

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XVIII ciclo

Curriculum in Ecologia Terrestre (Piante e Suolo)

Tesi di Dottorato

**La glucosio-6-fosfato deidrogenasi in orzo (*Hordeum vulgare*):
aspetti biochimici in risposta alla nutrizione azotata ed allo stress
salino e confronto con l'enzima dall'alga verde unicellulare**

Chlorella sorokiniana

Tutore
Ch.mo Prof.
Sergio Esposito

Candidata
Dott.ssa
Gea Guerriero

Coordinatore
Ch.mo Prof.
Maurilio De Felice

ANNO ACCADEMICO 2004-2005

INDICE	PAG.
CAP 1 INTRODUZIONE	5
<i>OPPP e G6PDH negli organismi fotosintetici</i>	5
<i>Effetti del potere riducente e della luce sull'attività G6PDH</i>	8
<i>Biologia molecolare della G6PDH negli organismi fotosintetici</i>	11
<i>Assorbimento ed assimilazione dell'azoto nelle piante superiori</i>	15
<i>Isoforme della GOGAT</i>	16
<i>Effetti della luce e della nutrizione azotata sulle isoforme GOGAT</i>	18
<i>Interrelazioni tra l'OPPP ed il ciclo GS/GOGAT</i>	19
<i>Stress salino nelle piante: generalità</i>	22
<i>Sintesi ed accumulo di osmoliti</i>	24
<i>Risposta delle piante allo stress salino: movimento degli ioni, trasduzione del segnale e turnover proteico</i>	25
 CAP 2 MATERIALI E METODI	 28
<i>Coltivazione delle piante</i>	28
<i>Preparazione dell'estratto per la misura delle attività enzimatiche</i>	29
<i>Preparazione dei plastidi da radici di orzo</i>	31
<i>Preparazione dei cloroplasti da foglie di orzo</i>	32
<i>Integrità e latenza della glucosio-6P deidrogenasi negli organelli isolati</i>	33
<i>Saggi enzimatici</i>	34
<i>Purificazione della G6PDH da radici di orzo</i>	37

<i>Coltivazione delle alghe</i>	38
<i>Determinazione del volume di impacchettato cellulare (PCV)</i>	39
<i>Preparazione dell'estratto per la misura delle attività enzimatiche</i>	39
<i>Purificazione della G6PDH da Chlorella</i>	40
<i>Determinazione delle costanti cinetiche</i>	41
<i>Separazione dei cloroplasti da Chlorella</i>	42
<i>Elettroforesi e Western blotting</i>	42
<i>Elettroforesi nativa ed activity staining</i>	
<i>G6PDH in estratti di Chlorella</i>	44
<i>Determinazione del peso molecolare</i>	44
<i>Determinazione delle proteine</i>	45
<i>Determinazione dei tioli</i>	45
CAP 3 RISULTATI	46
<i>Attività NADH-GOGAT in radici e foglie di orzo</i>	46
<i>Attività Fd-GOGAT in radici e foglie di orzo</i>	48
<i>Analisi mediante Western blotting della Fd-GOGAT</i>	50
<i>Effetto della luce sulla Fd-GOGAT</i>	52
<i>Effetto degli inibitori della sintesi proteica sulla Fd-GOGAT in orzo</i>	54
<i>Attività G6PDH in radici e foglie di orzo</i>	57
<i>Analisi mediante Western blotting della G6PDH</i>	59
<i>Preparazione dei plastidi e cloroplasti da radici e foglie di orzo</i>	61
<i>Effetti dello stress salino sulle attività G6PDH in radici e foglie</i>	64

	<i>Effetti dello stress osmotico sulle attività G6PDH</i>	64
	<i>Inibizione della sintesi proteica ed attività G6PDH durante lo stress salino</i>	65
	<i>Purificazione della G6PDH da radici di piante di orzo</i>	68
	<i>Analisi elettroforetica e Western blotting dei passaggi della purificazione</i>	71
	<i>Caratteristiche cinetiche della G6PDH plastidiale nelle radici</i>	73
	<i>Attività G6PDH in Chlorella cresciuta in diverse condizioni nutrizionali</i>	76
	<i>Effetto della luce e dei composti riducenti sull'attività G6PDH da Chlorella</i>	80
	<i>Purificazione della G6PDH da Chlorella</i>	83
	<i>Caratteristiche cinetiche della G6PDH purificata da Chlorella</i>	88
	<i>Separazione dei cloroplasti da Chlorella</i>	90
CAP 4	DISCUSSIONE	94
CAP 5	CONCLUSIONI	118
CAP 6	BIBLIOGRAFIA	120

INTRODUZIONE

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- δ -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⁺ 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, cosicché 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 ditiotreitolo

(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-tioredoossina (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 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 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 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 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 NADP^+ .

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

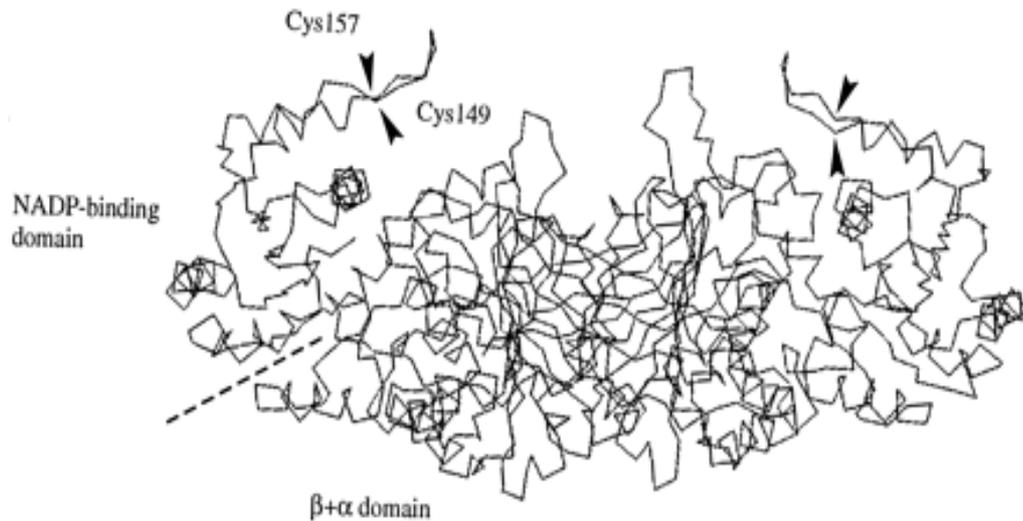
Cercare i responsabili effettori di tale inibizione ha portato all'ipotesi che intermediari e/o l'accettore finale degli elettroni del flusso fotosintetico degli elettroni possono essere coinvolti nella inibizione della G6PDH.

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 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). È stato suggerito che i residui amminoacidici coinvolti in questa regolazione redox sono le Cys¹⁴⁹ e Cys¹⁵⁷ (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^+). 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).



Struttura tridimensionale prevista del dimero della G6PDH plastidiale di patata. Le posizioni dei residui di cisteina Cys¹⁴⁹ e Cys¹⁵⁷ 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 origine 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 Cys¹⁴⁹ e Cys¹⁵⁷ 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,

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

Assorbimento ed assimilazione dell' azoto nelle piante superiori

L'azoto è l'elemento più richiesto tra tutti i macronutrienti presenti nella pianta: nei vegetali l'azoto è presente negli amminoacidi (e quindi nelle proteine e negli enzimi), negli acidi nucleici (DNA e RNA) e in una varietà di altri composti quali le clorofille; contengono inoltre azoto 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, NO_3^- e l'ammonio, NH_4^+) che organiche (come l'urea), ma la maggior parte degli organismi vegetali utilizza come fonte primaria d'azoto il nitrato assorbito dall'apparato radicale. Una volta assorbito, il nitrato subisce una serie di riduzioni successive che conducono alla formazione di ammonio. Le reazioni sono catalizzate da due enzimi, la nitrato reduttasi (NR; *EC 1.6.6.1*) e la nitrito reduttasi (NiR; *EC 1.7.7.1*). I due sistemi enzimatici hanno rispettivamente localizzazione citosolica e plastidiale: la NR, utilizzando NADH o NADPH, riduce il nitrato a ione nitrito (NO_2^-) il quale viene ridotto dalla NiR che opera la conversione del nitrito in ammonio, utilizzando la ferredossina (Fd) quale donatore di elettroni.

L'assimilazione dell'ammonio negli scheletri carboniosi avviene attraverso l'azione concertata di due enzimi, la glutammina sintetasi (GS; *EC 6.3.1.2*) e la glutammato sintasi (GOGAT, glutammina : α -chetoglutarato amminotransferasi), che porta alla sintesi netta di una molecola di acido glutammico a partire da ammonio e acido 2-chetoglutarico, attraverso la formazione di glutammina. Il complesso di reazioni viene comunemente denominato ciclo GS/GOGAT.

La glutammina sintetasi catalizza la prima tappa dell'organizzazione dell'ammonio, formando glutammina a partire da glutammato con l'idrolisi concomitante di ATP e presenza di magnesio.

La GOGAT catalizza il trasferimento del gruppo ammidico della glutammina alla posizione α -cheto del 2-chetoglutarato, dando così luogo alla sintesi di due molecole di glutammato (Lea e Mifflin, 1980). Quindi la GOGAT, in cooperazione con la GS, ha il compito di mantenere un flusso di azoto ciclico dall'ammonio alla glutammina ed al glutammato mediante quello che è noto come il ciclo GS/GOGAT (Lea e Mifflin, 1980). Tale ciclo determina la conversione netta di una molecola di α -chetoglutarato ed ammonio in una molecola di glutammato e gioca inoltre un ruolo cruciale nella riassimilazione dell'ammonio rilasciato dal processo fotorespiratorio (Lam et al. 1996).

Isoforme della GOGAT

Nelle piante coesistono diverse isoforme della GOGAT che si distinguono biochimicamente per la loro specificità verso il donatore fisiologico di elettroni, oltre che per la massa molecolare, la cinetica e la localizzazione tissutale (Suzuki e Gadal, 1984). Esiste infatti un enzima NADH-specifico (NADH-GOGAT; *EC 1.4.1.14*) ed un enzima che usa la ferredossina come donatore di elettroni (Fd-GOGAT; *EC 1.4.7.1*).

La Fd-GOGAT e NADH-GOGAT sono codificati da geni distinti: si tratta di due proteine differenti, infatti studi immunologici hanno rivelato che gli

anticorpi diretti contro l'isoforma Fd-dipendente non riconoscono quella NADH-dipendente (Vance, 2000).

Nella maggior parte delle piante la Fd-GOGAT è una flavoproteina con un centro Fe-S, composta da una sola subunità con una massa molecolare di 140-160 kDa localizzata nel cloroplasto (Suzuki e Gadal, 1984).

Nei tessuti verdi la Fd-GOGAT è essenziale per la riassimilazione dell'ammonio fotorespiratorio ed è coinvolta nella biosintesi degli amminoacidi (Lam et al. 1996). E' stata ritrovata anche nei tessuti non fotosintetici, ma non se ne conoscono ancora a fondo i ruoli fisiologici. In *Arabidopsis* sono presenti due Fd-GOGAT antigenicamente distinte, una delle quali (GLU 1) è espressa nelle foglie ad alti livelli, mentre l'altra (GLU 2) è espressa costitutivamente a livelli bassi nelle foglie ed a livelli più elevati nelle radici (Lam et al. 1996).

La Fd-GOGAT sembra essere anche implicata nel processo di senescenza: la degradazione delle proteine che avviene durante la senescenza porta alla formazione di alti livelli delle ammidi glutammina ed asparagina, le principali forme di traslocazione dell'azoto nelle piante. Una diminuzione dell'attività Fd-GOGAT porterebbe ad una mobilitazione della glutammina dalle foglie senescenti ai tessuti sink (Vance, 2000). Il gene per la Fd-GOGAT potrebbe quindi contribuire al progresso della senescenza spegnendosi.

E' stato isolato e caratterizzato un cDNA completo codificante per la Fd-GOGAT in mais (Vance, 2000): si è visto che tale cDNA codifica per una proteina di 1616 amminoacidi che comprende una presequenza di 97 amminoacidi ricca in serina ed arginina e con carica netta positiva, caratteristica tipica delle sequenze di

transito plastidiche. Anche la NADH-GOGAT è una flavoproteina con un centro Fe-S ed ha una massa molecolare di 200-240 kDa (Suzuki e Gadal, 1984; Anderson et al. 1989). E' monomerica e si trova soprattutto nei tessuti non verdi, ove la sua localizzazione è plastidiale (Suzuki e Gadal, 1984). Studi su fagiolo hanno dimostrato che esiste anche una isoforma di NADH-GOGAT associata esclusivamente ai noduli radicali (Chen et al. 1990).

Effetti della luce e della nutrizione azotata sulle isoforme GOGAT

L'attività della Fd-GOGAT è modulata in dipendenza della luce: in orzo sono stati riportati aumenti di 2-5 volte nell'attività della Fd-GOGAT alla luce (Pajuelo et al. 1997). L'aumento dell'attività è affiancato da un aumento della proteina, come mostrato dai saggi ELISA (Pajuelo et al. 1997): quindi l'aumentata attività della Fd-GOGAT che si ha alla luce è principalmente dovuta alla sintesi *de novo* della proteina e non all'attivazione d'una forma inattiva di Fd-GOGAT già presente. Le analisi mediante Northern blotting (Pajuelo et al. 1997) hanno mostrato che l'esposizione di tessuti eziolati alla luce provoca un aumento dell'mRNA Fd-GOGAT, indicando che l'evento primario che conduce all'aumentata attività dell'enzima è dato da una induzione da parte della luce del livello trascrizionale. E' stato anche studiato l'effetto che si osserva sull'espressione della Fd-GOGAT trasferendo tessuti verdi al buio: si è rilevata una certa stabilità dell'enzima, poiché il livello dell'attività e quello proteico restano immutati nelle prime 72 ore (Pajuelo et al. 1997). Si pensa quindi che la luce non sia il fattore-chiave che regola l'espressione della Fd-GOGAT, poiché in

orzo si ritrova attività Fd-GOGAT sia in tessuti eziolati che in tessuti verdi tenuti al buio: probabilmente c'è una risposta generale della pianta alla luce, più che un controllo diretto esercitato dalla luce.

La Fd-GOGAT è indotta dalla presenza di nitrato solo in presenza di luce (Pajuelo et al. 1997; Turano e Muhitch, 1999), dato che al buio si riscontrano gli stessi livelli di attività, contenuto proteico ed mRNA della Fd-GOGAT.

La NADH-GOGAT sembra invece regolata in dipendenza della disponibilità di azoto. L'aumento più consistente è registrato in seguito all'aggiunta di ammonio nelle radici (Turano e Muhitch, 1999).

L'attività NADH-GOGAT potrebbe essere controllata almeno in parte dall'espressione genica o dall'aumentata stabilità dell'RNA nelle radici. Alla luce di tutte le differenze esistenti fra le due isoforme, appare chiaro che i due enzimi rivestono ruoli fisiologici diversi nel metabolismo azotato delle piante superiori: la dipendenza della Fd-GOGAT dalla luce è in accordo col ruolo che gioca nella fotorespirazione, la dipendenza della NADH-GOGAT dalle fonti esogene di azoto è in accordo col ruolo che ha nell'assimilazione primaria dell'azoto (Turano e Muhitch, 1999).

Interrelazioni tra l'OPPP ed il ciclo GS/GOGAT

La stretta correlazione tra le vie che generano e che usano potere riducente si riflette anche nei cambiamenti dei livelli proteici e trascrizionali (Neuhaus ed Emes, 2000). Sia l'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi che quella della

6-fosfogluconato deidrogenasi (*6PGDH*; *EC 1.1.1.44*) aumentano nei plastidi di radici di mais e pisello durante l'assimilazione del nitrato.

L'OPPP genera il potere riducente necessario per l'attività della NiR: il NADPH convoglia il potere riducente alla Fd e quindi alla NiR tramite una Fd-NADP⁺ ossidoreduttasi (FNR) (Oji et al. 1985; Bowsher et al. 1992). E' interessante notare che le sequenze promotrici della NiR, della FNR, della Fd e della G6PDH posseggono il motivo NIT2, un fattore che regola il metabolismo azotato nei funghi (Neuhaus ed Emes, 2000). Quindi la conservazione di elementi regolatori in *cis* conferma l'ipotesi dell'espressione coordinata di diversi enzimi plastidiali metabolicamente correlati.

Studi effettuati su plastidi isolati (Bowsher et al. 1992; Esposito et al. 2003) dimostrano che oltre a fornire il potere riducente necessario per la riduzione del nitrato, per l'assimilazione dell'ammonio, per la biosintesi degli acidi grassi e per quella degli amminoacidi, il ciclo OPPP contribuisce anche a fornire gli equivalenti di riduzione indispensabili per la sintesi di glutammato: indipendentemente dall'isoforma coinvolta nel metabolismo azotato, la reazione catalizzata dalla GOGAT nei tessuti non fotosintetici necessita dello shunt del pentoso fosfato come fonte di potere riducente, essendo assenti le vie fotochimiche presenti nei tessuti verdi alla luce.

La dimostrazione d'un ciclo OPPP completo nei plastidi viene da studi effettuati somministrando agli organelli isolati ribosio-5-fosfato (R5P): con il pentoso fosfato si hanno le stesse velocità di produzione di glutammato registrate col G6P (Bowsher et al. 1992; Esposito et al. 2003).

Al momento non è stato descritto un carrier specifico del R5P sulla membrana plastidiale, anche se in effetti un trasportatore per i pentosi xilosio-5P e ribulosio-5P è stato isolato recentemente (Weber e Flugge, 2002); tale carrier però non sembra presentare capacità di trasporto per il R5P compatibili con le condizioni fisiologiche. Si suppone quindi che il R5P entri nel plastidio tramite il carrier dell'esoso fosfato (HPT) che è in grado di traslocare il pentoso fosfato (Weber e Flugge, 2002).

Substrati come il F6P, il glucosio-1-fosfato (G1P) mostrano velocità di formazione del glutammato inferiori rispetto al R5P ed il G6P: ciò dimostra che l'esoso fosfato può essere facilmente convertito a G6P dalle isoforme citosoliche contaminanti della fosfoglucomutasi e fosfogluco-isomerasi. La K_m apparente per la sintesi di glutammato guidata dal G6P è di 0.45 mM nei plastidi isolati (Esposito et al. 2003), un valore che è il 50% della K_m per la G6PDH purificata dagli organelli (0.96 mM): ciò indica che la G6PDH può supportare la sintesi di glutammato anche in condizioni subsaturanti (Esposito et al. 2003).

La correlazione dell'OPPP con la sintesi dell'isoforma GOGAT NADH-dipendente richiede la presenza di una transidrogenasi; la sintesi di glutammato ad opera della Fd-GOGAT necessiterebbe della presenza dei componenti per il trasferimento degli equivalenti di riduzione nel plastidio. Poiché i precursori per l'assimilazione dell'ammonio sono sintetizzati nel citosol o nei mitocondri, i plastidi necessitano d'un sistema di trasporto per l'ingresso dell' α -chetoglutarato e per l'esportazione del glutammato dai plastidi al citosol (Weber e Flugge, 2002).

L'involucro plastidiale contiene due trasportatori distinti del dicarbossilato: il traslocatore α -chetoglutarato/malato (DiT1) ed il traslocatore glutammato/malato (DiT2). DiT1 è specifico per i dicarbossilati (malato, succinato, fumarato, glutarato, α -chetoglutarato), mentre DiT2, oltre ai substrati di DiT1, accetta anche il glutammato e l'aspartato (Weber e Flugge, 2002); é inoltre presente un terzo trasportatore glutamina/glutammato (isolato in spinacio). Sono stati perciò ipotizzati due schemi a due e tre trasportatori in grado di descrivere lo scambio dei dicarbossilati e glutammato-glutamina sulla membrana plastidiale .

Stress salino nelle piante: generalità

Le piante incontrano spesso situazioni di stress causate da condizioni esterne che influenzano negativamente la crescita, lo sviluppo e la produttività.

Lo stress può essere di natura biotica, se causato da altri organismi viventi (come gli organismi patogeni), oppure abiotico, se dovuto a deficits/eccessi chimico-fisici. Tali condizioni di stress innescano un ventaglio di risposte finalizzate ad acclimatare l'organismo per consentirne la sopravvivenza: queste spaziano da modificazioni del metabolismo basale fino all'alterata espressione di uno specifico set di geni.

Un eccesso di sali solubili nel terreno provoca danni consistenti alle piante: un suolo che accumula una quantità eccessiva di sali minerali impedisce un normale sviluppo vegetativo e quindi, in termini agronomici, riduce la produttività. L'eccesso di sali porta alla formazione di suoli compatti che riducono la respirazione cellulare delle radici, ma anche il drenaggio dell'acqua e delle

sostanze sciolte nella materia organica. Il potenziale idrico del suolo viene alterato causando degli inconvenienti di natura osmotica alle radici. Molte delle risposte delle piante alla salinità sono correlate a quelle osservate per lo stress idrico ed osmotico: la salinità è infatti causa di stress ionico, osmotico, nonché ossidativo.

