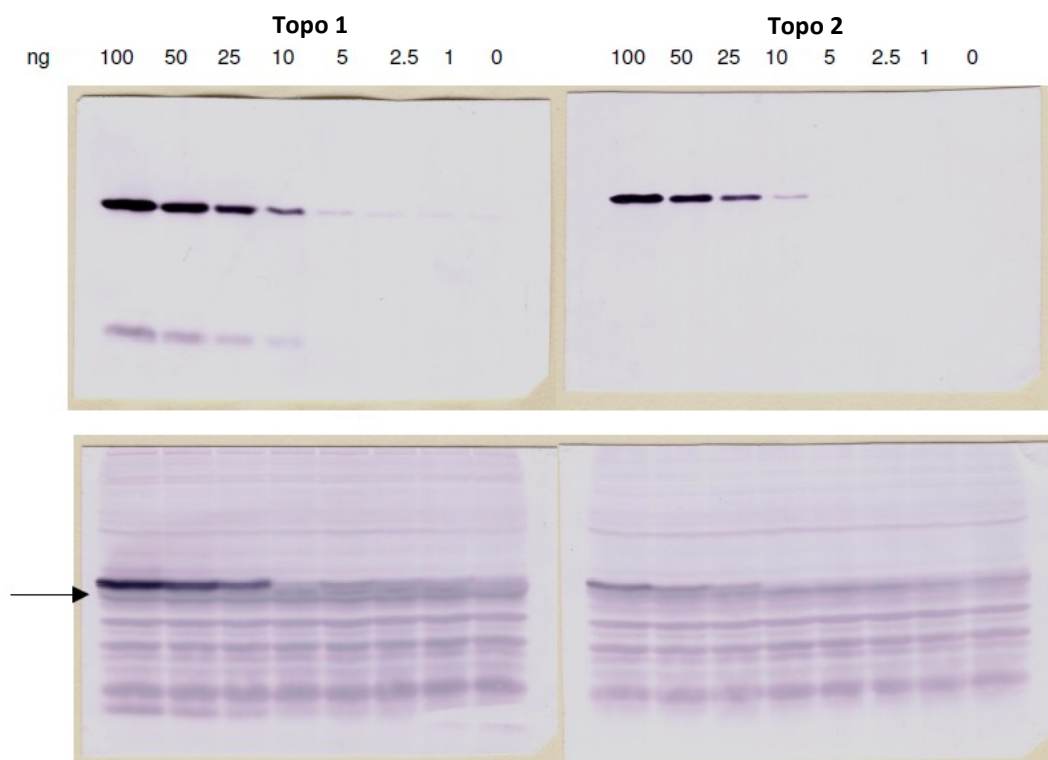
Il preparato così ottenuto è stato in parte utilizzato per verificare l'effetto inibitorio del glutamato. I risultati precedentemente ottenuti sono stati confermati anche sull'enzima ricombinante, permettendo così di escludere un artefatto dovuto alla possibile presenza di contaminanti residui nel preparato da cellule vegetali in coltura.

Una parte della proteina purificata è stata invece utilizzata per l'immunizzazione di due topolini da laboratorio. Dopo 15 giorni dalla terza iniezione le cavie sono state sacrificate, e

l'antisiero isolato dal sangue. Gli anticorpi prodotti sono stati saggiati per verificarne la sensibilità. Per lo sviluppo dei blot si è utilizzato la reazione colorimetrica catalizzata dalla fosfatasi alcalina coniugata con l'anticorpo secondario. La sensibilità è risultata soddisfacente per entrambi gli antisieri, con una capacità di evidenziare quantità inferiori a 10 ng di proteina pura (Figura 50). Tale sensibilità potrebbe essere ulteriormente aumentata utilizzando per lo sviluppo la chemiluminescenza. Quando la sensibilità è stata valutata su di un estratto grezzo preparato da cellule in coltura cresciute in condizioni normo-osmotiche (Figura 50), si sono però evidenziate numerose bande aspecifiche indicando una forte cross-reattività dell'anticorpo policlonale. L'aggiunta all'estratto grezzo di concentrazioni crescenti di 6xHis-P5CR ha comunque consentito di stimare la concentrazione di proteina nativa in un estratto grezzo intorno ai 5 ng su 100 µg di proteine caricate. Sono ora in corso esperimenti per ottimizzare le condizioni di ibridazione dell'anticorpo, in modo da ridurre il più possibile i legami aspecifici.

Figura 50. Sensibilità degli anticorpi policlonali nei confronti dell'antigene puro in assenza o in presenza di un estratto grezzo da cellule non stressate

Nel pannello superiore quantità da 0 a 100 ng di proteina pura sono state analizzate per Western blot. Lo sviluppo delle membrane ha rivelato una buona sensibilità degli anticorpi prodotti, consentendo nel caso dell'antisiero di Topo 1 di visualizzare una banda già con 1 ng di proteina. Nel pannello inferiore quantità da 0 a 100 ng di proteina ricombinante sono state aggiunte a 100 µg di proteine estratte da cellule in coltura di *Arabidopsis* prima di essere caricate su gel. In queste condizioni si riscontra una forte cross-reattività degli anticorpi verso altre proteine vegetali. Tuttavia è possibile riconoscere con chiarezza la banda corrispondente alla P5C reduttasi di *Arabidopsis* (freccia nera), che corre nel gel con una velocità leggermente superiore alla proteina ricombinante per la mancanza della coda di istidine.



