

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata**

**XXI ciclo**

Tesi di Dottorato

**Meccanismi di regolazione di enzimi plastidiali:**

**Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi e ADP-glucosio pirofosforilasi**

Tutore	Candidata	Coordinatore
Ch.mo Prof.	Dott.ssa	Ch.mo Prof.
Sergio Esposito	Myriam Ferrara	Amalia Virzo De Santo

Anno Accademico 2007-2008

<b>Indice</b>	<b>Pag.</b>
<b>CAP 1      INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<i>Fotosintesi</i>	5
<i>Sintesi dell'amido</i>	10
<i>ADP-glucosio pirofosforilasi</i>	13
<i>Glicolisi nelle piante</i>	16
<i>Ciclo Ossidativo del pentoso fosfato(OPPP)</i>	18
<i>OPPP e G6PDH negli organismi foto sintetici</i>	18
<i>Effetti del potere riducente e della luce sull'attività G6PDH</i>	21
<i>Biologia molecolare della G6PDH negli organismi fotosintetici</i>	25
<i>Regolazione redox: tioredossine</i>	29
<i>Meccanismi di fosforilazione enzimatica e "sugar sensing"</i>	30
<i>Trealosio</i>	32
<b>CAP 2      MATERIALI E METODI</b>	<b>34</b>
<i>Coltivazione delle piante</i>	34
<i>Preparazione dell'estratto per la misura della G6PDH</i>	36
<i>Saggio enzimatico G6PDH</i>	36
<i>Purificazione della G6PDH da radici di orzo(Hordeum vulgare)</i>	37
<i>Determinazione delle costanti cinetiche</i>	38
<i>Elettroforesi e Western Blotting</i>	39

<i>Coltivazione di Koliella antarctica</i>	40
<i>Determinazione del volume di impacchettamento cellulare(PCV)</i>	41
<i>Preparazione dell'estratto crudo e saggio G6PDH</i>	41
<i>Purificazione della G6PDH</i>	42
<i>Determinazione delle costanti cinetiche</i>	48
<i>Elettroforesi e Western Blotting</i>	49
<i>Determinazione del peso molecolare</i>	52
<i>Determinazione delle proteine</i>	52
<i>Isolamento dei cloroplasti da pisello(Pisum sativum)</i>	52
<i>Integrità dei cloroplasti</i>	53
<i>Incubazione dei cloroplasti con Trealosio-6-fosfato</i>	53
<i>Elettroforesi e Western Blotting</i>	54
<b>CAP 3      RISULTATI</b>	<b>57</b>
<i>Attività G6PDH in radici di orzo</i>	57
<i>Analisi mediante Western blotting della G6PDH</i>	59
<i>G6PDH purificata da radici di orzo</i>	61
<i>Analisi elettroforetiche e Western Blotting della purificazione</i>	64
<i>Caratteristiche cinetiche delle isoforme G6PDH di radici di orzo</i>	66
<i>Purificazione della G6PDH di Koliella antarctica</i>	68
<i>Caratteristiche cinetiche della G6PDH di Koliella</i>	72
<i>Dati elettroforetici di Koliella</i>	76
<i>Integrità dei cloroplasti di pisello (Pisum sativum)</i>	78

<i>Analisi Western AGPase da cloroplasti di pisello</i>	80
<b>CAP 4 Discussione</b>	<b>84</b>
<b>CAP 5 Bibliografia</b>	<b>99</b>



## INTRODUZIONE

### *Fotosintesi*

Il processo nel quale piante, alghe e procarioti usano direttamente l'energia luminosa per sintetizzare composti organici è la fotosintesi. La fotosintesi comprende sia una serie complessa di reazioni che coinvolgono, l'assorbimento della luce, la conversione dell'energia, il trasferimento elettronico, sia una fase composta di diverse reazioni enzimatiche che converte  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  in carboidrati.

La fotosintesi è un processo biologico di ossidoriduzione (redox). La  $\text{CO}_2$  è l'accettore di elettroni, e  $\text{H}_2\text{A}$  è un qualsiasi composto ridotto utilizzato per donare gli elettroni.  $\text{CH}_2\text{O}$  rappresenta il carboidrato generato dalla riduzione.

Se è l'acqua ad essere ossidata e gli elettroni rilasciati, trasferiti alla  $\text{CO}_2$  con produzione di ossigeno e carboidrati, si parla di fotosintesi ossigenica.

Negli Eucarioti le reazioni biochimiche e biofisiche della fotosintesi avvengono in un plastidio specializzato, il cloroplasto. La complessa struttura di questo organello riflette le sue diverse funzioni biochimiche. È limitato da una doppia membrana, una interna ed una esterna, e possiede all'interno un sistema di membrane, conosciute come membrane tilacoidali. Quest'ultime si organizzano nel grana, pile di membrane appressate, e nei tilacoidi dello stroma, esposti al mezzo fluido circostante, lo stroma del cloroplasto.

Il processo fotosintetico coinvolge due fasi: le reazioni luminose, che producono O<sub>2</sub>, ATP e NADPH; e le reazioni legate al carbonio ( ciclo di Calvin) , che riduce la CO<sub>2</sub> a carboidrati e consuma L' ATP e il NADPH prodotti dalla reazione alla luce.

Queste due fasi della fotosintesi avvengono in diversi compartimenti del cloroplasto.

Le membrane tilacoidali contengono i complessi multi proteici fotosintetici Fotosistema I e II (PSI e PSII), che comprendono i centri di reazione responsabili della conversione dell' energia luminosa nell' energia del legame chimico.

Questi centri di reazione sono parte di una catena di trasporto elettronico che contiene un complesso citocromo trans membrana (citocromo b<sub>6</sub> f), una proteina a rame solubile in acqua (plastocianina), e un chinone solubile nei lipidi (plastoquinone).

La catena fotosintetica di trasporto elettronico, localizzata nei tilacoidi, trasporta elettroni dall'acqua nel lume del tilacoide fino a composti solubili attivi in reazioni redox localizzati nello stroma.

L'ADP è fosforilato sulla superficie dell'ATP sintasi del cloroplasto, un grande complesso proteico esposto alla superficie dello stroma della membrana tilacoidale.

Al contrario, le reazioni del ciclo di Calvin avvengono nello stroma. Tutti i fotosistemi contengono un centro di reazione e un complesso di pigmenti di raccolta della luce o antenne. Le antenne, agiscono nell' assorbimento dell' energia luminosa e nel suo trasferimento o risonanza, al centro di reazione

(contenenti sia clorofilla speciali sia accettori di elettroni coinvolti nella conversione dell'energia).

Entrambi i fotosistemi (I e II) e gli altri componenti della catena di trasporto degli elettroni sono disposti secondo lo schema Z (fig.1)

Lo schema Z è un modello del trasporto elettronico cloroplastico che rende conto della diversa composizione in pigmenti dei due fotosistemi. Il PSI, con il suo centro di reazione P700, che assorbe a lunghezze d'onda maggiori, più efficiente in luce rosso-lontana. Il PSII, che funziona meglio in luce rossa a causa del suo centro di reazione P680, il quale assorbe a lunghezze d'onda più brevi.

Per la massima efficienza fotosintetica è indispensabile che i due fotosistemi cooperino. La luce rosso-lontana, attiva la fotochimica del PSI, ossida il fotosistema, che a sua volta ossiderà i trasportatori di elettroni tra i due fotosistemi.

All'opposto la luce rossa, attiva la fotochimica del PSII, ossida il PSII, generando composti ridotti che ridurranno i trasportatori elettronici che seguono nella catena.

Il ciclo di Calvin, può essere diviso in tre fasi: carbossilazione, riduzione e rigenerazione. La prima fase, consiste di una sola reazione di carbossilazione, del ribulosio 1,5-bisfosfato (RuBP) ad opera dell'enzima rubisco a produrre due molecole di fosfoglicerato(3-PGA). La fase di riduzione si svolge in due tappe e converte il 3-PGA nel trioso fosfato, gliceraldeide 3-fosfato (GAP). Ed è proprio in questa fase che si ha l'utilizzo dell'ATP e del potere riducente. Ed infine l'ultimo complesso insieme di reazioni, rigenera il composto di partenza, con l'utilizzo di un'altra molecola di ATP per mediare la conversione del ribulosio 5-

fosfato a RuBP. Molti degli enzimi del ciclo di Calvin che catalizzano le reazioni reversibili (come l' aldolasi, la transchetolasi, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) sono in comune alle vie di degradazione dei carboidrati glicolisi e OPPP. Essendo queste vie entrambe presenti nel cloroplasto, sono necessari sistemi specifici di regolazione per assicurare un'attività ottimale. I cambiamenti nel pH e nella concentrazione di  $Mg^{2+}$  regolano enzimi come la rubisco, la fruttosio-1,6-bisfosfatasi e la fosoribulochinasi. Un altro ruolo importante nell'attivazione degli enzimi del ciclo di Calvin è dato dalla luce, mediante un sistema di regolazione dipendente dallo stato redox, il quale coinvolge la ferredossina (proteina che contiene disolfuri), e l'enzima ferredossina-tioredoxina riduttasi(FTR). La ferredossina ridotta è prodotta dalle reazioni alla luce della fotosintesi e reagisce con la forma ossidata della tioredossina *f o m* in una reazione catalizzata dalla FTR. La tioredossina ridotta a sua volta riduce i ponti disolfuro dell' enzima, regolandolo. In conclusione gli enzimi del ciclo di Calvin sottoposti a regolazione dalla tioredossina ridotta vengono attivati per riduzione alla luce e disattivati per ossidazione al buio. Questa sequenza di reazioni lega le reazioni alla luce alla fissazione della  $CO_2$ , assicurando che la sintesi di carboidrati proceda alla luce. Questo meccanismo è stato dimostrato per diversi enzimi cloroplastici come fruttosio-1,6-bisfosfato, sedoepulosio-1,7-bisfosfatasi, fosfo-ribulochinasi e la rubisco attivasi. Il sistema tioredossina attiva anche altri processi dipendenti dalla luce nel cloroplasto, come la traduzione e la biosintesi degli acidi grassi. La tioredossina ridotta formata alla luce inibisce

contemporaneamente i processi catabolici, i quali avvengono soprattutto al buio, per esempio la via ossidativa del pentoso fosfati.

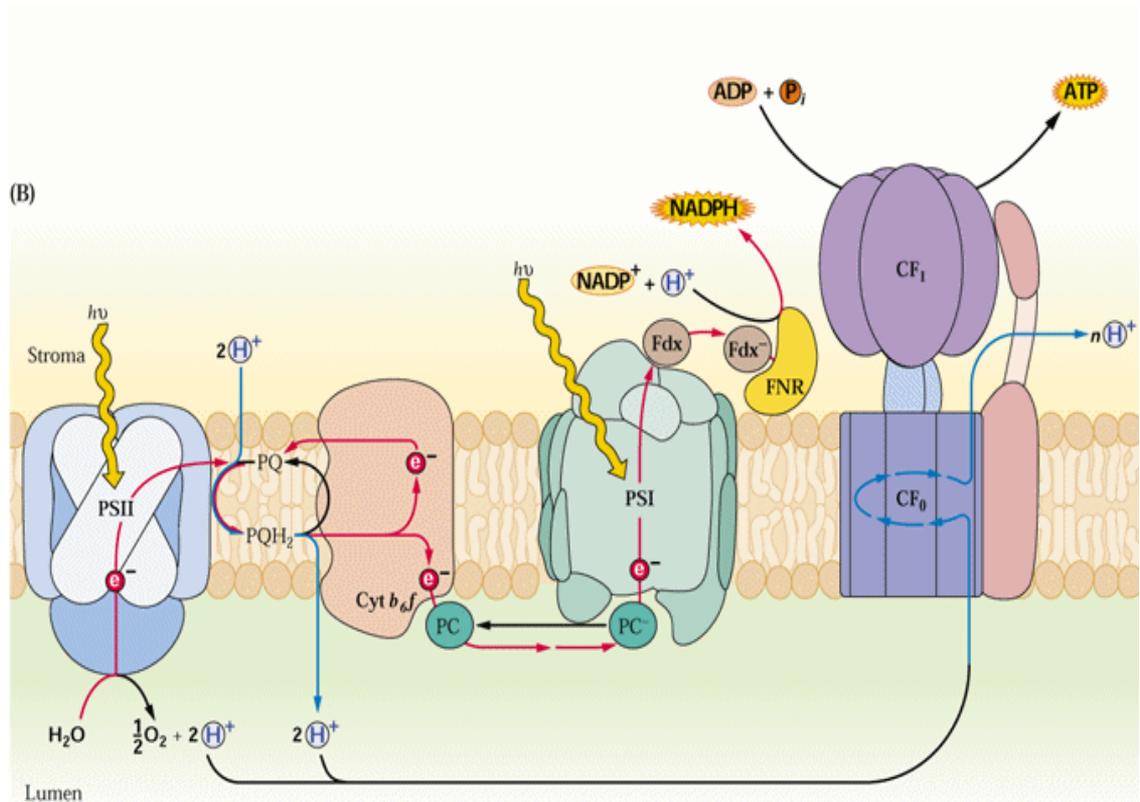


Fig. 1: rappresentazione dello schema Z

### *Sintesi dell'amido*

L' amido, un polimero del glucosio, è sintetizzato nei plastidi, temporaneamente nei cloroplasti e per periodi più lunghi negli amiloplasti dei tessuti di riserva, come i tuberi o i semi. L'amido consiste di due molecole : amilosio e amilopectina. In molti casi l'amilosio rappresenta il 30% dell'amido totale. Tuttavia la percentuale di amilosio dipende dalla specie e dall'organo usato per l'immagazzinamento dell'amido. Gli enzimi responsabili della sintesi dell'amido sono: l'ADP-glucosio pirofosforilasi, l'amido sintasi e gli enzimi di ramificazione. Le vie biosintetiche sia del saccarosio che dell'amido consumano esoso fosfati e sono rispettivamente localizzate nel citosol e nei plastidi (fig.2). La sintesi dell'amido delle piante inizia con la sintesi dell' ADP-glucosio. Nei cloroplasti, il ciclo di Calvin rende disponibili gli scheletri carboniosi per la sintesi dell'amido. Questo avviene quando l'esportazione di saccarosio dalla cellula nn può tenere il passo con la fotosintesi. L'eccesso di carboinio fissato entra nel pool degli esosi ed è infine immagazzinato nel cloroplasto sotto forma di amido. Negli amiloplasti invece il carbonio necessario alla sintesi dell'amido deve essere importato dal citosol.

L'ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPase), catalizza la prima reazione di sintesi dell'amido, dove il glucosio1-fosfato con l'utilizzo di una molecola di ATP è convertito in ADP-glucosio con rilascio di pirofosfato. L'amido sintasi aggiunge singole molecole di glucosio da ADP-glucosio all'estremità non riducente di una preesistente catena di amilosio o amilopectina , formando un legame  $\alpha(1\rightarrow4)$ . L'amido sintasi è rappresentata da diverse isoforme. Alcune si ritrovano nella fase

stromatica solubile del plastidio; altre sono legate ai granuli di amido in crescita. I mutanti delle singole isoforme possono sintetizzare una forma alterata di amido, indicando che le isoforme hanno distinte funzioni biochimiche. I mutanti waxy, per esempio, trovati in diverse specie di piante sono carenti dell'amido sintasi legata al granulo e producono amido che non contiene amilosio. Questo spiega che la formazione di amilosio è catalizzata dall'amido sintasi legata, mentre i glucani  $\alpha(1\rightarrow4)$ , generati dall'amido sintasi solubile, sono successivamente convertiti dall'enzima ramificante in amilopectina.

L'enzima ramificante scinde un legame  $\alpha(1\rightarrow4)$ , congiungendo le estremità riducenti dei diversi frammenti al C-6 di un glucosio che si trova approssimativamente venti residui a valle dalla fine della catena parentale, formando un legame  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Le due isoforme dell'enzima ramificante, I e II hanno diversa specificità. La forma I ha una più alta affinità per l'amido non ramificato (amilosio), mentre la forma II ramifica preferenzialmente l'amilopectina. Nonostante la biosintesi dell'amido richieda l'azione dei tre enzimi descritti precedentemente, le varie isoforme di questi ultimi possono combinarsi per creare amidi con differenti proprietà, alcuni dei quali si sono rivelati adatti ad usi industriali, come gli amidi usati nella carta, nei tessuti, nelle vernici, nelle bioplastiche e in vari alimenti.

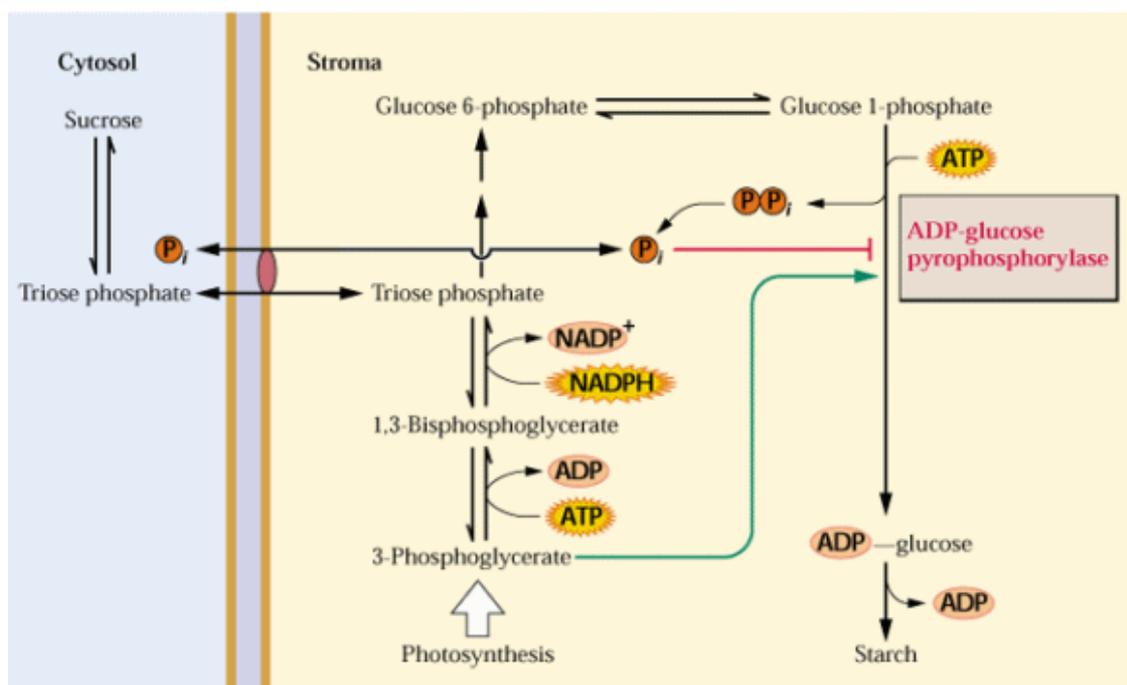


Fig.2: Regolazione sintesi dell'amido nei cloroplasti. Quando il 3-fosfoglicerato è abbondante, viene attivata la sintesi dell'amido. Il fosfato inorganico, come indicatore dello stato del pool dei trioso fosfati, inibisce la sintesi dell'amido.

### *ADP-glucosio pirofosforilasi*

L'ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPase) è il principale enzima di regolazione nella via biosintetica dell'amido. Sia nei tessuti fotosintetici sia in quelli eterotrofi l'AGPase è attivata dal 3-fosfoglicerato e inibita dal fosfato inorganico ( $P_i$ ). Il rapporto  $P_i / 3\text{-fosfoglicerato}$  è il principale regolatore della sintesi dell'amido, almeno nei tessuti verdi. Questo meccanismo correla l'attività dell'AGPase con il rifornimento di fotosintati, poiché l'enzima è attivato quando l'intermedio del ciclo di Calvin, ossia il 3-fosfoglicerato è abbondante. Quando la fotosintesi invece rallenta o cessa, la concentrazione di fosfato inorganico nel cloroplasto aumenta e la sintesi dell'amido è repressa. La concentrazione di  $P_i$  plastidiale è anche determinata dall'attività del trasportatore di trioso fosfato (TPT). Al buio, e qualche volta anche alla luce, il TPT scambia trioso fosfati dal cloroplasto con  $P_i$  citosolico, aumentando il rapporto  $P_i / 3\text{-fosfoglicerato}$  nell'organello inibendo la sintesi dell'amido. Negli amiloplasti invece gli esoso fosfati importati mediante un antiporto esoso fosfato/  $P_i$  vengono incorporati direttamente nell'amido. Come nei cloroplasti l'AGPase è inibita dal fosfato. Nelle piante, l'enzima è un eterotetramero, costituito da due subunità catalitiche (AGPB, 50kDa) e da due più grandi, subunità regolatorie (AGPS, 51 kDa). L'enzima delle piante superiori è regolato dalla formazione di un ponte cisteinico tra le due subunità catalitiche (AGPB) in risposta ai cambiamenti di luce e dei livelli degli zuccheri. La forma ridotta (monomerica) mostra una più alta affinità per il substrato ed è più sensibile all'attivatore allosterico 3PGA rispetto alla forma ossidata (dimerica). Questa regolazione redox, si pensa possa essere mediata dalle tioredossine *f* a *m* (fig.3),

può essere osservato inoltre un cambiamento nella mobilità elettroforetica di APGB in SDS-gels nn riducenti; APGB corre come una proteina dimerica nella forma ossidata e come monomero nella forma ridotta. In cloroplasti isolati da pisello, APS1 può essere convertito dalla forma dimerica a quella monomerica mediante illuminazione. Questo non richiede alti livelli di ATP o del rapporto NADPH/NADP<sup>+</sup>, ma dipende dalla presenza del 3PGA. Fornendo saccarosio a foglie di *Arabidopsis* si ottiene l'attivazione dell'AGPase al buio ed un aumento di quest' ultima alla luce. Il trealosio 6-fosfato, intermedio della sintesi del trealosio, è stato osservato recentemente, essere implicato nell' attivazione redox dell' AGPase indotta dagli zuccheri (Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006). A supporto di questa ipotesi vi sono esperimenti, dove addizionando 1 mM Tre6P si promuove l'attivazione redox dell'enzima nei cloroplasti isolati. Comunque, misurazioni successive di T6P mostrano che la concentrazione del metabolica sia probabilmente, 1-20  $\mu$ M *in vivo*.