Alcune piante si sono specializzate a vivere in ambienti salini (alofite), tramite aggiustamenti osmotici ottenuti con soluti compatibili sintetizzati nel citoplasma; altre piante, le glicofite, estrudono l'eccesso di sali attraverso apposite strutture secernenti, oppure sequestrano i sali nei vacuoli.

La radice è la principale barriera all'assorbimento dei numerosi elementi minerali: l'ingresso degli ioni nel simplasma radicale e lo scaricamento nello xilema sono dei processi altamente regolati.

Lo stress da sali induce cambiamenti strutturali, come è stato visto in piante di orzo (Huang et al. 1990): si nota infatti un aumento dei vacuoli, che probabilmente consentono l'accumulo dell'eccesso di ioni, i plastidi assumono una forma ameboide e racchiudono parte del citoplasma, meno denso rispetto al resto. Ciò è probabilmente causato da alterazioni nella composizione del citoplasma e da cambiamenti adattativi nella sintesi proteica.

I mitocondri subiscono inoltre consistenti danni strutturali (il citocromo c può essere rilasciato in seguito ai danni ossidativi dovuti ad una prolungata esposizione delle piante a stress salino) e la cromatina nei nuclei comincia a condensarsi (Huang et al. 1990).

Lo stress salino, come altre forme di stress, causa anche genotossicità, cioè danni al DNA. L'iperosmolarità provocata da una eccessiva presenza di sale

provoca la comparsa di frammenti di DNA a doppio filamento (dsDNA). Studi effettuati su orzo hanno infatti mostrato che lo stress salino causa degradazione del DNA già dopo 8 ore (“laddering”, ovvero “scalinata” del DNA) e porta alla morte cellulare (Katsuhara, 1997).

I geni regolati dallo stress salino appartengono a gruppi diversi: tali geni codificano per le proteine LEA (*Late Embriogenesis Abundant proteins*), per le osmotine, per le germin-like proteins (come recentemente visto in orzo), per le acquaporine, per le pompe ATPasi di membrana e per enzimi coinvolti nella detossificazione e nella biosintesi di soluti compatibili ed ormoni.

Durante lo stress salino si assiste dunque ad una mobilitazione di nutrienti che sono smistati dalle foglie danneggiate a quelle giovani, per favorirne la sopravvivenza.

Sintesi ed accumulo di osmoliti

Una delle risposte più immediate della pianta allo stress salino è la sintesi di soluti compatibili, ovvero di osmoliti, caratterizzati da particolari proprietà biochimiche: si tratta di composti organici altamente solubili che non interferiscono col metabolismo cellulare, anche ad elevate concentrazioni. Gli osmoliti sono degli stabilizzatori del guscio di idratazione delle proteine nella loro conformazione nativa. Tra questi composti figurano la prolina, gli zuccheri, i polialcoli, i fenoli, la glicina betaina ed altri amminoacidi (Yeo, 1998).

La sintesi e l'accumulo di soluti compatibili è una strategia utilizzata dalle piante per abbassare il potenziale osmotico del citosol. Gli osmoliti hanno

pertanto ruoli molteplici: proteggono i macchinari proteici dal “misfolding” ed alleviano gli effetti tossici provocati dalle specie reattive dell’ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), come la carbamilazione delle proteine e la perossidazione dei lipidi.

Tra gli zuccheri invece che svolgono il ruolo di osmoliti compatibili c’è il trealosio, un disaccaride, che protegge le membrane e le proteine in cellule sottoposte a stress, riduce inoltre l’aggregarsi delle proteine denaturate. Recenti studi mostrano che il trealosio ha anche un effetto soppressivo sulla morte cellulare apoptotica (Ashraf e Harris, 2004).

L’elevata salinità può creare stress secondari nelle piante: le specie ROS, come gli anioni superossido ed il perossido d’idrogeno, hanno effetti dannosi sulle strutture cellulari, sulle macromolecole, gli enzimi ed il DNA. La detossificazione mediante enzimi quale la catalasi e la superossido dismutasi contribuisce quindi ai meccanismi di tolleranza. A tal riguardo i fenoli agirebbero come antiossidanti, donando un atomo di idrogeno ai radicali liberi, generati in seguito a stress ossidativi. Molti acidi fenolici si trovano nelle piante come glicosidi, questo li rende più solubili e conferisce stabilità. Sono generalmente immagazzinati nel vacuolo.

Risposta delle piante allo stress salino: movimento degli ioni, trasduzione del segnale e turnover proteico

Il sodio può entrare attraverso svariati canali cationici: tali canali possono essere voltaggio-dipendenti o voltaggio-indipendenti (VICs, Voltage Independent

Channels). Una volta entrato nel citoplasma, lo ione sodio esercita un forte effetto inibitorio sull'attività di molti enzimi: un eccesso di ioni sodio ha infatti effetti sull'assorbimento del potassio (K^+) e ciò è causa di squilibri nel mantenimento del turgore cellulare e del potenziale di membrana.

Uno degli eventi più immediati che si evidenzia in seguito a stress ionico è l'aumento delle concentrazioni citosoliche di calcio (Ca^{2+}). Tale aumento funge da segnale, da secondo messaggero, poiché attiva i dispositivi enzimatici preposti al controllo dell'assorbimento del K^+ e della discriminazione K^+/Na^+ .

Studi effettuati su *Arabidopsis thaliana* hanno mostrato che la proteina-sensore dei livelli del Ca^{2+} citosolico è la proteina di legame SOS2 (*Salt Overly Sensitive 2*) (Xiong e Zhu, 2002). Una mutazione con perdita di funzione nel gene codificante per questa proteina rende la pianta ipersensibile allo stress salino.

Altro fenomeno tipico dello stress salino è l'estrusione del sodio per impedirne l'accumulo nel citosol; tale fenomeno è particolarmente importante nelle cellule dell'epidermide della radice.

Studi effettuati con il promotore di SOS1 (codificante per il sistema ad antiporto Na^+/H^+) fuso al gene GUS (β -glucuronidasi) hanno mostrato che il gene per l'antiporto di membrana è preferenzialmente espresso nelle cellule dell'epidermide a livello radicale (Xiong e Zhu, 2002). L'overespressione del gene SOS1, inoltre, rende piante wild-type di *Arabidopsis* più resistenti allo stress salino.

Un altro meccanismo che le piante utilizzano per ridurre gli effetti tossici dovuti ad un eccesso di sodio è dato dalla compartimentazione nel vacuolo: ciò

non solo contribuisce alla separazione del sodio dagli enzimi citosolici, ma bilancia anche il basso potenziale osmotico extracellulare creato dallo stress salino.

La compartimentazione vacuolare del sodio è ottenuta grazie all'azione dell'antiporto Na^+/H^+ del tonoplasto; il gradiente protonico che guida l'antiporto è generato dalle H^+ -ATPasi del tonoplasto e dalle pirofosfatasi.

Fenomeno estremamente importante durante lo stress salino è dato dal controllo del turnover proteico. Studi effettuati su *Pancregium maritimum* hanno evidenziato la correlazione tra stress salino e l'espressione del gene per l'ubiquitina (Khedr et al. 2003): l'ubiquitina è una proteina altamente conservata con una sequenza proteica identica in tutte le piante ed è una molecola che durante il normale ciclo cellulare viene attaccata come un'etichetta alle proteine da distruggere (ubiquitin tagging) e che viene utilizzata dalla cellula per segnalare la distruzione della proteina "etichettata". Le proteine che a causa di stress esogeni possono subire modificazioni strutturali ("misfolded proteins") sono riconosciute dal proteasoma, un grosso complesso proteico costituito da più subunità, presente sia nel citoplasma che nel nucleo di tutte le cellule degli eucarioti. Tale complesso è deputato alla eliminazione delle proteine contrassegnate per la degradazione, attraverso un articolato meccanismo enzimatico.

Nelle radici di *P. maritimum* è stato riscontrato un accumulo di coniugati Ub-proteine e ciò indica che il turnover proteico costituisce uno dei punti chiave per il controllo metabolico durante lo stress salino (Khedr et al. 2003).

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 CaSO₄ 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 ₂ HPO ₄	1 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
CaCl ₂	1 mM
K ₂ SO ₄	1.25 mM
MgCl ₂	1 mM
Oligoelementi ¹	0.5 gr/litro

¹ La Soluzione di Oligoelementi aveva la seguente composizione: KCl 2.5 mM – H₃BO₃ 1.25 mM - CuSO₄ 0.025 mM - MnSO₄ 0.25 mM - ZnSO₄ 0.1 mM -(NH₄)₆Mo₇O₂₄ 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 (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 delle attività enzimatiche

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 a pH 7.9, 10 mM MgCl_2 , 5 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 μM NADP^+ , Protease Inhibitor

Cocktail (Sigma P9599) 1ml/30 gr; la poltiglia ottenuta era centrifugata per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto era definito estratto grezzo e utilizzato per i saggi enzimatici di controllo e per la successiva purificazione.

Per l'estrazione della NADH-GOGAT veniva utilizzato un tampone (rapporto peso/volume 1:2) composto da: 100 mM MES-NaOH a pH 6.8, 100 mM saccarosio, 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol e 15 % (v/v) glicole etilenico. L'omogenato veniva centrifugato per 10' a 3500 g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Al supernatante ottenuto veniva aggiunto 0.1 mM PMSF e l'estratto veniva centrifugato per 20' a 20000 g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto veniva utilizzato per i saggi della NADH-GOGAT.

Per l'estrazione della Fd-GOGAT veniva utilizzato un tampone (rapporto peso/volume 1:2) composto da: 50 mM KH_2PO_4 a pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM 2-chetoglutarato, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.05% Triton X-100.

L'estratto veniva centrifugato per 20' a 20000 g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto veniva desalato su resina Sephadex G25 (colonna Pharmacia PD-10) e quindi utilizzato per i saggi della Fd-GOGAT.

Preparazione dei plastidi da radici di orzo

Le piante d'orzo venivano prelevate due ore dopo l'inizio del periodo di luce; le radici venivano separate dai fusti, asciugate e pesate. Tutta la procedura veniva condotta a 4°C.

Circa 20-50 gr di radici venivano poste in una capsula Petri contenente un tampone di estrazione (in rapporto 3:1 volume:peso) composto da: 50 mM Tricina-NaOH pH 7.9, 330 mM sorbitolo, 4 mM EDTA (sale di sodio), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) e 0.1% albumina serica bovina (BSA).

Le radici venivano sminuzzate con lamette tipo Mozart per circa 5 minuti, quindi venivano poste in un mortaio e pestate delicatamente per altri 5 minuti. La poltiglia ottenuta veniva filtrata attraverso 4 strati di garza e uno strato di Miracloth, l'estratto ottenuto veniva centrifugato per 6 minuti a 200g (centrifuga Haereus Megafuge con rotore swing-out) per rimuovere le cellule intatte, i nuclei e i vari detriti. Il supernatante rappresentava l'estratto grezzo; circa 5 ml di questa frazione venivano prelevati e conservati per la misura delle attività enzimatiche totali presenti.

Aliquote di 15 ml di estratto grezzo venivano delicatamente stratificate su 20 ml di tampone 50 mM Tricina-NaOH pH 7.9, 330 mM sorbitolo, 4 mM EDTA (sale di sodio), 1 mM MgCl₂, contenente Percoll al 20% (v/v) e poi sottoposte ad una centrifugazione a 4000g per 7 minuti a 4° C (Centrifuga Sorvall RC5C plus rotore SS34).

Il supernatante ottenuto rappresentava la frazione citosolica, mentre il restante pellet veniva delicatamente risospeso in 5-10 ml di tampone senza Percoll. Questa frazione era designata come frazione plastidiale.

La percentuale di plastidi separati è stata ottenuta utilizzando la formula:

$$\% \text{ di plastidi nella frazione plastidiale} = \frac{\text{attività dell'enzima marker plastidiale nella frazione plastidiale}}{\text{attività dell'enzima marker plastidiale nell'estratto grezzo}} \cdot 100$$

Le contaminazioni da parte del citosol e degli altri organelli nella frazione plastidiale erano calcolate dalla formula:

$$\% \text{ di contaminazione nella frazione plastidiale} = \frac{\text{attività dell'enzima marker nella frazione plastidiale}}{\text{attività dell'enzima marker nell'estratto grezzo}} \cdot 100$$

La contaminazione citosolica nella frazione plastidiale veniva misurata utilizzando come marker l'attività della PEP-carbossilasi.

Preparazione dei cloroplasti da foglie di orzo

Le piante venivano prelevate entro due ore dall'inizio del periodo di luce. Circa 50 gr di foglie venivano macerate in un mortaio contenente un tampone di estrazione (in rapporto 4:1 volume:peso): 50 mM HEPES-KOH pH7.5, 330 mM sorbitolo, 1mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, 1% (w/v) sodio ascorbato (subito prima dell'uso). Tutta la procedura successiva veniva condotta a 4°C.

Dopo aver ottenuto una pasta omogenea la sospensione di cloroplasti veniva filtrata attraverso 8 strati di garza e uno strato di Miracloth e quindi

centrifugata a 2500 g per 4 minuti a 4°C (Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS 34). Il supernatante veniva scartato. Il pellet veniva risospeso in 6 ml del tampone d'estrazione, stratificato su 17.5 ml di tampone 50 mM HEPES-KOH pH7.5, 330 mM sorbitolo, 1mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, contenente Percoll al 50% (v/v) e veniva centrifugato a 9000 g a 4°C per 15 minuti (Centrifuga Sorvall RC5C plus rotore SS34). Si prelevavano i cloroplasti intatti, si aggiungevano circa 30 ml di tampone d'estrazione e si centrifugava quindi a 4°C per 4 minuti a 2500 g (Centrifuga Sorvall RC5C plus rotore SS34) per rimuovere il Percoll .

Il pellet era risospeso in 3 ml circa di tampone d'estrazione e centrifugato a 4°C per 4 minuti a 2500 g (Centrifuga Sorvall RC5C plusrotore SS34). Il pellet rappresentava la frazione cloroplastica.

La contaminazione citosolica nella frazione plastidiale veniva misurata utilizzando come marker l'attività della PEP-carbossilasi. La contaminazione citosolica nella frazione cloroplastica era calcolata dalla formula:

$$\% \text{ di contaminazione citosolica nella frazione cloroplastica} = \frac{\text{attività della PEP carbossilasi nella frazione plastidiale}}{\text{attività della PEP carbossilasi nell' estratto grezzo}} \cdot 100$$

Integrità e latenza della glucosio-6P deidrogenasi negli organelli isolati

Per la misura dell'integrità plastidiale veniva calcolata la latenza dell'enzima G6PDH. Sono stati adottati due metodi differenti, il primo basato sullo shock osmotico, il secondo utilizzando il Triton X-100 (MacDonald e ap Rees, 1983).

Shock osmotico: l'attività enzimatica della G6PDH veniva misurata in plastidi integri. La miscela di reazione per il saggio di attività era preparata in 0.4 M tampone sorbitolo per conservare i plastidi intatti. Si determinava quindi l'attività della G6PDH in plastidi lisati mediante shock osmotico, con un tampone senza sorbitolo, in modo da liberare l'attività interna dell'enzima. Per evitare interferenze dovute alla differenza di concentrazione del sorbitolo, subito prima dell'aggiunta del substrato di reazione, il glucosio-6P, la concentrazione di sorbitolo veniva riportata a quella del controllo (plastidi intatti) utilizzando un tampone a forza ionica doppia.

Triton X-100: il saggio della G6PDH veniva condotto utilizzando le miscele di reazione in equilibrio osmotico. Dopo 10 minuti di lettura allo spettrofotometro veniva aggiunto 0.1% di Triton X-100 che, solubilizzando le membrane, rivelava l'attività enzimatica latente.

Saggi enzimatici

I saggi erano tutti effettuati 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).

Tutte le attività erano misurate in duplicato e confrontate con un bianco senza substrato. Gli enzimi accoppianti nelle miscele di reazione venivano sempre desalati mediante centrifugazione a 13000 rpm per 2 minuti (centrifuga Eppendorf 5415); il precipitato veniva risospeso nel tampone utilizzato per la misura dell'attività enzimatica secondo l'opportuna diluizione.

Glutammato sintasi NADH-dipendente (*EC 1.4.1.14; NADH-GOGAT*). Il saggio d'attività (Lea et al. 1990) era realizzato utilizzando una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 50 mM tampone fosfato a pH 7.5, 10 mM+10 mM KGA/Gln, 0.15 mM NADH e l'estratto. La lettura era effettuata a 340 nm, col modulo di cinetica, per 20 minuti ogni 30 secondi, osservando l'ossidazione del NADH.

Glutammato sintasi ferredossina-dipendente (*EC 1.4.7.1; Fd-GOGAT*). Per il saggio d'attività (Lea et al. 1990) era utilizzata una miscela di reazione avente la seguente composizione: 100 mM glutamina in 500 mM KH_2PO_4 -KOH pH 7.5, 100 mM 2-ossoglutarato in 500 mM KH_2PO_4 -KOH, pH 7.5, 150 mM metilviolageno e l'estratto. Dopo una pre-incubazione a 30°C, la reazione era iniziata aggiungendo 47 mg di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ e 50 mg NaHCO_3 sciolti in 1 ml di acqua distillata. Dopo 20 minuti d'incubazione a 30°C, la reazione era terminata aggiungendo 1 ml di etanolo.

Per la quantizzazione del glutammato formato, era utilizzata la tecnica della High Performance Liquid Chromatography (HPLC): gli amminoacidi formati erano derivatizzati con *orto*-ftalaldeide (*oPA*) ed eluiti in isocratica con un tampone 20 mM sodio fosfato (pH 6.8)-metanolo (67:36; v/v).

Glucosio-6P deidrogenasi (*EC 1.1.1.49; G6PDH*). Il saggio di attività della 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-fosfato pH 7.9, 10 mM MgCl_2 , 0.15 mM NADP^+ , 2 mM G6P e l'estratto. L'attività enzimatica era misurata come quantità di enzima in grado di ridurre 1 nmole di

NADP⁺ al minuto. L'attività specifica veniva espressa per mg di proteina presente nell'estratto.

Fosfoenolpiruvato carbossilasi (*EC 4.1.1.31; PEPCase*). Il saggio di attività (Esposito et al. 1998), era realizzato utilizzando una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 10 mM NaHCO₃, 1.5 U/ml di malico deidrogenasi, 1 mM fosfoenolpiruvato e l'estratto.

Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (*EC 1.2.1.13; GAPDH*). Il saggio di attività (Kang e Rawsthorne, 1996) era realizzato utilizzando una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 50 mM HEPES-NaOH in 0.5 M saccarosio pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH (o NADPH per le 2 isoforme coinvolte nella glicolisi e nel ciclo di Calvin), 5 mM 3-PGA, 2 U/ml di fosfoglicerato kinasi e l'estratto. La lettura era effettuata osservando l'ossidazione del NADH o NADPH a 340 nm.

Citocromo-c-ossidasi (*EC 1.9.3.1; COX*). Il saggio d'attività (Moore e Proudlove, 1983) era realizzato utilizzando una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 75 mM tampone fosfato pH 7.0, 5 μM citocromo c ridotto (la riduzione avveniva aggiungendo Na₂S₂O₄ e controllando che il rapporto delle letture a 550 nm e 565 nm fosse 9-10), 0.1% Triton X-100 e l'estratto. L'ossidazione del citocromo veniva seguita a 550 nm per 5 minuti.

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 di coltura erano asciugate, pesate ed immediatamente polverizzate in azoto liquido. Tutte le tappe successive erano condotte a 4-6°C; il tampone di estrazione (rapporto peso/volume 1:2) era composto da 100 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 5 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 μM 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°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto era designato come estratto grezzo, veniva portato al 70% di (NH₄)₂SO₄, agitando delicatamente per circa 90 minuti e poi centrifugato per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C 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; frazioni da 3.5 ml erano raccolte e saggiate per l'attività G6PDH. Le frazioni attive venivano raccolte e precipitate in (NH₄)₂SO₄ al 70% a 4°C overnight.

Dopo centrifugazione per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34), il pellet era risospeso nel tampone d'estrazione senza NADP⁺ e desalate su una colonna Sephadex G25; quindi l'eluato era applicato ad una colonna con resina d'affinità Reactive Blue-Agarose (Sigma RB4) e la G6PDH era eluita con un tampone contenete NADP⁺ 1.5 mM. Frazioni di 1 ml erano raccolte, saggiate per l'attività enzimatica, riunite ed utilizzate per la determinazione dei parametri cinetici e per le analisi elettroforetiche.

Coltivazione delle alghe

Chlorella sorokiniana 211/8k veniva coltivata in condizione di sufficienza di tutti i nutrienti, oppure poteva essere sottoposta a stress nutritivo in condizioni di assenza di azoto. L'azoto era fornito sotto forma di potassio nitrato (KNO₃) ad una concentrazione di 10 mM. In tal modo si ottenevano due tipi di colture: una costituita da cellule cresciute in assenza di azoto (-N), l'altra costituita da cellule che venivano cresciute in presenza di azoto (nitrato).