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I risultati ottenuti nel corso del presente studio, pur non consentendo l'acquisizione di evidenze conclusive che spieghino in dettaglio a livello molecolare i meccanismi alla base della tossicità della prolina esogena, rappresentano un insieme originale di dati suscettibile di costituire la base per un ulteriore approfondimento. In particolare, rispetto a quanto sin qui riportato nella letteratura scientifica, possono essere formulate le seguenti conclusioni:

- In una popolazione uniforme di cellule indifferenziate la somministrazione di NaCl induce rilevanti effetti tossici senza che le cellule accumulino prolina. Il fatto che le stesse cellule sottoposte ad uno stress di tipo puramente osmotico accumulino prolina è coerente con l'ipotesi che la tossicità ionica si instauri a concentrazioni di sale non sufficientemente alte da indurre un accumulo dell'imino acido. Tale ipotesi è avvalorata dalla spiccata sensibilità nei confronti del sale della P5C riduttasi di *A. thaliana*.
- L'accumulo di prolina nei trattamenti con PEG non sembra essere sufficiente a contrastare la corrispondente riduzione del potenziale idrico del mezzo.
- La somministrazione dell'imino acido esercita un marcato effetto inibente sulla crescita delle colture del solo genotipo *p5cdh*, e solo se l'aggiunta risulta contestuale al reinocolo, indicando che la sua tossicità dipende dallo stato fisiologico delle cellule.
- L'assenza di una P5CDH funzionale impedisce l'ossidazione a glutamato del substrato esogeno, anche se alcune evidenze sperimentali suggeriscono una sua parziale metabolizzazione ad arginina, probabilmente ad opera della OAT.
- In presenza di un evidente riduzione della proliferazione cellulare nei genotipi *p5cdh* trattati con prolina esogena, il test basato sull'incorporazione del colorante Blu di Evans non evidenzia alcuna riduzione della vitalità cellulare, suggerendo un effetto citostatico e non citotossico.
- Esperimenti complementari effettuati su ceppi isogenici di lievito indicano una maggiore sensibilità dei genotipi privi della ProDH rispetto a quelli privi della P5CDH. Questo suggerisce un effetto dipendente dalla concentrazione di prolina piuttosto che dall'accumulo di P5C.
- Cellule di *Arabidopsis* in coltura accumulano prolina se sottoposte a condizioni di stress ossidativo, avvalorando la possibilità che l'accumulo dell'imino acido possa costituire un generico meccanismo di difesa dai ROS.
- Studi sulla regolazione dei geni coinvolti in questo metabolismo, pur se non definitivi, suggeriscono che il superossido possa indurre specificamente la *ProDH* e l'*OAT*.
- Dei due enzimi capaci di utilizzare il P5C come substrato, la P5C riduttasi è stata purificata e caratterizzata da un punto di vista biochimico, rivelando una spiccata sensibilità ad alcuni ioni e agli amino acidi della famiglia del glutamato e suggerendo che in condizioni fisiologiche la sua attività sia parzialmente inibita *in vivo*.
- L'effetto inibente del glutamato ha un inconsueto andamento bimodale, che suggerisce

che la biosintesi di prolina possa essere limitata quando i livelli intracellulari di glutamato non siano sufficientemente elevati.

- L'ottenimento di anticorpi policlonali contro la 6xHis-P5CR, che mostrano una buona sensibilità nei confronti della proteina nativa, rappresenta un importante strumento di indagine per future analisi, la cui disponibilità potrebbe aprire la strada alla localizzazione subcellulare dell'enzima.

Nel prossimo futuro s'intende procedere ad affinare le analisi su un certo numero di punti cruciali, in modo da ottenere un quadro esaustivo su almeno alcuni aspetti che i presenti risultati hanno iniziato a delineare. In particolare ci si propone i seguenti obiettivi:

- Per quanto riguarda la tossicità della prolina esogena in lievito, per avvalorare l'ipotesi per cui nè il P5C nè i ROS generati dalla ProDH siano alla base di tali fenomeni, si cercherà di determinare i livelli di P5C, amino acidi e ROS nei diversi genotipi in risposta ai trattamenti con l'imino acido.
- Per verificare che l'accumulo di prolina in cellule in coltura non abbia come si crede in genere un ruolo di aggiustamento osmotico ma, come ipotizzato, intervenga maggiormente nella protezione da condizioni di stress ossidativo, si procederà a quantificare i livelli di ROS in cellule sottoposte a stress salino e osmotico e a determinare se gli stessi livelli indotti con altri mezzi siano sufficienti a causare un accumulo di prolina simile in termini sia quantitativi che temporali. Contestualmente, si cercherà di ottenere una misura esatta del volume cellulare per giungere ad una stima precisa della concentrazione di prolina nel citosol.
- Per ottenere la possibilità di quantificare contemporaneamente sia la P5C deidrogenasi che la P5C reductasi in diverse condizioni sperimentali, si provvederà infine alla purificazione all'omogeneità elettroforetica della P5CDH di *Arabidopsis*, così da poter indurre anche per questo enzima anticorpi policlonali.
- L'evidenza di una induzione sia di δ OAT che di *ProDH1* durante lo stress ossidativo insieme con l'indicazione che il P5C mitocondriale possa essere metabolizzato ad Orn/Arg e con la possibilità che anche la ProDH vegetale possa produrre SO suggerisce interessanti connessioni del metabolismo della prolina con le specie reattive dell'ossigeno e dell'ossido nitrico. Quest'ultimo recentemente è stato dimostrato poter essere prodotto nelle piante, analogamente agli animali, anche a partire dall'Arg. Inoltre l'accumulo di NO in risposta allo stress da freddo sembra essere legato all'accumulo di prolina (Zhao *et al.*,2009).

BIBLIOGRAFIA

- Abraham E., Rigo G., Szekely G., Nagy R., Koncz C. and Szabados L. (2003)** Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 51, 363–372.
- Aloni B. and Rosenshtein G. (1982)** Effect of flooding on tomato cultivars: The relationship between proline accumulation and other morphological and physiological changes. *Physiologia Plantarum* 56, 513–517.
- Anbazzhagan M., Krishnamurthy R. and Bhagwat K.A. (1988)** Proline: An enigmatic indicator of air pollution tolerance in rice cultivars. *Journal of Plant Physiology* 133, 122–123.
- Armengaud P., Thiery L., Buhot N., March G. G. and Savoure A. (2004)** Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum* 120, 442–450.
- Ashraf M and Foolad M.R. (2007)** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206–216.
- Atkinson D.E. (1977)** Cellular energy metabolism and its regulation. New York : Academic Press.
- Auerswald L., Schneider P. and Gade G. (1998)** Utilisation of substrates during tethered flight with and without lift generation in the African fruit beetle *Pachnoda sinuate* (Cetoniinae). *Journal of Experimental Biology* 201, 2333-2342.
- Ayliffe M.A., Mitchell H.J., Deuschle K. and Pryor A.J. (2005)** Comparative analysis in cereals of a key proline catabolism gene. *Molecular Genetics Genomics* 274, 494-505.
- Ayliffe M.A., Roberts J.K., Mitchell H.J., Zhang R., Lawrence G.J., Ellis J.G. and Pryor T.J (2002)** A plant gene up-regulated at rust infection sites. *Plant Physiology* 129, 169-180.
- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Lempe J. and Weigel D. (2006)** Potent Induction of *Arabidopsis thaliana* Flowering by Elevated Growth Temperature. *PLOS Genetics* 2, 980-989.
- Bassi R. and Sharma S.S. (1993)** Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by Lemnaminor. *Annals of Botany* 72, 151–154.
- Bates L.S., Waldren R.P. and Teare I.D. (1973)** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant & Soil* 39, 205–207.
- Bathurst N.O. (1954)** The amino-acids of grass pollen. *Journal Of Experimental Botany* 5, 253-256.