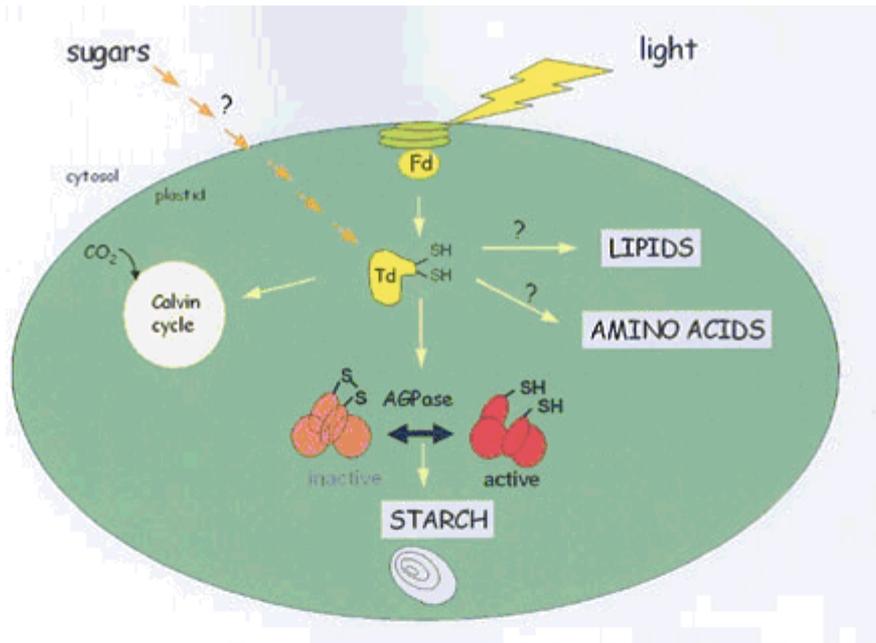


Fig.3: regolazione redox dell' AGPase

### *Glicolisi nelle piante*

La glicolisi è una sequenza di reazioni lineari nella quale il glucosio (negli animali, proveniente dalla scissione del glicogeno) è convertito in piruvato con riduzione di ATP e NADH. La via ossidativa dei pentoso fosfati è invece un processo ciclico, nel quale il glucosio-6-fosfato è ossidato a ribulosio-5-fosfato e  $\text{CO}_2$ , con formazione di NADPH e la successiva rigenerazione in diverse tappe del glucosio-6-fosfato.

Le due vie hanno diversi intermedi in comune e nonostante possano operare indipendentemente possono anche interagire. I vari zuccheri della glicolisi e della via ossidativa dei pentoso fosfati si trovano sia nei plastidi che nel citosol, e c'è comunicazione tra le vie attraverso le membrane plastidiali. In conclusione entrambe queste vie e le altre vie biosintetiche sono integrate nelle piante per mezzo della loro relazione con il pool del trioso fosfato/pentoso fosfato.

Nella prima parte della glicolisi, il glucosio viene fosforilato a fruttosio- 6- fosfato a spese di due molecole di ATP. Dapprima il glucosio viene fosforilato da una esochinasi con consumo di ATP, a glucosio-6-fosfato. Successivamente il glucosio- 6 -fosfato ad opera di una esoso fosfato isomerasi, viene convertito mediante una reazione reversibile in fruttosio 6 fosfato (F6P). Quest'ultimo con l'utilizzo di una seconda molecola di ATP viene convertito a fruttosio 1,6-bisfosfato (FBP) da una fosfofruttochinasi (PFK), che viene scisso in due triosi fosfati: gliceraldeide 3-fosfato (G3P) e diidrossiacetone fosfato (DHAP). La reazione successiva è mediata dalla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi-NAD dipendente, il gruppo aldeidico della G3P viene ossidato con relativa riduzione del

$\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  e contemporaneamente con una fosforilazione (usando  $\text{P}_i$ ) si ha produzione di acido 1,3 bisfosfoglicerico(BPGA) e  $\text{NADH}$ .

A questo punto inizia la seconda parte della glicolisi che prevede la produzione di molecole di ATP. Nella tappa successiva il fosfato del BPGA viene trasferito all'ADP mediante l'intervento di una fosfoglicerato chinasi con formazione di ATP, (fosforilazione a livello del substrato), e 3-fosfoglicerato (3PGA). Tale composto viene isomerizzato e deidratato a 2-fosfoenolpiruvato (PEP) che viene utilizzato nel passaggio finale della glicolisi per produrre ATP e piruvato.

Funzione della glicolisi nella cellula vegetale è non solo quella di generare ATP e potere riducente, ma soprattutto quello di fornire intermedi, utilizzabili nelle vie biosintetiche.

Essendo le piante autotrofe per il carbonio e l'azoto, possono sintetizzare tutta una serie di composti necessari per la loro crescita, come ad esempio la sintesi dei componenti della parete cellulare quali polisaccaridi e lignina.

La glicolisi inoltre nella cellula vegetale è duplicata nel compartimento citosolico e nel plastidio. Nella glicolisi vegetale, ritroviamo diverse isoforme degli enzimi glicolitici, di notevole importanza è l'enzima citosolico fosfofruttochinasi  $\text{PP}_i$  dipendente (PFP) che a differenza della fosfofruttochinasi ATP-dipendente, utilizza pirofosfato e catalizza una reazione reversibile. La pianta riesce in questo modo ad adattare il suo metabolismo a condizioni di stress, ad esempio una carenza di fosfato e quindi una riduzione degli adenilati fa sì che venga utilizzata la PFP, in quanto il livello di pirofosfato rimane invariato e può essere così utilizzato come sorgente alternativa di energia.

### ***Ciclo Ossidativo del Pentoso Fosfato (OPPP)***

Il ciclo del pentoso fosfato (*Oxidative Pentose Phosphate Pathway*, OPPP) costituisce una via alternativa alla glicolisi ed al ciclo di Krebs e prende il nome da zuccheri fosforilati che costituiscono dei composti intermedi a 5 atomi di carbonio. La funzione principale di tale via è quella di generare il cofattore ridotto NADPH usato nelle reazioni biosintetiche che si verificano nel citoplasma.

L'OPPP consta di una prima fase irreversibile in cui si produce NADPH ed anidride carbonica e di una seconda fase reversibile in cui si rigenera l'esoso dal ribulosio-5-fosfato. Nella prima fase si ha l'ossidazione del glucosio-6P ad opera della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH; *EC 1.1.1.49*) con formazione del 6-fosfoglucono- $\delta$ -lattone, successivamente idrolizzato a 6-fosfogluconato da una lattonasi specifica. Il fosfogluconato è poi convertito in ribulosio-5-fosfato dalla 6-fosfogluconato deidrogenasi. In queste ultime tre reazioni si riducono due molecole di NADP<sup>+</sup> a NADPH, successivamente utilizzate da altre vie biosintetiche.

Durante il ciclo si sintetizzano la 3-fosfogliceraleide (3-PGA) ed il fruttosio-6-fosfato (F6P), intermedi comuni alla glicolisi, cosicchè le due serie di reazioni risultano essere strettamente collegate.

### ***OPPP e G6PDH negli organismi fotosintetici***

Il potere riducente prodotto dall'OPPP viene utilizzato dalle piante principalmente nei processi di assimilazione dell'azoto mediati dalla nitrito reductasi (Bowsher et al. 1989) e dalla glutammato sintasi (Bowsher et al. 1992;

Esposito et al. 2003): ciò suggerisce pertanto l'esistenza d'una stretta connessione tra il metabolismo del carbonio e quello dell'azoto (Emes et al. 1979; Bowsher et al. 1989).

La presenza d'un ciclo OPPP nei plastidi così come nel citosol è stata ipotizzata in molti tessuti vegetali, sia verdi (Schnarrenberger et al. 1973) che non fotosintetici (Nishimura e Beevers, 1981) e nelle cellule in coltura (Krook et al. 1998).

Il principale enzima regolato dell'OPPP è la G6PDH. In tutte le piante finora studiate sono state trovate due isoforme della G6PDH, una citosolica e una plastidiale, sia nei tessuti fotosintetici (Schnarrenberger et al. 1973) che nelle radici (Hong e Copeland, 1991), suggerendo la presenza di due cicli OPPP distinti (Turner e Turner, 1980).

In realtà solo per la glucosio-6-fosfato deidrogenasi e per la 6-fosfogluconato deidrogenasi è stata accertata la presenza sia nel citosol sia nei plastidi, mentre per uno o più tra gli altri enzimi del ciclo sembra essere presente solo l'isoforma plastidiale (Schnarrenberger et al. 1995; Debnam ed Emes, 1999).

La presenza di due isoforme distinte compartimentate della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (P1-G6PDH e P2-G6PDH), è stata osservata sia in tessuti verdi (Schnarrenberger et al. 1973; Fickenscher e Scheibe, 1986; Srivastava ed Anderson, 1983; Bredemeijer ed Esselink, 1995), che in tessuti non fotosintetici (Nishimura e Beevers, 1981; Hong e Copeland, 1991; Esposito et al. 2001a).

Anticorpi preparati contro la forma citosolica dell'enzima non reagiscono con l'isoforma cloroplastica, la quale può essere facilmente distinta dalla prima

anche in base alla forte inattivazione in seguito all'incubazione con ditionitrotolo (DTT), che al contrario attiva alcuni enzimi fotosintetici, e all'esposizione alla luce (80% di inattivazione); l'isoforma citosolica non mostra significativa diminuzione di attività in seguito ad entrambi i trattamenti (Fickenscher e Scheibe, 1986; Anderson et al. 1974). L'inattivazione è evidenziata da un aumento della  $K_{mG6P}$ .

Recentemente sono stati ottenuti anticorpi in grado di discriminare le isoforme citosolica, plastidiale e cloroplastica della G6PDH di patata (*Solanum tuberosum*) (Wendt et al. 2000).

Uno dei meccanismi d'inattivazione alla luce è dovuto al trasporto elettronico nei tilacoidi, collegato al sistema ferredossina-tioeredossina (Fd/Tr).

Più articolata e a lungo termine sembra essere la regolazione dell'attività della G6PDH in relazione al metabolismo azotato in radici di orzo (Esposito et al. 1998; 2000; 2001b). E' interessante notare come la G6PDH sia regolata anche da altri fattori: l'attività dell'enzima aumenta in seguito all'infezione da parte del virus Y di patata (Sindelar et al. 1999) per rendere disponibili gli intermedi necessari alla sintesi dell'RNA virale nell'ospite. L'attività della G6PDH *in vitro* aumenta in seguito allo stress da freddo (Bredemeijer ed Esselink, 1995), probabilmente per generare NADPH ed intermedi necessari per sviluppare la resistenza al freddo. In grano (*Triticum aestivum* L.) sono stati identificati dei geni detti WESR (Wheat Early Salt Responding genes): di questi uno in particolare, WESR5, mostra omologia di sequenza con la G6PDH e sembra che abbia un ruolo fondamentale nella risposta allo stress salino (Nemoto e Sasakuma, 2000).

Pochi sono i lavori sulla G6PDH delle alghe (Huppe e Turpin, 1994; Huppe e Turpin, 1996), ma, dai dati pubblicati, sembra che così come nelle piante superiori, la G6PDH algale sia coinvolta nel metabolismo azotato (Jin et al. 1998).

Inoltre ci sono evidenze della presenza di isoforme multiple della G6PDH che variano in dipendenza del substrato azotato utilizzato in *Chlamydomonas reinhardtii* (Huppe e Turpin, 1996) e più recentemente è stata evidenziata la presenza di una unica via OPPP localizzata nel citosol delle diatomee (Michels et al. 2005).

### ***Effetti del potere riducente e della luce sull'attività G6PDH***

L'enzima cloroplastico è sottoposto ad un controllo fine da parte del potere riducente: l'attività del ciclo ossidativo del pentoso fosfato aumenta rapidamente in risposta alla diminuzione del rapporto  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ , mentre l'isoforma citosolica risulta essere insensibile ai cambiamenti del potere riducente (Fickenscher e Scheibe, 1986; Wenderoth et al. 1997).

Il NADPH si comporta come un inibitore competitivo nella patata americana (*Ipomea batatas*) (Muto ed Uritani, 1972), nei cloroplasti di spinacio (*Spinacia oleracea*) (Lendzian, 1980), nei cloroplasti di pisello (*Pisum sativum*) (Scheibe et al. 1989; Turner e Turner, 1980), nei noduli di soia (*Glycine max*) (Hong e Copeland, 1991) e in patata (*Solanum tuberosum*) (Graeve et al. 1994).

L'interazione del NADPH avviene nel sito ligando del  $\text{NADP}^+$ , in modo da rendere il sito stesso meno accessibile. L'ipotesi che il sito ligando del NADPH sia il sito di interazione dell'effettore è sostenuto dal fatto che quest'ultimo possa essere rimosso dal sito con aggiunta di  $\text{NADP}^+$ ; infatti l'effetto inibitorio aumenta durante l'esposizione alla luce, quando aumenta il rapporto  $\text{NADPH} / \text{NADP}^+$ .

L'inibizione della G6PDH indotta dalla luce può essere mimata incubando l'enzima con quantità crescenti di NADPH o aumentando il rapporto  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  (Lendzian e Bassham, 1975; Esposito et al. 2001a), indicando il NADPH come modulatore dell'enzima in questione.

Una diminuzione di tale rapporto potrebbe verificarsi quando il NADPH è usato nei processi biosintetici, o nella conversione di ossalacetato a malato da parte della malico deidrogenasi  $\text{NADP}^+$ -dipendente (Huppe e Turpin, 1994).

Probabilmente processi come l'ossidazione del NADPH nella catena respiratoria, l'ossidazione durante la biosintesi degli acidi grassi e di composti isoprenoidi come carotenoidi e gli steroli, favoriscono la conversione del NADPH in  $\text{NADP}^+$ , accelerando il ciclo del pentoso fosfato.

Le interazioni che avvengono tra le reazioni alla luce e le molecole di G6PDH (simulate nei sistemi ricostituiti di cloroplasti di spinacio) dipendono dalla ferredossina e dal  $\text{NADP}^+$ .

Quando piante intere o cloroplasti isolati vengono illuminati, l'attività della G6PDH è fortemente ridotta, o completamente inibita (Lenzian, 1980).

Cercare i responsabili effettori di tale inibizione ha portato all'ipotesi che intermediari e/o l'accettore finale degli elettroni del flusso fotosintetico degli elettroni possono essere coinvolti nella inibizione della G6PDH.

Nei cloroplasti di pisello (Srivastava e Anderson, 1982), l'enzima è inattivato dalla luce e dal ditiotreitolo in modo diverso, suggerendo che i cambiamenti dell'enzima provocati dall'uno non sono gli stessi provocati dall'altro. Il DTT infatti non compete con il trasporto di elettroni e sembra essere responsabile dell'inibizione dovuta alla riduzione dei legami disolfuro.

Alla luce la ferredossina ridotta può ridurre, oltre alle FNR (e al  $\text{NADP}^+$ ) durante la fase luminosa della fotosintesi, anche le tioredossine, che controllano gli enzimi fotosensibili del cloroplasto.

A differenza della controparte citosolica regolata solo dai metaboliti, l'isoforma cloroplastica (P1-G6PDH) è inattivata da modificazioni redox tramite il sistema Fd/Tr alla luce: per evitare un ciclo futile, nei cloroplasti l'OPPP agisce

solo di notte (von Schaewen et al. 1995). E' stato suggerito che i residui amminoacidici coinvolti in questa regolazione redox sono le Cys<sup>149</sup> e Cys<sup>157</sup> (Wenderoth et al. 1997); attraverso studi di mutagenesi sito-specifica e mediante la costruzione di proteine di fusione sovraesprese in *E. coli*, si è visto che le due cisteine regolatrici risiedono nel dominio N-terminale dell'enzima (che contiene pure il dominio di legame al NADP<sup>+</sup>). La sostituzione delle cisteine con delle serine abolisce completamente la regolazione redox dell'enzima, anche se enzimi chimera formati dalla proteina citosolica con l'aggiunta dell'estremità N-terminale cloroplastica, contenente le cisteine regolatrici, non mostrano la regolazione redox dell'enzima compartimentato (Wendt et al. 2000).

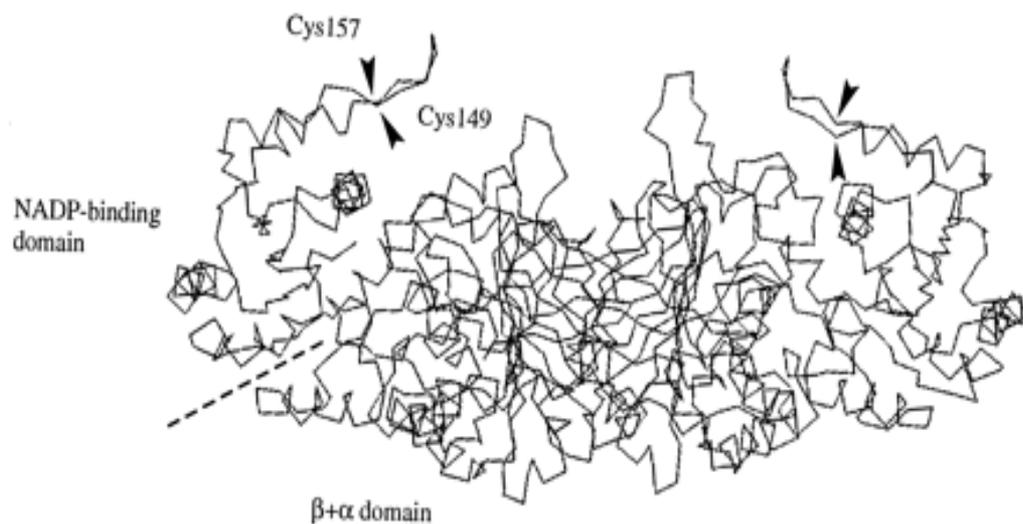


Fig.4: Struttura tridimensionale prevista del dimero della G6PDH plastidiale di patata. Le posizioni dei residui di cisteina Cys<sup>149</sup> e Cys<sup>157</sup> sono indicati dalle frecce. Sul monomero di sinistra il sito di legame è indicato da una linea tratteggiata (da Wenderoth et al. 1997).

### ***Biologia molecolare della G6PDH negli organismi fotosintetici***

L'analisi comparativa delle sequenze cDNA per la G6PDH di diverse piante, alghe, cianobatteri, funghi e animali ha permesso di costruire un albero filogenetico che identifica le varie "famiglie" di G6PDH note (Wendt et al. 1999).

Bisogna ricordare che negli archeobatteri il gene per la G6PDH non è presente, facendo presupporre una origina eubatterica del gene citosolico (Wendt et al. 1999).

Si può identificare un gruppo di enzimi presenti nei cianobatteri che si è evoluto in modo indipendente ed al quale sono simili le G6PDH degli eubatteri e funghi.

Si dipartono quindi due rami: nel primo sono raccolte l'isoforma degli animali e quella citosolica delle piante superiori, nel secondo sono presenti le isoforme di alghe rosse, verdi e quelle plastidiali.

Una attenta analisi delle sequenze plastidiali porta ad una ulteriore suddivisione tra le isoforme cloroplastiche (P1-G6PDH) e plastidiali (P2-G6PDH), entrambe codificate da geni nucleari.

Questa analisi lascia supporre un quadro evolutivo secondo il quale il gene G6PDH cianobatterico endosimbionte è stato sostituito da una copia nucleare codificante per l'isoforma citosolica, modificata con una sequenza per il riconoscimento plastidiale (chloroplast targeting sequence), similmente a quanto accaduto per la trioso fosfato isomerasi e la fruttosio-1,6- bisfosfato aldolasi.

Nelle piante tutte le isoforme della G6PDH sono codificate dal DNA nucleare e mostrano una omologia di circa il 65%, maggiore rispetto all'omologia con la G6PDH dei cianobatteri (55%).

Le isoforme delle G6PDH citosolica e plastidiale sono state sequenziate in diversi vegetali. In particolare nelle foglie di tabacco le sequenze delle due isoforme contengono circa il 40% di identità ed il 28% di similitudine, facendo supporre una diversa origine filogenetica.

Al contrario le sequenze amminoacidiche delle isoforme plastidiali di patata (*S. tuberosum*) e tabacco (*N. tabacum*) presentano oltre il 90% di identità; la sequenza amminoacidica dell'isoforma plastidiale da tabacco risulta essere simile per il 64% alla sequenza del batterio *Anabaena cylindrica* (fonte: GeneBank; software PC gene), facendo supporre il trasferimento ancestrale del gene dal plastidio al nucleo.

Sia le G6PDH cianobatteriche che le isoforme cloroplastiche si differenziano dalla G6PDH citosolica per la maggiore sensibilità al potere riducente.

Confrontando gli allineamenti separati della P1-G6PDH e P2-G6PDH del segnale peptide si riscontra che le variazioni avvengono in gruppi di amminoacidi conservati e anche intorno ai siti di sequenze segnale di processamento, facendo supporre che, in concomitanza con lo sviluppo di fotoautotrofi multicellulari e la differenziazione di organi specializzati, sia avvenuta la separazione in due classi delle isoforme plastidiali.