Il terreno base (Hoagland modificato a pH 6.5), privo di azoto, utilizzato in laboratorio per coltivare le alghe, aveva la seguente composizione:

KH ₂ PO ₄	1.75 gr/litro
K ₂ HPO ₄	0.75 gr/litro
NaCl	0.02 gr/litro
CaCl ₂	0,02 gr/litro
MgSO ₄	0.30 gr/litro
FeSO ₄	0.001 gr/litro
E.D.T.A. Sale sodico	0.001 gr/litro
Oligoelementi ²	0.5 gr/litro

² La Soluzione di Oligoelementi aveva la seguente composizione: MnCl₂ 1.81 μM – H₃BO₃ 23.1 M - Zn Cl₂ 0.38 μM- CuCl₂ 2H₂O 0.2 μM - Na₂ MoO₄ 2H₂O 0.055 μM.

Le colture erano mantenute ad una temperatura di 35°C e poste in condizioni di luce costante (35 W m⁻² lampade fluorescenti Philips TDL 150 μE m⁻² W55); inoltre venivano continuamente insufflate con aria arricchita del 5% di CO₂.

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 per la misura delle attività enzimatiche

Le alghe (50 ml) erano prelevate e centrifugate per 10 minuti a 4000 g. Il pellet così ottenuto veniva quindi risospeso in 2 ml di tampone di estrazione a 4-6°C: 100 mM Tris-HCl a pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 4 mM acido etilendiaminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 μM NADP⁺, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P9599) 1ml/100 ml. All'aggiunta del tampone di estrazione, le alghe venivano rotte mediante due passaggi consecutivi in French Press a 1000 psi in cella con pistone da 3/8" a freddo. L'estratto così ottenuto veniva centrifugato per 10' a 12000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus con rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto era definito estratto grezzo e utilizzato per i saggi enzimatici di controllo.

Purificazione della G6PDH da Chlorella

All'incirca 2 lt di alghe erano prelevati e centrifugati per 10 minuti a 4000 g. ed il pellet così ottenuto veniva risospeso in circa 20 ml di tampone di estrazione a 4-6°C: 100 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 5 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 μM NADP⁺, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P9599) 1 % tampone. All'aggiunta del tampone di estrazione, le alghe venivano rotte mediante due passaggi consecutivi in French Press a 1000 psi in cella con pistone da 3/8" a freddo. L'estratto così ottenuto veniva centrifugato per 10' a 12000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus con rotore Sorvall SS34). Il supernatante ottenuto era definito estratto grezzo e veniva portato al 30% di (NH₄)₂SO₄, agitando delicatamente per circa 30 minuti e poi centrifugato per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Il surnatante era poi portato al 70% di (NH₄)₂SO₄, agitando delicatamente per altri 30 minuti e poi centrifugato per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34). Il pellet era risospeso nel tampone d'estrazione e desalato su una colonna Sephadex G25 (Pharmacia PD10). L'eluato era quindi 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. Frazioni da 3.5 ml erano raccolte e saggiate per l'attività G6PDH. Le frazioni attive venivano raccolte e precipitate in (NH₄)₂SO₄ al 70% a 4°C overnight.

Dopo centrifugazione per 20' a 20000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus rotore Sorvall SS34), il pellet era risospeso nel tampone d'estrazione senza

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 contenente 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 da radici di orzo e *Chlorella* erano incubati nella miscela di reazione per la G6PDH e la K_{mG6P} apparente veniva misurata variando le concentrazioni di G6P da 0 a 100 mM, mantenendo la concentrazione di NADP⁺ a 150 μ M; analogamente, la K_{mNADP^+} apparente era misurata variando le concentrazioni di NADP⁺ da 0 a 150 μ 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_{iNADPH}) sono state calcolate col metodo del plot di Dixon, misurando l'attività G6PDH a varie concentrazioni di NADPH da 0 a 150 μ M, a livelli subsaturanti di NADP⁺ di 15, 30 e 50 μ M e mantenendo la concentrazione di G6P a 3 mM.

Separazione dei cloroplasti da Chlorella

Circa 400 ml di alghe erano prelevati e centrifugati per 10 minuti a 4000 g. Il pellet così ottenuto veniva risospeso in 10 ml di tampone a 4-6°C: 100 mM Hepes pH 8.0, 660 mM sorbitolo, 2 mM MnCl₂, 6 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 1% BSA. All'aggiunta del tampone di estrazione, le alghe venivano sottoposte ad un passaggio in French Press a 250 psi in cella con pistone da 3/8" a freddo.

L'estratto così ottenuto veniva centrifugato per 5' a 12000g a 4°C (centrifuga Sorvall RC5C plus con rotore Sorvall SS34) e il surnatante conservato e designato come estratto grezzo. Il pellet era risospeso in 20 ml di tampone senza BSA, stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll al 50% e 20% e centrifugati a 4500 g per 5' a 4°. Il pellet era risospeso in tampone senza BSA, e centrifugato a 4500g per 5', 4°. Il pellet rappresentava i cloroplasti isolati: questi erano risospesi in un volume minimo di tampone senza BSA ed osservati al microscopio ottico ed a fluorescenza. I saggi di integrità e latenza erano effettuati come già descritto per orzo.

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). Effettuato il trasferimento la membrana era incubata per 2 ore con antisiero per le isoforme G6PDH, ottenuto dalle 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 venivano identificati mediante incubazione 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 MgCl₂; Sigma B6404).

Elettroforesi nativa ed activity staining G6PDH in estratti di Chlorella

L'elettroforesi nativa era effettuata su un gel al 7% di acrilammide (running gel) ed al 3% (stacking gel); i campioni erano caricati sulla base delle stesse proteine o dello stesso PCV. Dopo 120 min a 180 V/30 mA a 4°C, l'attività enzimatica G6PDH era evidenziata incubando il gel per 20 minuti nel miscela di reazione [50 mM Tris HCl pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM NADP⁺, 5 mM glucosio-6P] e la reazione era visualizzata aggiungendo 1 ml di soluzione per la colorazione [35 mM 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H tetrazolio bromuro e 20 mM di fenazina metosulfato in 50 mM Tris-HCl pH 8.0], per 20 min al buio; la reazione era terminata immergendo il gel in acido acetico 1% per 5 minuti; il gel era quindi sciacquato in acqua distillata ed essiccato in un gel dryer. L'immagine era acquisita utilizzando uno scanner ad alta risoluzione ed analizzata con un personal computer.

Determinazione del peso molecolare

Il peso molecolare delle subunità della G6PDH e della Fd-GOGAT 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 Bio-Rad (Kaleidoscope pre stained markers).

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).

Determinazione dei tioli

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. Tutti i saggi erano effettuati in duplicato e confrontati con un bianco senza estratto. Il saggio era effettuato aggiungendo l'estratto (10-100 μl) ad una miscela di reazione avente la seguente composizione (volume finale 1 ml): 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM DTNB, per misurare i tioli accessibili nella proteina nativa, mentre a tale miscela si aggiungeva urea 4M, per misurare i tioli totali nella proteina purificata e denaturata (Ellman, 1958).

I valori erano ulteriormente verificati prendendo in considerazione una retta di taratura effettuata con glutatione ridotto (GSH).

RISULTATI

Attività NADH-GOGAT in radici e foglie di orzo

L'attività NADH-GOGAT è stata misurata nelle radici e foglie d'orzo in diverse condizioni di nutrizione azotata: nelle foglie non si riscontravano sostanziali variazioni nei livelli NADH-GOGAT sia nelle condizioni di crescita - N sia in presenza di 10 mM ammonio fosfato o potassio nitrato, con valori di circa $1-1.4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ (Fig. 1).

Nelle radici di piante cresciute in assenza di azoto l'attività NADH-GOGAT era di $7.1 \pm 0.4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$; l'aggiunta di azoto provocava un aumento dell'attività NADH-GOGAT che in condizioni di crescita su ammonio raggiungeva il valore di $45.4 \pm 2.7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ dopo 5 giorni (Fig. 1), mentre su nitrato era $18.2 \pm 0.9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ dopo 3 giorni (Fig. 1).

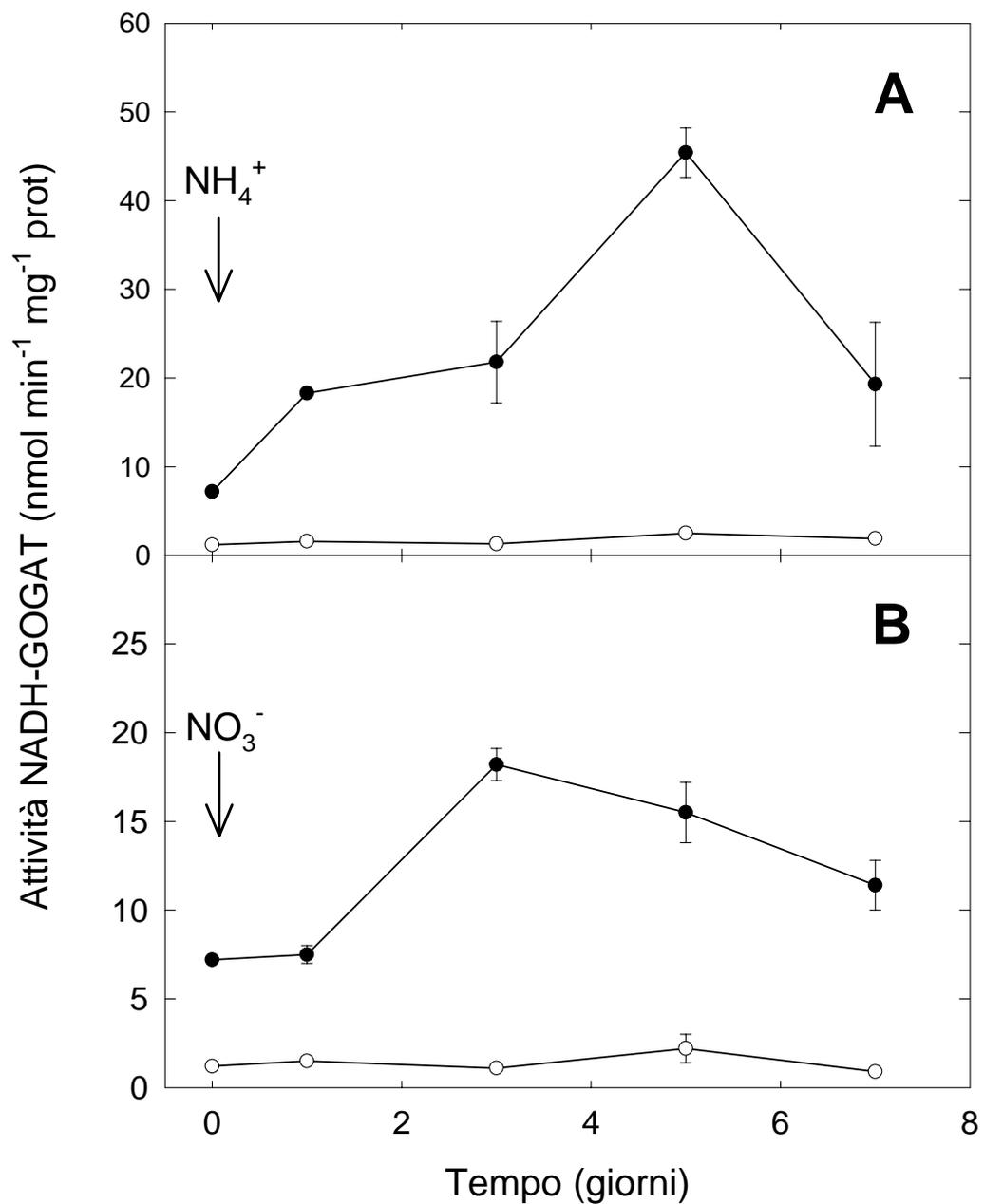


Figura 1 - Attività NADH-GOGAT in piante di orzo cresciute in differenti condizioni di nutrizione azotata. Le piante di controllo venivano cresciute per 14 giorni senza alcuna fonte di azoto (-N); 10 mM ammonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), venivano aggiunti dopo sette giorni; l'attività enzimatica veniva misurata nelle piante raccolte al 14° giorno. Le attività sono espresse come $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteina; i valori sono la media di 3-5 determinazioni separate \pm errore standard. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Attività Fd-GOGAT in radici e foglie di orzo

L'attività Fd-GOGAT è stata misurata nelle radici e foglie d'orzo in diverse condizioni di nutrizione azotata.

Nelle foglie di piante -N l'attività Fd-GOGAT era di $265 \pm 39 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$; tale valore subiva un forte incremento sia con con ammonio, fino a $520 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ dopo 1 giorno (Fig. 2), che con nitrato, fino a $390 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ dopo 3 giorni (Fig. 2).

Nelle radici di piante cresciute in assenza di azoto l'attività Fd-GOGAT era di $172 \pm 2.6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$; l'aggiunta di ammonio provocava un leggero aumento dell'attività Fd-GOGAT fino a $215 \pm 20 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ dopo un giorno (+25%), mentre su nitrato non si misuravano variazioni apprezzabili dell'attività (Fig. 2).

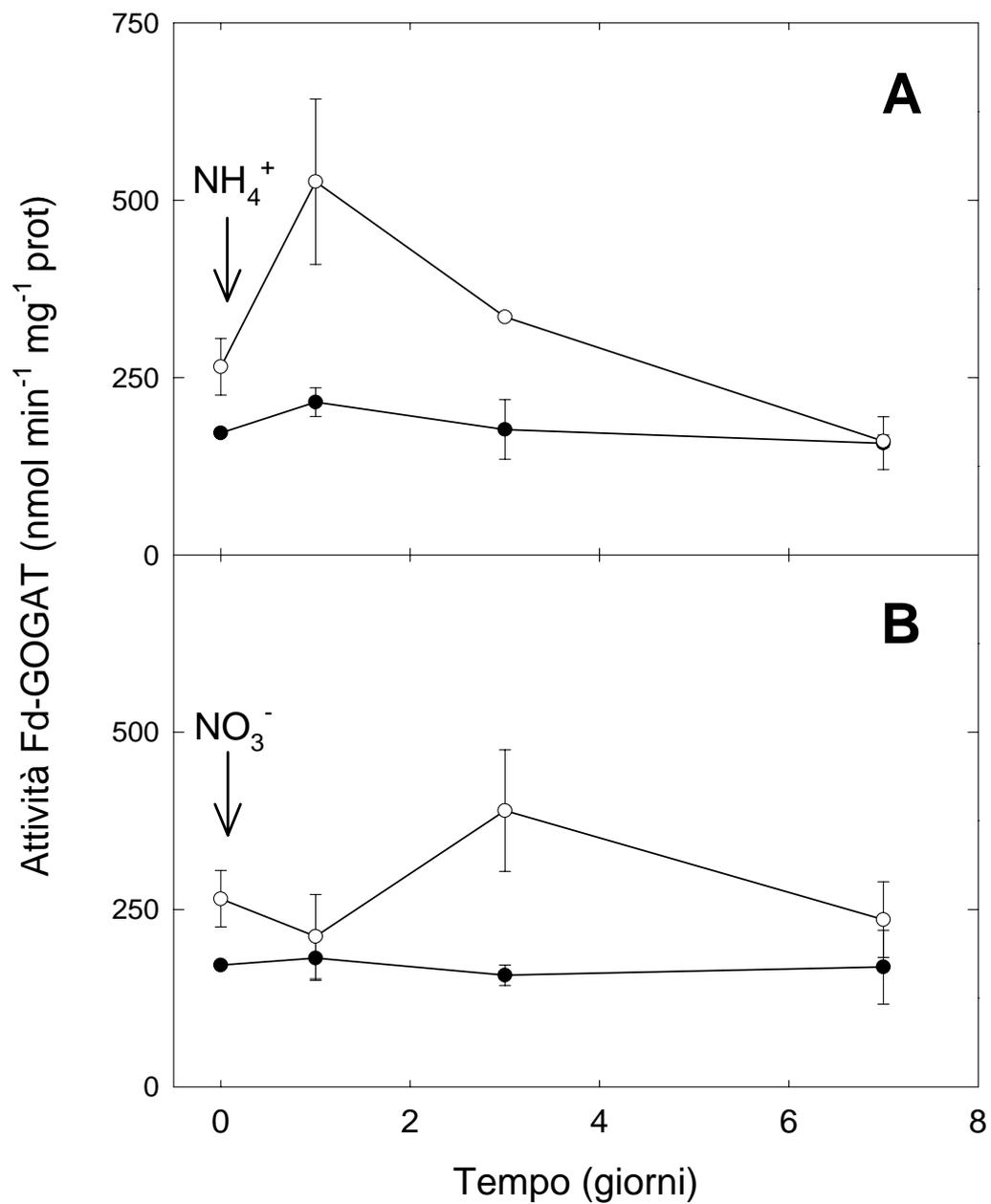


Figura 2 - Attività Fd-GOGAT in piante di orzo cresciute in differenti condizioni di nutrizione azotata. Le piante di controllo venivano cresciute per 14 giorni senza alcuna fonte di azoto (-N); 10 mM ammonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), venivano aggiunti dopo sette giorni; l'attività enzimatica veniva misurata nelle piante raccolte al 14° giorno. Le attività sono espresse come $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteina; i valori sono la media di 3-5 determinazioni separate \pm errore standard. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Analisi mediante Western blotting della Fd-GOGAT

Gli estratti grezzi di radici e foglie di orzo erano sottoposti a SDS-PAGE e poi trasferiti su membrana di nitrocellulosa dove la Fd-GOGAT era evidenziata tramite l'utilizzo di anticorpi specifici per la Fd-GOGAT di orzo (Pajuelo et al. 2000).

Negli estratti grezzi di radice non si evidenziavano variazioni nella quantità di proteina in seguito all'aggiunta di azoto (non mostrato), come già dimostrato dai dati sulle attività.

Nelle foglie l'aggiunta di ammonio provocava un aumento della Fd-GOGAT (176 kDa) dopo un giorno, con nitrato si notava un leggero aumento 3 giorni dopo l'aggiunta di nitrato (Fig. 3). Tali risultati confermavano i dati riguardanti le attività.

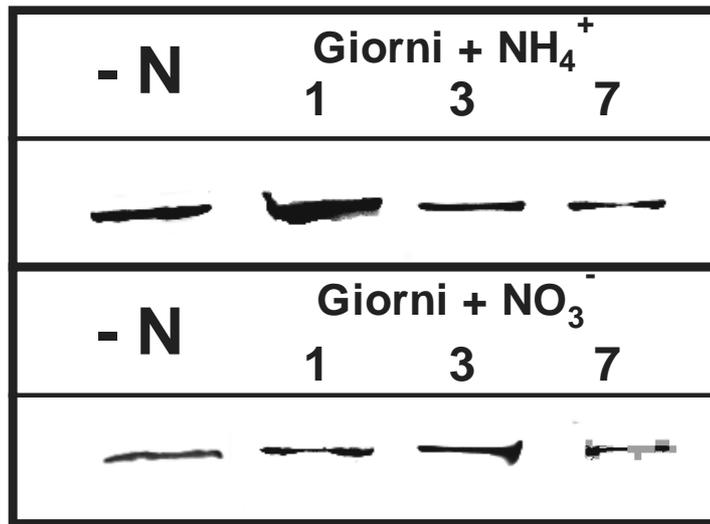


Figura 3 - Western blots della Fd-GOGAT da foglie di orzo. I gel erano caricati con estratti grezzi da foglie di piante d'orzo cresciute per 7 giorni in un terreno privo d'azoto (-N); l'azoto era poi aggiunto come 10 mM (NH₄)₂PO₄, o KNO₃ e le proteine erano evidenziate tramite SDS-PAGE/Western blotting usando anticorpi monoclonali specifici per la Fd-GOGAT da orzo (Pajuelo et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Effetto della luce sulla Fd-GOGAT

Per esaminare l'effetto della luce sulla Fd-GOGAT, piante eziolate cresciute al buio per 7 giorni erano esposte alla luce, quindi le foglie erano prelevate nelle prime 5h di illuminazione e venivano preparati degli estratti grezzi successivamente sottoposti a Western blotting.

Nelle foglie di piante cresciute in assenza di azoto al buio per 6 giorni l'attività Fd-GOGAT raddoppiava nella prima ora di illuminazione e aumentava fino ad oltre 3 volte il valore iniziale nelle prime 5h (non mostrato).

I Western blots di foglie eziolate non mostravano variazioni apprezzabili rispetto alle foglie dopo illuminazione (i valori densitometrici variano entro il 15%), sia in piante prive d'azoto che con nitrato (Fig. 4); risultati simili si ottenevano in piante cresciute su ammonio (non mostrato).