- Beligni M.V. and Lamattina L. (2000)** Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210, 215–221.
- Berlicki L., Obojska A., Forlani G. and Kafarski P. (2005)** Design, synthesis, and activity of analogues of phosphinothricin of inhibitors of glutamine synthetase. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 6340-6349.
- Bettini P., Michelotti S., Bindi D., Giannini R., Capuana M. and Buiatti M. (2003)** Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* rolD gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* 107, 831-836.
- Binzel M.L., Hasegawa P.M., Rhodes D., Handa S., Handa A.V. and Bressan R.A. (1987)** Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiology* 84, 1408–1415.
- Black W.J., Stagos D., Marchitti S.A., Nebert D.W., Tipton K.F., Bairoch A. and Vasiliou V. (2009)** Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics* 19, 893-902.
- Blodgett J.A., Zhang J.K. and Metcalf W.W. (2005)** Molecular cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the phosphinothricin tripeptide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 230-240.
- Boggess S.F., Aspinall D. and Paleg L. (1976a)** Stress metabolism IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Australian journal of plant physiology* 3, 513–525.
- Boggess S.F., Stewart C.R., Aspinall D. and Paleg L. (1976b)** Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiology* 58, 398–401.
- Bohnert H. J. and Jensen R. G. (1996)** Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in biotechnology* 14, 89–97.
- Bohnert H. J. and Shen B. (1999)** Transformation and compatible solutes. *Scientia horticulturae* 78, 237–260.
- Bolwell G.P., Davies D.R., Gerrish C., Auh C. and Murphy T.M. (1998)** Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanism. *Plant Physiology* 116, 1379–1385.
- Bone N., Millar J.B.A., Toda T. and Armstrong J. (1998)** Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Current biology* 8, 135-144.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R., and Zhu J. (2005)** Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123, 1279–1291.

- Bouché N. and Fromm H. (2004)** GABA in plants: just a metabolite? Trends in Plant Science 9, 110–115.
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Moller S.G. and Fromm H. (2003)** Mitochondrial succinic semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 100, 6843–6848.
- Bown A.W., MacGregor K.B. and Shelp B.J. (2006)** Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? Trends in Plant Science 11, 424–427.
- Boyer J.S. (1982)** Plant productivity and environment. Science 218, 443-448.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- Breitkreuz K.E., Shelp B.J., Fischer W.N., Schwacke R. and Rentsch D. (1999)** Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. FEBS letters 450, 280–284.
- Carter C., Shafir S., Yehonatan L., Palmer R.G. and Thornburg R. (2006)** A novel role for proline in plant floral nectars. Naturwissenschaften 93, 72-79.
- Castro G.R. Baigori M.D and Siñeriz F. (1995)** A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms. Journal of Microbiological Methods 22, 51-56.
- Chang P.F.L., Damsz B., Kononowicz A.K., Reuveni M., Chen Z., Xu Y., Hedges K., Tseng C.C., Singh N.K., Binzel M.L., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M and Bressan R.A.(1996)** Alterations in cell membrane structure and expression of a membrane-associated protein after adaptation to osmotic stress. Physiologia Plantarum 98, 505-516.
- Chen J., Zhang X., Jing R., Blair M.W., Mao X. and Wang S. (2010)** Cloning and genetic diversity analysis of a new P5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theoretical and applied genetics. 120, xxx-yyy.
- Chen Z., Silva H. and Klessig D.F. (1993)** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 262, 1883-1886.
- Cheong Y.H., Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T. and Luan S. (2002)** Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. Plant Physiology 129, 661–677.
- Chiang H.H. and Dandekar A.M. (1995)** Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L) during development and in response to desiccation. Plant, Cell & Environment 18, 1280–1290.
- Choi Y.E., Jeong J.H., In J.K. and Yang D.C. (2003)** Production of herbicide-resistance transgenic *Panax ginseng* through the introduction of the phosphotricin acetyl transferase gene and successful soil transfer. Plant Cell Reports 21, 563-568.

- Chu T.M., Jusaitis M., Aspinall D. and Paleg L.G. (1978)** Accumulation of free proline at low temperatures. *Physiologia Plantarum* 43, 254–260.
- Crawford L.A., Bown A.W., Breitzkreuz K.E. and Guinel F.C. (1994)** The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiology* 104, 865–871.
- Csató M., Dobozy A. and Simon N. (1980)** Study of Phagocytic Function with a Quantitative Nitroblue-Tetrazolium (NBT) Reduction Test in Diabetes Mellitus. *Archives of Dermatological Research* 268, 283-288.
- Csonka L.N. and Hanson A.D. (1993)** Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* 45, 569–606.
- Curtis J., Shearer G. and Kohl D.H. (2004)** Bacteroid proline catabolism affects N(2) fixation rate of drought-stressed soybeans. *Plant Physiology* 136 3313-3318.
- De Ronde J.A., Spreeth M.H. and Cress W.A. (2000)** Effect of antisense Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 32, 13–26.
- Delauney A.J. and Verma D.P.S. (1993)** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 4, 215–223.
- Delauney A.J. and Verma, D.P.S. (1990)** A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Molecular Genetics and Genomics* 221, 299–305.
- Delauney A.J., Hu C.A. , Kavi Kishor P.B. and Verma D.P.S. (1993)** Cloning of ornithine- δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by transcomplementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 18673–18678.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. and Lamb C. (1998)** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585–588.
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunse R. and Frommer W., B. (2004)** The role of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation *The Plant Cell* 16, 3413-3425.
- Deuschle K., Funck D., Hellmann H., Däschner K., Binder S. and Frommer W.,B. (2001)** A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal* 27, 345-355.
- Di Martino C, Pizzuto R, Pallotta ML, De Santis A, Passarella S. (2006)** Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta* 223, 1123-33.