Dall'allineamento di 36 isoforme G6PDH si trova che tre posizioni, contenenti le cisteine regolatrici redox Cys<sup>149</sup> e Cys<sup>157</sup> sono conservati (Wenderoth et al. 1997). Una terza cisteina in posizione 168 è anche presente in tre sequenze di G6PDH in funghi, ma probabilmente non è rilevante nella regolazione redox.

Le due cisteine presenti nelle sequenze plastidiali delle G6PDH delle piante sono conservate molto bene, mentre non sono mai presenti nelle sequenze delle isoforme citosoliche e cianobatteriche (Wenderoth et al. 1997).

La sequenza genomica della G6PDH è stata sequenziata per l'isoforma plastidiale di *N. tabacum* ed è organizzata in 10 esoni (41.6% G+C) e 9 introni (34% G+C), cosicché la proteina completa consiste di 593 amminoacidi (Knight ed Emes, 2001).

Nella regione 5'-UTR è stato identificato un promotore di 940 nucleotidi, inoltre sono stati identificati ulteriori importanti elementi promotori: il primo, NIT2, è responsabile della regolazione da parte dello stato azotato, il secondo è un sito di legame per un fattore di shock termico.

La sequenza cDNA dell'isoforma citosolica in patata è tipica di un gene eucariotico, comprendendo un segnale di poliadenilazione nella regione 3'-UTR e una sequenza di consenso Kozak intorno al codone di inizio. Apparentemente non è presente un peptide di transito codificato dalla regione 5'-terminale, questo indica che il gene prodotto rimane nel citosol.

L'analisi genomica (mediante Southern blotting) ha rivelato che l'enzima plastidiale è codificato da una famiglia di geni a singola copia e l'isoforma citosolica è codificata da una famiglia genica con basso numero di copie in patata.

I sei residui di cisteine descritti nell'isoforma plastidiale sono confinati nello spazio compreso dall'N-terminale: questi comportano delle modificazioni reversibili redox che possono indurre la formazione di ponti disolfuro intramolecolari o misti.

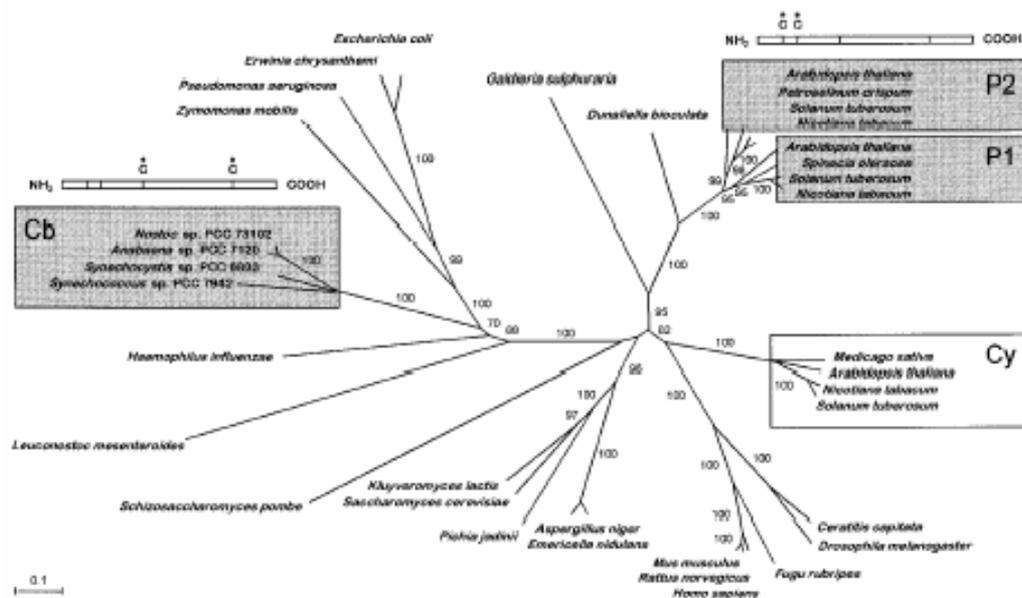


Fig.5: Albero filogenetico delle varie isoforme della G6PDH (da Wendt et al. 1999).

## ***Tioredoxine***

Le tioredossine sono proteine ubiquitarie di 12 kDa, la cui funzione primaria è la regolazione dell'attività enzimatica mediante l'ossidazione o riduzione di disolfuri. Il loro sito attivo -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys- è altamente conservato e contiene un gruppo disolfuro che subisce cambiamenti reversibili di stato redox. Il sistema ferredossina-tioredoxina del cloroplasto è costituito da ferredossina, l'enzima Fe-S, ferredossina-tioredoxina riduttasi (FTR) e le tioredossine di tipo *f* e *m*.

Nonostante abbiano una funzione simile, le tioredossine che partecipano alla regolazione enzimatica nella fotosintesi ossigenica, differiscono per la loro storia filogenetica.

La tioredossina *m* somiglia alle tioredossine batteriche, mentre la tioredossina *f* è più simile alle tioredossine degli eucarioti.

Secondo questa ipotesi le tioredossine di tipo *m* sono derivate dal procariote endosimbionte progenitore del cloroplasto in cui esse si sono evolute per regolare la fotosintesi ossigenica.

Le tioredossine interagiscono con una vasta gamma di proteine, mediante un meccanismo redox basato sull'ossidazione reversibile di due cisteine, accompagnato dal trasferimento di due protoni e due elettroni.

La struttura 3D di diverse tioredossine è stata determinata; essa presenta un core di cinque foglietti beta paralleli alternati a quattro alfa eliche. Il sito attivo si trova in un piccolo segmento all'estremità N-terminale della seconda alfa elica, separato dal resto dell'elica, da un cappio causato da un residuo di prolina

conservato.

### ***Meccanismi di fosforilazione e “ sugar sensing”***

Esperimenti condotti su un sistema di dischi fogliari per valutare gli effetti in diverse condizioni sull'espressione e sull'attività enzimatica delle isoforme della G6PDH in patata (*Solanum tuberosum*), mostrano che l'attività della G6PDH citosolica aumentava di circa sei volte in 24 ore, quando i dischi fogliari erano incubati al buio con zuccheri metabolizzabili. Al contrario cambiamenti osmotici, sequestro di fosfato o stress di ossidativo non avevano alcun effetto sull'attività della G6PDH citosolica. La scoperta inoltre di elementi multipli SURE (elementi in risposta agli zuccheri), presenti nella regione promotrice del gene dell'enzima (fig.6), suggeriscono che quest'ultimo sia regolato al livello trascrizionale dalla disponibilità di zuccheri (Hauschild e von Schaewen, 2003).

Per quanto concerne l'isoforma compartimentata, esperimenti di immunoprecipitazione di  $^{32}\text{P}$  con anticorpi specifici per l'isoforma P<sub>1</sub> (cloro plastica), suggerivano una possibile fosforilazione dell'enzima anche se la proteina fosforilata non era evidenziabile (Hauschild e von Schaewen, 2003).

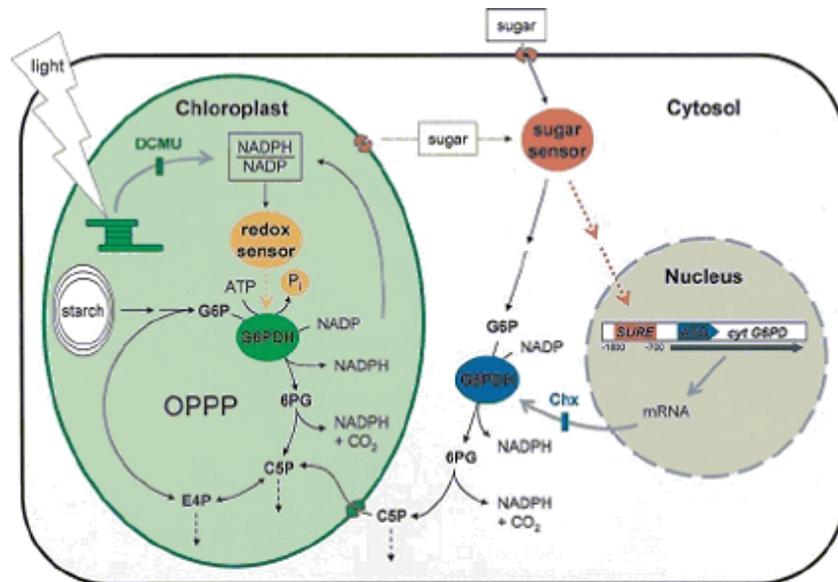


Fig.6: meccanismi di regolazione delle differenti isoforme della G6PDH

### ***Trealosio***

Il trealosio è un disaccaride composto da due molecole di glucosio, l'UDP-glucosio e il glucosio-6-fosfato, uniti dall'enzima trealosio-6-fosfato sintasi (TPS) con liberazione dell'UDP. Successivamente, la molecola risultante, il trealosio-6-fosfato (T6P) è defosforilata in trealosio dall'enzima trealosio-6-fosfato fosfatasi (TPP), anche se può essere defosforilato da fosfatasi aspecifiche. Il trealosio è il disaccaride più diffuso in natura, lo ritroviamo nei batteri, nei funghi, negli insetti e nelle piante. La presenza ubiquitaria del trealosio è accompagnata da una vasta gamma di funzioni differenti: è un osmoprotettore in *E.coli*, regola il livello degli zuccheri negli insetti e i carboidrati di riserva nei funghi.

In *E. coli*, le due attività enzimatiche coinvolte nella biosintesi del trealosio sono effettuate da OtsA (attività di TPS) e da OtsB (attività di TPP). Il catabolismo del trealosio può avvenire in vari modi: tramite fosforilazione del trealosio in *E.coli*, o tramite fosforilazione ed successiva idrolisi da parte delle trealasi in piante, animali, funghi e batteri.

Utilizzando un inibitore delle trealasi, la valadamicina A in piante transgeniche completate con DNA di *E. coli*, si è rivelato un accumulo di trealosio sia nelle piante transgeniche che nei controlli, suggerendo quindi la presenza di una via biosintetica endogena del trealosio.

Il trealosio ha un ruolo notevole nel tollerare gli stress, in particolare la siccità. Il trealosio si accumula ad un livello pari al 12% del peso secco della pianta e protegge le proteine e le strutture della membrana quando è sottoposto a stress

idrico, mentre i livelli di trealosio si abbassano nuovamente in seguito all'irrigazione delle piante.

Il precursore del trealosio, il Trealosio-6-fosfato (T6P), è indispensabile per la regolazione di utilizzo degli zuccheri e la crescita delle piante. Il T6P sintetizzato nel citosol, agisce sul metabolismo plastidiale promuovendo un trasferimento redox mediato da tioredossina all'enzima ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPase), in risposta del livello degli zuccheri del citosol, ossia una regolazione per la sintesi dell'amido indipendente dalla luce (Kolbe et al. 2005).

## Materiali e Metodi

### *Coltivazione delle piante*

I semi d'orzo (*Hordeum vulgare L.*, var. Nure) erano forniti dall'Istituto Sperimentale di Cerealicoltura di Fiorenzuola d'Arda (PC) e conservati alla temperatura di 4°C. Venivano immersi in una soluzione di CaSO<sub>4</sub> 2 mM per circa 20 minuti, lavati in acqua deionizzata e poi lasciati ad imbibire in acqua per 60'.

La germinazione dei semi avveniva al buio alla temperatura di 21°C, su carta da filtro imbevuta di acqua deionizzata; dopo 5 giorni, a germinazione avvenuta, le piantine venivano rimosse e poste in coltura idroponica su un terreno modificato di tipo Long Ashton, avente la seguente composizione:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Oligoelementi <sup>1</sup>	0.5 gr/litro

<sup>1</sup> La Soluzione di Oligoelementi aveva la seguente composizione: KCl 2.5 mM – H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.25 mM - CuSO<sub>4</sub> 0.025 mM - MnSO<sub>4</sub> 0.25 mM - ZnSO<sub>4</sub> 0.1 mM -(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.007 mM.

Il recipiente di coltura era un contenitore di Plexiglas avente un volume di 8 litri; in esso, per mezzo di sottili strisce di gommapiuma sostenute da bacchettine di Plexiglas, gruppi di 10-12 piante erano posizionate con le radici immerse nel terreno continuamente aerato.

Le piante venivano illuminate con un flusso di fotoni di  $300 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  e sottoposte ad un fotoperiodo di 16 h di luce / 8 h di buio, in una camera termoregolata a 20 °C con il 50% di umidità relativa.

Dopo 5-7 giorni di idrocoltura veniva aggiunto al terreno 10 mM ammonio fosfato bibasico  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  ed i prelievi si eseguivano a distanza di sette giorni dall'aggiunta. Ad un altro gruppo di piante veniva aggiunto dopo 5-7 giorni 10 mM nitrato di potassio  $(\text{KNO}_3)$  come unica fonte di azoto e tali piante venivano raccolte sette giorni dopo; un altro gruppo ancora era lasciato in condizione di N-deprivazione.

### ***Preparazione dell'estratto per la misura della G6PDH***

Le piante d'orzo erano prelevate due ore dopo l'inizio del periodo di luce; le radici e le foglie venivano separate dai fusti, asciugate accuratamente, pesate e polverizzate in azoto liquido in un mortaio. All'aggiunta del tampone di estrazione, i tessuti polverizzati venivano macerati nel mortaio a freddo, fino ad ottenere una poltiglia omogenea che veniva filtrata attraverso 4 strati di garza.

Per l'estrazione della G6PDH il tampone di estrazione (rapporto peso/volume 1:2) a 4-6°C era composto da: 100 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 μMNADP<sup>+</sup>, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma 9599) 1 ml/30 gr peso fresco.

La poltiglia ottenuta era centrifugata per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5-C plus rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto era definito come l'estratto grezzo e utilizzato per i saggi enzimatici di controllo e per la successiva purificazione.

### ***Saggio enzimatico G6PDH***

Il saggio era effettuato a 25° C in cuvette da 1 cm di cammino ottico (UV grade), monitorando le variazioni di assorbanza utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU-65 con modulo cinetico (Kinetics Pack Module).

Il saggio di attività della G6PDH (*EC 1.1.1.49; G6PDH*) (Esposito et al. 1998) era realizzato aggiungendo l'estratto ad una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM NADP<sup>+</sup>, 3 mM G6P e l'estratto. L'attività enzimatica era

misurata come quantità di enzima in grado di ridurre 1 nmole di  $\text{NADP}^+$  al minuto. L'attività specifica veniva espressa per mg di proteina presente nell'estratto.

### ***Purificazione della G6PDH da radici di orzo***

La G6PDH presente nelle radici di piante di orzo veniva parzialmente purificata per la determinazione di alcuni parametri cinetici.

All'incirca 30-50 grammi di radici erano asciugate, pesate ed immediatamente polverizzate in azoto liquido. Tutte le tappe successive erano condotte a  $4-6^\circ\text{C}$ ; il tampone di estrazione (rapporto peso/volume 1:2) era composto da 100 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo,  $15\ \mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$ , Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P9599) 1ml/30 gr.

All'aggiunta del tampone di estrazione, le radici polverizzate venivano macerate in un mortaio a freddo, fino ad ottenere una poltiglia omogenea che veniva successivamente filtrata attraverso 4 strati di garza. Tale filtrato era centrifugato poi per 20' a 20000g a  $4^\circ\text{C}$  (centrifuga Sorvall RC5-C plus rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto era designato come l'estratto grezzo, veniva portato al 70% di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , agitando delicatamente per circa 90 minuti e poi centrifugato per 20' a 20000g a  $4^\circ\text{C}$  (centrifuga Sorvall RC5-C plus rotore Sorvall SS34). Il pellet era risospeso nel tampone d'estrazione e desalato su una colonna Sephadex G25 (Pharmacia PD10). L'eluato era poi applicato ad una colonna a scambio ionico Q-Sepharose, precedentemente equilibrata col tampone d'estrazione. Dopo aver lavato la colonna, le proteine venivano eluite applicando un gradiente lineare di KCl da 0 a 400 mM, con un flusso di 1 ml al minuto.

Campioni di 3.5 ml erano raccolti e saggiati per l'attività G6PDH. Le frazioni attive venivano raccolte e precipitate in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% a 4°C overnight.

Dopo centrifugazione per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5-C plus rotore Sorvall SS34), il pellet era risospeso nel tampone d'estrazione senza  $\text{NADP}^+$  e desalate usando una colonna Sephadex G25; successivamente l'eluato era applicato ad una resina d'affinità Reactive Blue Agarose (Sigma RB4) e le proteine erano eluite con un tampone contenete  $\text{NADP}^+$  1.5 mM. Frazioni di 1 ml erano raccolte, saggiate per l'attività G6PDH, riunite ed utilizzate per la determinazione dei parametri cinetici.

### ***Determinazione delle costanti cinetiche***

Gli enzimi purificati erano incubati nella miscela di reazione per la G6PDH e la  $K_m$  G6P apparente veniva misurata variando le concentrazioni di G-6-P da 0 a 100 mM, mantenendo la concentrazione di  $\text{NADP}^+$  a 150  $\mu\text{M}$ ; analogamente, la  $K_m$   $\text{NADP}^+$  apparente era misurata variando le concentrazioni di  $\text{NADP}^+$  da 0 a 150  $\mu\text{M}$ , mantenendo la concentrazione di G6P a 3 mM.

I risultati sono stati messi in grafico col software Jandel Sigma Plot ed i parametri cinetici calcolati col grafico dei doppi reciproci. Le costanti di inibizione per il NADPH ( $K_i$  NADPH) sono state calcolate col metodo del plot di Dixon, misurando l'attività G6PDH a varie concentrazioni di NADPH da 0 a 150  $\mu\text{M}$ , a livelli subsaturanti di  $\text{NADP}^+$  di 15, 30 e 50  $\mu\text{M}$  e mantenendo la concentrazione del G6P a 3 mM.

### *Elettroforesi e Western blotting*

I campioni di estratto grezzo o le isoforme G6PDH purificate venivano sottoposti a elettroforesi denaturante (SDS PAGE) (Laemmli, 1970).

Per l'analisi veniva utilizzato un gel di poliacrilammide 10x10.5 cm al 10%, con uno "stacking gel" al 4%; i campioni denaturati venivano sottoposti a un campo elettrico di 40 mA/180 V per 120 min in una vasca per elettroforesi (Hoefer miniVE system), la corrente veniva erogata da un alimentatore (Pharmacia E301).

Il tampone di corsa utilizzato era così composto:

Tris-HCl (pH 8.3.)	25	mM
Glicina	0.192	mM
SDS ( <i>Sodiododecilsolfato</i> )	0.1	%

Gli estratti, prima di essere caricati nei pozzetti del gel, venivano denaturati in una miscela di trattamento: 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20 % (v/v) glicerolo, 0.2 mM DTT, 0.02 % blu di bromofenolo, in proporzione 1:1, e messi in un bagno a 100°C per cinque minuti, quindi i campioni raffreddati in ghiaccio prima del caricamento nel gel.

Per l'analisi Western, i polipeptidi separati erano trasferiti su membrana di nitrocellulosa (Scheichler & Schuell Protran BA 83 0.2 µM), applicando una corrente di 25 V/300 mA per 2 h in una opportuna vaschetta di trasferimento (Hoefer miniVE blot module).

Per il trasferimento si faceva uso di un tampone uguale a quello di corsa contenente 20 % metanolo per migliorare il trasferimento delle proteine (Towbin Transfer Buffer). Dopo il trasferimento la membrana era incubata per 2 ore con antisiero per le isoforme citosolica (Cy-G6PDH), plastidiale (P2-G6PDH) e

cloroplastica (P1-G6PDH) di patata sovraespressa in *E. coli* (Wendt et al. 2000), o per la Fd-GOGAT di orzo (Pajuelo et al. 2000).

I peptidi di interesse erano identificati con anticorpo secondario (anti-rabbit IgG sviluppato in capra e coniugato con fosfatasi alcalina; Sigma A3687) e visualizzati mediante reazione con i sali di tetrazolio (soluzione 0.48 mM nitro blu di tetrazolio, 0.56 mM 5-bromo-4 cloro-3 indolil fosfato in 10 mM Tris-HCl pH 9.2 e 60 mM MgCl<sub>2</sub>; Sigma B6404).

### ***Coltivazione di Koliella antarctica***

*Koliella antarctica* ha una temperatura di crescita non superiore ai 15°C. Le alghe venivano coltivate in laboratorio a 5°C ± 0.2°C, in un incubatore sotto continua illuminazione (120 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), fornita da lampade fluorescenti (Philips TLD 30W/55). L'atmosfera all'interno dell'incubatore era arricchita con 5% di CO<sub>2</sub>.

La composizione del terreno di coltura era la seguente:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.75 gr/litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75 gr/litro
NaCl	0.02 gr/litro
CaCl <sub>2</sub>	0,02 gr/litro
MgSO <sub>4</sub>	0,30 gr/litro
FeSO <sub>4</sub>	0,001 gr/litro
E.D.T.A. Sale sodico	0.001 gr/litro
Oligoelementi	0,5 gr/litro

La soluzione di oligoelementi aveva la seguente composizione:

KCl	2.5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.25 mM
CuSO <sub>4</sub>	0.025 mM
MnSO <sub>4</sub>	0.25 mM
ZnSO <sub>4</sub>	0.1 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.007 mM

#### ***Determinazione del volume di impacchettato cellulare (PCV)***

Il volume di impacchettato cellulare era determinato centrifugando a 4000 g per 5 minuti un'aliquota nota (in genere 10 ml) di sospensione cellulare in un tubo da ematocrito.

#### ***Preparazione dell'estratto crudo e saggio per G6PDH***

Le cellule venivano raccolte (0.25-1.5 lt) e centrifugate per 20 minuti 5000 rpm. Quindi il pellet veniva risospeso (1:2 V/V) in un tampone di estrazione a 4-6°C avente la seguente composizione: 50 mM Tris-P<sub>i</sub> a pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl/ml Plant Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P9599), 15 µM NADP<sup>+</sup>.