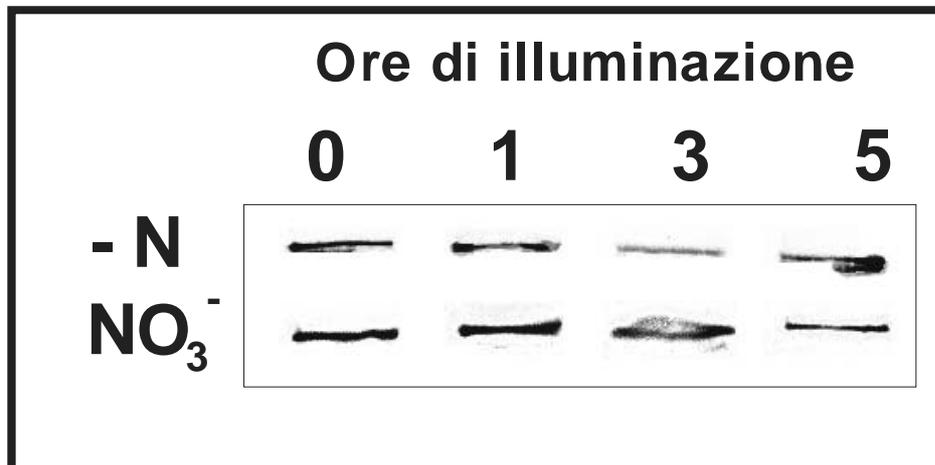


Figura 4 - Western blots della Fd-GOGAT da foglie di piante eziolate (7d) prive d'azoto (-N) o con 10 mM KNO₃ (NO₃⁻). Le foglie erano prelevate al termine del periodo al buio (tempo 0) e dopo le ore di illuminazione evidenziate. La proteina era evidenziata utilizzando anticorpi monoclonali contro la Fd-GOGAT di orzo (Pajuelo et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Effetto di inibitori della sintesi proteica sulla Fd-GOGAT in orzo

Per analizzare la sintesi *de-novo* della GOGAT, sono stati aggiunti al settimo giorno inibitori della sintesi proteica al terreno di coltura contenente le fonti azotate. Quindi le attività GOGAT sono state misurate 24h dopo.

La cicloesimide (CHX) ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), un potente inibitore della sintesi proteica eucariotica, inibiva l'attività NADH-GOGAT che diminuiva fino al 10% del controllo, mentre il cloramfenicolo (Cm) ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), un inibitore delle subunità 50S dei ribosomi plastidiali e mitocondriali (ribosomi 70S), non influenzava l'attività dell'enzima (Tabella 1A).

Allo stesso modo, la CHX provocava un completa scomparsa dell'attività Fd-GOGAT nelle radici ed una diminuzione del 90% nelle foglie dopo 24h (Tabella 1B); risultati simili si ottenevano con i Western blots della Fd-GOGAT, ove l'analisi densitometrica confermava una scomparsa dell'80-90% della proteina in presenza di CHX, di ammonio e nitrato, rispettivamente (Fig. 5A).

Il Cm non aveva effetti sull'attività Fd-GOGAT dopo 24h, che era l'80-93% del controllo (Tabella 1B); i Western blots sottoposti ad analisi densitometrica non mostravano variazioni apprezzabili nella proteina Fd-GOGAT nelle foglie (Fig. 5B) e nelle radici (non mostrato).

A-NADH-GOGAT	NH₄⁺		NO₃⁻	
	<i>Radici</i>	<i>Foglie</i>	<i>Radici</i>	<i>Foglie</i>
Controllo	18.3 (100 %)	1.6 (100 %)	7.5 (100 %)	1.5 (100 %)
CHX	1.08 (5.9 %)	0.35 (22 %)	1.8 (24 %)	0
CAMP	n.d.	n.d.	5.2 (69 %)	n.d.
B-Fd-GOGAT	NH₄⁺		NO₃⁻	
	<i>Radici</i>	<i>Foglie</i>	<i>Radici</i>	<i>Foglie</i>
Controllo	177 (100 %)	374 (100 %)	157 (100 %)	358 (100 %)
CHX	0	39 (10 %)	0	44 (12 %)
CAMP	n.d.	295 (79 %)	146 (93 %)	289 (81 %)
C-G6PDH	NH₄⁺		NO₃⁻	
	<i>Radici</i>	<i>Foglie</i>	<i>Radici</i>	<i>Foglie</i>
Controllo	193 (100 %)	42 (100 %)	201 (100 %)	39.4 (100 %)
CHX	102 (53 %)	48.3 (116 %)	111 (55 %)	33.5 (85 %)

Tabella 1- Effetto degli inibitori della sintesi proteica sulle attività NADH-GOGAT (A), Fd-GOGAT (B) e G6PDH (C) in radici e foglie di piante cresciute in diverse condizioni di nutrizione azotata. CHX= cicloesimide; CAMP= cloramfenicolo. Le attività sono espresse in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$; in parentesi le percentuali rispetto al controllo senza inibitori. n.d. = non determinato.

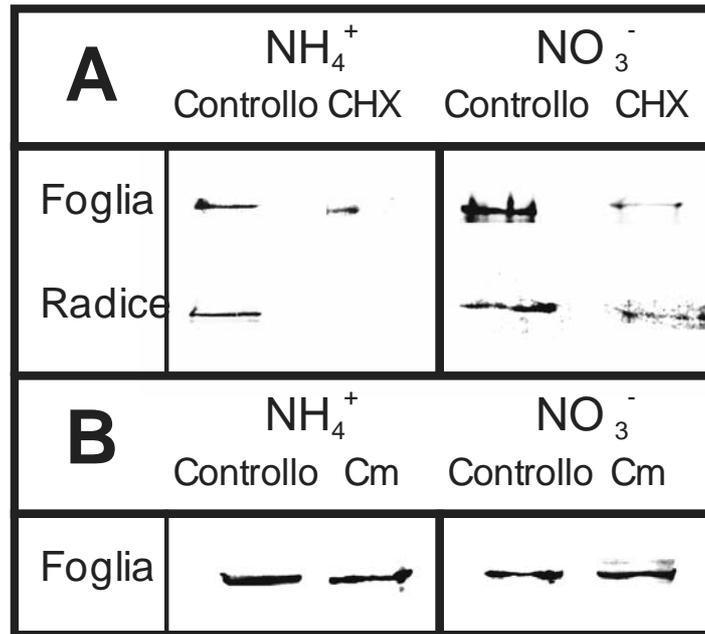


Fig. 5 - Effetto degli inibitori della sintesi proteica sulla Fd-GOGAT in radici e foglie di piante cresciute in diverse condizioni di nutrizione azotata. (A) Western blots della Fd-GOGAT in foglie e radici di piante cresciute su un terreno contenente 10 mM ammonio (NH_4^+) o 10 mM nitrato (NO_3^-), comparati con estratti di piante cresciute in presenza di $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ di cicloesimide (CHX). (B) Western blots della Fd-GOGAT in foglie e radici di piante cresciute su un terreno contenente 10 mM ammonio (NH_4^+) o 10 mM nitrato (NO_3^-), comparati con estratti di piante cresciute in presenza di $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ di cloramfenicolo (Cm). La proteina era evidenziata utilizzando anticorpi monoclonali contro la Fd-GOGAT di orzo (Pajuelo et al. 2000). Altri particolari in “Materiali e Metodi”.

Attività G6PDH in radici 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. 6). Questi livelli rimanevano invariati per almeno 14 giorni in assenza di qualsiasi fonte azoto (Fig. 6).

Nelle foglie l'attività della G6PDH rimaneva invariata sia dopo l'aggiunta di 10 mM NO_3^- che di 10 mM di NH_4^+ (Fig. 6).

L'aggiunta di 10 mM ammonio al terreno di coltura raddoppiava l'attività G6PDH nelle radici a $192 \pm 7.9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$. In modo analogo, l'aggiunta di 10 mM nitrato a piante cresciute per sette giorni in assenza di azoto raddoppiava l'attività della G6PDH nelle radici in 72h, fino a $201 \pm 6.6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ rimanendo costante per tutto il periodo successivo (Fig. 6).

L'aggiunta di cicloesimide provocava il mancato aumento dell'attività totale G6PDH nelle radici che rimaneva ai livelli costitutivi delle piante -N (Tabella 1C). Nelle foglie l'aggiunta dell'inibitore della sintesi proteica non causava sostanziali variazioni nell'attività G6PDH, che rimaneva ai livelli basali del controllo (Tabella 1C).

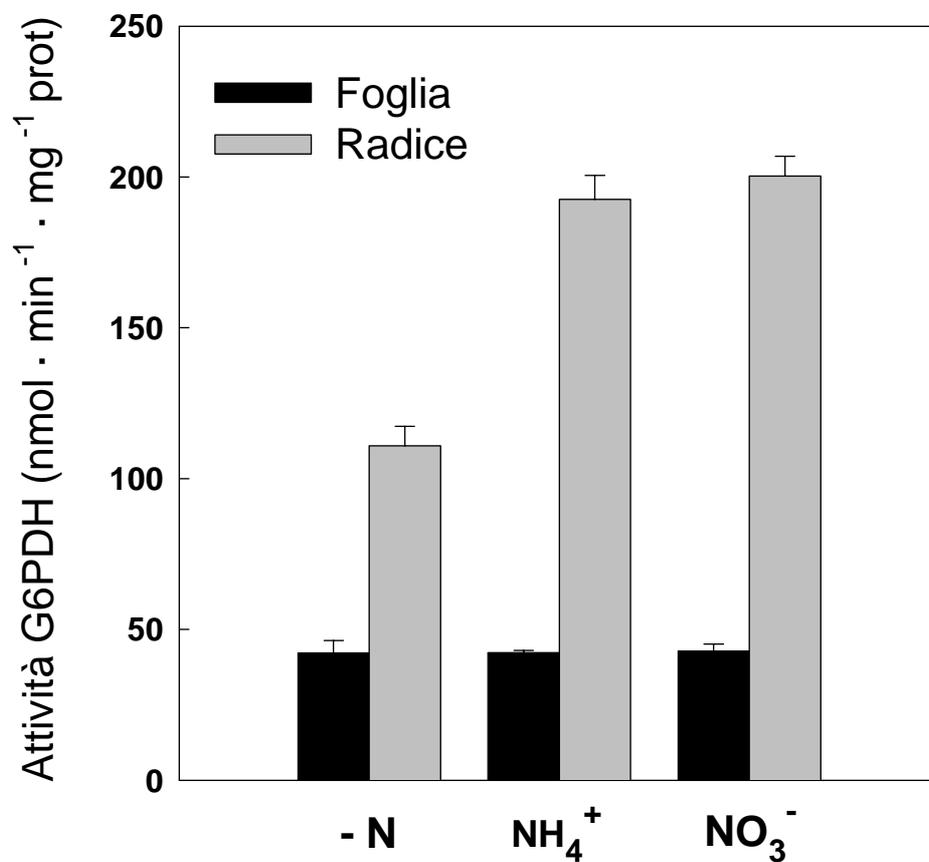


Figura 6 - Attività G6PDH in piante di orzo cresciute in differenti condizioni di nutrizione azotata. Le piante di controllo venivano cresciute per 14 giorni senza alcuna fonte di azoto (-N); 10 mM ammonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻) venivano aggiunti dopo sette giorni; l'attività enzimatica veniva misurata nelle piante raccolte al 14° giorno. Le attività sono espresse come nmol·min⁻¹·mg⁻¹ 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 polipeptidi 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. 7).

Nelle radici la presenza di CHX provocava un aumento più contenuto nella proteina citosolica (96% del controllo -N) e si osservava una modesta presenza della P2-G6PDH con azoto (15–18% del controllo senza CHX) (Fig. 7).

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. 7). 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. 7).

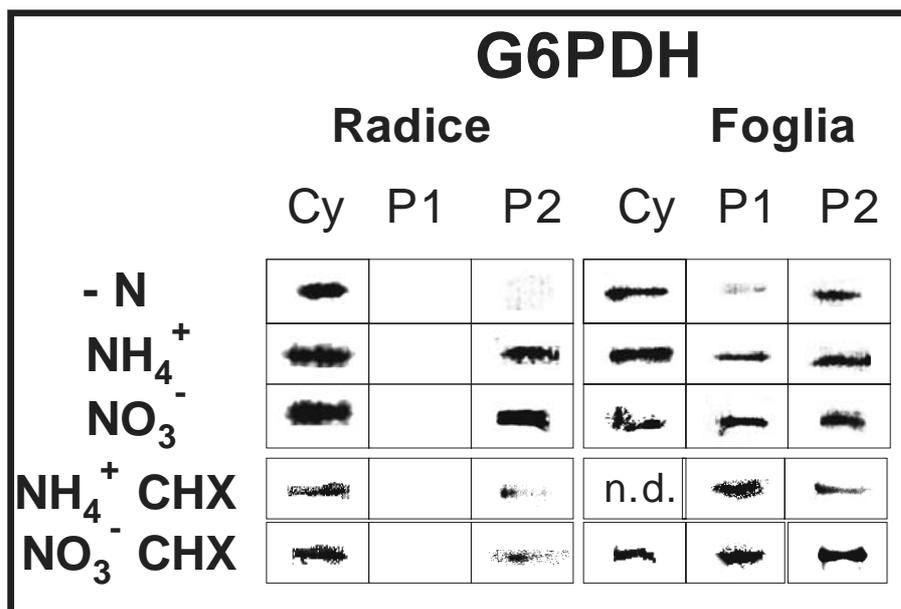


Figura 7 - Western blots della G6PDH da estratti grezzi delle radici di orzo in differenti condizioni di nutrizione azotata. Il nitrato e l'ammonio erano forniti per 3d, mentre questi erano forniti per 1d in presenza di CHX. Le differenti isoforme erano rilevate utilizzando anticorpi monoclonali contro le G6PDH citosolica (Cy), cloroplastica (P1) e plastidiale (P2) da patata (Wendt et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Preparazione dei plastidi e dei cloroplasti da radici e foglie di orzo

Per studiare le attività delle isoforme G6PDH nei plastidi e nei cloroplasti, i saggi enzimatici erano condotti sugli organelli isolati e la percentuale dell'attività presente nei plastidi era calcolata considerando la resa e la contaminazione delle preparazioni.

La resa dei plastidi da radici e dei cloroplasti dalle foglie era del 35 e del 60 %, rispettivamente. La contaminazione citosolica ottenuta calcolando l'attività della PEPCasi (marker citosolico) nella frazione plastidiale era minore dell' 1% (Tabella 2). L'integrità dei plastidi era del 73%, mentre quella dei cloroplasti era del 50%. La contaminazione da parte dei mitocondri (citocromo c ossidasi) si manteneva entro il 2% nei plastidi (Tabella 2).

L'attività G6PDH nei plastidi da radici era il 13.6% del totale, in piante cresciute con ammonio. Quando le piante erano cresciute con nitrato, si osservava un aumento nella percentuale dell'attività G6PDH plastidiale, che raggiungeva il 25.2% dell'attività totale. Il t-test ad una coda effettuato su tali risultati forniva un valore P di 8×10^{-3} , mostrando una differenza statisticamente significativa dei dati tra radici in presenza di nitrato e di ammonio.

L'aumento dell'attività della G6PDH citosolica nelle radici con azoto può essere stimato in funzione della comparsa della P2-G6PDH e della sua diversa abbondanza con ammonio e con nitrato.

I Western blots mostravano una assenza della P2-G6PDH in piante deprivate d'azoto; si può quindi calcolare che l'aumento dovuto all'ammonio *per se* è di $82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ Se la P2-G6PDH rappresenta il 13.6% dell'attività totale, l'attività plastidiale è di $26 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$; perciò

l'aumento dell'isoforma citosolica con ammonio è di $55 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$, valore che evidenziava un aumento del 50% rispetto all'attività misurata nelle radici private d'azoto.

Ripetendo lo stesso calcolo con nitrato, dove la P2-G6PDH rappresenta il 25.2%, l'aumento dell'isoforma citosolica è meno di $40 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$, valore che mostrava un incremento del 36%.

L'attività G6PDH nei cloroplasti isolati da piante private d'azoto era il 16.4% del totale. Nessuna apprezzabile variazione si osservava nella percentuale della G6PDH nei cloroplasti di piante cresciute su ammonio o nitrato.

	Plastidi		Cloroplasti	
Resa	35.2 ± 4.2	n=6	63 ± 1,8	n=3
Integrità	73.5 ± 4.9	n=6	49.4 ± 8.2	n=3
Contaminazione citosolica	0.39 ± 0.14	n=6	0.58 ± 0.13	n=3
Contaminazione mitocondriale	2.33 ± 0.6	n=6	n.d.	
<i>Recoveries</i>				
PEPCasi	108 ± 5.9	n=6	96.4 ± 6.5	n=3
APPasi	97.1 ± 4.7	n=3	n.d.	
Citocromo c ossidasi	80.1 ± 4.6	n=4	n.d.	
G6PDH	99.8 ± 2.6	n=4	92.6 ± 1.5	n=3
Clorofilla	---		93.4 ± 1.11	n=3

Tabella 2 - Proprietà delle preparazioni di plastidi e cloroplasti. I valori sono espressi come percentuale delle attività degli enzimi marker misurate negli organelli rispetto all'estratto grezzo. Le *recoveries* delle proteine solubili, degli enzimi marker e della clorofilla sono mostrate come percentuale dell'attività plastidiale più quella citosolica rispetto all'estratto grezzo ± s.e. n= numero delle determinazioni indipendenti usate per calcolare le medie. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Effetti dello stress salino sulle attività G6PDH in radici e foglie

Quando le piante erano trasferite su un terreno privo di azoto in presenza di 0.15 M NaCl, l'attività G6PDH nelle radici aumentava in 24h a 198.1 ± 6.8 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot (Fig. 8), mentre nelle foglie raggiungeva il valore di 83.4 ± 4.8 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot (Fig. 8).

Piante d'orzo cresciute in condizioni di stress salino (0.15 M NaCl) per 24h mostravano un'attività della G6PDH nelle radici di 147.7 ± 7.1 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot quando era aggiunto ammonio, e di 195.5 ± 16.8 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot con nitrato (Fig. 8); nelle foglie non si osservavano cambiamenti significativi nell'attività G6PDH misurata in condizioni di stress salino, sia quando veniva aggiunto ammonio (44.9 ± 4.8 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot), che nitrato (42.3 ± 3.5 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot) (Fig. 8), rispetto al controllo (piante -N).

Effetti dello stress osmotico sulle attività G6PDH

Se veniva aggiunto al terreno di crescita mannitolo al 5%, un osmolita che provoca uno stress osmotico analogo a quello indotto da 0.15 M NaCl, le attività della G6PDH in piante prive di azoto rimanevano pressoché invariate nelle radici (113.4 ± 14 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot), ed aumentavano nelle foglie fino a 56.5 ± 5 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot (+ 45%). L'aggiunta di mannitolo insieme ad ammonio o nitrato causava un aumento nell'attività G6PDH sia nelle radici (147 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot) che nelle foglie (60 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot), rispetto a piante prive di azoto. Piante nutrite con nitrato e di mannitolo non mostravano variazioni nell'attività G6PDH nelle radici rispetto a piante cresciute senza azoto; un lieve aumento a 50.4 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ prot (+28%) era misurata nelle foglie (Fig. 8).

Inibizione della sintesi proteica ed attività G6PDH durante lo stress salino

Per verificare se il mancato aumento della attività G6PDH in seguito all'aggiunta di azoto durante lo stress salino fosse dovuto al blocco della sintesi proteica, al terreno di coltura veniva aggiunto un potente inibitore della sintesi proteica citosolica, la cicloesimide ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHX).

Piante cresciute su un terreno privo di azoto, al quale veniva aggiunto CHX e 10 mM ammonio fosfato al settimo giorno di idrocoltura, mostravano un'attività G6PDH di $102 \pm 4.9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot nelle radici dopo 24h e $48 \pm 2.3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot nelle foglie (Fig. 8). Quando 10 mM di potassio nitrato era aggiunto insieme con la CHX, le attività misurate erano $111 \pm 8.4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot nelle radici dopo 24h e $34 \pm 0.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot nelle foglie (Fig. 8).

L'analisi Western blotting su estratti grezzi da radici e foglie di piante d'orzo cresciute su nitrato non mostravano sostanziali variazioni nella quantità di protina in seguito a stress salino (Fig. 9). Simili risultati si ottenevano in piante deprivate d'azoto e cresciute su ammonio, in presenza di NaCl 0.15 M (non mostrato).