- Donald S., Sun X., Hu C., Yu J., Mei J., Valle D. and Phang J. (2001).** Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Research* 61, 1810-1815.
- Draper S.R. (1972)** Amino acid changes associated with low temperature treatment of *Lolium perenne*. *Phytochemistry* 11,639–641.
- Drażkiewicz M., Skórzyńska-Polita E. and Krupaa Z. (2007)** The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere* 67, 188-193.
- Durner J., Wendehenne D. and Klessig D.F. (1998)** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 95, 10328–10333.
- Eisemberg D., Gill H.S., Pfluegl G.M. and Rotsein S.H. (2000)** Structure-function relationship of glutamine synthetase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 122-145.
- Fabro G., Kovacs I., Pavet V., Szabados L. and Alvarez M.E. (2004)** Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 343–350.
- Farrand S.K., Dessaux Y. (1986)** Proline biosynthesis encoded by the *noc* and *occ* loci of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Journal of Bacteriology* 167,732–734.
- Fester T. and Hause G. (2005)** Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15, 373–379.
- Forlani G., Giberti S., Berlicki L., Petrollino D. and Kafarski P. (2007)** Plant P5C reductase as a new target for aminomethylenebisphosphonates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 4340-4347.
- Forlani G., Lejczak B. and Kafarski P. (1996)** N-pyridyl-aminomethylene bisphosphonic acids inhibit the first enzyme in the shikimate pathway, 3-deoxy-arabino-heptolusonate-7-phosphate synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 55, 180-188.
- Forlani G., Mangiagalli A., Pinter C. and Nielsen E. (2000)** Expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and proline/arginine homeostasis in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* 110, 22-27.
- Forlani G., Obojska A., Berlicki Ł. and Kafarski P. (2006)** Phosphinothricin analogues as inhibitors of plant glutamine synthetases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 796-802.
- Forlani, G., Scainelli, D. and Nielsen, E. (1997a).** Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato. Purification and properties. *Plant Physiology* 113, 1413-1418.
- Forlani, G., Scainelli, D., and Nielsen, E. (1997b).** Two δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase isoforms are expressed in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells

and are differentially modulated during the culture growth cycle. *Planta* 202, 242-248.

Frachisse J.M., Thomine S., Colcombet J., Guern J. and Barbier-Brygoo H. (1999). Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. *Plant Physiology* 121, 253–262.

Fujita T., Maggio A., Garcio-Rios M., Bressan R. A. and Csonka L. N. (1998) Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiology* 118, 661–674.

Funck D., Stadelhofer B. and Koch W. (2008) Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology* 8, 40-54.

Gade G. and Auerswald L. (2002) Beetles' choice—proline for energy output: control by AKHs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132, 117-129.

Garcia-Rios M.G., Fujita T., LaRosa C.P., Locy R.D., Clithero J.M., Bressan R.A. and Csonka L.N. (1997) Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding *g*-glutamyl phosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94, 8249–8254.

Gardener M.C. and Gillman M.P. (2001) The effects of soil fertilizer on amino acids in the floral nectar of corncockle, *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae). *OIKOS* 92, 101-106.

Gietz R.D. and Woods R.A. (2002) Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350, 87-96.

Ginzberg I., Stein H., Kapulnik Y., Szabados L., Strizhov N., Schell J., Koncz C., Zilberstein A. (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology* 38, 755–764.

Girousse C., Bournoville R. and Bonnemain J.L. (1996) Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiology* 111, 109–113.

Godzik S. and Linskens H.F. (1974) Concentration changes of free amino acids in primary bean leaves after continuous and interrupted SO₂ fumigation and recovery. *Environmental Pollution* 7, 25–38.

Göring H. and Thien B.H. (1979) Influence of nutrient deficiency on proline accumulation in the cytoplasm of *Zea mays* L. seedlings. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 174, 9–16.

Grallath S., Weimar T., Meyer A., Gumy A., Suter-Grotemeyer M., Neuhaus J-M. and Rentsch D. (2005) The AtProT Family. Compatible Solute Transporters with

- Similar Substrate Specificity But Differential Expression Patterns. *Plant Physiology* 137, 117–126.
- Gyamfi S., Pfeifer U., Stiershneider M. and Sessitsch A. (2002)** Effects of transgenic glufosinate-tolerant oil seed rape and the associate herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rizosphere. *Microbial Ecology* 41, 181-190.
- Hansen K., Wacht S., Seebauer H. and Schnuch M. (1998)** New aspects of chemoreception in flies. *Annals of The New York Academy of Sciences* 855, 143-147.
- Hare P.D. and Cress W.A. (1996)** Tissue specific accumulation of transcript encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 19, 249–256.
- Hare P.D. and Cress W.A. (1997)** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, 79–102.
- Hare P.D., Cress W.A. and Van Staden J. (1998)** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment* 21, 535–554.
- Hare P.D., Cress W.A. and van Staden J. (1999)** Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50, 413–434.
- Haudecoeur E., Planamente S., Cirou A., Tannières M., Shelp B.J., Morér S. and Faure D. (2008)** Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS* 106,14587-14592.
- Hauptmann R.M., Della-Cioppa G., Smith A. G., Kishore G.M. and Widholm J. (1987)** Expression of glyphosate resistance in carrot somatic hybrid cells through the transfer of an amplified 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase gene. *Molecular & General Genetics* 211, 357-363.
- Hayashi H., Alia M.L., Deshniem P., Ida M. and Murata N. (1997)** Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 12, 133-142.
- He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M. and Pei Z.M. (2004)** Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305, 1968–1971.
- Hellmann H., Funck D., Rentsch D. and Frommer W. (2000)** Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology* 123, 779-790.
- Hervieu F., Le Dily F., Huault C. and Billard J.P. (1995)** Contribution of ornithine aminotransferase to proline accumulation in NaCl-treated radish cotyledons. *Plant, Cell & Environment* 18, 205-210.