Le alghe venivano lisate attraverso due passaggi consecutivi in French Press (Aminco, USA), a 16000 psi (atmosfera per pollice quadrato) utilizzando una cella del diametro di ¾ di pollice. L'estratto così ottenuto veniva centrifugato a 13000 rpm per 20 minuti a 0-4°C (centrifuga Sorvall RC2-B, rotore Sorval SS

34). Il surnatante veniva definito come l'estratto grezzo e utilizzato per i saggi di attività enzimatica e per la determinazione della concentrazione proteica.

La miscela di reazione per la misura dell'attività enzimatica aveva la seguente composizione: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM NADP<sup>+</sup>, 2 mM G6P. La riduzione del NADP<sup>+</sup> veniva monitorata seguendo la variazione di assorbanza a 340 nm della miscela di reazione all'aggiunta dell'estratto (volume finale 1 ml), in cuvette da 1 cm di cammino ottico. L'attività era misurata in triplicato.

Per la valutazione della concentrazione proteica veniva allestito un saggio basato sul metodo di Bradford (1976), con albumina di siero bovino come standard: il campione era aggiunto ad una miscela Bio-Rad e ne veniva misurata l'assorbanza a 280 nm. Le misure erano effettuate in duplicato e confrontate con un bianco di riferimento.

### ***Purificazione della G6PDH da Koliella***

L'estratto grezzo veniva preparato come descritto, saggiato per la determinazione dell'attività totale ed utilizzato per la purificazione della G6PDH.

All'estratto grezzo venivano aggiunti 10 mg/ml di protamina solfato, per la precipitazione degli acidi nucleici. Dopo 20' a 4°C l'estratto veniva centrifugato a 13000 rpm per 20 minuti a 0-4°C (centrifuga Sorvall RC2-B, rotore Sorval SS 34). Successivamente, veniva fatto un "taglio" precipitando una parte delle proteine con solfato d'ammonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] al 40% di saturazione a 2-4° C per 40 minuti, centrifugando quindi a 13000 rpm per 20 minuti a 0-4°C (centrifuga Sorvall RC2-B con rotore Sorvall SS34). Il surnatante veniva ulteriormente

portato al 70% di saturazione di solfato d'ammonio a 2-4°C per 20 minuti e centrifugato a 13000 rpm per 20 minuti a 0-4°C. Il pellet veniva risospeso in 2.5 ml tampone con la seguente composizione: 50m mM Tris-HCl a pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 µM NADP<sup>+</sup> e quindi veniva desalato su resina Sephadex G25 (colonna PD-10 Amersham Biosciences – GE Healthcare, Svezia), precedentemente condizionata con un tampone avente la stessa composizione di quello appena descritto. L'eluato G25 veniva caricato su colonna per cromatografia a scambio ionico Q-Sepharose Hi-Prep Fast Flow, collegata al sistema AKTAprime plus (Amersham Biosciences – GE Healthcare, Svezia). Questo strumento garantisce l'esecuzione dei comuni passaggi di purificazione, assicurando nel contempo una maggiore precisione nelle operazioni. Offre significativi vantaggi in termini di velocità, iniettando fino a 50 ml di liquido al minuto, ad una pressione di 1 MPa. Esso è compatibile con una vasta gamma di colonne preconfezionate e adattabile alle più comuni tecniche di cromatografia. Il liquido viene fatto fluire verso la colonna da una pompa a singolo canale. Il gradiente viene applicato automaticamente, per mezzo di una valvola di scambio a tre aperture e un mixer. Un sensore di pressione previene danni alla colonna qualora la pressione aumenti eccessivamente. Il percorso del flusso è controllato automaticamente da due valvole rotanti motorizzate: una delle due provvede alla selezione del tampone o del campione; l'altra viene usata per l'iniezione del campione. Un monitor ad alta precisione misura l'assorbanza a lunghezze d'onda nel campo dell'UV (254-280 nm), la conducibilità e, nel caso lo si richieda, il pH. Un sensore della temperatura all'interno della cella di conducibilità fornisce automaticamente la temperatura di esercizio e rettifica adeguatamente le misure di pH e conducibilità. Vengono

raccolte frazioni di volume (o intervalli di tempo) stabilito dall'operatore mediante un raccoglitore di frazioni integrato.



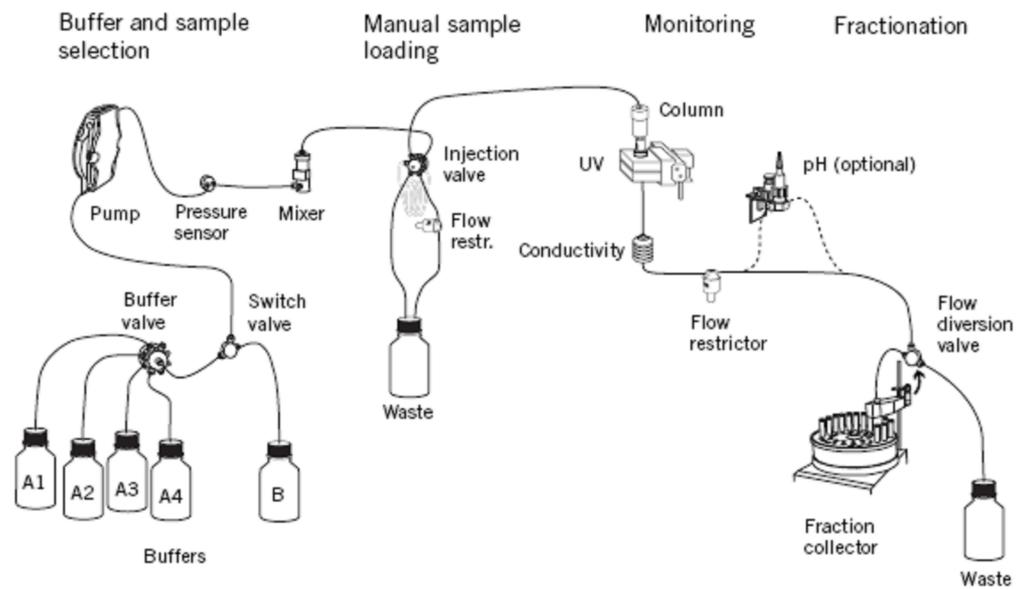


Figura 7: Schema a blocchi della piattaforma AKTA per la purificazione di proteine

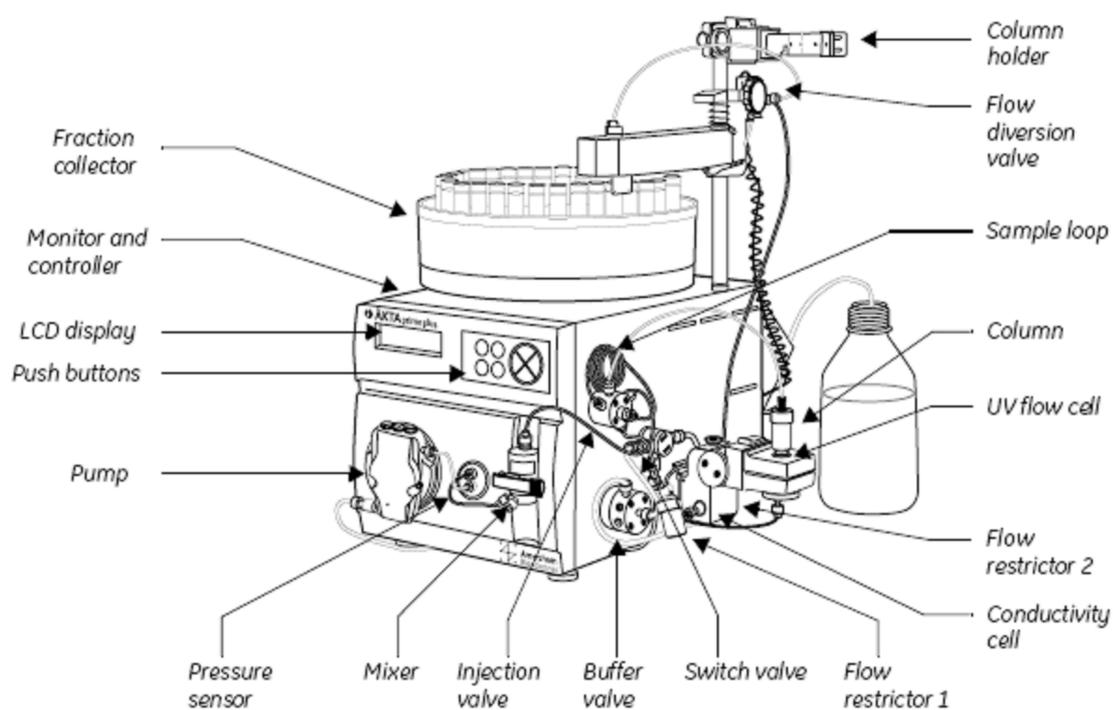
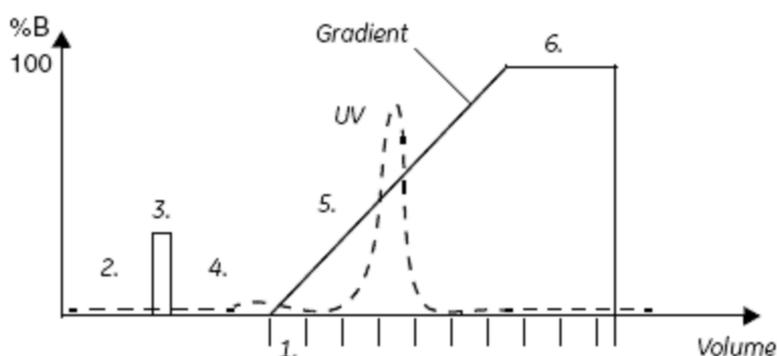


Figura 8: Schema descrittivo del sistema AKTA Prime della Amersham Biosciences – GE Healthcare

Il programma per la purificazione della G6PDH prevedeva una iniezione di 4 ml di campione sulla colonna precedentemente equilibrata con il tampone di corsa, quindi un lavaggio con 50 ml di tampone per eluire le proteine non legate alla matrice Q-Sepharose, una successiva applicazione di un gradiente di KCl da 0 a 400 mM (100 ml complessivi) per eluire selettivamente le proteine legate, infine il mantenimento per ulteriori 50 ml del tampone contenente KCl 400 mM. Il flusso applicato era di 2.5 ml al minuto e venivano raccolte frazioni di 2.5 ml.



Le frazioni eluenti dalla colonna Q-Sepharose venivano saggate per l'attività enzimatica G6PDH. Quelle di interesse formavano un picco di attività e venivano riunite, misurandone il volume complessivo, l'attività e le proteine totali presenti per determinare il apporto di purificazione (in genere tra 2 e 4). Le proteine presenti nelle frazioni venivano concentrate al 70% di solfato d'ammonio per 40 minuti a 2-4°C e centrifugate a 13000 rpm per 20 minuti a 2-4°C. Il pellet veniva risospeso in 2.5 ml di tampone (50 mM Tris-HCl a pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) e desalato su resina Sephadex G25 come descritto in precedenza.

L'eluato G25 si saggiava per l'attività G6PDH e per le proteine totali presenti per determinare il rapporto di purificazione (in genere tra 3 e 7). Veniva, successivamente, caricato su una colonna per cromatografia per affinità (HiTrap-BlueHp), precedentemente condizionata con tampone A senza NADP<sup>+</sup>.

Il ligando è un pigmento cibacron blue F3G-A che è covalentemente legato ad una resina ad alta densità di agarosio attraverso un legame con la Triazina del ligando.

Questa colonna interagisce biospecificamente con proteine che hanno siti di legame per cofattori nucleotidi. La colonna veniva lavata con 2.5 ml di tampone A senza NADP<sup>+</sup>.

Le frazioni (0.5ml circa) erano eluite con 5 ml di tampone A con 1 mM NADP<sup>+</sup>. Venivano saggiate per l'attività G6PDH. Quelle di interesse erano riunite per la determinazione dei parametri cinetici.

### ***Determinazione delle costanti cinetiche***

Gli enzimi purificati da *Koliella* erano incubati nella miscela di reazione per la G6PDH e la  $K_{m_{G6P}}$  apparente veniva misurata variando le concentrazioni di G6P da 0 a 100 mM, mantenendo la concentrazione di NADP<sup>+</sup> a 150 μM; analogamente, la  $K_{m_{NADP^+}}$  apparente era misurata variando le concentrazioni di NADP<sup>+</sup> da 0 a 150 μM, mantenendo la concentrazione di G6P a 3 mM.

I risultati sono stati messi in grafico col software Jandel Sigma Plot ed i parametri cinetici calcolati col metodo dei doppi reciproci. Le costanti di inibizione per il NADPH ( $K_{i_{NADPH}}$ ) sono state calcolate col metodo del plot di Dixon, misurando l'attività G6PDH a varie concentrazioni di NADPH da 0 a 150 μM, a livelli

subsaturanti di NADP<sup>+</sup> di 15, 30 e 50  $\mu$ M e mantenendo la concentrazione di G6P a 3 mM.

***Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) e Western Blotting***

I campioni ottenuti dall'esecuzione del protocollo di purificazione sopra descritto e l'estratto crudo venivano caricati su un gel di poliacrilammide al 10 % di SDS (Sodiododecilsolfato), allo scopo di testare l'efficacia della procedura di purificazione. Essi erano preventivamente denaturati mediante riscaldamento (100°C per 5 minuti) in presenza di SDS e blu di bromofenolo, un tracciante che permette di seguire la corsa elettroforetica. La soluzione denaturante per i campioni, in proporzione 1:1, aveva la seguente composizione:

Tris- HCl	0,125 M
SDS	4%
Glicerolo	20%
DTT	0,2 M
Blu di Bromofenolo pH 6,8	0,02%

I gel di poliacrilammide si ottengono copolimerizzando acrilammide e metilen-bisacrilammide in presenza di un agente iniziatore (N,N,N',N'-tetrametilendiammide) e un catalizzatore (persolfato di ammonio). È possibile variare la porosità del gel modificando le concentrazioni di acrilammide e le proporzioni di metilen-bisacrilammide.

Il gel al 10% aveva la seguente composizione:

Tris-HCl pH 8,8	1,5 M	5 ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	-	8,1 ml
Acryl/Bis	30%	6,6 ml
SDS	10%	200 µl
APS	10%	100 µl
TEMED	-	10 µl

La composizione dello “stacking gel” era:

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M	1,89 ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	-	4,5 ml
Acryl/Bis	30%	1 ml
SDS	10%	75 µl
APS	10%	37,5 µl
TEMED	-	7,5 µl

Il tampone di corsa (5x) era così composto:

Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Glicina	0,192 mM
SDS	0,1%

La corsa elettroforetica era condotta per 120 minuti a 180 V.

Le proteine dopo separazione erano visualizzate mediante Comassie Blue o Nitrato d'argento (Sigma Prot-Sil 1). In questo modo era possibile analizzare il contenuto proteico del campione in esame e identificare la banda corrispondente all'enzima di interesse.

Per l'analisi Western, i polipeptidi separati erano trasferiti su membrana di nitrocellulosa (Scheichler & Schuell Protran BA 83 0.2  $\mu$ M), applicando una corrente di 25 V / 300 mA per 2 h in una opportuna vaschetta di trasferimento (Hoefer miniVE blot module).

Per il trasferimento (Towbin Transfer Buffer) si faceva uso di un tampone uguale a quello di corsa con aggiunta di metanolo al 20%. Effettuato il trasferimento la membrana era incubata per 2 ore con antisiero per la G6PDH, ottenuto dalle isoforme citosolica, plastidiale e cloroplastica di patata sovraespressa in *E. coli* (Wendt et al., 2000).

I peptidi di interesse venivano identificati mediante incubazione con anticorpo secondario (anti-rabbit IgG - sviluppato in capra - coniugato con fosfatasi alcalina - Sigma A3687) e visualizzati mediante reazione con i sali di tetrazolio (soluzione 0.48 mM nitro blu di tetrazolio, 0.56 mM 5-bromo-4 cloro-3 indolil fosfato in 10 mM Tris-HCl, pH 9.2 e 60 mM MgCl<sub>2</sub> - Sigma B6404).

Le membrane venivano quindi poste su uno scanner ad alta risoluzione e l'immagine acquisita attraverso un personal computer (software Corel Photo Paint 9.0).

### ***Determinazione del peso molecolare***

Il peso molecolare delle subunità della G6PDH era determinato con un'analisi SDS-PAGE, calcolandolo il fattore di mobilità relativa ( $R_f$ ), sia nei gel colorati con Blue Coomassie, che nei Western blots dell'estratto grezzo. I markers di peso molecolare erano i Kaleidoscope pre stained markers (Bio-Rad – USA).

### ***Determinazione delle proteine***

La concentrazione delle proteine (espressa come  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) presenti nell'estratto durante i vari passaggi di purificazione veniva determinata usando il saggio basato sulla colorazione Blue Coomassie R-250 (Bradford, 1976); come standard veniva utilizzata albumina di siero bovina (BSA).

### ***Isolamento dei cloroplasti da pisello (*Pisum sativum*)***

I cloroplasti sono stati isolati pesando approssivamente 100 g di foglie, da piante precedentemente tenute al buio per 8-10h.

Le foglie sono state omogenizzate, utilizzando un frullatore, in 800 ml di tampone così costituito: 330 mM di sorbitolo, 10 mM di  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\text{-HCl}$  (pH 6.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM di sodio ascorbato, 0.5 % (w/v) BSA. La poltiglia ottenuta è stata filtrata attraverso diversi strati di miracloth e di nylon, successivamente centrifugata a 1,700 g per 1 minuto. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 10 ml di tampone con 330 mM sorbitolo, 50 mM di HEPES-KOH, 2 mM di EDTA ed infine 1 mM di  $\text{MgCl}_2$  (pH 7.6). La sospensione di cloroplasti è stata stratificata su un tampone contenente Percoll (pH 7.6), così costituito: 330 mM sorbitolo, 50 mM HEPES-KOH, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  e 40 % di Percoll (Pharmacia-LKB,

Uppsala, Sweden) e centrifugata a 1700 g per un minuto utilizzando un rotore a braccia oscillanti.

Il pellet rappresentava la frazione di cloroplasti intatti, che è stato risospeso ancora una volta in tampone e centrifugato per eliminare il Percoll, precedentemente utilizzato per il gradiente. Il contenuto di clorofilla infine, è stato misurato, utilizzando metanolo secondo il protocollo di Porra et al (1989). Dalle misure avute, si è stabilito di lavorare con sospensioni cloroplastiche, contenenti 1 µg di clorofilla.

### ***Integrità dei cloroplasti***

L'integrità dei cloroplasti è stata valutata mediante l'utilizzo del microscopio a contrasto di fase. In quanto i cloroplasti intatti si presentano di un pallido giallo-verde con un alone intorno, mentre i cloroplasti rotti (e le membrane tilacoidali) si presentano di un verde scuro e con struttura granulosa.

### ***Incubazione dei cloroplasti con Trealosio -6 fosfato***

I cloroplasti purificati dalle foglie di pisello, sono stati diluiti in un rapporto di 1:5 con il seguente tampone: 330 mM di sorbitolo, 50 mM di Hepes-KOH (pH 7.5), 2 mM di EDTA, 1 mM di MgCl<sub>2</sub>, 4 mM di NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM di 3PGA e 0.3 mM di DTT. Successivamente sono stati incubati per 15 minuti con differenti concentrazioni di Tre6P e con l'enzima trealosio fosfato fosfatasi (TPP) bollito e non, per controllare se effetti sullo stato redox dell'AGPase siano attribuibili unicamente al T6P o ai contaminanti ritrovati nel T6P che è in commercio. L'intero procedimento è stato effettuato al buio, per evitare l'attivazione

dell'AGPase alla luce. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati ed i pellet risospesi in Laemmli buffer con e senza l'agente riducente, DTT.

### ***Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) e Western Blotting***

I campioni ottenuti dall'esecuzione del protocollo sopra descritto venivano caricati su un gel di poliacrilammide al 10 % di SDS (Sodiododecilsolfato). Essi erano preventivamente denaturati mediante riscaldamento (100°C per 5 minuti) in presenza di SDS e blu di bromofenolo, un tracciante che permette di seguire la corsa elettroforetica. Precisamente i campioni risospesi in Laemmli buffer con DTT per 3 minuti e i campioni risospesi senza DTT per un minuto. I gel di poliacrilammide si ottengono copolimerizzando acrilammide e metilen-bis-acrilammide in presenza di un agente iniziatore (N,N,N',N'-tetrametilendiammide) e un catalizzatore (persolfato di ammonio). È possibile variare la porosità del gel modificando le concentrazioni di acrilammide e le proporzioni di metilen-bisacrilammide.

Il gel al 10% aveva la seguente composizione:

Tris-HCl pH 8,8	1,5 M	5 ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	-	8,1 ml
Acryl/Bis	30%	6,6 ml
SDS	10%	200 µl
APS	10%	100 µl
TEMED	-	10 µl

La composizione dello “stacking gel” era:

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M	1,89 ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	-	4,5 ml
Acryl/Bis	30%	1 ml
SDS	10%	75 µl
APS	10%	37,5 µl
TEMED	-	7,5 µl

Il tampone di corsa (5x) era così composto:

Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Glicina	0,192 mM
SDS	0,1%

La corsa elettroforetica era condotta per 1 h a 180 V.

Per l'analisi Western, i polipeptidi separati erano trasferiti su membrana di PVDF , applicando una corrente di 100 V per 1 h in una opportuna vaschetta di trasferimento (Bio-Rad).