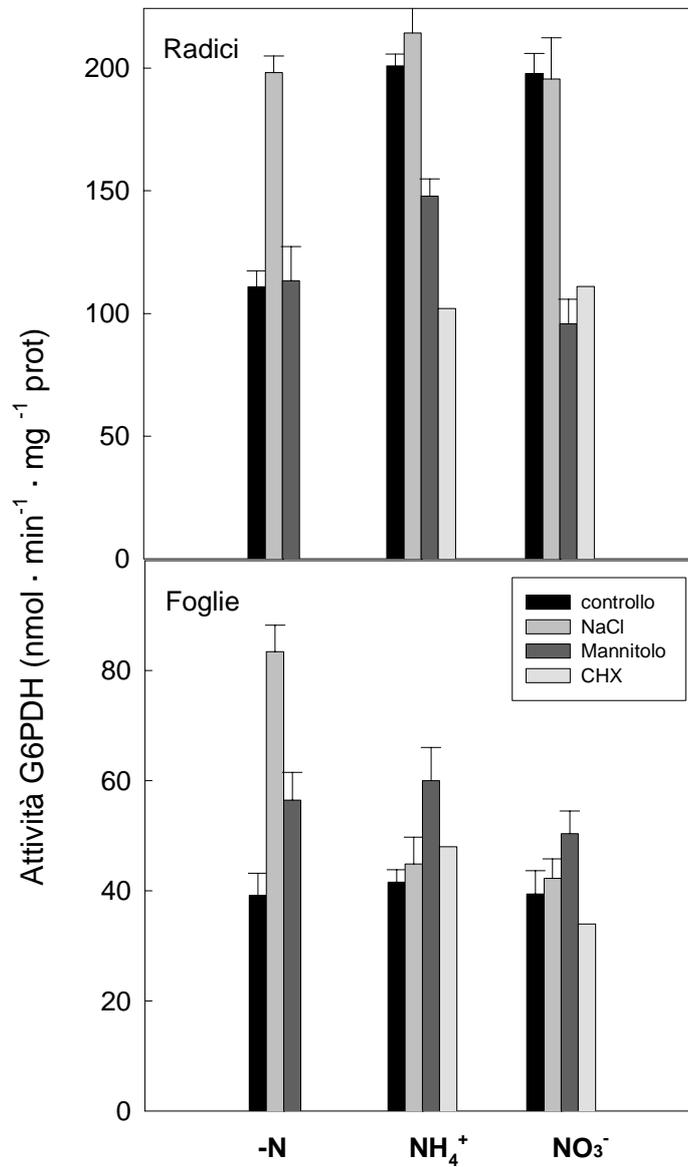


Figura 8 - Attività G6PDH in radici e foglie di piante cresciute in condizioni di controllo (colonne nere), aggiunta di 0.15 M di cloruro di sodio al settimo giorno (colonne grigio chiaro), aggiunta di mannitolo al 5% al settimo giorno (colonne grigio scuro), o aggiunta di cicloesimide ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) al settimo giorno (colonne grigio chiarissimo). Le attività sono espresse come $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteine}$; i valori sono la media di tre determinazioni indipendenti \pm errore standard. Altri particolari in “Materiali e Metodi”.

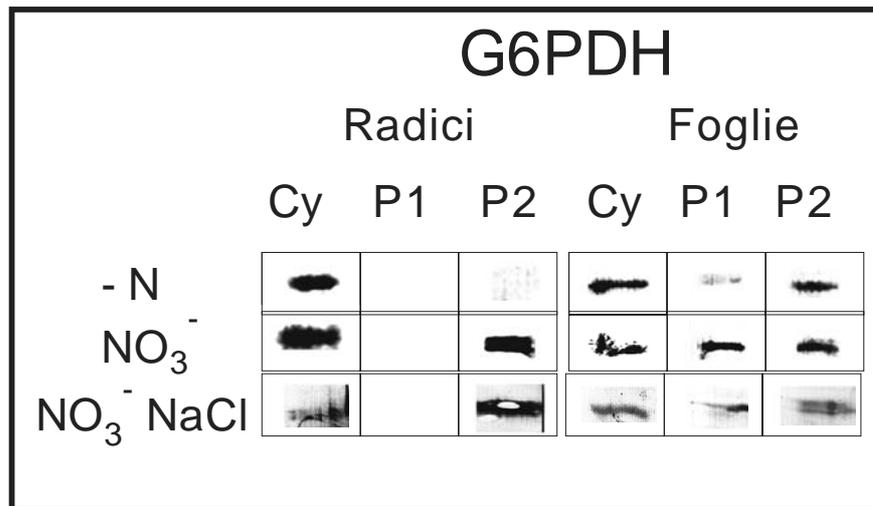


Figura 9 - Western blots degli estratti grezzi di radici e foglie di piante d'orzo cresciute in differenti condizioni nutrizionali. Le piante erano cresciute su terreno privo di azoto (-N). Al settimo giorno era aggiunto nitrato 10 mM (NO₃⁻); nitrato 10 mM in presenza di cloruro di sodio 0.15M (NO₃⁻ + NaCl); ammonio (NH₄⁺); ammonio e cloruro di sodio 0.15 M (NH₄⁺ + NaCl). La determinazione di differenti isoforme era fatta utilizzando anticorpi monoclonali contro le G6PDH citosolica (Cy), cloroplastica (P1) e plastidiale (P2) da patata (Wendt et al. 2000).

Purificazione della G6PDH da radici di piante di orzo

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

Il protocollo utilizzato permetteva una purificazione della G6PDH di 30-60 volte nelle radici di piante cresciute in diverse condizioni di nutrizione azotata (Tabelle 3 e 4).

Il passaggio di purificazione su colonna Q-Sepharose mostrava un singolo picco di attività enzimatica, indicando la presenza di una unica forma G6PDH, sia in radici di piante cresciute in assenza di fonti azotate che in quelle di piante cresciute in assenza di azoto ma in presenza di NaCl 0.15 M (Fig. 10). L'unico picco presente corrispondeva all'isoforma citosolica.

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. 10). Lo stesso profilo di eluizione si osservava in radici di piante cresciute in presenza di fonti azotate e di NaCl 0.15 M (Fig. 10).

L'attività caricata sulla colonna di Blue-Agarose veniva ritrovata nelle frazioni eluite con il NADP⁺ al 70-90%. L'isoforma eluiva esclusivamente con il NADP⁺ dalla colonna Blue-Agarose mentre le frazioni eluite in presenza di NAD⁺ non mostravano alcuna attività G6PDH (Fig. 10).

La G6PDH era strettamente specifica per il NADP⁺ e per il glucosio-6P: non veniva misurata attività in presenza di altri zuccheri fosforilati e di 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 ₄) ₂ SO ₄ + 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 3 - 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".

NO₃⁻	Volume totale	Proteine totali	Attività totale	Attività specifica	Resa	Fattore di purificazione
Estratto grezzo	43	16.9	4134	243.4	100	1
70% (NH ₄) ₂ SO ₄ + G25 – Picco 1	3.5	0.49	20	41.5	0.7	0.1
70% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 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 4 - 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".

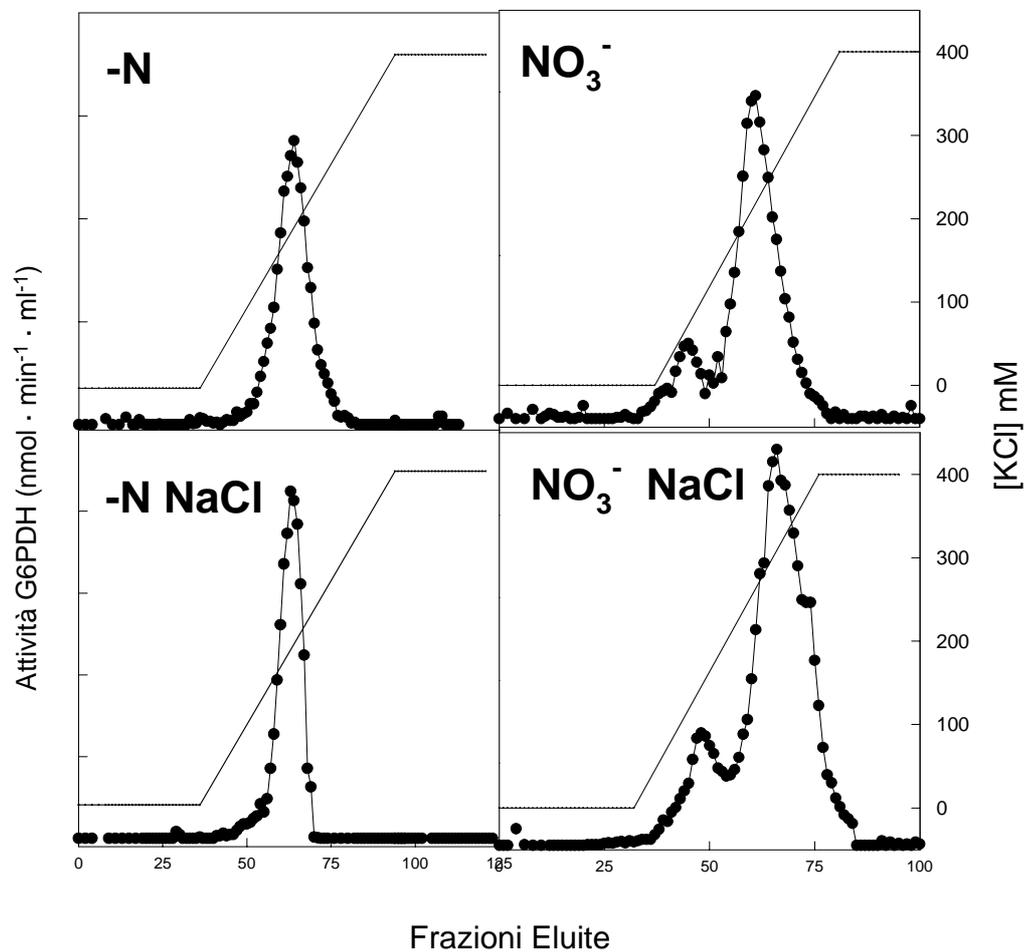


Figura 10 - Profilo di attività della G6PDH (●) estratta da radici di piante d'orzo cresciute in assenza di azoto per 7 giorni, con nitrato 10 mM, in presenza ed assenza di NaCl 0.15 M per 24h, delle frazioni eluite da una colonna di Q-Sepharose (1,27 x 18 cm). La linea continua indica il gradiente di KCl applicato alla colonna. La procedura completa è descritta in “Materiali e Metodi”.

Analisi elettroforetica e Western blotting dei passaggi della purificazione

Le varie fasi della purificazione delle isoforme G6PDH da radici di piante d'orzo cresciute in vari regimi di nutrizione azotata, in presenza o meno di stress salino, 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. 11). L'isoforma citosolica era purificata all'omogeneità, come evidenziato dall'indagine elettroforetica e dalla successiva colorazione con nitrato d'argento (Fig. 11). Il peso molecolare dell'isoforma purificata era di circa 63 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 (Wendt et al. 2000) (non mostrato).

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

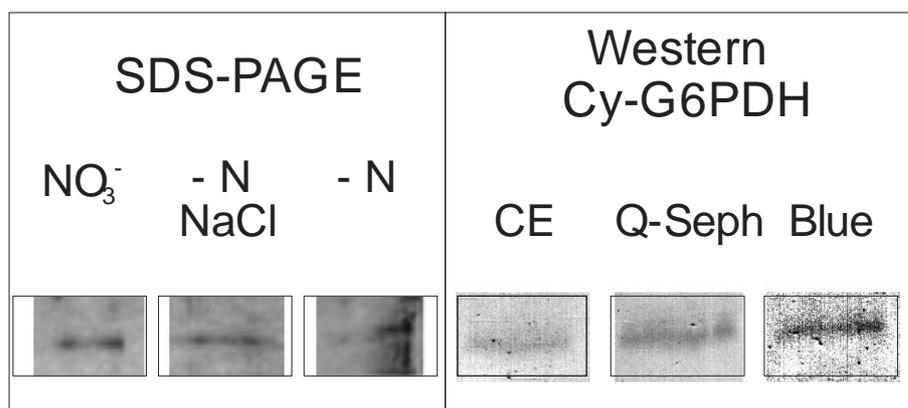


Figura 11 - Analisi elettroforetica della G6PDH citosolica purificata da radici di orzo. Pannello SDS-PAGE: isoforma citosolica purificata e colorata su gel SDS-PAGE con nitrato d'argento. NO₃⁻, piante cresciute con nitrato; - N NaCl, piante cresciute in assenza di azoto e sottoposti a stress salino; -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 purificate da 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 (non mostrato), con un valore di $K_{m_{G6P}}$ di 0.36 mM (Tabella 5). La cinetica di saturazione della Cy-G6PDH nei confronti del $NADP^+$ era di tipo iperbolico (non mostrato); il valore di K_m calcolato per il coenzima ossidato era 18.7 μM (Tabella 5). L'inibizione da NADPH per la Cy-G6PDH veniva misurata a differenti concentrazioni di $NADP^+$ (15, 30, 50 μM), variando la concentrazione di NADPH. Le rette in funzione di $1/V$ convergevano tutte sul valore $-1/K_i$ che dava una $K_{i_{NADPH}}$ di 15.55 μM .

In presenza di cloruro di sodio la $K_{m_{G6P}}$ diminuiva ad un valore di 0.25 mM, la costante cinetica per il $NADP^+$ era 27 μM e la costante di inibizione era 37.9 μM (Tabella 5).

La Cy-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di nitrato mostrava un valore di $K_{m_{G6P}}$ di 0.34 mM (Tabella 5); il valore di K_m calcolato per il $NADP^+$ era 14 μM (Tabella 5), mentre quello per la $K_{i_{NADPH}}$ 19.8 μM .

In presenza di cloruro di sodio la $K_{m_{G6P}}$ diminuiva ad un valore di 0.20 mM, la costante cinetica per il $NADP^+$ era 6.8 μM e la costante di inibizione per il NADPH era 29.5 μM (Tabella 5).

La P2-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di nitrato mostrava una cinetica iperbolica nei confronti del substrato glucosio-6P (non mostrato), con un valore di $K_{m_{G6P}}$ di 0.68 mM; il valore di $K_{i_{NADPH}}$ era 49.8 μM (Tabella 5).

In presenza di cloruro di sodio la $K_{m_{G6P}}$ dell'isoforma plastidiale non

variava apprezzabilmente, mostrando un valore di 0.74 mM, la costante cinetica per il NADP^+ era 3.9 μM , mentre la costante di inibizione era 48.5 μM (Tabella 5).

La Cy-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di ammonio esibiva un valore di $K_{m\text{G6P}}$ di 0.50 mM (Tabella 5); il valore di K_m calcolato per il NADP^+ era 6.4 μM (Tabella 5), mentre quello per la $K_{i\text{NADPH}}$ 57.5 μM .

In presenza di cloruro di sodio la $K_{m\text{G6P}}$ dimezzava a 0.25 mM, la costante cinetica per il NADP^+ era 13.35 μM e la costante di inibizione per il NADPH era 86 μM (Tabella 5).

La P2-G6PDH purificata da radici di orzo cresciute in presenza di ammonio mostrava un valore di $K_{m\text{G6P}}$ di 0.87 mM, mentre la costante cinetica per il coenzima NADP^+ era 18.8 μM ; il valore di $K_{i\text{NADPH}}$ era 48.5 μM (Tabella 5).

In presenza di cloruro di sodio la $K_{m\text{G6P}}$ dell'isoforma plastidiale diminuiva drasticamente a 0.28 mM, la costante cinetica per il NADP^+ era 20 μM , mentre la costante di inibizione era 30 μM (Tabella 5).

	-N	-N NaCl		NO₃⁻	NO₃⁻ NaCl		NH₄⁺		NH₄⁺NaCl	
	<i>Cy-G6PDH</i>	<i>Cy-G6PDH</i>	<i>Cy-G6PDH</i>	<i>P2-G6PDH</i>	<i>Cy-G6PDH</i>	<i>P2-G6PDH</i>	<i>Cy-G6PDH</i>	<i>P2-G6PDH</i>	<i>Cy-G6PDH</i>	<i>P2-G6PDH</i>
K_mG_{6P}	0.36±0.015	0.25±0.009	0.34±0.11	0.68±0.08	0.20±0.04	0.74±0.23	0.50±0.06	0.87±0.1	0.25±0.05	0.28*
K_mNADP⁺	18.7±1.25	27±1.5	14±2	nd	6.8±1.7	3.9±1.1	6.4±0.55	18.8±1.4	13.35±4.15	20*
K_iNADPH	15.55±4.5	13± 2	19.8±4.4	49.8*	29.5±3.4	48.5±16.5	57.5±9	48.5±1.5	86±3	30*

Tabella 5 - Costanti cinetiche delle isoforme G6PDH purificate da radici di piante di orzo cresciute in diversi regimi di nutrizione azotata, con e senza l'aggiunta di NaCl 0.15 M al terreno di coltura. Le K_{mG6P} sono espresse in valori mM, le K_{mNADP^+} e le K_{iNADPH} sono espresse come valori μ M. Altri particolari in "Materiali e Metodi". *= 1 solo valore.

Attività G6PDH in Chlorella cresciuta in diverse condizioni nutrizionali

La misura dell'attività negli estratti grezzi di *Chlorella sorokiniana* richiedeva l'aggiunta di inibitori di proteasi per evitare processi proteolitici: si osservava una notevole perdita dell'attività 3 ore dopo la preparazione degli estratti, quando non venivano utilizzati inibitori di proteasi; in presenza di inibitori di proteasi non si osservavano variazioni apprezzabili nelle attività G6PDH (non mostrato).

L'attività G6PDH in cellule di *Chlorella* (211/8k) cresciute per 24h senza azoto era di $373 \pm 40 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ (Tabella 6); quando veniva aggiunto azoto, l'attività diminuiva drasticamente fino a circa $100 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$, sia con ammonio (non mostrato) che con nitrato (Tabella 6). Quando l'attività era espressa in funzione del volume di cellule impacchettate (Packed Cell Volume, PCV) le attività G6PDH non cambiavano nelle diverse condizioni di nutrizione azotata (Tabella 6).

Bisogna notare che alghe cresciute per 24h su nitrato 10 mM esibivano un contenuto di proteine di $0.43 \pm 0.09 \text{ mg prot} \cdot \mu\text{l PCV}^{-1}$ (n=3), un valore 2.9 volte più elevato rispetto a quello di cellule cresciute per 24h in assenza d'azoto ($0.149 \pm 0.03 \text{ mg prot} \cdot \mu\text{l PCV}^{-1}$); tali valori non variavano apprezzabilmente 48 h dopo l'aggiunta di nitrato ($0.418 \pm 0.12 \text{ mg prot} \cdot \mu\text{l PCV}^{-1}$; n=3). Inoltre i diametri delle cellule di *Chlorella* osservate al microscopio restavano invariati sia in condizione di deprivazione che di sufficienza d'azoto (non mostrato).

I risultati relativi alle attività erano confermati da elettroforesi nativa e successiva colorazione con sali di tetrazolio per evidenziare l'attività G6PDH:

quando il caricamento su gel era effettuato sulla base dello stesso contenuto di proteine, si osservava una intensità maggiore della colorazione negli estratti grezzi di cellule deprivate d'azoto, ma quando il caricamento era effettuato sulla base dello stesso PCV, non si osservavano variazioni nell'intensità, in tutte le condizioni di crescita esaminate (Fig. 12) .

Condizioni di crescita	Attività G6PDH (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹ prot)	%	Attività G6PDH (nmol · min ⁻¹ · µl ⁻¹ PCV)	%
-N	373 ± 40	100 %	77.6 ± 9	100 %
NO ₃ ⁻	96 ± 5	26 %	80.3 ± 8	104 %

Tabella 6 - Attività G6PDH in *Chlorella sorokiniana* cresciuta in diversi regimi di nutrizione azotata. Cellule di controllo erano cresciute per 24h senza alcuna fonte azotata (-N); nitrato 10 mM (NO₃⁻) era aggiunto dopo 24h e le alghe erano cresciute in presenza d'azoto per altre 24h. Le attività sono espresse come nmol·min⁻¹·mg⁻¹ prot (colonna 2), o come nmol·min⁻¹ · µl⁻¹ PCV (colonna 4). Le percentuali delle attività rispetto alla alghe di controllo (-N) sono indicate nella colonna di fianco alle attività. I valori sono la media di 3-5 determinazioni separate ± errore standard. Altri particolari in “Materiali e Metodi”.

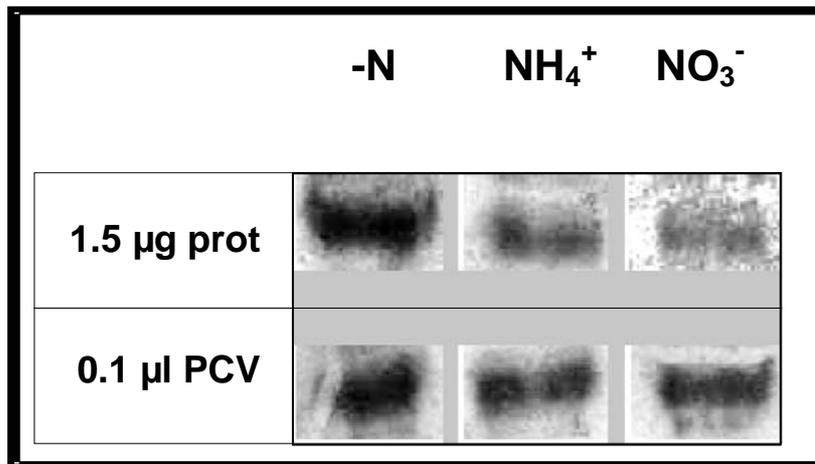


Figura 12 - Elettroforesi nativa e colorazione con sali di tetrazolio di estratti grezzi da *Chlorella* in diversi regimi di nutrizione azotata. Il caricamento era effettuato sulla base della stessa quantità di proteine ($1.5 \mu\text{g}^{-1}$ prot), o dello stesso PCV ($0.1 \mu\text{l}$ PCV). Altri particolari in “Materiali e Metodi”.