- Heuer B . (1994)** Osmoregulatory role of proline in water and salt-stressed plants. Handbook of Plant and Crop Stress ed. Pessarakli M. 363–381.
- Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouزيد R., Bidani A., Jaoua L., Savoure A. and Jaoua S. (2005)** Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science*, 169, 746-752.
- Holmström K.O., Mäntylä E., Welin B., Mandal A., Tapio Palva E., Tunnela O.E. and Londesborough J. (1996)** Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379, 683-684.
- Hu C-A.A., Delauney A.J. and Verma D.P.S. (1992)** A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 89, 9354–9358.
- Hu. C.A., Lin W.W., Obie C. and Valle D. (1999)** Molecular enzymology of mammalian Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase. Alternative splice donor utilization generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 6754–6762.
- Hua X.J., Van de Cotte B., Montagu M.V. and Verbruggen N. (1997)** Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114, 1215–1224.
- Hua X.J., Van de Cotte B., Montagu M.V. and Verbruggen N. (1999)** A 69 bp fragment in the pyrroline-5-carboxylate reductase promoter of *Arabidopsis thaliana* activates minimal CaMV 35S promoter in a tissue-specific manner. *FEBS Letters* 458, 193–196.
- Hua X.J., Van de Cotte B., Van Montagu M.V. and Verbruggen N (2001)** The 5' untranslated region of the *At-P5R* gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 26, 157–169.
- Hung S.H., Yu C.W. and Lin C.H. (2005)** Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin Of Academia Sinica* 46, 1-10
- Igarashi Y., Yoshiba Y., Takeshita T., Nomura S., Otomo J., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2000)** Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding proline transporter in rice. *Plant & Cell Physiology* 41, 750–756.
- Iyer S. and Caplan A. (1998)** Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiology* 116, 203–211.
- Jaspers P. and Kangasjärvi J. (2010)** Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x
- Kavi Kishor P.B. (1988)** Effect of salt stress on callus cultures of *Oryza sativa* L. *Journal of Experimental Botany* 39, 235–240.

- Kavi Kishor P.B. (1989)** Aromatic amino acid metabolism during organogenesis in rice callus cultures. *Physiologia Plantarum* 75, 395 – 398.
- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G., Hu C.A.A. and Verma D.P.S. (1995)** Over expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotic tolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108, 1387–1394.
- Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N., SriLaxmi P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P. and Sreenivasulu N. (2005)** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88, 424-438.
- Kimura T., Nakano T., Taki N., Ishikawa M., Asami T. and Yoshida S. (2001)** Cytokinin-induced gene expression in cultured green cells of *Nicotiana tabacum* identified by fluorescent differential display. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65, 1275–1283.
- King N.D., Hojnacki D. and O'Brian M.R. (2000)** The Bradyrhizobium japonicum proline biosynthesis gene proC is essential for symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 66 5469-5471.
- Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1996)** A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 8, 1323–1335.
- Kohl D. H., Keenly E. H., Zhu Y., Schubert K. R. and Shearer G. (1991)** Proline accumulation, nitrogenase (C_2H_2 reducing) activity and activities of enzymes related to proline metabolism in drought stressed soybean nodules. *Journal of Experimental Botany* 42, 831–837.
- Kohl D.H., Lin J.J., Shearer G. and Schubert K.R. (1990)** Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in legume root nodules. *Plant Physiology* 94, 1258–1264.
- Kohl D.H., Schubert K.R., Carter M.B., Hagedorn C.H. and Shearer G. (1988)** Proline metabolism in N_2 -fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85, 2036–2040.
- Kononowicz A.K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (1990)** Chromosome number and nuclear DNA content of plants regenerated from salt adapted plant cells. *Plant Cell Reports* 8, 676-679.
- Krishnan N., Dickman M.B. and Becker D.F. (2008)** Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 44, 671-681.

- Kuo C.G. and Chen B.W. (1980)** Physiological responses of tomato cultivars to flooding. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105, 751–755.
- Kuo C.G., Chen H.M. and Ma L.H. (1986)** Effect of high temperature on proline content in tomato floral buds and leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 111, 746–750.
- La Rosa P.C., Rhodes D., Rhodes J.C., Bressan R A. and Csonka L.N. (1991)** Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Plant Physiology* 96, 245–250.
- Labanauskas C.K., Stolzy L.H. and Handy M.F. (1974)** Soil oxygen and *Phytophthora* spp. root infestation effects on protein and free amino acids in lemon and orange leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 99, 497–500.
- Lancien M. and Roberts M.R. (2006)** Regulation of *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 gene expression by γ -aminobutyric acid. *Plant, Cell and Environment* 29, 1430–1436.
- Liu J. and Zhu J.-K. (1997)** Proline accumulation and salt-stress induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114, 591-596.
- Liu Y., Borchert G.L., Surazynski A., Hu C.A. and Phang J.M. (2006)** Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene* 25, 5640-5647.
- Lorences E.P. and Fry S.C (1991)** Absolute measurement of cell expansion in plant cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24,211-215.
- Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J.and Bressan R.A. (2002)** Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31, 699-712.
- Mani S., Van De Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. (2002)** Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 128, 73–83.
- Martínez C, Pons E, Prats G and León J. (2004)** Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 37, 209-217.
- Mattioli R., Costantino P. and Trovato M. (2009a)** Proline accumulation in plants. Not only stress. *Plant Signalling & Behaviour* 4, 1016-1018.
- Mattioli R., Falasca G., Sabatini S., Altamura M.M., Costantino P. and Trovato M. (2009 b)** The proline biosynthetic genes *P5CS1* and *P5CS2* play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development. *Physiologia Plantarum* 137, 72–85.