Per il trasferimento si faceva uso di un tampone di corsa contenente metanolo al 20%. Effettuato il trasferimento, la membrana era incubata con una soluzione di bloccaggio (con latte in polvere 5 %) O/N. Successivamente la membrana è stata incubata con un anticorpo primario-sviluppato in coniglio, diretto contro la coda di istidine dell' AGPB di patata (Tiessen et al., 2002) e un anticorpo secondario (anti-rabbit IgG - sviluppato in capra - coniugato con una perossidasi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

L' azione della perossidasi, è stata rivelata su una film Kodak usando un Kit ECL (Amersham Biosciences, Uppsala).

## RISULTATI

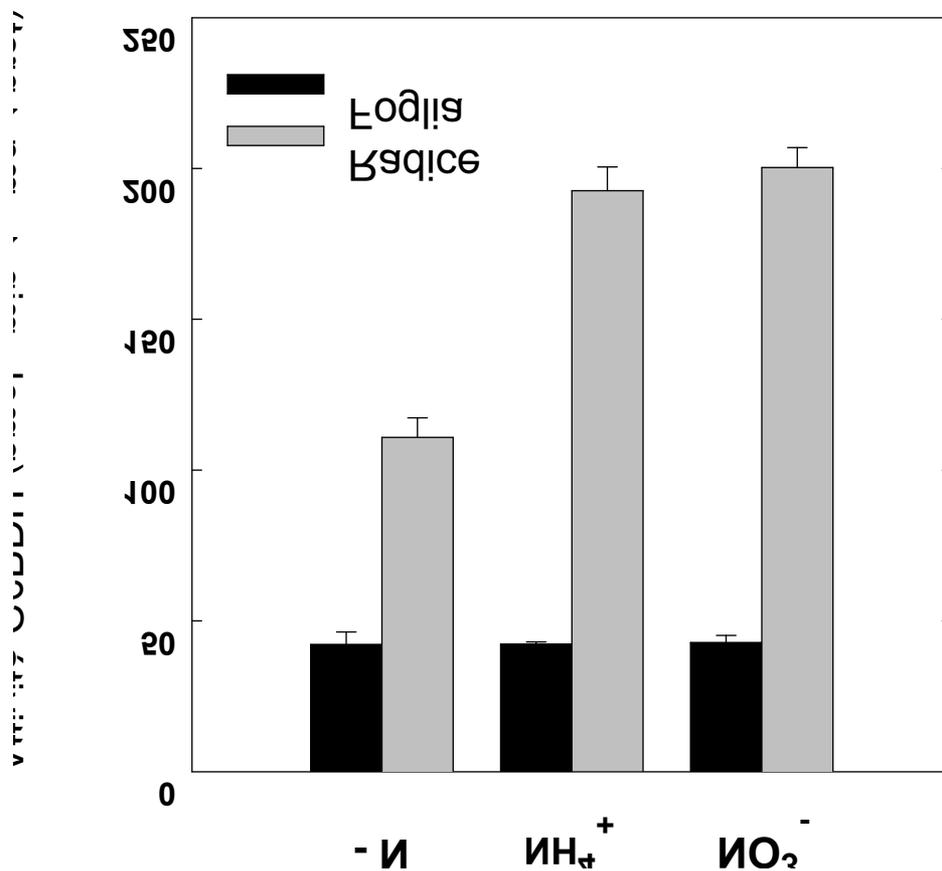
### *Attività G6PDH in piante di orzo*

L'attività G6PDH in foglie di piante di orzo cresciute senza alcuna fonte di azoto era di  $42.2 \pm 4.1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ ; nelle radici l'attività totale della G6PDH era di  $111 \pm 6.4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$  (Fig.9). Questi livelli rimanevano invariati per almeno 14 giorni di idrocoltura in assenza di qualsiasi fonte azoto (Fig.9).

Nelle foglie l'attività della G6PDH rimaneva invariata sia dopo l'aggiunta di 10 mM  $\text{NO}_3^-$  che di 10 mM di  $\text{NH}_4^+$  (Fig.9).

L'aggiunta di azoto (10 mM ammonio o nitrato) al terreno di coltura causava un aumento del 50% dell'attività G6PDH nelle radici in 24h. Dopo 72h l'attività dell'enzima raggiungeva  $192 \pm 7.9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$  con ammonio e  $201 \pm 6.6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$  con nitrato rimanendo costante per tutto il periodo successivo (Fig.9).

L'aggiunta di cicloesimide (per 24 h) provocava il mancato aumento dell'attività totale G6PDH nelle radici che rimaneva ai livelli costitutivi delle piante -N (non mostrato). Nelle foglie l'aggiunta dell'inibitore della sintesi proteica non causava sostanziali variazioni nell'attività G6PDH, che rimaneva ai livelli basali del controllo (non mostrato).

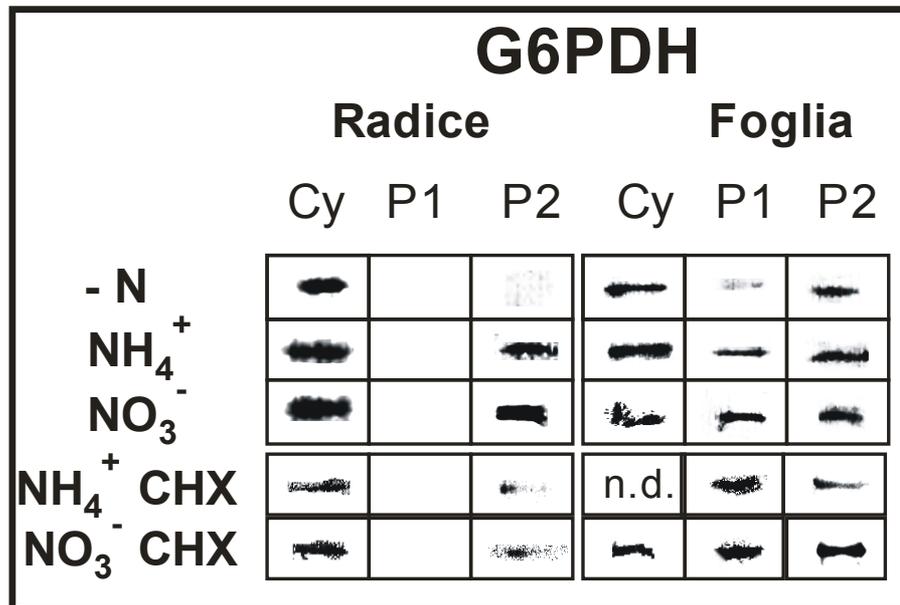


**Figura 9:** Attività G6PDH in piante di orzo cresciute in differenti condizioni di nutrizione azotata. Le piante di controllo venivano cresciute per 14 giorni senza alcuna fonte di azoto (-N); 10 mM ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) venivano aggiunti dopo sette giorni; l'attività enzimatica veniva misurata nelle piante raccolte al 14° giorno. Le attività sono espresse come nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteina; i valori sono la media di 3-5 separate determinazioni ± errore standard. Altri particolari in “Materiali e Metodi”.

### *Analisi mediante Western blotting della G6PDH*

Gli estratti grezzi da radici e foglie di orzo erano sottoposti a SDS-PAGE e poi trasferiti su membrana di nitrocellulosa dove le isoforme di G6PDH erano evidenziate tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici per le isoforme plastidiale (P2) e cloroplastica (P1) della G6PDH (Wendt et al. 2000).

Negli estratti grezzi da radici di orzo cresciute in assenza di azoto non si osservava la presenza di proteine che reagivano contro gli anticorpi delle isoforme compartimentate, sia P1-G6PDH che P2-G6PDH. L'aggiunta di ammonio o di nitrato provocava la comparsa della isoforma P2-G6PDH in entrambi i casi e la presenza dell'isoforma P2 era più evidente con nitrato (+20%) che con ammonio. L'isoforma citosolica aumentava in seguito all'aggiunta di azoto (+76%) (Fig. 10). Nelle radici, in presenza di CHX non si osservava un cambiamento nella presenza della proteina citosolica (96% del controllo -N), e si verificava una modesta presenza della P2-G6PDH con azoto (15–18% del controllo senza CHX) (Fig. 10). Negli estratti grezzi di foglie -N erano presenti le 3 diverse isoforme G6PDH che reagivano con i tre anticorpi specifici per le isoforme G6PDH da patata (Wendt et al. 2000). L'isoforma citosolica aumentava del 35% con ammonio. Si osservava una presenza basale e costante della P2-G6PDH in tutte le condizioni esaminate mentre la P1-G6PDH era appena visibile in piante -N ed era indotta con azoto (Fig. 10). L'aggiunta di CHX non causava apprezzabili variazioni nelle isoforme G6PDH negli estratti grezzi da foglie. Solo la P2-G6PDH mostrava intensità minore in presenza di ammonio e CHX (45% del controllo) (Fig. 10).



**Figura 10:** Western blots della G6PDH da estratti grezzi delle radici di orzo in differenti condizioni di nutrizione azotata. Il nitrato e l'ammonio erano forniti per 3d, mentre questi erano forniti per 1d in presenza di CHX. Le differenti isoforme erano rilevate utilizzando anticorpi monoclonali contro le G6PDH citosolica (Cy), cloroplastica (P1) e plastidiale (P2) da patata (Wendt et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

### ***G6PDH purificata da radici di orzo***

La G6PDH veniva purificata da radici di piante di mediante il protocollo descritto in “Materiali e Metodi”.

Il protocollo utilizzava una purificazione della G6PDH di 30-50 volte nelle radici di piante cresciute in diverse condizioni di nutrizione azotata (Tabelle 1 e 2).

Il passaggio di purificazione su colonna Q-Sepharose mostrava un singolo picco di attività enzimatica, indicando la presenza di una unica forma G6PDH in radici di piante cresciute in assenza di fonti azotate (Fig. 11). L'unico picco presente corrispondeva all'isoforma citosolica, come si poteva verificare con analisi Western con anticorpi specifici.

In presenza di fonti azotate, si osservavano 2 picchi d'attività G6PDH che eluivano da resina Q-Sepharose: il primo picco corrispondeva all'isoforma plastidiale, mentre il secondo a quello citosolico (Fig. 11). Anche in questo caso le differenti isoforme potevano essere discriminate con anticorpi specifici.

L'attività caricata sulla colonna di Blue-Agarose veniva ritrovata nelle frazioni eluite con il  $\text{NADP}^+$  al 70-90%. L'isoforma eluiva esclusivamente con il  $\text{NADP}^+$  dalla colonna blue-agarose, mentre le frazioni eluite in presenza di  $\text{NAD}^+$ , non mostravano alcuna attività G6PDH (Fig. 11).

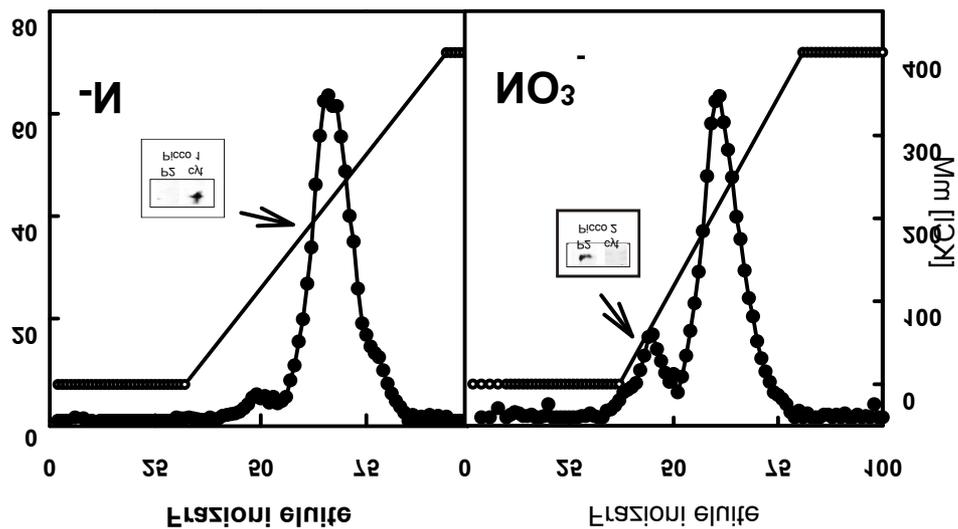
La G6PDH era strettamente specifica per il  $\text{NADP}^+$  e per il glucosio-6P, infatti non veniva misurata attività in presenza di altri zuccheri fosforilati e di  $\text{NAD}^+$  (non mostrato).

- N	Volume totale	Proteine totali	Attività totale	Attività specifica	Resa	Fattore di purificazione
Estratto grezzo	44	17.6	9173	202	100	1
70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + G25	3.5	1.05	2029.5	579.9	22.13	3.9
Blue-Agarose	4.5	0.033	231	7001	2.52	33.6

**Tabella 1:** Tipico protocollo di purificazione della G6PDH da radici di piante di orzo cresciute in assenza di azoto per 7d. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Volume totale	Proteine totali	Attività totale	Attività specifica	Resa	Fattore di purificazione
Estratto grezzo	43	16.9	4134	243.4	100	1
70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + G25 Picco 1	3.5	0.49	20	41.5	0.7	0.1
70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + G25 Picco 2	3.5	0.28	238	848.9	11.3	2.7
Blue-Agarose 1	2.2	0.0019	6	3174	0.15	13
Blue-Agarose 2	3.1	0.0078	91	11499	2.2	47.2

**Tabella 2:** Tipico protocollo di purificazione della G6PDH da radici di piante di orzo cresciute in presenza di nitrato per 3d. Altri particolari in "Materiali e Metodi".



**Figura 11:** Profilo di attività della G6PDH (●) estratta da radici di piante d'orzo cresciute in assenza di azoto per 7 giorni (sinistra); e con nitrato 10 mM (destra), delle frazioni eluite da una colonna di Q-Sepharose (1,27 x 18 cm). La linea continua indica il gradiente di KCl applicato alla colonna. La procedura completa è descritta in "Materiali e Metodi".

### *Analisi elettroforetica e Western blotting della purificazione*

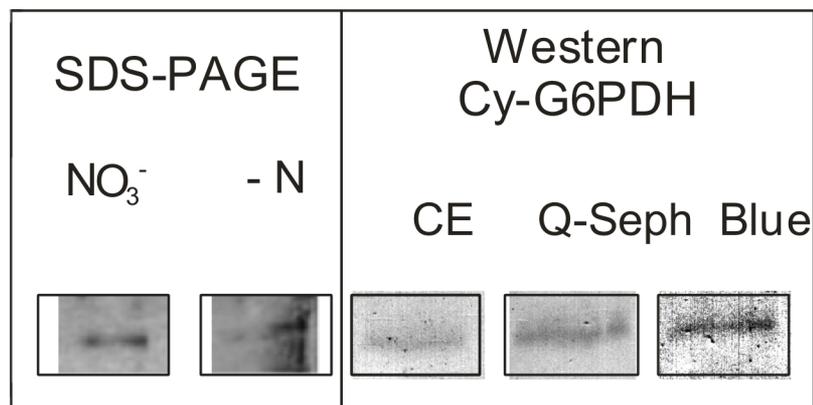
Le G6PDH purificate da radici di piante d'orzo cresciute in vari regimi di nutrizione azotata, sono state sottoposte ad elettroforesi e successivo Western blotting.

L'indagine Western blotting ha mostrato una specificità dell'unico picco Q-Sepharose presente nelle radici deprivate d'azoto e del secondo picco nelle radici con azoto per gli anticorpi diretti contro l'isoforma citosolica da patata (Wendt et al. 2000) (Fig. 12).

L'isoforma citosolica era purificata all'omogeneità, come evidenziato dall'indagine elettroforetica e dalla successiva colorazione con nitrato d'argento (Fig. 12). Il peso molecolare dell'isoforma purificata era di circa 60 kDa.

L'analisi Western blotting mostrava inoltre una specificità del primo picco Q-Sepharose presente nelle radici con azoto verso gli anticorpi diretti contro l'isoforma plastidiale (P2-G6PDH) da patata (Fig.11).

Il protocollo di purificazione utilizzato consentiva di purificare l'isoforma P2-G6PDH all'omogeneità come evidenziato dall'indagine elettroforetica (non mostrato).



**Figura 12:** Analisi elettroforetica della G6PDH citosolica purificata da radici di orzo. Pannello SDS-PAGE: isoforma citosolica purificata e colorata su gel SDS-PAGE con nitrato d'argento. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, piante cresciute con nitrato; -N piante cresciute in assenza di azoto.

Pannello Western Cy-G6PDH: passaggi di purificazione dell'isoforma citosolica da piante -N. CE, estratto grezzo; Q-Seph, unico picco colonna Q-sepharose; Blue, picco purificato su colonna Blue-Agarose. Il Western blotting era effettuato utilizzando anticorpi monoclonali specifici per la Cy-G6PDH da patata (Wendt et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

### *Caratteristiche cinetiche delle isoforme G6PDH di radici di orzo*

La Cy-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in assenza d'azoto mostrava una cinetica iperbolica nei confronti del substrato glucosio-6P, con un valore di  $K_{m_{G6P}}$  di 0.34 mM (Tabella 3a). Il valore di  $K_m$  calcolato per il  $NADP^+$  era 18.1  $\mu M$  (Tabella 3a). L'inibizione da NADPH per la Cy-G6PDH dava una  $K_{i_{NADPH}}$  di 19.1  $\mu M$ .

La Cy-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di nitrato mostrava valori di  $K_{m_{G6P}}$  essenzialmente identici a quelli misurati nelle radici -N (Tabella 3a) con la  $K_{m_{G6P}}$  di 0.26 mM e la  $K_{m_{NADP^+}}$  di 9.1  $\mu M$  (Tabella 3a), mentre la  $K_{i_{NADPH}}$  era 38.8  $\mu M$ .

La Cy-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di ammonio esibiva un valore di  $K_{m_{G6P}}$  di 0.46 mM (Tabella 3a), il valore di  $K_m$  calcolato per il  $NADP^+$  era 10.3  $\mu M$  (Tabella 3a), mentre quello per la  $K_{i_{NADPH}}$  era 51.1  $\mu M$ .

La P2-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di nitrato mostrava una cinetica iperbolica nei confronti del substrato glucosio-6P, con un valore di  $K_{m_{G6P}}$  di 0.62 mM, mentre il valore di  $K_{m_{NADP^+}}$  era 6.8  $\mu M$ , e il valore di  $K_{i_{NADPH}}$  era 28.1  $\mu M$  (Tabella 3b).

La P2-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di ammonio mostrava un valore di  $K_{m_{G6P}}$  di 0.87 mM, mentre la costante cinetica per il coenzima  $NADP^+$  era 8.1  $\mu M$  e il valore di  $K_{i_{NADPH}}$  era 48.5  $\mu M$  (Tabella 3b).

3a) Per l'isoforma Cyt-G6PDH :

	$K_{mG6P}$	$K_{mNADP^+}$	$K_{iNADPH}$
-N	$0.34 \pm 0.02$	$18.1 \pm 1.1$	$19.1 \pm 0.8$
$NO_3^-$	$0.26 \pm 0.08$	$9.1 \pm 5.1$	$38.8 \pm 6.1$
$NH_4^+$	$0.46 \pm 0.1$	$10.34 \pm 4.5$	51*

3b) Per l'isoforma P2-G6PDH :

	$K_{mG6P}$	$K_{mNADP^+}$	$K_{iNADPH}$
$NO_3^-$	$0.62 \pm 0.08$	$6.8 \pm 1.4$	$28.1 \pm 2.5$
$NH_4^+$	$0.87 \pm 0.1$	8.1 *	$48.5 \pm 1.5$

**Tabella 3 a e b:** Costanti cinetiche delle isoforme G6PDH purificate da radici di piante di orzo cresciute in diversi regimi di nutrizione azotata. Le  $K_{mG6P}$  sono espresse in valori mM, le  $K_{mNADP^+}$  e le  $K_{iNADPH}$  sono espresse come valori  $\mu M$ . Altri particolari in "Materiali e Metodi". \*= 1 solo valore.

### ***Purificazione della G6PDH da Koliella antarctica***

La G6PDH veniva purificata da cellule di *Koliella antartica* su terreno liquido sufficiente per 7 giorni mediante il protocollo descritto in Materiali e metodi.

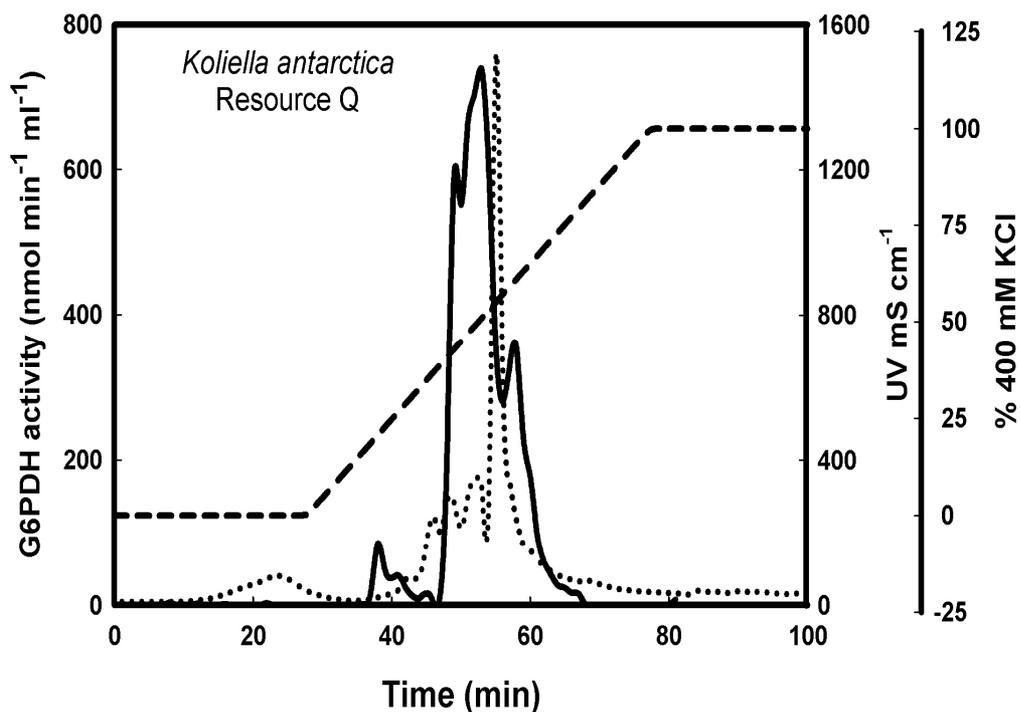
Il protocollo utilizzato permetteva una purificazione della G6PDH di circa 20 volte ( come descritto precedentemente).