Effetto della luce e dei composti riducenti sull'attività G6PDH da Chlorella

L'attività G6PDH da *Chlorella* rispondeva parzialmente alla luce: quando le cellule erano trasferite al buio, si osservava un incremento dell'attività del 35% in 30 minuti rispetto alle cellule alla luce e tale attivazione al buio durava per almeno 4h (Fig. 13). Quando le cellule erano trasferite nuovamente alla luce, l'attività G6PDH ritornava ai livelli di controllo (non mostrato).

La G6PDH purificata da *Chlorella* era relativamente insensibile al ditionitrotolo ridotto (DTT): l'esposizione dell'enzima purificato al DTT 30 mM per 90 minuti provocava solo il 14% di inibizione (non mostrato). Il glutatione ridotto (GSH) esercitava invece una inattivazione più rapida e massiccia rispetto al DTT (Fig. 14): in presenza di GSH 5 mM l'attività G6PDH era il 36% del controllo (0 mM GSH), mentre in presenza di GSH 30 mM l'attività scendeva ad appena il 7.3% del controllo.

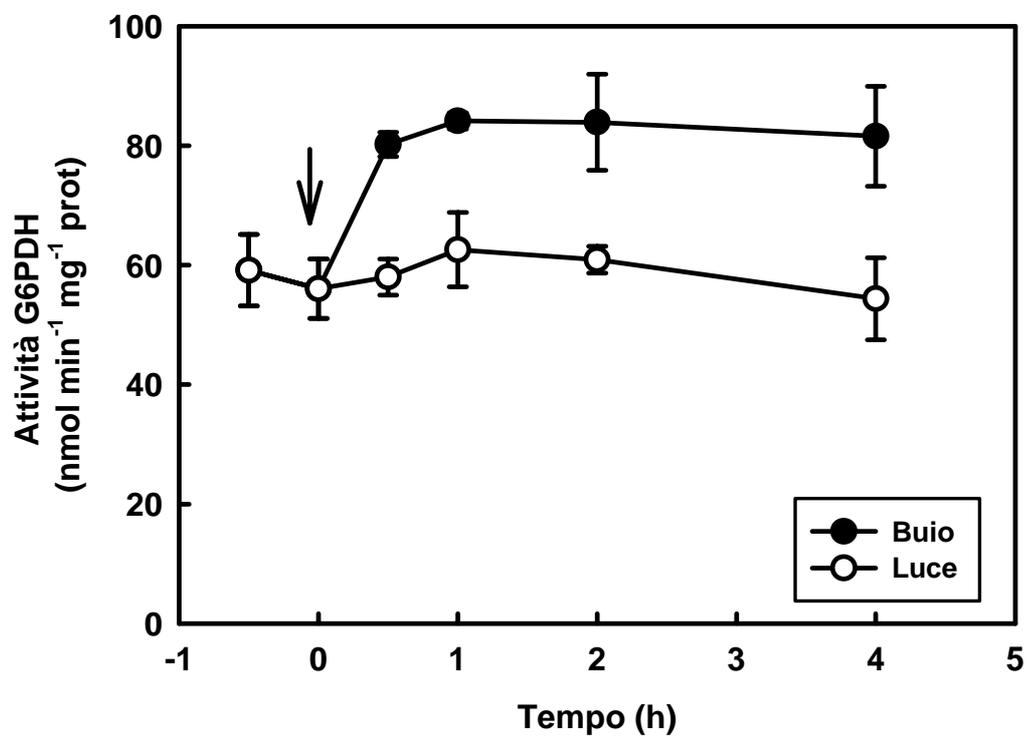


Figura 13 - Effetto del buio sull'attività G6PDH in *Chlorella*. La sospensione cellulare era posta in luce continua o al buio; i prelievi erano effettuati ai tempi indicati e veniva misurata l'attività G6PDH. La freccia indica l'inizio del periodo al buio.

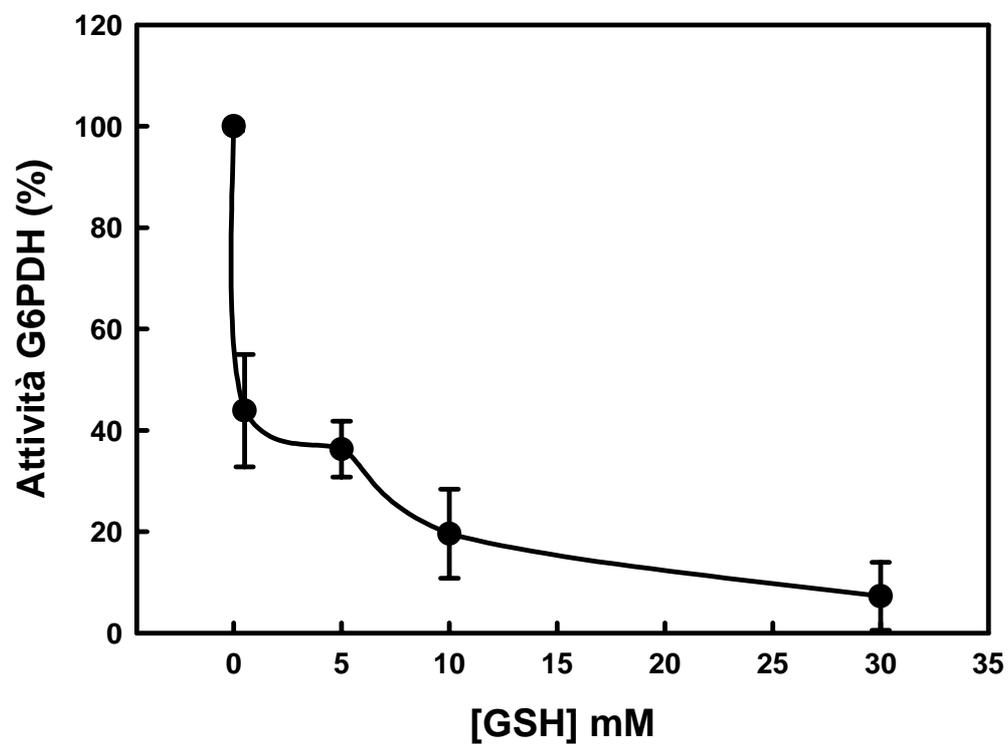


Figura 14 - Effetto del glutathione ridotto sull'attività della G6PDH purificata da *Chlorella sorokiniana*. I saggi di attività erano effettuati alle concentrazioni indicate di glutathione ridotto. L'attività G6PDH è espressa come percentuale rispetto al controllo (0 mM GSH). L'enzima purificato era incubato in presenza di glutathione ridotto a 25°C per 60 minuti.

Purificazione della G6PDH da Chlorella

La G6PDH era rapidamente purificata circa 90 volte da alghe cresciute sia in assenza che presenza d'azoto (Tabella 7); un unico picco d'attività era presente in seguito a cromatografia a scambio ionico su resina Q-Sepharose (Fig. 15).

L'elettroforesi denaturante degli estratti grezzi mostrava l'esistenza di una unica G6PDH di tipo P2 sia in alghe deprivate che sufficienti d'azoto; tale proteina corrispondeva a quella purificata e visualizzata dopo colorazione con nitrato d'argento (Fig. 16). Il peso molecolare stimato della subunità era 76 ± 2 kDa ($n=3$), suggerendo un peso complessivo dell'enzima di circa 304 kDa.

L'analisi Western blotting, condotta utilizzando anticorpi monoclonali in grado di discriminare le 3 isoforme G6PDH (Cy-G6PDH, P1-G6PDH, P2-G6PDH; Wendt et al. 2000) su gel nativi, confermava la presenza di una unica G6PDH che reagiva contro anticorpi anti-P2 da patata (Fig. 17, lane 4).

	Volum e totale	Protein e totali	Attivit à totale	Attività specific a	Res a	Fattore di purificazion e
Estratto grezzo	19	248	1601	6.5	100	1
Q- Sepharose	31	13.3	713	53.5	44.5	8.3
30- 70 % (NH ₄) ₂ SO ₄	7	0.68	382	562	23.8	87
Blue- Agarose	0.5	0.010	6	617	1.6	96

Tabella 7 - Tipico protocollo di purificazione della G6PDH da cellule di *Chlorella*. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

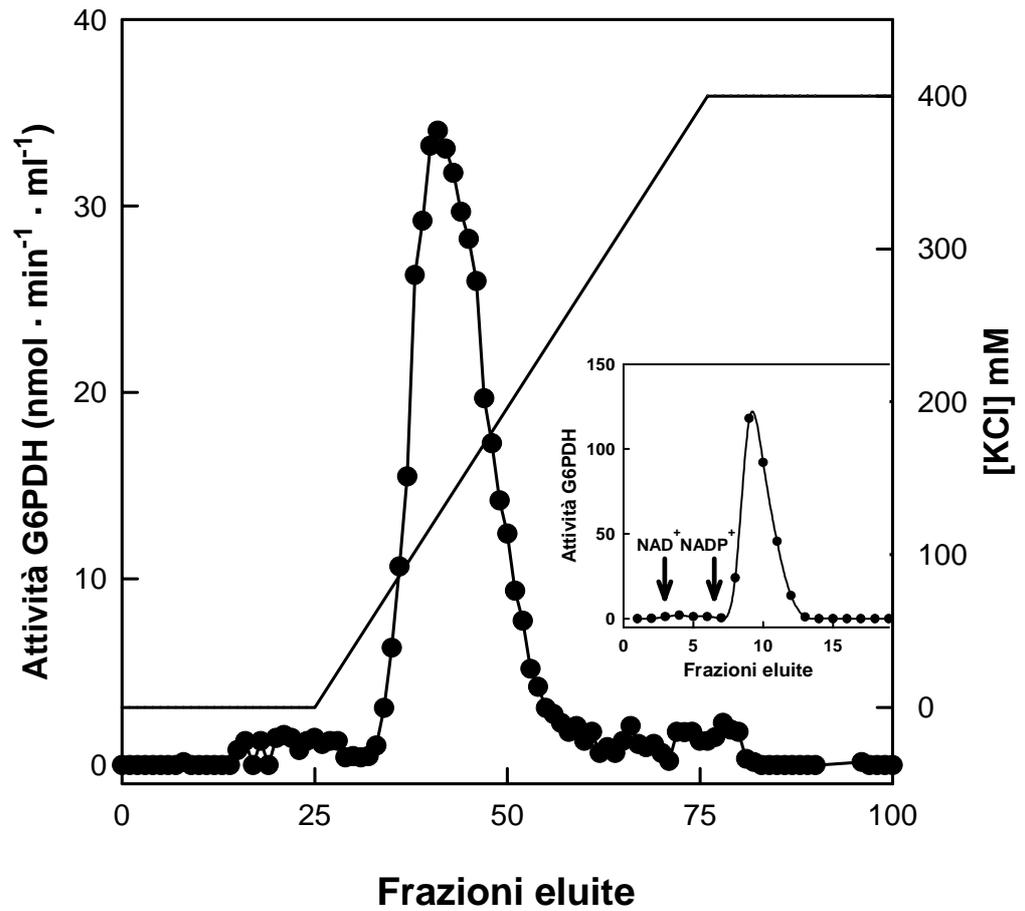


Figura 15 - Profilo di eluizione G6PDH da resina Q-Sepharose d'un estratto di *Chlorella* cresciuta in presenza di 10 mM KNO₃ per 24h. La linea continua indica il gradiente di KCl. Insetto: profilo di eluizione G6PDH delle frazioni raccolte e concentrate eluite da resina Blue-Agarose. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

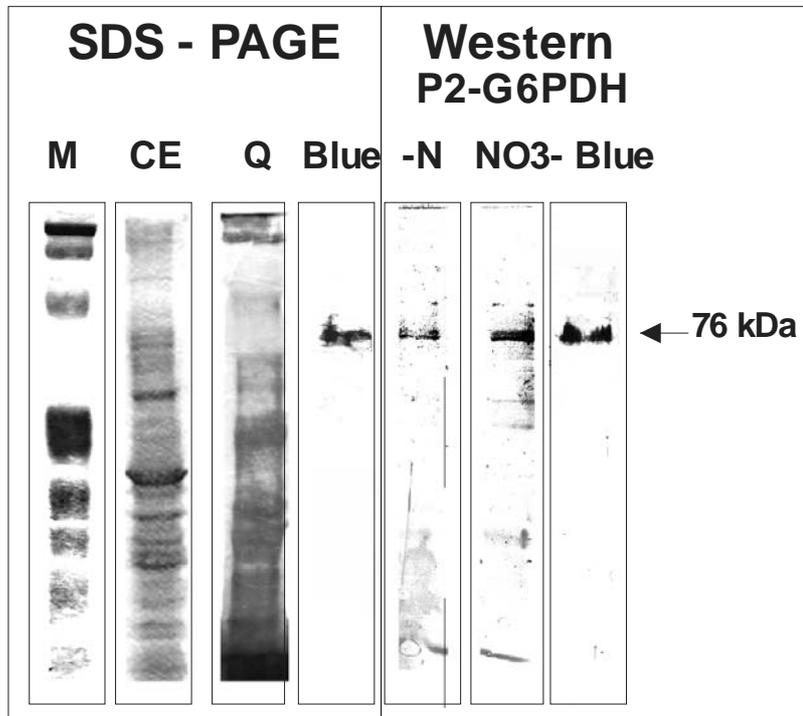


Figura 16 - SDS-PAGE e Western blots di estratti grezzi e purificati da *Chlorella*. Pannello SDS-PAGE: lane M, markers di peso molecolare noto; lane CE, estratto grezzo colorato con Coomassie; lane Q, frazioni Q-Sepharose colorate con nitrato d'argento; lane Blue, frazione purificata eluita da resina Blue-Agarose colorata con nitrato d'argento.

Pannello Western P2-G6PDH: lane -N, Western blot di estratti grezzi da alghe deprivate d'azoto; lane NO_3^- , Western blot di estratti grezzi da alghe cresciute su nitrato; lane Blue, Western blot della G6PDH purificata da alghe cresciute su nitrato. Il Western blotting era effettuato utilizzando anticorpi monoclonali specifici per l'isoforma P2-G6PDH da patata (Wendt et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

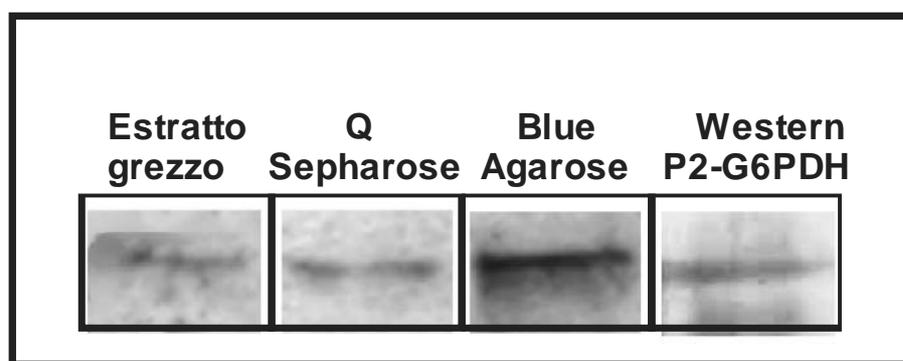


Figura 17 - Elettroforesi nativa delle diverse frazioni utilizzate per la purificazione della G6PDH da *Chlorella*. Lane 1, estratto grezzo; lane 2, frazioni raccolte e concentrate eluite da resina Q-Sepharose; lane 3, enzima purificato eluito da resina Blue-Agarose; lane 4, Western blot della G6PDH purificata. L'attività G6PDH era determinata con i sali di tetrazolio. Il Western blotting era effettuato utilizzando anticorpi specifici per l'isoforma P2-G6PDH da patata (Wendt et al. 2000). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

Caratteristiche cinetiche della G6PDH purificata da Chlorella

La G6PDH parzialmente purificata da cellule di *Chlorella* cresciute in condizioni di deprivazione d'azoto presentava un valore di K_{mG6P} di 0.29 mM (Tabella 8).

L'enzima purificato da cellule affamate d'azoto presentava una cinetica di saturazione di tipo iperbolico nei confronti del $NADP^+$ (non mostrato); il valore di K_m calcolato per il coenzima ossidato era di 9.37 μM .

L'inibizione da NADPH veniva misurata a differenti concentrazioni di $NADP^+$ (15, 30, 50 μM), variando la concentrazione di NADPH. Le rette in funzione di $1/V$ convergono tutte sul valore $-1/K_i$ che dava una K_{iNADPH} di 114.3 μM , in condizioni di assenza d'azoto (Tabella 8).

In cellule cresciute su nitrato, la K_{mG6P} era di 0.34 mM, la K_{mNADP^+} era di 9.25 μM , mentre la K_{iNADPH} diminuiva a 47.8 μM (Tabella 8). L'optimum di pH dell'enzima purificato da cellule deprivate d'azoto era 8.0 (Tabella 8).

	-N	NO ₃ ⁻
K _m G _{6P} (mM)	0.29 ± 0.04	0.34 ± 0.06
K _m NADP ⁺ (μM)	9.37 ± 2.1	9.25 ± 2.6
K _i NADPH (μM)	114.3 ± 11	47.8 ± 4
pH optimum	8.0	n.d.

Tabella 8 - Proprietà cinetiche della G6PDH purificata da *Chlorella* cresciuta in diversi regimi di nutrizione azotata. I valori sono la media di 3 determinazioni separate ± errore standard. Altri particolari in “Materiali e Metodi”.

Separazione dei cloroplasti da Chlorella

Il metodo di separazione messo a punto ha permesso di ottenere una rapida purificazione dei cloroplasti da cellule di *Chlorella*.

La resa dei cloroplasti presenti nella frazione plastidiale, misurata mediante l'attività della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi NADPH-dipendente (NADPH-GAPDH) era mediamente del 76%. Una ulteriore misura della resa dei cloroplasti era effettuata mediante la misura della clorofilla presente nella frazione cloroplastica rispetto a quella presente nell'estratto grezzo; in tal caso la resa dei cloroplasti era del 71%, un valore simile a quello calcolato per la NADPH-GAPDH.

La contaminazione citosolica era misurata mediante la fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPCasi) e la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi NADH-dipendente (NADH-GAPDH). La contaminazione citosolica risultava del 5.4% con la PEPCasi e del 3.3% con la NADH-GAPDH (Tabella 9). L'indagine al microscopio confermava i dati sull'integrità della preparazione degli organelli (Fig. 18). La preparazione dei cloroplasti presentava una contaminazione relativamente bassa di mitocondrii, tra il 5 e il 7 % (Tabella 9), mentre la contaminazione da parte dei microcorpi era inferiore al 10 % (non mostrato).

La frazione cloroplastica isolata da *Chlorella* mostrava una unica banda d'attività su gel nativo (PAGE nativa) e tale banda corrispondeva a quella evidenziata in estratti grezzi (Fig. 19). Non si evidenziavano altre bande colorate, con differente peso molecolare. Tali dati indicano pertanto una localizzazione cloroplastica della G6PDH purificata da cellule di *Chlorella*.