- Mattioli R., Marchese D., D'Angeli S., Altamura M.M. Costantino P. and Trovato M. (2008)** Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 66, 277-288.
- Mauro M.L., Trovato M., Paolis A.D., Gallelli A., Costantino P. and Altamura M.M. (1996)** The plant oncogene rolD stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Developmental Biology* 180, 693-700.
- Maxwell S. and Davis G. (2000)** Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 97, 13009-13014.
- Mazzucotelli E., Tartari A., Cattivelli L. and Forlani G. (2006)** GABA metabolism during cold acclimation and freezing in barley and wheat. *Journal of Experimental Botany* 57, 3755-3766.
- Meon S., Fisher J.M. and Wallace H.R. (1978)** Changes in free proline following infection of plants with either *Meloidogyne javanica* or *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiological Plant Pathology* 12, 251–256.
- Merrill M.J., Yeh G.C. and Phang J.M. (1989)** Purified human erythrocyte pyrroline-5-carboxylate reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 9352–9358.
- Mevi-Schutz J. and Erhardt A. (2005)** Amino acids in nectar enhance butterfly fecundity: a long-awaited link. *The American Naturalist* 165, 411-420.
- Micheu S., Crailsheim K. and Leonhard B. (2000)** Importance of proline and other amino acids during honeybee flight (*Apis mellifera carnica* POLLMANN). *Amino Acids* 18, 157-175.
- Miller G., Honig A., Stei H., Suzuki N, Mittler R. and Zilberstein A. (2009)** Unraveling Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 26482–26492.
- Miras S., Salvi D., Ferro M., Grunwald D., Garin J., Joyard J. and Rolland N. (2002)** Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 47770–47778.
- Mitchell H.J., Ayliffe M.A., Rashid K.Y. and Pryor A.J. (2006)** A rust-inducible gene from flax (*fls1*) is involved in proline catabolism. *Planta* 223, 213-222.
- Mohanty S.K. and Sridhar R. (1982)** Physiology of rice tungro virus disease: Proline accumulation due to infection. *Physiologia Plantarum* 56, 89–93.
- Moreau M., Lindermayr C., Durner J. and Klessig D.F. (2010)** NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia Plantarum* doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x
- Morgan J.M. (1984)** Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 299-319.
- Murahama M., Yoshida T., Hayashi F., Ichino T., Sanada Y. and Wada K. (2001)** Purification and characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase

- isoenzymes, indicating differential distribution in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant & Cell Physiology* 42, 742–750.
- Murashige T. and Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Naidu B.P., Paleg L.G., Aspinall D., Jennings A.C. and Jones G.P. (1991)** Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. *Phytochemistry* 30, 407–409.
- Nakashima K., Satoh R., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1998)** A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118, 1233–1241.
- Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato T., Tabata S. and Shinozaki K. (2003)** Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant & Cell Physiology* 44, 541–548.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y., Wada K., Tsukaya H., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1999)** Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 18, 185–193.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D. and Wilson I. (2008)** Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59, 165–176.
- Nomura M. and Takagi H. (2004)** Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 101, 12616–12621.
- Obojska A., Berlicki Ł., Kafarski P., Lejczak B., Chicca M. and Forlani G. (2004)** Herbicidal pyridyl derivatives of aminomethylene-bisphosphonic acid inhibit plant glutamine synthetase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3337-3344.
- Occhipinti A., Berlicki Ł., Giberti S., Dzedziola G., Kafarski P. and Forlani G. (2010)** Effectiveness and mode of action of phosphonate inhibitors of plant glutamine synthetase. *Pest Management Science* 66, 51-58.
- Orsini F., Cascone P., De Pascale S., Barbieri G., Corrado G., Rao R. and Maggio A. (2010)** Systemin-dependent salinity tolerance in tomato: evidence of specific convergence of abiotic and biotic stress responses. *Physiologia Plantarum* 138, 10-21.
- Owens T. and Poole R.J. (1979)** Regulation of cytoplasmic and vacuolar volumes by plant cells in suspension culture. *Plant Physiology* 64, 900-904.

- Ozden M., Demirel U. and Kahraman A. (2009)** Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae* 119, 163-168.
- Pardha Saradhi P., Arora S. and Prasad K.V.S.K. (1995)** Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications* 209, 1–5.
- Parre E., Ghars M.A., Leprince A.S., Thiery L., Lefebvre D., Bordenave M., Richard L., Mazars C., Abdelly C., Savouré A. (2007)** Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144, 503–512.
- Peng Z., Lu Q. and Verma D.P.S. (1996)** Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular & General Genetics* : MGG 253, 334–341.
- Petrollino D. (2006)** Studio dei meccanismi cellulari alla base della fitotossicità della prolina esogena in un mutante *p5cdh* di *Arabidopsis thaliana*. Tesi di laurea specialistica in Biotecnologie Agro-Industriali. Università di Ferrara.
- Phang J.M. (1985)** The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Current Topics in Cellular Regulation* 25, 91–132.
- Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J. and Smeeckens S.C.M. (1995)** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under water stress. *Plant Physiology* 107, 125-130.
- Quan L.-J., Zhang B., Shi W.W. and Li H.Y. (2008)** Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal Of Integrative Plant Biology* 50,2-18 .
- Rayapati P.J., Stewart C.R. and Hack E. (1989)** Pyrroline-5-carboxylate reductase is in Pea (*Pisum sativum* L.) leaf chloroplasts. *Plant Physiology* 91, 581–586.
- Razem F.A., El-Kereamy A., Abrams S.R. and Hill R.D.(2006)** The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439, 290-294.
- Rentsch D., Hirner B., Schmelzer E. and Frommer W.B. (1996)** Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *The Plant Cell* 8,1437-46.
- Rhodes D. and Samaras Y. (1994)** Genetic control of osmoregulation in plants. In *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (ed. Strange), 347-361.
- Ribarits A., Abdullaev A., Tashpulatov A., Richter A., Heberle-Bors E. and Touraev A. (2007)** Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta* 225, 1313–1324.