Il passaggio di purificazione su colonna Q-Sepharose mostrava un singolo picco di attività enzimatica, indicando la presenza di una unica forma di G6PDH; il profilo di eluizione è mostrato nella Figura 13 .

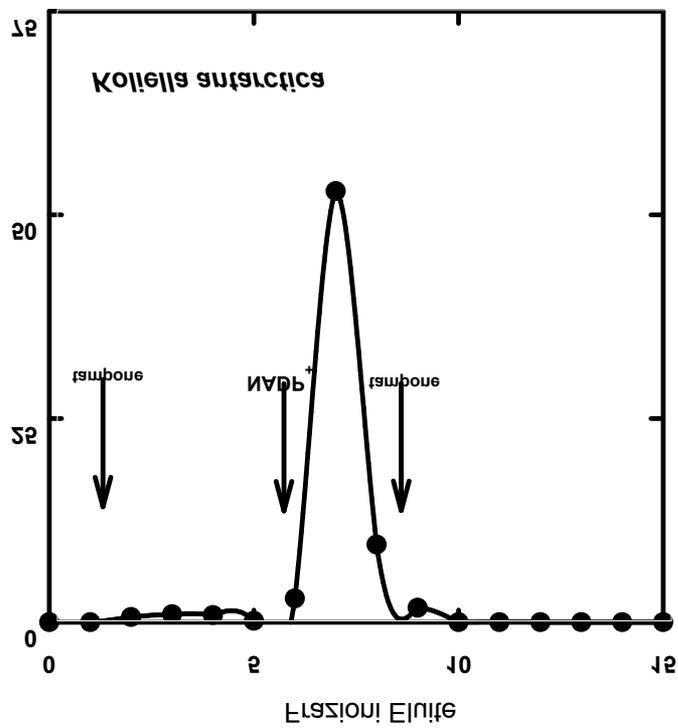
L'attività caricata sulla colonna di Blu agarosio veniva ritrovata nelle frazioni eluite con il  $\text{NADP}^+$  al 70-90%. (Figura 14). La G6PDH era strettamente specifica per il  $\text{NADP}^+$  e per il glucosio-6P. Non veniva misurata attività in presenza di altri zuccheri fosforilati (tale dato non fu mostrato) e di  $\text{NAD}^+$ .

- N	Volume totale	Proteine totali	Attività totale	Attività relativa	Resa	Purificazione
Estratto crudo	44	17,6	9173	202	100	1
70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + G25	3,5	1,05	2029,5	579,9	22,13	3,9
Blu agarosio	4,5	0,033	231	7001	2,52	33,6

**Tab.4** -Tipico protocollo di purificazione della G6PDH da cellule di *Koliella antarctica*. Altri particolari in "Materiali e Metodi".



**Figura 13** : Profilo di attività della G6PDH (linea continua) estratta da *Koliella antarctica*, delle frazioni eluite da una colonna Resource Q-Sepharose (6ml). Sono indicate l'assorbanza a 280 nm delle proteine eluenti dalla colonna (linea tratteggiata) e la percentuale della soluzione 400 mM KCl applicata alla colonna per formare il gradiente salino (linea punto linea). La procedura è descritta in Materiali e metodi.



**Figura 14:** Profilo di attività della G6PDH da colonna di blu-agarosio. Le proteine purificate venivano eluite con 1,5 mM  $\text{NADP}^+$  (freccia). La procedura completa è descritta in "Materiali e metodi".

### ***Caratteristiche cinetiche della G6PDH di Koliella antarctica***

La G6PDH purificata da *Koliella a.* cresciuta in presenza di nitrato 5 mM per 24 ore presentava una cinetica iperbolica nei confronti del substrato glucosio-6P .

L'enzima mostrava un valore di  $K_m_{G6P}$  di  $0.21 \pm 0.05$  mM (n=4) (Fig. 15).

L'isoforma cloroplastica presentava una cinetica di saturazione di tipo iperbolico nei confronti del  $NADP^+$  (Fig. 16); il valore di  $K_m$  calcolato era di  $28.1 \pm 4.6$   $\mu$ M (n=4).

L'inibizione da NADPH veniva misurata a differenti concentrazioni di  $NADP^+$  di 15, 30, 50  $\mu$ M variando la concentrazione di NADPH. Le rette in funzione di  $1/V$  convergono tutte sul valore  $-1/K_i$  che dava un valore di  $K_{i\ NADPH}$  di  $21.86 \pm 3.8$   $\mu$ M (n=4) (Fig. 17).

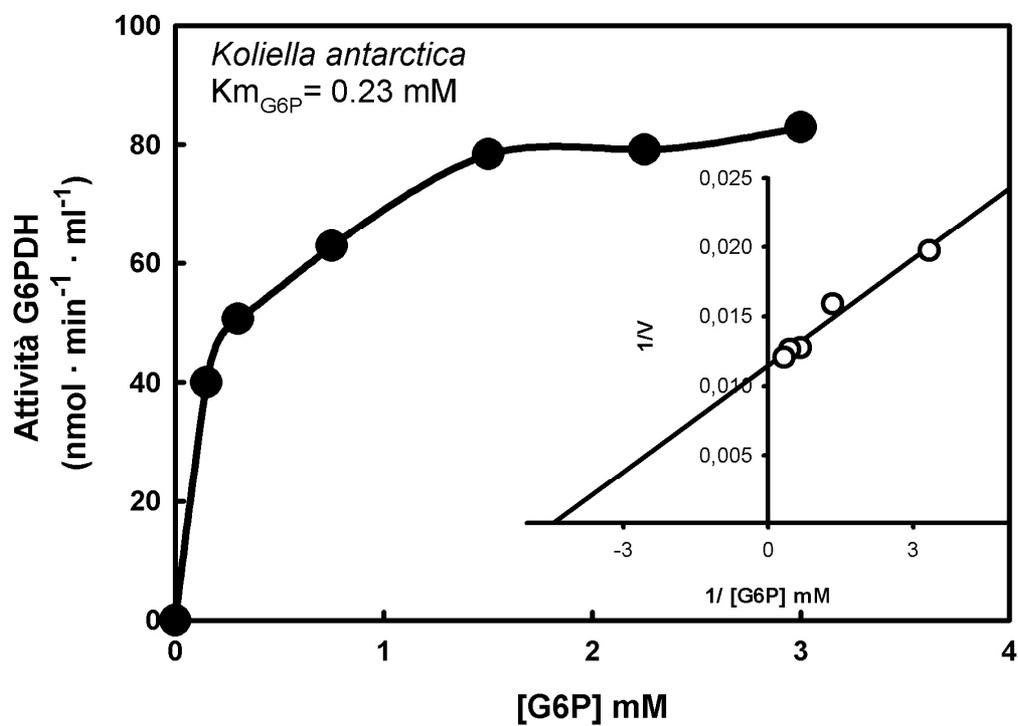


Figura 15: Curva di saturazione della G6PDH per la cinetica di saturazione da substrato per il glucosio-6P e, nell'inserto, linearizzazione di Lineweaver-Burk della G6PDH purificata da *Koliella a.* cresciuta in presenza di nitrato 10 mM per 24 ore. Le curve ottenute sono calcolate con il software Jandel Sigmaplot. Altri particolari descritti in "Materiali e metodi".

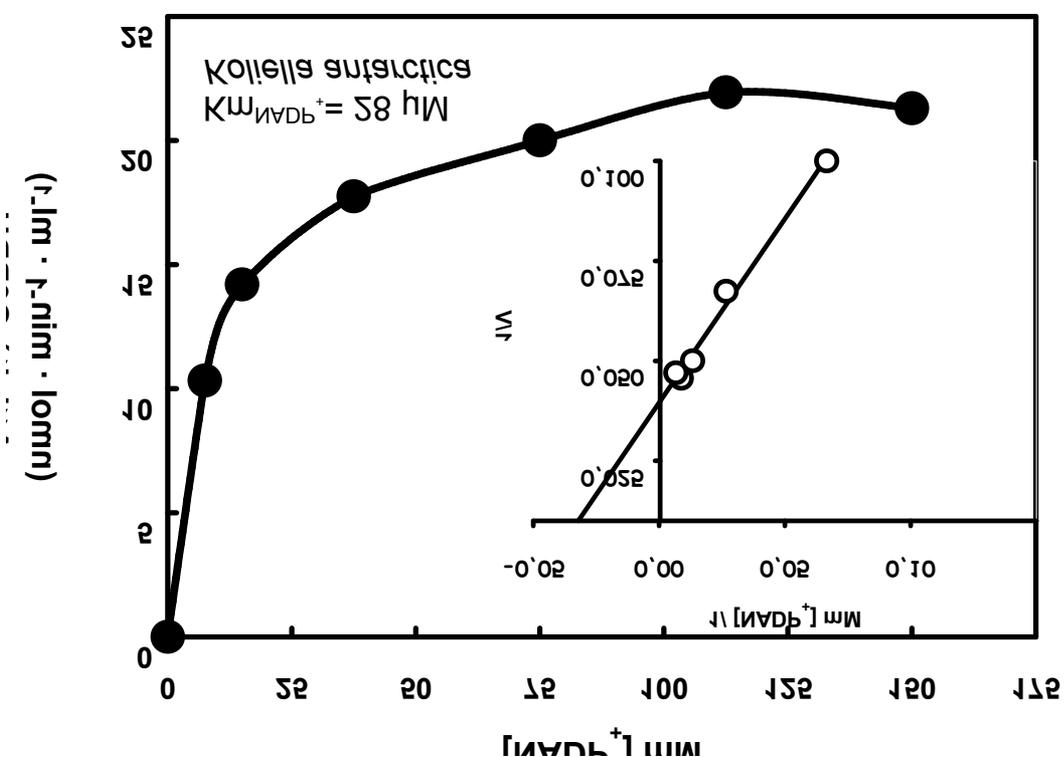


Figura 16: Curva di saturazione della G6PDH per la cinetica di saturazione da substrato per il NADP<sup>+</sup> e, nell'inserto, linearizzazione di Lineweaver-Burk della G6PDH purificata da *Koliella a.* cresciuta in presenza di nitrato 10 mM per 24 ore. Le curve ottenute sono calcolate con il software Jandel Sigmaplot. Altri particolari descritti in "Materiali e metodi".

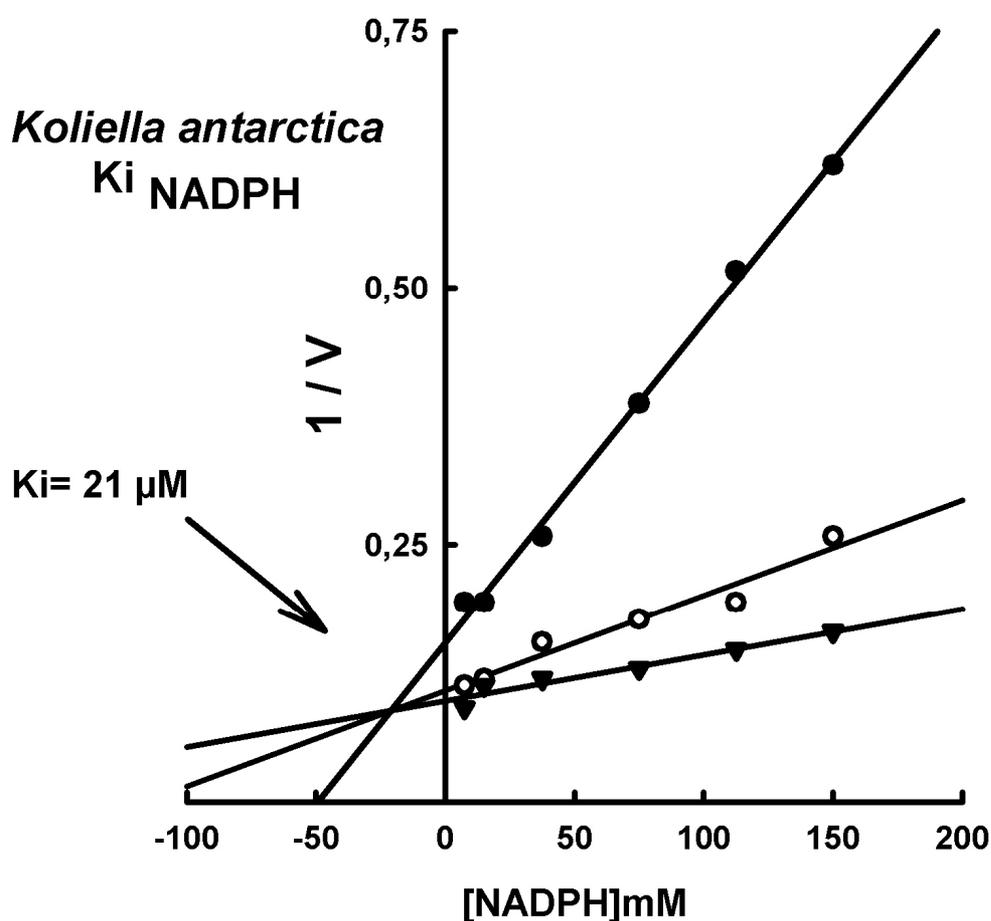


Figura 17: Misura della costante di inibizione per il NADPH mediante il Plot di Dixon della G6PDH parzialmente purificata da *Koliella antarctica*. La concentrazione di NADPH veniva variata in condizioni di saggio sub-ottimali per il  $\text{NADP}^+$  (15, 30, 50  $\mu\text{M}$ ) mentre gli altri reagenti erano saturanti. Altri particolari descritti in Materiali e metodi.

### *Dati elettroforetici*

La procedura utilizzata consentiva la purificazione della G6PDH da *Koliella*: nei gel denaturanti colorati con il nitrato di argento era possibile identificare una singola proteina dalle frazioni attive eluenti dalla colonna di blu agarosio (Fig. 18). L'analisi Western veniva effettuata sottoponendo sia gli estratti crudi che la G6PDH purificata ad elettroforesi denaturante (SDS-PAGE); le proteine venivano quindi trasferite su membrana di nitrocellulosa dove le isoforme di G6PDH erano evidenziate tramite l'utilizzo di anticorpi specifici per le isoforme citosolica (Cyt), plastidiale (P2) e cloroplastica (P1) della G6PDH (Wendt et al. 2000).

Sia gli estratti grezzi di *Koliella* che la G6PDH purificata reagivano esclusivamente contro gli anticorpi per l'isoforma plastidiale (P2-G6PDH) di patata (Wendt et al., 2000) (Fig. 18). Non si verificavano reazioni di colorazione in presenza di anticorpi monospecifici sia per l'isoforma cloroplastica che per quella citosolica (Fig. 18 ). Il peso molecolare delle subunità, calcolato con il metodo della mobilità relative, è di 71 kDa.

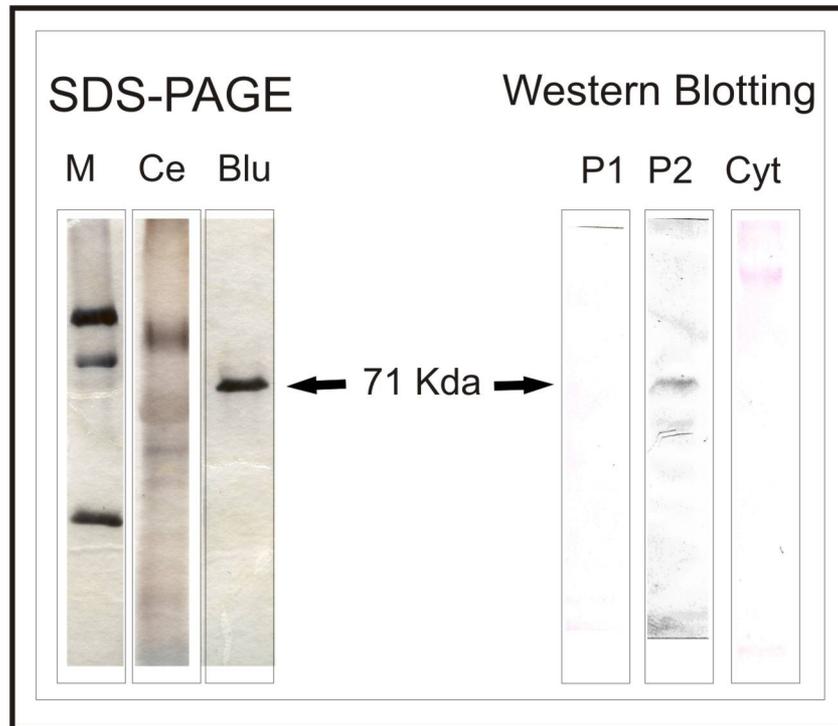


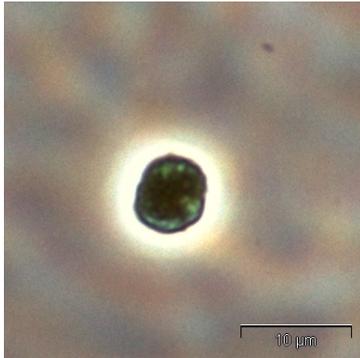
Figura 18: SDS PAGE (sinistra) ed analisi Western (destra) della G6PDH purificata da *Koliella antarctica*. M: markers; CE, estratto grezzo; Blu: G6PDH purificata su blu agarosio. P1: anticorpi contro l'isoforma cloroplastica P1-G6PDH di patata; P2 anticorpi contro l'isoforma plastidica P2-G6PDH di patata; Cyt anticorpi contro l'isoforma citosolica Cy-G6PDH di patata (Wendt et al., 2000). Altri particolari in Materiali e Metodi.

### ***Preparazione e integrità cloroplasti di pisello (Pisum sativum)***

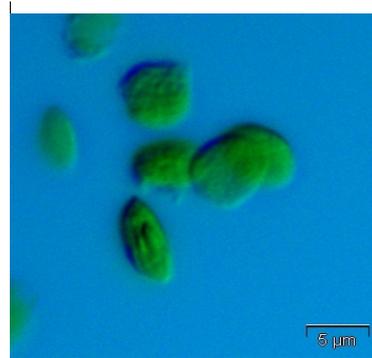
Piante di pisello tenute al buio per 8-10 h, sono state usate per isolare i cloroplasti fogliari mediante il protocollo modificato e corretto dalla procedura di Lunn et al. (1990).

Le foglie sono state omogenizzate con l'utilizzo di un frullatore. La poltiglia ottenuta è stata filtrata attraverso diversi strati di miracloth e di nylon, successivamente centrifugata. La sospensione di cloroplasti risultante era stratificata su un tampone contenente Percoll . Il pellet ottenuto dopo il gradiente con percoll rappresentava la frazione di cloroplasti intatti.

L'integrità di questi ultimi è stata determinata effettuando un controllo con un microscopio ottico e a contrasto di fase (Fig. 19 a e b)



a



b

Figura 19 a e b: immagini rispettivamente al microscopio a contrasto di fase e al microscopio ottico dei cloroplasti isolati da foglie di pisello (*Pisum sativum*).

*Analisi Western AGPase da cloroplasti di pisello (Pisum sativum)*

I cloroplasti isolati dalle foglie di pisello sono stati incubati con differenti concentrazioni di trealosio-6-fosfato per 15'. L'intera procedura è stata effettuata al buio e a 4°C.

Nelle fig.20 A, B, C, D sono mostrate le analisi western (ECL) rivelate mediante l'utilizzo di anticorpi specifici diretti contro l'AGPase.

Il trattamento con TPP (Trealosio fosfato fosfatasi) è stato effettuato per controllare gli effetti sullo stato redox dell'AGPase. Il controllo con cloroplasti incubati in presenza di TPP attivo (che quindi trasforma il Tre6P in Trealosio), e con TPP inattivato (mediante bollitura dell'enzima per 5') era teso a verificare se gli effetti fossero attribuibili unicamente al Tre6P o ai contaminanti ritrovati nel T6P disponibile commercialmente.

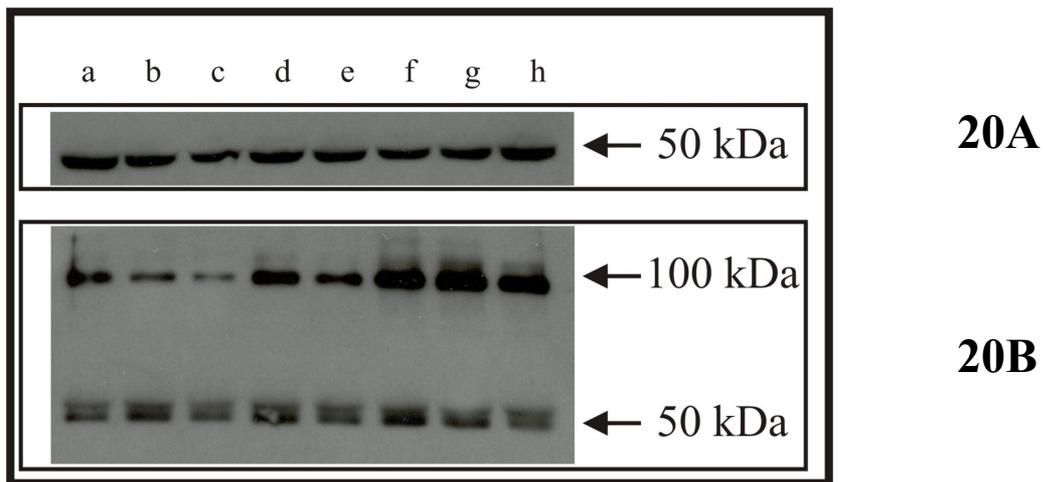


Fig.20A e 20B: cloroplasti isolate senza ascorbato. 20A) Campioni con DTT. 20B) Campioni senza DTT.