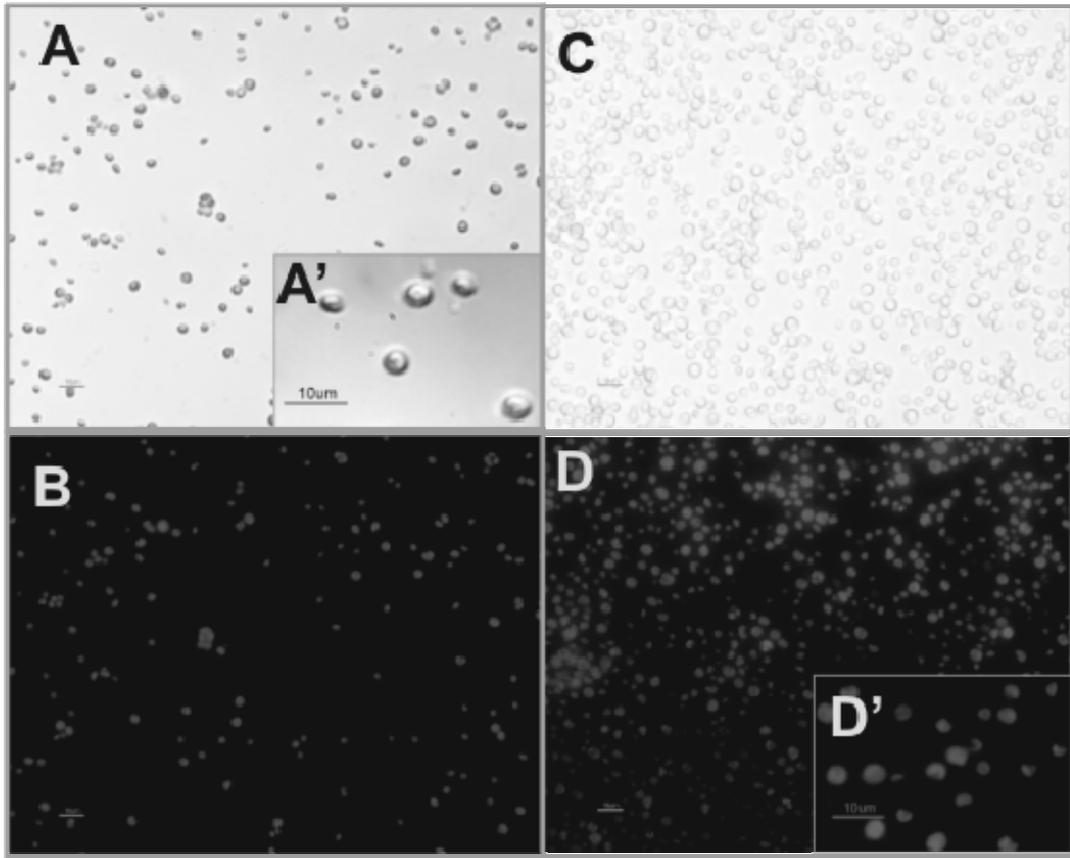


Figura 18 - Pannello a sinistra: cellule di *Chlorella* osservate al microscopio ottico. (A): cellule ad un ingrandimento 40x. (A'): cellule di *Chlorella* ad un ingrandimento 100x. (B): la stessa immagine osservata a fluorescenza, ingrandimento 40x. Pannello a destra: cloroplasti isolati da *Chlorella* al microscopio ottico (A) e la stessa immagine osservata a fluorescenza (B). Ingrandimento 40x. (B'): cloroplasti di *Chlorella* ad un ingrandimento 100x.

	G6PDH	NADH- GAPDH (Citosol)	PEPCasi (Citosol)	NADPH- GAPDH (Clor.)	Clorofilla (Clor.)	Cit c ox (Mitoc.)	Fumarasi (Mitoc.)
Estratto Grezzo	169	1041	73	13794	1731	1926	146
Pellet (Clor.)	122 (72 %)	35 (3.3 %)	4 (5.4 %)	10503 (76 %)	1230 (71 %)	135 (7 %)	6.8 (4.6 %)

Tabella 9 - Distribuzione delle attività degli enzimi marker degli organelli nelle frazioni ottenute durante l'isolamento dei cloroplasti da *Chlorella*. Le attività sono espresse come attività totali misurate in ogni frazione. I valori in parentesi rappresentano la percentuale di attività ritrovata nella frazione plastidale rispetto all'estratto grezzo. Lo schema è rappresentativo di una preparazione tipica da alghe cresciute in condizioni ottimali. Altri particolari in "Materiali e Metodi".

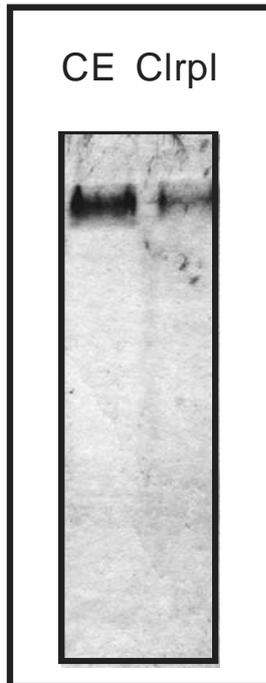


Figura 19 - Gel nativo colorato per l'attività della G6PDH di un estratto grezzo e della frazione cloroplastica di *Chlorella* (CE= estratto grezzo, Clrpl= cloroplasti). Altri particolari in "Materiali e Metodi".

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; contengono inoltre azoto 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, NO_3^- e l'ammonio, NH_4^+) che 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. L'assimilazione dell'ammonio nelle piante superiori ha luogo tramite le azioni sequenziali degli enzimi glutammina sintetasi e glutammato sintasi.

Le fonti di ammonio possono essere costituite dalla riduzione assimilativa del nitrato, dall'assorbimento di ammonio dal terreno, dalla fotorespirazione o da processi metabolici secondari, come il catabolismo amminoacidico. L'azione concertata degli enzimi coinvolti nell'assunzione ed organizzazione dell'azoto ha come risultato la formazione di molecole organiche

atte ad essere utilizzate, trasferite oppure ad essere accumulate in tessuti di riserva. Infatti le molecole contenenti azoto vengono trasportate verso le foglie ove vengono utilizzate direttamente o indirettamente per la sintesi di tutti gli altri amminoacidi essenziali per la fabbricazione delle proteine vegetali.

Nelle piante superiori esistono due tipi di GOGAT: una Fd-GOGAT ed una NADH-GOGAT. Tali isoforme hanno peso molecolare diverso e sono immunologicamente distinte. La Fd-GOGAT è presente in prevalenza nei tessuti verdi, mentre la NADH-GOGAT prevale nelle radici. L'isoforma Fd-dipendente gioca un ruolo fondamentale nella riassimilazione dell'ammonio fotorespiratorio (Chen et al. 1990) e rappresenta l'ultimo enzima coinvolto nell'assimilazione del nitrato nelle piante superiori.

E' interessante notare come la somministrazione di nitrato provochi un accumulo dell'mRNA codificante per la Fd-GOGAT e come l'aggiunta di differenti concentrazioni di nitrato non influenzi l'attività e la quantità di proteina in piante di riso (Mattana et al. 1996).

La risposta della Fd-GOGAT al nitrato è rapida e transitoria: si ha un effetto induttivo sull'attività specifica ed esperimenti condotti con la [³⁵S] metionina mostrano il coinvolgimento dello ione nella sintesi *de novo* della proteina. La quantità totale di proteina Fd-GOGAT tuttavia non aumenta, e ciò suggerisce la presenza d'un meccanismo regolante la traduzione e l'attività dell'enzima preesistente (Mattana et al. 1996).

Nei tessuti verdi vi è una maggiore attività di Fd-GOGAT, che però non sembra essere dipendente dalla nutrizione azotata nelle foglie delle piante di soia

(Turano e Muhitch, 1999), anche se un lieve aumento è stato registrato in riso cresciuto con nitrato (Mattana et al. 1996).

Nelle radici di soia l'attività Fd-GOGAT è molto bassa (Turano e Muhitch, 1999); similmente in orzo le attività Fd-GOGAT nella radice sono più basse di quelle misurate nei tessuti verdi, e la nutrizione azotata non sembra influenzare in modo sostanziale l'attività enzimatica, ad eccezione di un lieve aumento nelle piante cresciute su ammonio.

L'analisi Western utilizzando anticorpi per la Fd-GOGAT da orzo (Pajuelo et al. 2000) ha confermato i dati di attività: nelle foglie di orzo si rilevava la presenza di una proteina del peso molecolare di 176 kDa, identificabile con la Fd-GOGAT; le attività Fd-GOGAT misurate nelle foglie crescevano in condizioni di nutrizione azotata in corrispondenza all'aumento dei livelli di proteina misurati con l'analisi Western.

Questi dati rispecchiano il comportamento descritto in precedenza: l'attività nelle radici di soia con ammonio aumenta di 14 volte rispetto a quella di radici cresciute in un terreno privo di azoto (Turano e Muhitch, 1999).

Le foglie di piante di soia cresciute al buio e trattate con diverse fonti azotate mostrano un aumento parallelo di proteina ed mRNA per la NADH-GOGAT, mentre l'attività di questa isoforma non sembra modulata dalla luce (Turano e Muhitch, 1999). L'attività NADH-GOGAT nelle foglie di orzo aumenta di circa due volte in presenza di ammonio, anche se comunque le attività NADH-dipendenti nei tessuti fotosintetici sono sensibilmente più basse rispetto alle radici, confermando l'ipotesi che la NADH-GOGAT è la principale

isoforma nelle radici, mentre giocherebbe un ruolo secondario nelle foglie (Turano e Muhitch, 1999).

Nelle piante superiori la maggior parte dell'attività NADH-GOGAT è confinata nelle radici per l'assimilazione primaria dell'azoto; circa l'85% dell'attività GOGAT è dovuta all'attività piridin nucleotide-dipendente (Lea e Mifflin, 1980). Ciò nonostante, l'attività NADH-GOGAT è stata osservata nei tessuti verdi, particolarmente nelle foglie in via di sviluppo, per la riassimilazione della glutammina dagli elementi del cribro (Lea e Mifflin, 1980; Ishiyama et al. 2003).

L'attività NADH-GOGAT aumentava considerevolmente quando alle radici era fornito azoto inorganico: con nitrato si osservava un incremento di 2.5 volte in 24 h, mentre l'aumento era di circa 6 volte con ammonio a 3 giorni dall'aggiunta.

Nelle radici di riso l'ammonio induceva l'espressione della NADH-GOGAT in 3-6 ore e la proteina era identificabile dopo 24h (Hirose et al. 1997; Ishiyama et al. 2003); tale effetto non è direttamente indotto dall'ammonio, ma probabilmente da uno dei suoi derivati (Ishiyama et al. 2003).

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. Il suo ruolo principale è quello di generare potere riducente sottoforma del

coenzima ridotto NADPH. E' necessario ricordare che questo ciclo è utilizzato anche per la produzione d'intermedi carboniosi: infatti in tutti gli organismi il ribosio è necessario alla biosintesi degli acidi nucleici, inoltre negli organismi vegetali c'è anche il fabbisogno d'una grande quantità di eritrosio-4-fosfato per la biosintesi degli amminoacidi aromatici e delle clorofille (Vance, 2000).

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

Ci sono evidenze che la via OPPP possa 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'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.

L'aumento dell'attività G6PDH in seguito all'aggiunta d'azoto è dovuto in parte all'aumento dell'attività dell'isoforma citosolica ed in parte alla comparsa dell'isoforma plastidiale (Esposito et al. 2001b),

L'isolamento dei plastidi da radice e l'accurato calcolo delle contaminazioni ha consentito la stima della percentuale di G6PDH presente nei plastidi con ammonio e nitrato. La percentuale di G6PDH plastidiale nelle radici è il 25% con nitrato ed il 14% con ammonio, molto probabilmente per la maggiore richiesta di elettroni necessari per l'assimilazione del nitrato dovuta all'induzione del sistema nitrato/nitrito reductasi (Wright et al. 1997). Tali risultati sono ulteriormente confermati dal calcolo delle percentuali delle eluizioni cromatografiche relative all'isoforma citosolica e plastidiale: nelle radici con ammonio la G6PDH plastidiale era il 17% sette giorni dopo l'aggiunta di ammonio al terreno di coltura (Esposito et al. 2001a).

Nelle radici di orzo cresciuto in assenza di azoto, la P2-G6PDH era assente (Esposito et al. 2001b): non era possibile purificare l'isoforma, né questa era rilevabile mediante gli anticorpi specifici negli estratti grezzi (Esposito et al. 2001b, 2003, 2005a). Inoltre l'ammonio causava un aumento dell'attività citosolica del 50%, mentre l'attività P2-G6PDH aumentava del 14%; ciò suggerisce una sintesi aumentata di asparagina e glutammina che sono infatti

immediatamente traslocate alle parti aeree della pianta tramite il flusso xilematico (Rigano et al. 1996a, b). Nelle radici di piante cresciute con nitrato si osserva la comparsa della P2-G6PDH che rappresenta il 25% dell'attività totale mentre l'attività dell'isoforma citosolica aumenta del 36%. Tali dati suggeriscono che il controllo da parte del sistema NR/NiR sui processi metabolici cellulari sia operante anche sulla via del pentoso fosfato .

L'OPPP plastidiale garantisce il rifornimento di potere riducente nelle radici per la produzione di glutammato, mentre l'attività e proteina Fd-GOGAT non variavano durante l'assimilazione dell'azoto. Al contrario, l'induzione dell'attività NADH-GOGAT è correlata alla sintesi *de-novo* dell'enzima: in seguito all'inibizione della sintesi proteica con cicloesimide, si assiste ad un mancato aumento dell'attività NADH-GOGAT. L'attività G6PDH rimaneva a livelli basali in presenza di inibitori della sintesi proteica, evidenziando un lento turnover dell'enzima: dati preliminari di sequenziamento suggeriscono la possibilità che l'isoforma citosolica sia bloccata all'N-terminale (dati non mostrati).

Nelle foglie l'attività NADH-GOGAT era considerevolmente più bassa rispetto alle radici, e inoltre non si osservavano variazioni nell'attività sia in presenza di ammonio che di nitrato. Un aumento della Fd-GOGAT veniva misurato nelle foglie: l'attività dell'enzima raddoppiava con ammonio dopo 1 giorno, mentre con nitrato aumentava del 50%, 3 giorni dopo l'aggiunta della fonte azotata.

E' interessante notare come l'aumento dell'attività Fd-GOGAT non sia accompagnato da variazioni nella quantità di proteina (Mattana et al. 1996): l'ammonio provocava un aumento del trascritto dopo un giorno, soltanto nelle foglie. Nelle piante d'orzo, le attività GOGAT e la proteina Fd-GOGAT, ritornavano ai livelli basali in 7-10 giorni sia con ammonio che con nitrato, suggerendo il raggiungimento d'un nuovo stato metabolico nelle cellule fotosintetiche.

L'espressione della Fd-GOGAT è indotta dalla luce in mais (Suzuki et al. 2001), *A. thaliana* (Ziegler et al. 2003), orzo (Pajuelo et al. 1997) e tale effetto può essere mimato dalla luce rossa (Suzuki et al. 2001; Ziegler et al. 2003), e/o dal saccarosio (Ziegler et al. 2003); tali risultati supportano l'ipotesi secondo cui la luce non è l'effettore primario sull'espressione della Fd-GOGAT (Pajuelo et al. 1997).

Foglie eziolate di orzo esposte alla luce mostravano un forte aumento dell'attività Fd-GOGAT nelle prime 5h; l'effetto massimo era raggiunto quando erano presenti sia la luce che la fonte azotata. Non si osservavano variazioni nei livelli di proteina Fd-GOGAT dopo l'illuminazione nei Western blots, suggerendo l'esistenza di un livello basale di proteina nelle foglie eziolate, pronta ad essere attivata in seguito ad illuminazione.

E' quindi possibile ipotizzare uno schema generale per l'interrelazione tra le attività delle due forme compartimentate della G6PDH e le isoforme Fd-dipendente e NADH-dipendente della GOGAT.

Nelle radici l'isoforma GOGAT preponderante sembra essere l'isoforma NADH-dipendente, la cui attività è fortemente aumentata dalla presenza di azoto; la maggiore attività misurata in presenza di ammonio può essere dovuta alla completa derepressione dell'enzima, la cui attività è modulata dal sistema nitrato reductasi/nitrito reductasi in presenza di NO_3^- . In tali condizioni, il potere riducente nei tessuti eterotrofi viene senz'altro fornito dall'attività della P2-G6PDH, la cui presenza viene anch'essa indotta dall'azoto, con ogni probabilità sotto lo stimolo di elevati livelli di glutammina nel tessuto (Esposito et al. 2001b).

Nelle foglie non si notavano variazioni apprezzabili nei livelli di NADH-GOGAT all'aggiunta di azoto, parallelamente alla presenza costitutiva della P2-G6PDH; le isoforme NADH-GOGAT e P2-G6PDH sarebbero così strettamente correlate tra loro in base alla richiesta di potere riducente, come proposto nelle radici.

Nelle foglie la P1-G6PDH, la cui espressione sembra in qualche modo regolata dalla luce (Wendt et al. 2000), era presente a livelli costitutivi, apparentemente non influenzati dalla nutrizione azotata in piante -N e con nitrato, ma si evidenziava invece un sensibile aumento di proteina nelle foglie di piante cresciute su ammonio: tale isoforma avrebbe così un ruolo nel fornire potere riducente per la Fd-GOGAT. Quindi una correlazione tra l'attività della P1-G6PDH e la Fd-GOGAT sembra essere probabile nelle fasi di buio, quando l'arresto della fotosintesi, che produce i riducenti per l'assimilazione dell'azoto, coincide con alti livelli di ammonio provenienti sia dalla fotorespirazione che dai

processi deamminativi a carico della glutammina e dell'asparagina, le due ammidi che rappresentano i principali vettori di azoto dalla radice alla foglia in orzo (Rigano et al. 1996).

Le caratteristiche cinetiche delle isoforme della G6PDH confermano queste ipotesi: la P2-G6PDH è molto meno sensibile agli alti livelli di NADPH rispetto all'isoforma P1-G6PDH; in effetti nelle radici durante l'assimilazione dell'azoto sono stati misurati livelli elevati di NADPH ed un alto rapporto NADPH/NADP⁺ (Wright et al. 1997).

Nelle foglie sembrerebbe essere presente un livello costitutivo di NADH-GOGAT, la cui attività sembra essere in connessione con la presenza della P2-G6PDH; probabilmente questo sistema garantisce una attività basale di assimilazione dell'azoto.

Durante la fase fotosintetica si ha l'induzione della Fd-GOGAT (Turano e Muhitch, 1999) e il potere riducente che si rende necessario per la riassimilazione dell'azoto durante il ciclo fotorespiratorio è evidentemente fornito dal sistema di trasporto degli elettroni fotosintetico. Durante il periodo di buio gli alti livelli di azoto verrebbero smaltiti utilizzando sia la NADH-GOGAT, nella prima fase di transizione luce-buio, quando il rapporto NADPH/NADP⁺ è ancora elevato, sia la Fd-GOGAT insieme alla P1-G6PDH nelle fasi successive di oscurità, quando i livelli di riducenti tendono a scendere a livelli che non interferiscono con la attività della isoforma cloroplastica.

Quindi, nelle foglie sarebbero presenti due modelli per l'assimilazione dell'azoto, il primo, che è presente anche nelle radici, prevede una attività

NADH-GOGAT associata all'isoforma P2-G6PDH, la quale è sensibile alla nutrizione azotata, ed è in grado di sopportare alti livelli di riducenti nel plastidio; il secondo, che prevede il coordinamento delle attività Fd-GOGAT e P1-G6PDH, servirebbe a sostenere l'assimilazione dell'azoto nella foglia durante il periodo di buio; l'attività di questi enzimi sembra essere più genericamente controllata dalla luce, che influenza l'espressione di entrambe le proteine, e dalla corrente traspiratoria.

L'isoforma citosolica, invece, non sembra essere direttamente influenzata dallo stato azotato: è coinvolta nell'omeostasi e nel metabolismo basale cellulare (Kruger e von Schaewen, 2003). Come recentemente evidenziato, l'isoforma citosolica sembra essere regolata dal glucosio, indicando un coinvolgimento nel complesso meccanismo dello "sugar-sensing" (Hauschild e von Schaewen, 2003).

Piante d'orzo cresciute in presenza di azoto inorganico come ammonio o nitrato mostrano una attività totale della G6PDH nelle radici doppia rispetto a quella misurata nelle piante di controllo cresciute in assenza di azoto: in tal modo viene attivata la sintesi di glutammato ed aumenta pertanto il consumo (e di conseguenza la richiesta) di potere riducente. Nelle foglie di orzo non si misurano variazioni evidenti nell'attività totale della G6PDH.

In particolare, la stretta connessione tra il ciclo OPPP ed il ciclo GS/GOGAT è dimostrata dalla dipendenza della sintesi di glutammato (da parte della GOGAT) dall'ossidazione del glucosio 6P (Bowsher et al. 1992; Esposito et al. 2003). In particolare, grande importanza è stata attribuita alla implicazione

della fase ossidativa del ciclo nell'assimilazione dell'azoto, poiché costituisce la via primaria di produzione di potere riducente sia per la NiR (Oji et al. 1985; Bowsher et al. 1992), che per la GOGAT (Bowsher et al. 1992; Esposito et al. 2003).

Nei plastidi delle radici delle piante superiori la via ossidativa del pentoso fosfato fornisce il potere riducente per la nitrito riduttasi (Bowsher et al. 1989) e per la glutammato sintasi (Bowsher et al. 1992; Esposito et al. 2003). E' possibile che le due reazioni competano l'un con l'altra per gli equivalenti di riduzione generati durante l'ossidazione dei carboidrati: una molecola e mezza di glucosio-6P per molecola di nitrito ridotta deve essere ossidata contro la mezza molecola di glucosio-6P necessaria per ogni reazione GOGAT. Studi ulteriori contribuiranno a comprendere la risposta dell'OPPP nella ripartizione del potere riducente per la NiR e la GOGAT.

La stretta interazione tra OPPP ed assimilazione dell'azoto nelle radici di orzo è confermata dagli esperimenti con inibitori. La metionina sulfoximina, un inibitore specifico della glutammina sintetasi, blocca la formazione della glutammina, annullando di conseguenza anche in presenza di ammonio l'aumento dell'attività della G6PDH (Esposito et al. 1998); inoltre la somministrazione di azaserina (inibitore della GOGAT) a plastidi isolati blocca la sintesi di glutammato dipendente dal glucosio-6P e dal ribosio-5P negli organelli (Esposito et al. 2003), favorendo l'ipotesi che gran parte dell'attivazione della G6PDH in presenza di azoto sia dovuta all'aumento di potere riducente richiesto dalla via GS/GOGAT (Esposito et al. 2001a).