- Roberts J.K., and Pryor A. (1995)** Isolation of a flax (*Linum usitatissimum*) gene induced during susceptible infection by flax rust (*Melampsora lini*). *The Plant Journal* 8, 1-8.
- Roosens N. H., Bitar F. A., Loenders K., Angenon G. and Jacobs M. (1995)** Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding : new strategies in plant improvement* 9, 73–80.
- Roosens N.H., Thu T.T., Iskandar H.M., Jacobs M. (1998)** Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 117, 263-271.
- Rose R. K. and Turner S. J (1998)** Extracellular volume in streptococcal model biofilms: effects of pH, calcium and fluoride. *Biochimica et Biophysica Acta* 1379, 185–190.
- Rubin L.J., Gaines G.G. and Jensen R.A. (1984)** Glyphosate inhibition of EPSP synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology* 75, 839-845.
- Samach A., Onouchi H., Gold S.E., Ditta G.S., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M.F., Coupland G. (2000)** Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613-1616.
- Sans N., Schindler U. and Schröder J. (1988)** Ornithine cyclodeaminase from Ti plasmid C58: DNA sequence, enzyme properties and regulation of activity by arginine. *European Journal of Biochemistry* 173, 123–130.
- Santos R., Herouart D., Sigaud S., Touati D. and Puppo A. (2001)** Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 86–89.
- Sarkar D., Bhowmik P.C., Kwon Y-I., Shetty K. (2009).** Clonal response to cold tolerance in creeping bentgrass and role of proline-associated pentose phosphate pathway. *Bioresource Technology* 100, 5332–5339.
- Sarvesh A., Anuradha M., Pulliah T., Reddy T.P. and Kavi Kishor P.B. (1966)** Salt stress and antioxidant response in high and low proline producing cultivars of niger, *Guizotia abyssinica* (L.F) Cass. *Indian Journal of Experimental Biology* 34, 252–256.
- Savouré A., Hua X.J., Bertauche N., Van Montagu M., Verbruggen N. (1997)** Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of the proline biosynthesis upon cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* : MGG 254, 104-109.
- Savouré A., Jaoua S., Hua X.J., Ardiles W., Van Montagu M. and Verbruggen N. (1995)** Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 372,13–19.

- Sawahel W.A. and Hassan A.H. (2002)** Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnology Letters* 24, 721–725
- Saxena S. N., Kaushik N. and Sharma R. (2008)** Effect of abscisic acid and proline on in vitro flowering in *Vigna aconitifolia*. *Biologia Plantarum* 52, 181-183.
- Scaraffia P.Y. and Wells M.A. (2003)** Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology* 49, 591-601.
- Schat H., Sharma S.S. and Vooijs R. (1997)** Heavy metal induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101, 477–482.
- Schwacke R., Grallath S., Breitzkreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer W.B. and Rentsch D. (1999)** LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *The Plant Cell* 11, 377–392.
- Seitz E.W. and Hochster R.M. (1964)** Free proline in normal and in crown-gall tumour tissue of tomato and tobacco. *Life Sciences* 3, 1033–1037.
- Sekhar P.N., Amrutha R.N., Sangam S., Verma D.P. and Kishor P.B. (2007)** Biochemical characterization, homology modeling and docking studies of ornithine delta-aminotransferase-an important enzyme in proline biosynthesis of plants. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 26, 709-719.
- Sharma S.S. and Dietz K.J. (2006)** The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* 57, 711-26.
- Shelp B.J., Bown A.W. and McLean M.D. (1999)** Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4, 446–452.
- Shelp B.J., Bown A.W. and McLean M.D. (1999)** Metabolism and function of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4, 446–452.
- Sheveleva E., Chmara W., Bohnert H.J. and Jensen R.G. (1997)** Increased salt and drought tolerance by D-Ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum L.* *Plant Physiology* 115, 1211-1219.
- Siripornadulsil S., Traina S., Verma D.P.S. and Sayre R.T. (2002)** Molecular mechanisms of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell* 14, 2837–2847.
- Spollen W.G., Tao W., Valliyodan B., Chen K., Hejlek L.G., Kim J-J., LeNoble M.E., Zhu J., Bohnert H.J., Henderson D., Schachtman D.P., Davis G.E., Springer G.K., Sharp R.E. and Nguyen H.T. (2008)** Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. *BMC Plant Biology* 8:32.
- Srivastava M.P. and Tandon R.N., 1966** Free amino acid spectrum of healthy and infected Moshambi fruit. *Naturwissenschaften* 53, 508-509.

- Stines A.P., Naylor D.J., Hoj P.B. and Heeswijck R.V. (1999)** Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiology* 120, 923–931.
- Strizhov N., Ábrahám E., Ökrész L., Blickling S., Zilberstein A., Schell J., Koncz C. and Szabados L. (1997)** Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 12, 557–569.
- Sudhamsu J. and Crane B.R. (2009)** Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends in Microbiology* 17, 212–218.
- Swanson S. and Gilroy S. (2010)** ROS in plant development. *Physiologia Plantarum* doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x
- Szabados L. and Savouré A. (2010)** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* Corrected proofs.
- Székely G., Abraham E., Cseplo A., Rigo G., Zsigmond L., Csiszar J., Ayaydin F., Strizhov N., Jasik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. (2008)** Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 53, 11–28.
- Szoke A., Miao G.H., Hong Z. and Verma D.P.S. (1992)** Subcellular location of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiology* 99, 1642–1649.
- Taiz L. and Zeiger E. (2006)** *Plant Physiology*, Fourth Edition. Chapter 1 pag.14.
- Tarczynski M.C., Jensen R.G. and Bohnert H.J. (1993)** Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259, 508-510.
- Tartari A and Forlani G. (2008)** Osmotic adjustments in a psychrophilic alga, *Xanthonema* sp (Xanthophyceae). *Environmental and Experimental Botany* 63, 342-350.
- Tischner R., Galli M., Heimer Y.M., Bielefeld S., Okamoto M., Mack A. and Crawford N.M. (2007)** Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *FEBS Journal* 274, 4238–4245.
- Torres M.A. (2010)** ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x
- Trotel P., Bouchereau A., Niogret M. F. and Larher F. (1996)** The fate of osmoregulated proline in leaf discs of rape (*Brassica napus* L.) incubated in a medium of low osmolarity. *Plant Science* 118, 31–45.

- Trovato M., Maras B., Linhares F. and Costantino P. (2001)** The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98, 13449-13453.
- Ueda A., Shi W.M., Sanmiya K., Shono M. and Takabe T. (2001)** Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots. Plant & Cell Physiology 42, 1282–1289.
- Van Swaaij A.C., Jacobsen E. and Feenstra W.J. (1985)** Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. Physiologia Plantarum 64, 230–236.
- Vanrensburg L., Kruger G.H.J. and Kruger R.H. (1993)** Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultra structure in *Nicotiana tabacum* L. Journal of Plant Physiology 141, 188–194.
- Vaucheret H., Kronenberger J., Lepingle A., Vilaine F., Boutin J-P. and Caboche M. (1992)** Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. The Plant Journal : for cell and molecular biology 2, 559–569.
- Verbruggen N., Hua X. J., May M. and Van Montagu M. (1996)** Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 93, 8787–8791.
- Verbruggen N., Villarroel R. and Van Montagu M. (1993)** Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 103, 771–781.
- Verslues P.E. and Bray E.A. (2006)** Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. Journal of Experimental Botany 57, 201–212.
- Verslues P.E. and Sharp R.E. (1999)** Proline Accumulation in Maize (*Zea mays* L.) Primary Roots at Low Water Potentials. II. Metabolic Source of Increased Proline Deposition in the Elongation Zone. Plant Physiology. 119, 1349-1360.
- Verslues P.E., Kim Y.S. and Zhu J.K. (2007)** Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate : glyoxylate aminotransferase mutant. Plant Molecular Biology 64, 205-217.
- Villarreal N.M., Martinez G.A. and Civello P.M. (2009)** Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. Plant Science 176, 749–757.
- Voetberg G.S and Sharp R.E. (1991)** Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials.III Role of Increased Proline Deposition in Osmotic Adjustment. Plant Physiology 96, 1125-1130.