I campioni sono stati caricati su un gel di poliacrilammide non riducente con il seguente schema: a) cloroplasti, b) cloroplasti con tampone, c) cloroplasti preincubati con 10 $\mu$ M Tre6P senza TPP, d) cloroplasti preincubati con 1 mM Tre6P senza TPP, e) cloroplasti preincubati con 10 $\mu$ M Tre6P con TPP, f) cloroplasti preincubati con 1 mM Tre6P con TPP ed infine g) cloroplasti preincubati con 10 $\mu$ M Tre6P con TPP bollito (inattivato), h) cloroplasti preincubati con 1 mM Tre6P con TPP bollito per bloccare l'attività enzimatica.

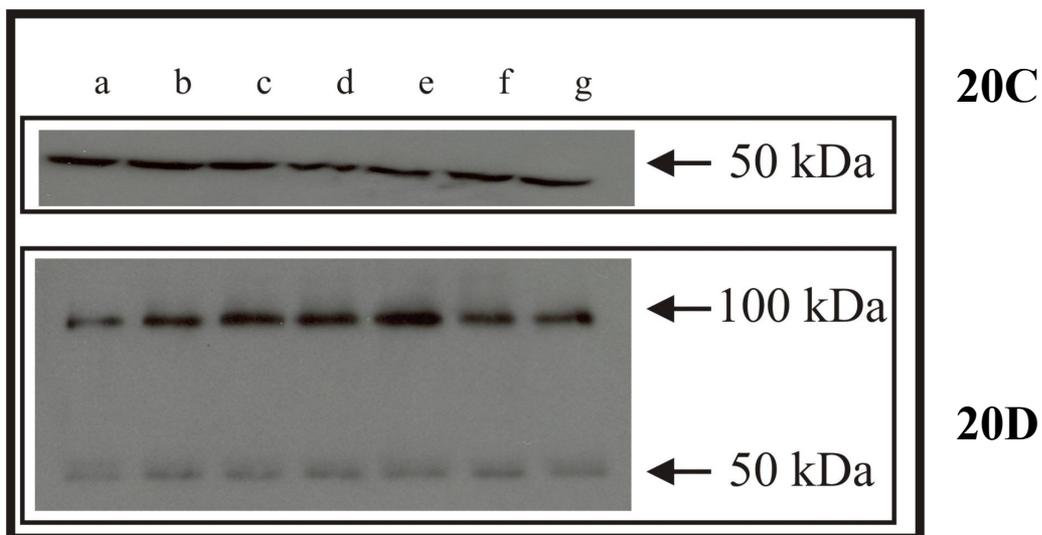


Fig.20C e 20D: Cloroplasti isolate senza ascorbato; 20C) Campioni con DTT.  
20D) Campioni senza DTT.

Nelle fig. C e D, I campioni sono stati caricati secondo il seguente schema a) cloroplasti, b)cloroplasti con tampone, c)cloroplasti preincubati con 5 $\mu$ M , d) 10  $\mu$ M , e)20  $\mu$ M, f) 50  $\mu$ M ed infine g) 1mM di T6P.

Nei cloroplasti mantenuti in condizioni di controllo (nessun metabolita aggiunto) si evidenziava la presenza di bande che reagivano contro gli anticorpi per l'AGPase. Queste bande presentavano rispettivamente un peso molecolare di 100 e 50 kDa.

All'aggiunta di concentrazione crescenti (e fisiologiche) da 5 a 50 $\mu$ M di trealosio-6-fosfato (Tre6P) si osservava una maggiore intensità della banda corrispondente al peso molecolare di 100 kDa e che quindi rappresentava il dimerico.

Infine i cloroplasti incubati sia con Tre6P e l'enzima Trealosio fosfato fosfatasi (TPP), che con Tre6P e TPP bollito (enzima inattivato), mostravano due bande corrispondenti alle due forme dell'enzima sia dimerica che monomerica con pesi molecolari quindi di 100 e 50 kDa senza evidenziare particolari differenze tra i due trattamenti.

## DISCUSSIONE

L'azoto è l'elemento assorbito dalle radici più richiesto tra tutti i macronutrienti presenti nella pianta.

Nei vegetali l'azoto è presente negli amminoacidi (quindi nelle proteine e negli enzimi), nei nucleotidi (quindi negli acidi nucleici DNA e RNA) e in una varietà di altri composti quali ad esempio le clorofille.

Inoltre contengono azoto anche alcune importanti classi di ormoni vegetali, quali le auxine e le citochinine.

A differenza degli animali, le piante sono in grado di assorbire ed assimilare fonti azotate sia inorganiche (come il nitrato,  $\text{NO}_3^-$  e l'ammonio,  $\text{NH}_4^+$ ) e sia organiche (come l'urea), ma la maggior parte degli organismi vegetali utilizza come fonte primaria d'azoto il nitrato, che rappresenta la principale forma di azoto presente nel terreno, assorbito dall'apparato radicale. Una volta assorbito, il nitrato subisce una serie di riduzioni successive che conducono alla formazione di ammonio.

L'ammonio viene organicato mediante l'azione di enzimi capaci di fissarlo in scheletri carboniosi forniti da vie metaboliche di base come la glicolisi e la fotosintesi.

Il processo di assimilazione dell'azoto nelle radici delle piante dipende dal rifornimento di scheletri carboniosi ed ATP, garantiti dalla respirazione e dal potere riducente che nei plastidi non fotosintetici deriva dalla respirazione e dall'OPPP.

Il ciclo ossidativo dei pentosi fosfati costituisce la via metabolica alternativa alla

glicolisi ed al ciclo di Krebs nell'ossidazione dei carboidrati.

La cellula vegetale risponde alla forte richiesta di NADPH attraverso questa via metabolica, che genera continuamente potere riducente dalle reazioni della G6PDH e dalla 6-fosfogluconato deidrogenasi.

Gli enzimi coinvolti nella generazione di potere riducente sono la G6PDH e la 6PGDH che mantenendo alto il rapporto  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  può quindi essere utilizzato dagli enzimi NADPH-dipendenti, oppure trasferito alla Fd tramite una NADPH-Fd ossidoreduttasi (FNR o diaforasi, Oji et al. 1985).

Negli organismi vegetali la via OPPP può essere presente sia nel citosol che nei plastidi. L'esistenza di due distinte isoforme della G6PDH (e anche della 6-fosfogluconato deidrogenasi, 6PGDH) nelle piante è stata ampiamente dimostrata sia nei tessuti verdi (Schnarrenberger et al. 1973) che in quelli eterotrofi (Nishimura e Beevers, 1981) e la loro diversa localizzazione nel citosol e nel plastidio è stata discussa a fondo (Emes e Bowsher 1991; Kruger e von Schaewen, 2003).

L'esistenza di differenti isoforme della G6PDH nei tessuti vegetali è stata messa in relazione al rifornimento di NADPH per la nitrito riduttasi (Oji et al., 1985; Bowsher et al., 2007) e al meccanismo che trasferisce gli elettroni dal NADPH alla ferredossina, e da questa alla nitrito riduttasi (Oij et al., 1985).

L'attività della G6PDH nel citoplasma rappresenta circa l'80-95% del totale dell'attività misurata (Debnam ed Emes, 1999; Esposito et al. 2001a). L'isoforma citosolica sembra coinvolta nel mantenimento del metabolismo basale della cellula, come ad esempio, la produzione del potere riducente necessario alla

sintesi dei polisaccaridi della parete durante l'accrescimento.

Nel citosol, però, la via non è sempre completa, infatti ad eccezione della G6PDH e della 6PGDH, possono non essere presenti alcuni enzimi della fase rigenerativa (Debnam ed Emes, 1999). Tale via sembra pertanto più importante per il metabolismo plastidiale che per quello citosolico: la via dello scichimato e la biosintesi degli acidi grassi hanno luogo nei plastidi e l'OPPP può fornire gli equivalenti di riduzione richiesti.

Nell'alga verde criofila *Koliella antarctica* non appare evidente l'esistenza di G6PDH localizzate in diversi compartimenti cellulari; il protocollo di purificazione utilizzato consentiva la separazione di una singola G6PDH in *Koliella*.

Sebbene sia nota una sequenza putativa citosolica nell'alga verde *Chlorella*, le sequenze di cDNA note fanno supporre che la G6PDH delle alghe verdi sia presente all'interno dei cloroplasti (Wendt et al., 1999).

Inoltre, bisogna osservare che recentemente è stata dimostrata l'esistenza di un'unica OPPP citosolica nelle diatomee (Michels et al. 2005), quindi, nelle alghe la presenza e la distribuzione dell'OPPP non seguono uno schema semplice e lo scenario evolutivo dovrebbe essere analizzato alla luce di dati biochimici e molecolari ancora mancanti.

*Koliella antarctica*, isolata nel mar di Ross in Antartide, nella baia di Terra Nova, come tutti gli organismi psicrofili è in grado di tollerare le basse temperature.

La possibilità, da parte di queste alghe, di vivere a temperature basse deriva da particolari adattamenti fisiologici e biochimici, che assicurano il normale

svolgimento dei loro processi metabolici permettendo una crescita cellulare adeguata.

Tra gli adattamenti si possono includere le variazioni della composizione dei lipidi di membrana, tali da aumentarne la fluidità e quindi la funzionalità alle basse temperature (cosa che favorisce la permeabilità selettiva delle membrane e la mobilità delle proteine al loro interno), nonché una modificazione della composizione amminoacidica delle proteine tale da conferire agli enzimi una più alta efficienza alle basse temperature.

Le cellule di *K. antarctica* sono di forma cilindrica (circa 5  $\mu\text{m}$  di lunghezza) si trovano singole o assemblate in corte catene facilmente dissociabili. Esse si riproducono vegetativamente tramite frammentazione con produzione di pseudofilamenti composti da due o quattro cellule.

*K. antarctica* è caratterizzata da una parete non mucillaginosa e da un cloroplasto mancante di pirenoide; (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) è stata isolata nell'estate australe 1989/90, alla profondità di 3 m sotto il pack-ice, presso la Baia di Terra Nova (Antartide).

L'esame ultrastrutturale, l'analisi microspettrofluorimetrica dell'assetto del PSII, l'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici hanno mostrato che l'alga nel periodo di buio attua un rimodellamento del suo plastidio.

L'appartenenza di *Koliella* al Phylum *Chlorophyta* è inequivocabilmente provata dalla presenza di clorofilla *a e b*, di amido nei plastidi, di una parete rigida composta da cellulosa, emicellulose e sostanze pectiche (in alcuni generi di alghe verdi). Tali caratteri sono condivisi con le piante superiori.

Recenti studi sull'alga psicrofila *Koliella antarctica*, sono stati fatti soprattutto per individuare le sue esigenze di crescita, per stabilire le caratteristiche di fotosintesi e respirazione che tale alga presenta.

Per valutare la velocità di crescita, fotosintesi e respirazione in funzione dell'intensità luminosa e della temperatura, e per stabilire il significato fisiologico sono stati condotti studi paralleli anche su *C. sorokiniana* che non è capace di svilupparsi a temperature inferiori a 20 °C, e presenta a tale temperatura una velocità di crescita ( $\mu$ ) pari a 1,04 d<sup>-1</sup> (Vona et al., 2004).

Da questi dati si evince che in *K. antarctica* la fotosintesi presenta una temperatura massima superiore a quella della crescita, mentre in *C. sorokiniana* la crescita e la fotosintesi hanno lo stesso optimum di Temperatura.

La velocità di crescita ( $\mu$ ) dell'alga psicrofila *K. antarctica* e dell'alga mesofita *C. sorokiniana* a diverse temperature è stata misurata come variazione di densità ottica a 530 nm (Vona et al., 2004).

La temperatura delle acque antartiche è estremamente bassa ( $\leq 1^\circ\text{C}$ ) e la sopravvivenza di questa specie è assicurata da peculiari adattamenti.

Grazie ai suoi molteplici effetti, si può affermare che la temperatura rappresenta il fattore più importante nel determinare la distribuzione degli organismi viventi sulla superficie terrestre e negli ambienti acquatici (Field and Somer, 1998).

Le specie criofile esibiscono una temperatura di crescita molto bassa: *K. antarctica* è inibita a temperature superiori ai 15°C.

La G6PDH di *Koliella* sembra essere compartimentata: i Western blots indicavano che gli anticorpi specifici per la G6PDH citosolica e cloroplastica non reagivano

con gli estratti grezzi e con l'isoforma purificata; gli anticorpi anti-P2 erano invece riconosciuti sia dagli estratti grezzi che dalla proteina purificata.

L'isoforma mostrava un peso molecolare di 71 kDa, più alto rispetto alle isoforme note nelle piante superiori (Esposito et al. 2001a; Wakao e Benning, 2005) e simile al valore recentemente indicato per la G6PDH purificata dall'alga verde *Chlorella sorokiniana* (Esposito et al., 2006). La glucosio-6P deidrogenasi parzialmente purificata da *Koliella* presenta caratteristiche cinetiche simili a quelle ritrovate nei plastidi dei tessuti delle piante superiori, (Anderson et al., 1974; Scheibe et al., 1989; Esposito et al., 2001a). L'affinità della G6PDH da *Koliella antarctica* è simile a quella ritrovata in molte altre piante superiori (Kruger e von Schaewen, 2003), ma in generale il valore di  $K_{mG6P}$  ritrovato nell'alga unicellulare è più basso rispetto ad altre isoforme compartimentate note (Esposito et al., 2005). La principale differenza rispetto alla G6PDH purificata da altre alghe verdi e piante superiori, è l'alta  $K_m$  per il  $NADP^+$ , indice di una bassa affinità dell'enzima per il suo substrato, circa 4 volte superiore a quella misurata nelle altre G6PDH (Kruger e von Schaewen, 2003).

Inoltre la  $K_i$  per il NADPH è di circa 20  $\mu M$ , un valore che colloca la G6PDH di *Koliella* ad un valore intermedio della scala di sensibilità verso il principale inibitore dell'enzima. Nelle piante superiori la  $K_i$  per l'enzima P1 è molto bassa, circa 5-7  $\mu M$ , mentre quella dell'enzima P2 è più elevata, 30-80  $\mu M$ , indicando una maggiore flessibilità metabolica dell'enzima nell'alga verde criofila.

Il rapporto  $NADPH/NADP^+$  varia tra 2 e 6 in *Selenastrum minutum* (Vanlerberghe et al. 1992) e 3 in *Chlamydomonas reinhardtii* (Forti et al. 2003), alla luce: in

simili condizioni la G6PDH cloroplastica sarebbe fortemente inibita (Lendzian, 1980, Scheibe et al. 1989), ma l'enzima da *Koliella* potrebbe conservare gran parte della sua efficienza catalitica.

Un aspetto singolare della G6PDH algale è la bassa sensibilità verso la luce e gli agenti riducenti, che è invece tipica delle isoforme citosoliche da piante superiori (Fickenscher e Scheibe, 1986, Esposito et al. 2001a), ma non di quelle plastidiali (Fickenscher e Scheibe, 1986, Esposito et al. 2001 a e b ).

Il rapporto NADPH/NADP<sup>+</sup> varia tra 2 e 6 in *Selenastrum minutum* (Vanlerberghe et al. 1992) e 3 in *Chlamydomonas reinhardtii* (Forti et al. 2003), alla luce: in simili condizioni la G6PDH cloroplastica sarebbe fortemente inibita (Lendzian, 1980, Scheibe et al. 1989), ma l'enzima da *Koliella* potrebbe conservare gran parte della sua efficienza catalitica.

Recentemente una analisi del genoma di *Arabidopsis* (Wakao e Benning, 2005) ha mostrato l'esistenza d'una G6PDH appartenente al gruppo della P1-G6PDH, che curiosamente mostra una  $K_{i\text{NADPH}}$  di 30-70  $\mu\text{M}$ , un valore simile a quello noto per l'enzima P2-G6PDH.

Tali dati suggeriscono una diversa struttura biochimica tale da conferire proprietà regolative differenti tra le isoforme della G6PDH di *Koliella antarctica* e quelle purificate da alghe unicellulari e dai cloroplasti delle piante superiori (Wenderoth et al., 1997, Esposito et al., 2006).

In *Chlorella sorokiniana* l'attività G6PDH, quando espressa sulla base del PCV, rimaneva invariata 24h dopo l'aggiunta d'azoto a cellule cresciute in assenza di azoto; tale comportamento era confermato dai gel nativi colorati per l'attività

G6PDH (Esposito et al. 2006). In contrasto con il dato calcolato in funzione dei  $\text{mg prot}^{-1}$  di estratto, che viene convenzionalmente utilizzato per la misura delle attività enzimatiche.

Nel caso delle alghe unicellulari, sembra quindi più appropriato esprimere l'attività enzimatica in funzione del PCV, poiché in seguito a deprivazione d'azoto si verifica una massiccia degradazione dell'apparato fotosintetico e della Rubisco, che costituiscono una considerevole percentuale delle proteine totali nelle alghe.

La deprivazione d'azoto può provocare una crescita rallentata o un tempo di generazione più lungo (Vona et al. 1999), ma non causa apprezzabili variazioni nel diametro e volume cellulare (dati non mostrati), infatti, il PCV rappresenta quindi una unità di misura più accurata e corretta per quantificare l'attività dell'enzima nelle alghe cresciute in diversi regimi di nutrizione azotata. A confortare questa assunzione, si può osservare che cambiamenti nella fonte azotata causano variazioni nel contenuto delle proteine. Sulla base del PCV, il contenuto di proteine è 3 volte più elevato in alghe cresciute su nitrato rispetto ad alghe private di azoto.

Come per *Koliella*, il protocollo di purificazione utilizzato consentiva la separazione di una singola G6PDH in *Chlorella*, a differenza delle radici di orzo (Esposito et al. 2001a; Esposito et al. 2001b) dove due isoforme sono presenti. La presenza di una unica isoforma è confermata dai gel nativi colorati per l'attività G6PDH (Esposito et al. 2006), infatti, era possibile osservare la presenza d'una singola banda sia negli estratti grezzi che nell'isoforma purificata all'omogeneità.

Comunque la possibile esistenza di una G6PDH citosolica non può essere esclusa; in banca dati è disponibile una sequenza ottenuta da *Chlorella vulgaris* per una G6PDH che condivide alta omologia con le isoforme citosoliche delle piante superiori (n° d'accesso AB085846).

I Western blots indicavano che la G6PDH di *Chlorella* riconosceva unicamente gli anticorpi anti-P2 sia dagli estratti grezzi che dalla proteina purificata, ma non con gli anticorpi contro l'isoforma cloroplastica P1 delle piante superiori. L'isoforma mostrava un peso molecolare di 76 kDa, un peso simile a quello della G6PDH di *Koliella*. I parametri cinetici della G6PDH purificata da *Chlorella* suggeriscono una localizzazione cloroplastica dell'enzima.

La sensibilità della G6PDH verso il potere riducente sembra dipendere dallo stato azotato delle alghe, poiché alghe cresciute su nitrato erano più suscettibili al NADPH rispetto ad alghe deprivate di azoto (Esposito et al. 2006).

La G6PDH da alghe -N mostrava alta tolleranza verso l'inibitore NADPH, suggerendo la produzione di potere riducente per assicurare una rapida ed efficiente assimilazione dell'azoto durante la deprivazione: la  $K_{iNADPH}$  è 90-100  $\mu$ M, un valore simile a quello riscontrato per la P2-G6PDH nelle radici di orzo (Esposito et al. 2003).

Invece la G6PDH da alghe cresciute su azoto esibiva una  $K_{iNADPH}$  più bassa (48  $\mu$ M), suggerendo l'ipotesi di eventuali modifiche post-traduzionali dell'enzima: recentemente è stata avanzata l'ipotesi secondo cui le isoforme cloroplastiche (e probabilmente plastidiali) subiscano una fosforilazione in patata (Hauschild e von Schaewen, 2003).

La G6PDH purificata da *Chlorella* ha 9 cisteine per sub unità (Esposito S , dati non pubblicati) rispetto alle 6 note nelle piante superiori (Wenderoth et al. 1997): questo alto numero di cisteine potrebbe essere coinvolto nella particolare regolazione redox di questa isoforma, e ulteriori studi sono necessari per chiarire questo aspetto.

Nelle radici di orzo cresciute in assenza di azoto è presente una sola isoforma della G6PDH, che eluiva in un singolo picco da una colonna cromatografica a scambio anionico; questa proteina reagiva specificamente contro gli anticorpi monoclonali della isoforma citosolica di patata (Wendt et al., 2000); i parametri cinetici erano simili a quelli misurati per la Cyt-G6PDH in altre piante (Fickensher e Scheibe 1986; Graeve et al., 1994) e in una varietà di orzo lievemente differente (Esposito et al., 2001 a).

Nelle piante nutrite con azoto, sia ammonio che nitrato, era possibile purificare una seconda isoforma della G6PDH, che eluiva in un picco distinto dalla colonna Q-sepharose precedendo il picco della Cyt-G6PDH. Questa isoforma reagiva specificamente contro gli anticorpi per l'isoforma plastidiale di patata (P2-G6PDH, Wendt et al., 2000) ma non contro l'isoforma cloroplastica (P1-G6PDH). L'isoforma plastidiale era caratterizzata da una minore affinità per il G6P ( $K_{mG6P} \sim 0.6-0.9$  mM) e soprattutto da una forte tolleranza agli alti livelli di NADPH, il maggiore regolatore dell'attività della G6PDH, con una  $K_i$  NADPH di 30-80  $\mu$ M.

L'isoforma citosolica di piante nutrite con azoto presentava parametri cinetici identici all'unica G6PDH parzialmente purificata nelle radici cresciute

senza azoto ( $K_{m_{G6P}} \sim 0.3 \text{ mM}$ ;  $K_{i_{NADPH}} \sim 15\text{-}30 \text{ }\mu\text{M}$ ), per cui l'isoforma citosolica non varia apprezzabilmente i suoi parametri cinetici in nessuna condizione di nutrizione azotata, e in presenza/assenza di stress salino.

L'isoforma plastidiale (P2-G6PDH) rappresenta il 15~20% dell'attività totale (Hong e Copeland, 1991; Bredemeijer e Esselink, 1995; Debnam e Emes, 1999; Esposito et al., 2001a), mentre la maggior parte dell'attività della G6PDH è attribuibile alla isoforma citosolica.

La comparsa della G6PDH plastidiale (isoforma P2) dopo l'aggiunta di azoto conferma il coinvolgimento di questa isoforma nella produzione di potere riducente per la nitrato riduttasi e per la GOGAT e un ruolo costitutivo per la G6PDH citosolica, la cui attività aumenta in relazione all'incremento della richiesta di nucleotidi durante la crescita radicale (Esposito et al., 2001).

L'isoforma plastidiale in presenza di sale presenta valori doppi di  $K_{i_{NADPH}}$ , e l'enzima è più resistente all'inibitore con ammonio piuttosto che con nitrato, dove i valori di  $K_{i_{NADPH}}$  sono comparabili a quelli dell'isoforma citosolica.

La  $K_{m_{G6P}}$  nell'isoforma plastidiale, è 2-3 volte superiore all'isoforma citosolica, ciò è compatibile con i livelli medi di G6P nei plastidi che sono presumibilmente più alti per il breakdown dell'amido.

Da notare che, il rapporto  $K_{i_{NADPH}}/K_{m_{NADP^+}}$  nell'isoforma citosolica, in assenza di azoto è circa 1 mentre in presenza di azoto è compreso tra 4 e 5, indicando una possibile maggiore inibizione dell'enzima in assenza di azoto poiché, in condizioni in cui il rapporto NADP/NADPH è 1, l'isoforma citosolica risulterebbe fortemente inibita dal rapporto NADPH/NADP<sup>+</sup> in radici cresciute in

assenza di azoto, mentre sarebbe necessario, per raggiungere lo stesso effetto, un rapporto tra 4 e 5, nelle radici cresciute in presenza di azoto, condizioni di fatto irrealizzabili in cellule della radice.

Per quanto concerne il secondo enzima compartimentato preso in esame, l'ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPase) è l'enzima che catalizza il primo step della sintesi dell'amido nei plastidi. La reazione consiste nel convertire glucosio-1-fosfato e ATP in ADP-glucosio e  $PP_i$  per formare l'adenin-difosfo glucosio (ADP-glucosio) il precursore della molecola dell'amilosio.

Successivamente l'ADP-glucosio così formatosi viene utilizzato come nuova unità per allungare la catena di amido glucosio da sintetizzare. L'AGPase è un eterotetramero, costituito da due sub unità regolatrici "grandi" (AGPS, 51 kDa) e da due sub unità catalitiche "piccole" (AGPB, 50 kDa).

L'enzima delle piante superiori è regolato dalla formazione di un ponte cisteinico tra le due subunità catalitiche (AGPB) in risposta ai cambiamenti di luce e dei livelli degli zuccheri .

La forma ridotta (monomerica) mostra una più alta affinità per il substrato ed è più sensibile all' attivatore allosterico 3PGA (acido 3 fosfoglicerico) rispetto alla forma ossidata (dimerica). Questa regolazione redox, si pensa possa essere mediata dalle tioredossine *f e m*.

L'importanza dell'ADP-glucosio pirofosforilasi nella biosintesi dell'amido è stata dimostrata attraverso l'espressione in tuberi di patata di una AGPase batterica non regolata. La presenza di questo enzima aumenta l'ammontare di amido fino al 60%, suggerendo che nelle piante wild-type questo enzima catalizzi la principale

fase di regolazione della via e che l'enzima batterico sia capace di evitare questa regolazione (Buchanan et al., 2003).

Nelle foglie, l'AGPase ha una regolazione redox dipendente da luce. Questo ricorda l'attivazione alla luce degli enzimi del ciclo di Calvin e i relativi processi fotosintetici. Gli elettroni sono trasferiti dal fotosistema I alla ferrodossina e tramite una ferrodossina-tioredoxina riduttasi alle tioredossine *f* e *m*, che attivano gli enzimi bersaglio per la riduzione dei disolfuri regolatori.

L'attivazione redox dell'AGPase risponde anche ai cambiamenti degli zuccheri attraverso il meccanismo dello "sugar-sensing" (Kolbe et al. 2005).

L'attivazione dell'enzima in foglie (Hendriks J., 2003) e in tuberi di patata (Tiessen A., 2002) veniva strettamente correlata con il contenuto di saccarosio.

Recenti studi in tuberi di patata inoltre, rivelano che il saccarosio e il glucosio conducono all'attivazione redox dell'AGPase attraverso due differenti vie, coinvolgendo la proteina chinasi SnRK1 e un esochinasi (Tiessen A., 2003).

L' SnRK1 e l'esochinasi, sono entrambe implicate in una rete di controllo dell'espressione e fosforilazione degli enzimi citosolici in risposta agli zuccheri (Smeekens S., 2000), ma di come esse siano legate all'attivazione dell'AGPase, e quindi alla sintesi dell'amido nei plastidi, è ancora sconosciuto.

Recentemente, il metabolismo del trealosio è stato suggerito che possa essere implicato nella regolazione dell'utilizzo degli zuccheri in lievito e nelle piante.

Il trealosio è sintetizzato attraverso un precursore fosforilato, il trealosio-6-fosfato grazie all'intervento di due enzimi la trealosio fosfato sintasi (TPS) e la trealosio fosfato fosfatasi (TPP). Mutanti per il gene di TPS in *Arabidopsis*, mostrano un

arresto nelle fasi precoci dello sviluppo, precisamente nella fase di espansione cellulare (Eastmond P.J.,2002).

Studi effettuati su linee transgeniche che overesprimevano TPS o TPP, identificavano il trealosio-6-fosfato essenziale per l'utilizzo degli zuccheri e la crescita di piante di *Arabidopsis* (Schluepmann H.,2003).

Somministrando esternamente trealosio o saccarosio a piante wild-type di *Arabidopsis*, si registrava un aumento nei livelli del T6P in un tempo che andava dai 30 minuti alle due ore.

Questo indica che vi è un legame tra gli zuccheri e il T6P (Schluepmann H., 2004).

Recentemente è stato suggerito che il T6P, sintetizzato nel citosol, potrebbe agire ~~agisce~~ sul metabolismo plastidiale promuovendo un trasferimento redox mediato da tioredossina all'enzima ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPase), in risposta del livello degli zuccheri del citosol, ossia una regolazione per la sintesi dell'amido indipendente dalla luce (Kolbe et al. 2005).

Durante questi esperimenti, cloroplasti isolati sono stati incubati con saccarosio, saccarosio-6-fosfato , trealosio e trealosio-6-fosfato: solo addizionando il trealosio-6-fosfato si rivelava tramite analisi western con anticorpi diretti contro l'AGPase, un'unica banda corrispondente ad un peso molecolare di 50 kDa (forma ridotta). Bisogna però sottolineare che durante questi esperimenti sono state utilizzate delle concentrazioni 10 volte superiori a quelle fisiologiche (Kolbe et al.2005). Da qui la necessità di verificare tali osservazioni, utilizzando livelli di trealosio 6P più aderenti alle condizioni *in vivo* (da 5 a 20 $\mu$ M ).

In primo luogo, sono stati ritrovati dei contaminanti nel Tre6P disponibile commercialmente, quali detergenti e acidi grassi, rivelando una purezza del composto pari solo al 60-70%.

E' quindi possibile che gli effetti attribuiti al trealosio 6P siano dovuti in parte o in toto ai contaminanti presenti nelle preparazioni del composto.

Lo stato di attivazione redox in cloroplasti isolati è analizzato mediante elettroforesi con gel SDS non riducenti ed immunoblotting.

Questo tipo di analisi permette di analizzare l'attivazione redox dell'enzima, in quanto è osservato un cambiamento nella mobilità elettroforetica di APGB in SDS-gel non riducenti; APS1 migra come una proteina dimerica nella forma ossidata (100 kDa) e come monomero nella forma ridotta (50 kDa).

I risultati ottenuti non confermano l'effetto del Tre6P 1mM riportato da Kolbe et al (2005), inoltre non c'è una chiara differenza tra i campioni trattati solo con il Tre6P e campioni con Tre6P e TPP, indicando che non c'è un effetto diretto del Tre6P in condizioni fisiologiche sull' AGPase.

I dati suggeriscono che il Tre6P non ha un effetto diretto come metabolita segnale in questo tipo di regolazione, ma non è da escludere che ci sia un fattore che interagisca con il Tre6P e che insieme collaborino nel regolare l'enzima.

In conclusione, i risultati ottenuti, pur non invalidando del tutto l'ipotesi che il Tre6P possa mediare un'attivazione redox mediata dagli zuccheri dell'AGPase, necessitano di ulteriori ricerche ed per comprendere il meccanismo di regolazione dell'enzima AGPase che modula la sintesi dell'amido attraverso il meccanismo

dello sugar sensing.



## BIBLIOGRAFIA

ANDERSON L.E., LIM T.C., YOON PARK K.E.: Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose 6 phosphate dehydrogenase by light and dithiothreitol. *Plant Physiol.* 53, 835-839 (1974).

BOWSER C.G., HUCKLESBY D.P., EMES M.J. : Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum*. *Planta* 177, 359-366 (1989).

BRADFORD M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).

BREDEMEIJER G.M.M., ESSELINK G.: Glucose 6-phosphate dehydrogenase during cold-hardening in *Lolium perenne*. *J. Plant Physiol.* 145, 565-569 (1995).

BUCHANAN B., WILHELM GRUISSEM, RUSSEL L. JONES: *Biochimica e biologia delle piante*. Zanichelli 2003

DEBNAM P.M., EMES M.J.: Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *J. Exp. Bot.* 50, 1653-1661 (1999).

DEBNAM P.M., FERNIE A.R., LEISSE A., GOLDING A., BOWSER C.G., GRIMSHAW C., KNIGHT J.S., EMES M.J.: Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative

stress in leaves. *Plant Journal* 38, 49-59 (2004).

EASTMOND P.J., A.J. VAN DIJKEN, SPIELMAN M., KERR A., TIESSER A.F., DICKINSON H.G., JONES J.D., SMEEKENS S.C., GRAHAM I.A.: trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J* 29, 225-235 (2002).

EMES M.J., ENGLAND S.: Purification of plastids from higher-plant roots. *Planta* 168, 161-166 (1986).

EMES M.J., BOWSHER C.G. : Integration and compartmentation of carbon and nitrogen metabolism in roots. *Semin. Ser. Soc. Exp. Botany* 42, 147-165 (1991).

ESPOSITO S., CARILLO P., CARFAGNA S.: Ammonium metabolism stimulation of glucose-6P dehydrogenase in young barley roots. *J. Plant Physiol.* 153, 61-66 (1998).

ESPOSITO S., CARILLO P., CARFAGNA S., DI MARTINO RIGANO V., VONA V., RIGANO C.: Glucose-6P dehydrogenase activities in barley roots upon  $\text{NH}_4^+$  supply in "Nitrogen in a sustainable ecosystem". *From the Cell to the Plant*. 129-132 Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands (2000) .

ESPOSITO S., CARFAGNA S., MASSARO G., VONA V., DI MARTINO RIGANO V.: Glucose-6P dehydrogenase in barley roots: kinetic properties and localisation of the isoforms. *Planta* 212, 627-634 (2001a).

ESPOSITO S., MASSARO G., VONA V., DI MARTINO RIGANO V. CARFAGNA S., RIGANO C.: Ammonium induction of a novel isoform of glucose-6Pdehydrogenase in barley roots. *Physiologia Plantarum* 113, 469-476 (2001b).

ESPOSITO S., GUERRIERO G., VONA V., DI MARTINO RIGANO V., CARFAGNA  
ESPOSITO S., GUERRIERO G., VONA V., DI MARTINO RIGANO V., CARFAGNA  
S., RIGANO C.: Glucose-6P dehydrogenase in *Chlorella sorokiniana* (211/8k): an  
enzyme with unusual characteristics. *Planta* DOI 10.1007/s00425-005-0110-2  
(2005b).

FICKENSCHER K., SCHEIBE R.: Purification and properties of the  
cytoplasmatic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Archiv.  
Biochem. Biophys.* 247, 393-402 (1986).

FORTI G., FURIA A., BOMBELLI P., FINAZZI G.: In vivo changes of the  
oxidation-reduction state of NADP<sup>+</sup> and of the ATP/ADP cellular ratio linked to  
the photosynthetic activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*  
132,1464–1474 (2003).

GRAEVE K., VON SCHAEWEN A., SCHEIBE R.: Purification, characterization,  
and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum  
tuberosum* L.). *Plant J.* 5, 353-361 (1994).

HAUSCHILD R., VON SCHAEWEN A.: Differential regulation of glucose-6-  
phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol.* 133, 47-  
62 (2003).

HENDRIKS J., KOLBE A., GIBON Y., STITT M., GEIGENBERGER P.: ADP-  
glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox modification in  
response to light and to sugar in leaves of *Arabidopsis* and other Plant Species.  
*Plant Physiol.* 133,838-849 (2003).

HIROSE N., HAYAKAWA T., YAMAYA T.: Inducible accumulation of mRNA for

NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to ammonium ions. *Plant and Cell Physiology* 38, 1295-1297 (1997).

HONG Z.Q., COPELAND L.: Isoenzymes of glucose 6-phosphate dehydrogenase from the plant fraction of soybean nodules. *Plant Physiol.* 96, 862-867 (1991).

HUPPE H.C., TURPIN D.H.: Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 577-607 (1994).

HUPPE H.C., TURPIN D.H.: Appearance of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms in *Chlamydomonas reinhardtii* during growth on nitrate. *Plant Physiol.* 110, 1431-1433 (1996).

JIN T., HUPPE H.C., TURPIN D.H.: In vitro reconstitution of electron transport from glucose-6-phosphate and NADPH to nitrite. *Plant Physiol.* 117, 303-309 (1998).

KNIGHT J.S., EMES M.J., DEBNAM P.M.: Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 212, 499-507 (2001).

KOLBE A., TIESSEN A., SCHLUEPMANN, MATTHEW P., SILKE U., GEIGENBERGER P.: Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *PNAS* 102, 11118-11123 (2005).

KROOK J., VREUGDENHIL, DIJKEMA C., VAN DER PLAS L.H.W.: Sucrose and starch metabolism in carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions analysed by <sup>13</sup>C-

labelling: indications for a cytosol and a plastid-localized oxidative pentose phosphate pathway. *J. Exp. Bot.* *49*, 1917-1924 (1998).

KRUGER N.J., VON SCHAEWEN A.: The pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6*, 236-246 (2003).

LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685 (1970).

LEA P.J., MIFLIN B.J.: Ammonia assimilation In: MIFLIN B.J. (ed.): *The Biochemistry of Plants*, Vol.5, 169-202. Academic Press, New York (1980).

LENDZIAN K., BASSHAM J.A.: Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios. *Bioch. Biophys. Acta* *396*, 260-275 (1975).

LENDZIAN K.J.: Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP<sup>+</sup> and dithiothreitol at variable NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios in an illuminated reconstituted spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system. *Planta* *148*, 1-6 (1980).

LUNN J.E., DROUX M., MARTIN J., DOUCE R. : Localization of ATP Sulfurylase and O-Acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol* *94*, 1345-1352 (1990).

LUNN J.E., REGINA FEIL, HENDRIKS J.H., GIBON Y., MORCUENDE R., OSUNA D., WOLF-RUDIGER SCHEIBLE, CARILLO P., HAJIREZAI M.R., STITT M. : a Sugar-induced increases in Trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem.J* *397*, 139-148 (2006).

MATTANA M., CORAGGIO I., BRAMBILLA I., BERTANI A., REGGIANI R.: Nitrate assimilation during the anaerobic germination of rice: expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* 199, 74-78 (1996).

MICHELS A.K., WEDEL N., KROTH P.G.: Diatom plastids possess a phosphoribulokinase with an altered regulation and no oxidative pentose phosphate pathway. *Plant Physiol.* 137, 911-920 (2005).

MUTO S., URITANI I. : Inhibition of sweet potato glucose 6-phosphate dehydrogenase by NADPH and ATP. *Plant Cell Physiol.* 13, 377-380 (1972).

NEMOTO Y., KAWAKAMI N., SASAKUMA T.: Isolation of novel early salt-responding genes from wheat (*Triticum aestivum* L.) by differential display. *Theor. Appl. Genet.* 98, 673-678 (1999).

NEMOTO Y., SASAKUMA T.: Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 158, 53-60 (2000).

NISHIMURA M., BEEVERS H.: Isoenzymes of sugar phosphate metabolism in endosperm of germinating castor beans. *Plant Physiol.* 67, 1255-1258 (1981).

OJI Y., WATANABE M., OKAMOTO S.: Nitrite reduction in barley-root plastids: dependence on NADPH coupled with glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases, and possible involvement of an electron carrier and a diaphorase. *Planta* 165, 85-90 (1985).

PORRA R.J., W.A. THOMPSON., P.E. KRIEDEMANN.: Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the

concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica acta* 975, 384-394 (1989).

RIGANO C., DI MARTINO RIGANO V., VONA V., CARFAGNA S., CARILLO P., ESPOSITO S.: Ammonium assimilation by young barley plants of *Hordeum vulgare* in light and darkness: effects on respiratory oxygen consumption by roots. *New Phytol.* 132, 375-382 (1996a).

SCHEIBE R., GEISSLER A., FICKENSCHER K. : Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: Km shift upon light modulation and reduction. *Archiv. Biochem. Biophys.* 274, 290-297 (1989).

SCHNARRENBERGER C., OESER A., TOLBERT N.E.: Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archiv. Biochem. Biophys.* 154, 438-448 (1973).

SCHNARRENBERGER C., FLETCHENER A., MARTIN W.: Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol.* 108, 609-614 (1995).

SCHLUEPMANN H., PELLNY T., VAN DIJKEN A., AGHDASI M., WOBES B., PAUL M., SMEEKENS S.: Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 135,879-890 (2004).

SCHLUEPMANN H., PELLNY T., VAN DIJKEN A., SMEEKENS S., PAUL M.: Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 100,6849-6854 (2003).

SINDELAR L., SINDELAROVA M., BURKETOVA L.: Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissue and protoplasts. *Plant Physiol. Biochem.* 37 (3), 195-201 (1999).

SRIVASTAVA D.K., ANDERSON L.E.: Isolation and characterization of light- and dithiothreitol- modulatable glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 724, 359-369 (1983).

TIESSEN A., HENDRIKS J.H., STITT M., BRANSCHIED A., GIBON Y., FARRÈ E.M., GEIGENBERGER P.: Starch synthesis in Potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14, 2191-2213 (2002).

TIESSEN A., PRESCHA K., , BRANSCHIED A., PALACIOS N., MCKIBBIN R., HALFORD N.G., GEIGENBERGER P.: Evidence that SNF-1 related Kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.* 35,490-500 (2003).

TURNER J.F., TURNER D.H.: The regulation of glycolysis in "The Biochemistry of plants" P.K. STUMPF e D.H. COHN EDITORS. VOL.2, D.D. DAVIES ED. pp. 310-313, ACADEMIC PRESS (1980).

VANCE C.P.: Biologia molecolare del metabolismo dell'azoto in *Metabolismo Vegetale*, Dennis D.T., Turpin D.H. Lefebvre D.D. e Layzell D.B. Calderini Edagricole (2000).

VON SCHAEWEN A., LANGENKAMPER G., GRAEVE K., WENDEROTH I. e SCHEIBE R.: Molecular characterization of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato in comparison to its cytosolic counterpart. *Plant Physiol.* *109*, 1327-1335 (1995).

VONA V., DI MARTINO RIGANO V., ESPOSITO S., CARILLO P., CARFAGNA S., RIGANO C.: Growth, photosynthesis, and respiration of *Chlorella sorokiniana* after N-starvation. Interactions between light, CO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> supply. *Physiologia Plantarum* *105*, 288-293 (1999).

WAKAO S., BENNING C.: Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant J.* *41*, 243-256 (2005).

WENDEROTH I., SCHEIBE R., VON SCHAEWEN A.. Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* *272*, 26985-26990 (1997).

WENDT U.K., HAUSCHILD R., LANGE C., PIETERSMA M., WENDEROTH I., VON SCHAEWEN A. : Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plants. *Plant Mol. Biol.* *40*, 487-894 (1999).

WENDT U.K., WENDEROTH I., TEGELER A., VON SCHAEWEN A.: Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* *23*, 723-733 (2000).

WRIGHT D.P., HUPPE H.C., TURPIN D.H.: In vivo and in vitro studies of glucose 6-phosphate dehydrogenase from barley root plastids in relation to reductant supply for  $\text{NO}_2^-$  assimilation. *Plant Physiol.* *114*, 1413-1419 (1997).