- Wacht S., Lunau K. and Hansen K. (2000)** Chemosensory control of pollen ingestion in the hoverfly *Eristalis tenax* by labellar taste hairs. *Journal of Comparative Physiology A* 186,193-203.
- Waditee R., Hibino T., Tanaka Y., Nakamura T., Incharoensakdi A., Hayakawa S., Suzuki S., Futsuhara Y., Kawamitsu Y., Takabe T. and Takabe T. (2002)** Functional characterization of betaine/proline transporters in betaine-accumulating mangrove. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 18373–18382.
- Walton E. F., Podivinsky E., Wu R. M., Reynolds P.H.S. and Young L.W. (1998)** Regulation of proline biosynthesis in kiwifruit buds with and without hydrogen cyanamide treatment. *Physiologia Plantarum* 102, 171–178.
- Wang S. and Brandriss M.C. (1986)** Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned *PUT1* gene. *Molecular and Cellular Biology* 6, 2638-2645.
- Weltmeier F., Ehler A., Mayer C.S., Dietrich K., Wang X., Schutze K., Alonso R., Harter K., Vicente-Carbajosa J. and Droge-Laser W. (2006)** Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *The EMBO Journal* 25, 3133–3143.
- White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P. and Nester E.W. (1985)** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 164, 33-44.
- Williams I. and Frank L. (1975)** Improved chemical synthesis and enzymatic assay of delta-1-pyrroline-5-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry* 64, 85-97.
- Williamson C.L. and Slocum R.D. (1992)** Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.) *Plant Physiology* 100, 1464–1470.
- Wojtaszek P. (1997)** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322, 681-692.
- Wrzaczek M., Overmyer K. and Kangasjärvi J. (2010)** Plant ROS and RNS: making plant science more radical than ever. *Physiologia Plantarum* Accepted Article.
- Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Chen Z.L., Qu L.J. (2005)** Over-expression of the bacterial *nhaA* gene in rice enhances salt and drought tolerance. *Plant Science* 168, 297-302.
- Wu S.-J., Ding L. and Zhu J.-K. (1996)** SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell*, 8, 617-627.
- Yancey P.H. (1994)** Compatible and counteracting solutes. In *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (ed. Strange), 81-109.
- Yang C.W. and Kao C.H. (1999)** Importance of ornithine- δ -aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation* 27, 189-92.

- Yang S., Lan S. and Gong M. (2009)** Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* 166, 1694- 1699.
- Yoon K.A., Nakamura Y. and Arakawa H.(2004)** Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *Journal of Human Genetics* 49, 134-140.
- Yoshiba Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K. (1995)** Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 7, 751–760.
- Yoshiba Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1997)** Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant & Cell Physiology* 38, 1095–1102.
- Yoshinaga K., Arimura S., Niwa Y., Tsutsumi N., Uchimiya H. and Kawai-Yamada M. (2005)** Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 96, 337-342.
- Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K., Rowland O., Jones J.D.G. and Doke N. (2003).** *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* 15, 706-718.
- Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J. (2004)** Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 101, 15811–15816.
- Zhang C-S., Lu Q. and Verma D.P.S (1995)** Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 20491–20496.
- Zhang C-S., Lu Q. and Verma D.P.S. (1997)** Characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Science* 129, 81–89.
- Zhang H.B., Wang L.H. and Zhang L.H. (2002)** Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99, 4638–4643.
- Zhang H.Q., Croes A. and Linskens H. (1982)** Protein synthesis in germinating pollen of *Petunia*: role of proline. *Planta* 154, 199-203.
- Zhao M., Chen L., Zhang L. and Zhang W. (2009)** Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151,755–767.

Zhu B., Su J., Chang M., Verma D.P.S., Fan Y.L. and Wu R. (1998) Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Science* 139, 41–48.

RINGRAZIAMENTI

La mia estrema riconoscenza va al prof. Forlani, Peppino per gli amici, che in tutti questi anni è stato non solo un punto di riferimento scientifico, per il continuo confronto, per tutto quello che mi ha insegnato e per come ha saputo motivarmi, ma anche un esempio di vita da seguire, per i sacrifici, per la comprensione e per l'amicizia che mi ha dimostrato. Grazie di cuore.

Un particolare ringraziamento al Dott. Dietmar Funck, per la sua ospitalità, per la pazienza dimostrata nei mesi di collaborazione e per aver condiviso con me la convinzione che “proline will save the world”.

Ringrazio inoltre : la prof. Iwona Adamska che mi ha accolto nel suo gruppo e che ha supportato economicamente parte di questo lavoro; tutto il “Fantastik Lab” ed in particolare Samuele Giberti per aver condiviso con me parte dei dati sulla P5CR.

Un affettuoso ringraziamento va poi alla mia famiglia che mi ha sostenuto moralmente in tutti questi anni di studio e alla mia sorellina che mi è stata sempre vicina e che riempie la mia vita di suoni, di visioni e quindi di emozioni dal Sud del mondo.

In fine vorrei ringraziare: Oreste, Anna e Nicola che con la loro meridionalità hanno saputo colorare anche le giornate più grige e scaldare quelle più fredde; la Vale per l'amicizia dimostratami e per il supporto medico costante; tutti gli amici che in questi anni hanno con i loro sorrisi e le loro storie lasciato in me un segno indelebile e tutti i nuovi e vecchi inquilini di Castel Tedaldo per avermi sopportato e aiutato nei momenti più duri.