Nelle radici di orzo è stato dimostrato che, in presenza dei substrati della GOGAT, i plastidi isolati erano in grado di sintetizzare glutammato solo in presenza di glucosio-6P o di ribosio-5P, provando l'esistenza d'un OPPP completo nei plastidi della radice (Esposito et al. 2003).

La comparsa dell'isoforma P2-G6PDH dopo l'aggiunta di ammonio ne dimostra un coinvolgimento diretto nella produzione di potere riducente per la GOGAT nelle radici. L'analisi Western utilizzando anticorpi specifici per le isoforme plastidiale e cloroplastica della G6PDH suggerisce che nelle radici la presenza della isoforma P2-G6PDH è strettamente dipendente dalla nutrizione azotata, mentre non è presente la P1-G6PDH.

Nelle foglie la situazione sembra essere più articolata. Infatti un livello basale costitutivo di P2-G6PDH è sempre presente in tutte le condizioni di nutrizione azotata, mentre l'isoforma P1-G6PDH è dipendente dalla fonte di azoto: in presenza di ammonio si ha una netta prevalenza dell'isoforma P1-G6PDH, mentre minore sembra la quantità di proteina P1-G6PDH rilevabile in condizioni di assenza di azoto e presenza di nitrato.

La G6PDH delle piante superiori mostra una struttura omotetramerica con peso molecolare variabile tra i 200 e i 260 kDa (Hong e Copeland, 1991; Schnarrenberger et al. 1973; Graeve et al. 1994; Fickenscher e Scheibe, 1986): nell'orzo la G6PDH da plastidi di radice mostra un peso molecolare di 264 kDa, mentre nei cloroplasti il peso molecolare è stimato intorno ai 244 kDa.

Numerosi sono gli studi effettuati sull'isoforma cloroplastica (Schnarrenberger et al. 1973; Anderson et al. 1974; Srivastava e Anderson 1983;

Fickenscher e Scheibe, 1986; Bredemeijer e Esselink 1995), mentre pochi sono quelli sull'isoforma compartimentata in tessuti eterotrofi vegetali (Wright et al. 1997; Esposito et al. 2001a, Esposito et al. 2003): il principale impedimento è rappresentato dalle difficoltà nell'isolamento di plastidi dalle radici e da altri tessuti non fotosintetici (Tetlow et al. 1993).

L'isolamento dei plastidi dalle radici presenta una serie di difficoltà dovute alla maggiore fragilità di questi organelli rispetto ai cloroplasti fogliari; nei tessuti non fotosintetici, infatti, i granuli di amido rappresentano un serio ostacolo alle alte rese di isolamento, in quanto l'involucro plastidiale si rompe facilmente, anche a basse velocità, durante le centrifugazioni (Emes ed England 1986; Tetlow et al. 1993).

L'attività della G6PDH nei plastidi è strettamente influenzata dal rapporto intraplastidiale NADPH/NADP⁺ (Wright et al. 1997): i dati mostrati dimostrano che a differenza della isoforma cloroplastica, quella plastidiale è caratterizzata da un'alta tolleranza al NADPH, con una K_i NADPH intorno a 60 μ M. L'isoforma plastidiale permette quindi un'efficiente sintesi di glutammato anche in presenza di alti rapporti NADPH/NADP⁺ (Esposito et al. 2003); mentre l'isoforma cloroplastica sembra essere più sensibile di quella plastidiale al nucleotide ridotto, con una K_i NADPH intorno a 14 μ M (Wendt et al. 2000).

La elevata tolleranza dell'isoforma P2-G6PDH nei confronti del NADPH risolve almeno in parte uno dei principali quesiti sulla regolazione della via del pentoso fosfato nei tessuti vegetali, ed in particolare di quelli non fotosintetici: la capacità cioè della G6PDH compartimentata di sostenere l'alta richiesta di

NADPH per il metabolismo azotato durante la sintesi del glutammato, pur essendo fortemente inibita dal coenzima ridotto.

Queste differenze nella regolazione sono state confermate da studi di biologia molecolare: sono state isolate differenti sequenze di cDNA codificanti per l'isoforma citosolica, cloroplastica e plastidiale della G6PDH da patata (*S. tuberosum*) (Wendt et al. 2000).

L'isoforma P2-G6PDH è localizzata nei plastidi, sia fotosintetici (dove è presente insieme alla isoforma P1-G6PDH) sia in quelli non fotosintetici (dove rappresenta l'unica G6PDH compartimentata). L'enzima presenta una sequenza caratteristica all'estremità N-terminale codificante per un peptide di transito per i cloroplasti.

Lo studio della regolazione della P1-G6PDH ha portato ad individuare una coppia di cisteine (Cys¹⁴⁹/Cys¹⁵⁷) presenti in prossimità dell'N-terminale della proteina come le possibili candidate alla regolazione redox dell'enzima in patata. Da notare che l'inserimento di un loop amminoacidico contenente questa coppia di cisteine nell'isoforma citosolica (Wenderoth et al. 1997) non è sufficiente ad attribuire la regolazione da tioredossine. Inoltre la P2-G6PDH presenta ugualmente queste due cisteine (Wendt et al. 2000) anche se in vitro sembra essere inibita nei cloroplasti solo al 50% dal sistema Fd/Tr (Wendt et al. 2000; Esposito e al. 2001).

Le piante terrestri nascono e si sviluppano su terreni nei quali la salinità costituisce un importante fattore limitante. I principali responsabili dello stress salino sono: scarsità di precipitazione, eccessiva evaporazione e traspirazione,

acque di irrigazione ad elevato contenuto di sali. In particolare, i sali che maggiormente possono interferire con le normali funzioni delle piante sono calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), solfato (SO_4^{2-}) e cloruro di sodio.

Quest'ultimo, se presente ad elevate concentrazioni, può ridurre la porosità del suolo con drammatiche ripercussioni sul grado di imbibizione dell'acqua; in tal caso, si modificano anche i gradienti di potenziale idrico tra radice e suolo con ovvie conseguenze per le piante. Tuttavia, alcune piante, dette alofite, hanno sviluppato in generale una moderata tolleranza agli stress salini.

Nel grano lo stress salino induce l'espressione di alcuni geni detti WESR (Wheat Early Salt Responding) e tra questi il frammento di cDNA detto WESR5 mostra omologia di sequenza con il gene della G6PDH (Nemoto e Sasakuma, 1999; 2000). Sono stati isolati cloni di cDNA codificanti per la G6PDH tramite l'uso di WESR5 come sonda e sono stati ottenuti tre cloni: Tagpd1, Tagpd2 e Tagpd3 codificanti per tre polipeptidi avente peso molecolare di 57.7 kD (Nemoto e Sasakuma, 2000). Tali cloni di cDNA, facevano supporre che codificassero per l'isoforma citosolica dell'enzima, mancando della sequenza di transito plastidiale (Wenderoth et al. 1997).

Nel grano durante le prime 2h di trattamento con NaCl si aveva una rapida induzione della trascrizione della G6PDH che raggiungeva un picco a 12h. Queste evidenze sperimentali suggeriscono un coinvolgimento della via del pentoso fosfato nelle prime fasi di risposta e/o adattamento allo stress da parte delle piante.

Piante di orzo cresciute in presenza di nitrato mostrano, dopo un solo

giorno dall'aggiunta della sostanza, un'attività della G6PDH nelle radici aumentata di circa il 70 %, rispetto a quella misurata nelle piante di controllo cresciute in assenza di azoto.

L'aggiunta di cloruro di sodio al terreno di coltura provocava un raddoppio dell'attività della G6PDH nelle radici, indipendentemente dall'aggiunta di nitrato mentre nelle foglie non si verificavano variazioni apprezzabili dell'attività G6PDH nelle differenti condizioni nutrizionali di coltura.

Questo suggerisce che lo stress salino induce un incremento dell'attività della G6PDH che esula dai normali meccanismi di regolazione presenti nelle condizioni fisiologiche.

Nelle radici di piante di orzo cresciute in assenza di azoto in condizioni di stress salino si verifica un incremento più rapido e più elevato dell'attività G6PDH; poichè l'unica isoforma purificabile da tali tessuti è quella citosolica, si può ipotizzare che il metabolismo citoplasmatico venga influenzato dallo stress salino. Quindi, in condizioni di stress salino l'attività citosolica della G6PDH aumenterebbe per formare, attraverso la via del pentoso fosfato, precursori o cofattori atti a determinare la tolleranza al sale.

Bisogna inoltre ricordare che la Cy-G6PDH aumenta durante la crescita indotta dalla nutrizione azotata; il maggiore incremento dell'attività della G6PDH citosolica è dovuta con ogni probabilità alla totale derepressione del gene WESR5 che nel grano è localizzato sul cromosoma 2B (Nemoto e Sasakuma 1999; 2000; Wendt et al. 2000), ulteriori studi molecolari sono

necessari per indagare le modalità di regolazione di questo enzima in condizioni di stress salino.

Gli effetti nelle prime fasi dello stress salino sull'attività della G6PDH sono più evidenti sull'apparato radicale che non nelle foglie, quindi, per studiare meglio gli effetti dello stress salino, le isoforme G6PDH sono state purificate dalle radici di orzo cresciuto in diverse condizioni di nutrizione azotata in presenza o meno di stress salino.

Innanzitutto è stato confermato che nelle radici di orzo cresciute in assenza di azoto era presente una sola isoforma della G6PDH (Esposito et al. 2001b), 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) e i parametri cinetici erano simili a quelli misurati per la Cy-G6PDH in altre piante (Fickensher e Scheibe 1986; Graeve et al. 1994) e coincidenti con quelli misurati in una varietà di orzo lievemente differente (Esposito et al. 2001a).

L'isoforma citosolica purificata da radici di piante cresciute in assenza d'azoto e presenza di sale mostrava un leggero abbassamento del valore di K_{mG6P} rispetto al controllo cresciuto solo in assenza di azoto: la K_{mG6P} passava da 0.36 a 0.25 mM, mentre la K_{iNADPH} non subiva sostanziali variazioni, poiché mostrava un valore di 13 μ M, coincidente a quello misurato per le radici -N (15.5 μ M).

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 Cy-G6PDH. Questa

isoforma reagiva specificamente contro gli anticorpi per l'isoforma plastidiale di patata (P2-G6PDH, Wendt et al. 2000). L'isoforma plastidiale era caratterizzata da una minore affinità per il G6P (la $K_{m_{G6P}}$ è compresa fra 0.68-0.87 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 circa 30-50 μ M.

L'isoforma citosolica da piante cresciute su nitrato presentava parametri cinetici pressochè identici all'unica G6PDH parzialmente purificata nelle radici cresciute senza azoto ($K_{m_{G6P}}$ 0.34 mM; $K_{m_{NADP^+}}$ 14 μ M; $K_{i_{NADPH}}$ 19.8 μ M).

Lo stress salino non provocava sostanziali variazioni nel valore di $K_{m_{G6P}}$ della P2-G6PDH: la costante restava compresa intorno a 0.68-0.74 mM.

Lo stress salino provocava la diminuzione dei valori di $K_{m_{G6P}}$ per la P2-G6PDH in presenza di ammonio: la $K_{m_{G6P}}$ diminuiva drasticamente, passando da 0.87 a 0.28 mM.

L'isoforma citosolica subiva, come già osservato nelle piante -N, un abbassamento del valore di $K_{m_{G6P}}$ che scendeva a 0.20-0.25 mM; soprattutto l'isoforma citosolica mostrava un'aumento della tolleranza al NADPH in condizioni di stress, con i valori di $K_{i_{NADPH}}$ che aumentavano a circa 30-58 μ M con nitrato ed ammonio rispettivamente.

L'isoforma plastidiale diviene molto più affine al substrato glucosio-6P, per incrementare la richiesta di potere riducente in condizioni di stress: nel plastidio il coinvolgimento di questa isoforma nelle biosintesi è stato più volte dimostrato (Bowsher et al. 1992; Esposito et al. 2003; Kruger e von Schaewen, 2003) e recentemente l'aumento della attività della P2-G6PDH è stato messo in

relazione con lo stress luminoso in spinacio (Debnam et al. 2004). Inoltre, l'attività di questa isoforma in condizioni di stress, è particolarmente favorita data la sua grande tolleranza agli alti valori di potere riducente presenti nelle cellule vegetali in condizioni di stress sia nutrizionale (Wright et al. 1997; Esposito et al. 2003) che fotosintetico (Debnam et al. 2004).

L'isoforma citosolica non solo aumenta la sua affinità per il glucosio-6P, soprattutto incrementa in maniera consistente il valore di K_{iNADPH} fino a raggiungere, sotto stress salino, alti valori comparabili a quelli dell'isoforma plastidiale.

Questi dati suggeriscono che lo stress salino provoca una sensibile diminuzione dell'effetto inibente del NADPH sulle attività della G6PDH; poiché tali variazioni sono state osservate su isoforme purificate che non mostrano variazioni evidenti del peso molecolare, né della specificità verso gli anticorpi monoclonali, si può supporre che i(1) meccanismo(i) coinvolti in tali variazioni debbano essere ipotizzati nell'ambito di modificazioni della struttura enzimatica quali una diversa conformazione dipendente dallo stato redox;; sblocco dell'N-terminale dell'isoforma citosolica che normalmente appare bloccato (S. Esposito, comunicazione personale); azione dei livelli di glucosio libero citoplasmatici, per l'isoforma citosolica (Hauschild e von Schaewen, 2003), e fosforilazione della P2-G6PDH come recentemente proposto per le isoforme G6PDH di tabacco (Debnam et al. 2004).

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 gels nativi colorati per l'attività G6PDH (Esposito et al. 2005b). Queste osservazioni contrastano con il dato calcolato in funzione dei 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): 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.

Il protocollo di purificazione utilizzato consentiva la separazione di una singola G6PDH in *Chlorella*, a differenza delle radici di orzo (Esposito et al. 2001; 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. 2005b): 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 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 76 kDa (Esposito et al. 2005b), un peso leggermente più alto rispetto alle isoforme note nelle piante superiori (Esposito et al. 2001a; Wakao e Benning, 2005).

E' da osservare che recentemente è stata dimostrata l'esistenza di una 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.

I parametri cinetici della G6PDH purificata da *Chlorella* erano simili a quelli misurati per la P2-G6PDH di patata (Wendt et al. 2000) e di radici di orzo (Esposito et al. 2001a; Esposito et al. 2003) che suggeriscono una localizzazione cloroplastica dell'enzima.

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).

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. 2005b).

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 $K_{i\text{NADPH}}$ è 90-100 μM , 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 $K_{i\text{NADPH}}$ più bassa (48 μM), 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).

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 *Chlorella* 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 μM , un valore simile a quello noto per l'enzima P2-G6PDH.

La G6PDH purificata da *Chlorella* ha 9 cisteine per subunità, e 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.

CONCLUSIONI

Si può concludere che in *Hordeum vulgare* oltre alla nota isoforma citosolica, sono presenti due diverse isoforme della G6PDH localizzate nei plastidi, che presentano caratteristiche cinetiche proprie nei tessuti fotosintetici ed eterotrofi; le isoforme sembrano mostrare caratteristiche regolatorie, soprattutto quelle legate all'inibizione da NADPH ed al potere riducente, differenti tra loro. In particolare appare evidente come un ruolo fondamentale sia rivestito dalla P2-G6PDH nelle radici: l'isoforma è direttamente coinvolta nella produzione del potere riducente necessario alla assimilazione dell'azoto, e presenta una elevata tolleranza al NADPH, il principale inibitore della G6PDH.

In questo contesto, appare consistente l'ipotesi secondo cui la via del pentoso fosfato giochi un ruolo centrale nella risposta a breve e medio termine allo stress salino nelle piante, sia per aumentare la produzione di potere riducente in contrapposizione all'inevitabile stress ossidativo indotto dalla presenza del sale, sia per attivare le vie biosintetiche che portano alla produzione di osmoliti in grado di contrastare la perdita d'acqua da parte della radice. E' interessante osservare come lo stress provochi nelle due isoforme presenti nelle radici, la Cy-G6PDH e la P2-G6PDH ampiamente distinguibili fra loro, degli effetti molto simili, quali l'aumento di affinità per il glucosio-6P e l'aumento, anche nella Cy-G6PDH, della K_{iNADPH} , e quindi della tolleranza agli alti livelli di riducenti presenti in condizioni di stress.

Inoltre, è interessante notare che l'unica G6PDH che è possibile isolare dall'alga verde unicellulare *Chlorella sorokiniana* presenta caratteristiche

peculiari ed in un certo senso ibride rispetto a quelle delle isoforme P1-G6PDH (cloroplastica) e P2-G6PDH (plastidiale) delle piante superiori: il peso molecolare più elevato, il maggiore numero di cisteine ed i parametri cinetici potrebbero far supporre che tale enzima rappresenti un antenato delle isoforme compartimentate delle piante superiori, che si sono successivamente specializzate e differenziate.

Ovviamente studi molecolari, peraltro già parzialmente in atto, saranno necessari per chiarire e possibilmente provare questa ipotesi.

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).

ANDERSON M.P., VANCE C.P., HEICHEL G.H., MILLER S.S: Purification and characterization of NADH-Glutamate Synthase from Alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90, 351-358 (1989).

ASHRAF M., HARRIS P.J.C : Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166, 3-16 (2004).

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).

BOWSER C.G., BOULTON E.L., ROSE J., NAYAGAM S., EMES M.J.: Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J.* 2, 893-898 (1992).

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).

CHEN F.-L., BENNETT M.J., CULLIMORE J.V.: Effect of nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH-dependent Glutamate Synthase and

Glutamine Synthetase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. J. Exp. Bot., vol. 41, 231, 1215-1221 (1990).

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., BOWSHER 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).

ELLMAN G.L.: Colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch. Biochem. Biophys. 74, 443-450 (1958).

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 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., MASSARO G., VONA V., DI MARTINO RIGANO V., CARFAGNA S.: Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* 216, 639–647 (2003).

ESPOSITO S., GUERRIERO G., VONA V., DI MARTINO RIGANO V., CARFAGNA S., RIGANO C.: Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *J. Exp. Bot.* 56, 55–64 (2005a).

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⁺ 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).

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).

HUANG C.Y., VAN STEVENINCK R.F.N.: Salinity induced structural changes in meristematic cells of barley roots. *New Phytologist* 115, 17-22 (1990).

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).

ISHIYAMA K., KOIJMA S., TAKAHASHI H., HAYAKAWA T., YAMAYA T. : Cell type distinct accumulations of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . Plant Physiol. and Biochem. *41*, 643–647 (2003).

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).

KANG F., RAWSTHORNE S.: Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* *199*, 321-327 (1996).

KATSUHARA M.: Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant and Cell Physiology* *38*, 1091-1093 (1997).

KHEDR A.H.A., ABBAS M.A., AMAL A.A.W., QUICK W.P., ABOGADALLAH G.M.: Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *J. Exp. Bot.* *392*, 2553-2562 (2003).

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).

KROOK J., VREUGDENHIL, DIJKEMA C., VAN DER PLAS L.H.W.: Sucrose and starch metabolism in carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions analysed by ^{13}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).

LAM H.M., COSCHIGANO T., OLIVEIRA I.C., MELO-OLIVEIRA R., CORUZZI G.M.: The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 569-593 (1996).

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).

LEA P.J., BLACKWELL R.D., CHEN F.-L., HECHT U.: Enzymes of ammonia assimilation *in* *Methods in plant biochemistry- Vol.3 - Enzymes of primary metabolism*, DEY P.M. E HARBORNE J.B. Eds., pp 258-276, Academic Press London (1990).

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

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

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).

MOORE A.L., PROUDLOVE M.O.: Mitochondria and sub-mitochondrial particles *in* Isolation of membranes and organelles from plant cells HALL J.L. e MOORE A.L. Eds. pp 153-184 Academic Press London (1983).

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).

NEUHAUS H.E., EMES M.J.: Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 111-140 (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).

PAJUELO P., PAJUELO E., FORDE B.G., MARQUEZ A.J.: Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley. *Planta* 203, 517-525 (1997).

PAJUELO P., PAJUELO E., MARQUEZ A.J.: Proteolysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) ferredoxin-glutamate synthase affects ferredoxin- and methyl viologen-dependent enzyme activities differently. *J. Plant Physiol.* 157, 575-579 (2000).

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).

RIGANO C., DI MARTINO RIGANO V., VONA V., CARFAGNA S., CARILLO P., ESPOSITO S.: NH_4^+ assimilation by roots of young plants, changes in pool of free glutamine and asparagine and respiratory oxygen consumption. *Plant Physiol. and Biochem.* 34, 683-690 (1996b).

SCHEIBE R., GEISLER A., FICKENSCHER K. : Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: K_m 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).

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).

SUZUKI A., GADAL P. Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other organisms. *Physiol. Veg.* *22* : 471-486(1984)

SUZUKI A., RIOUAL S., LEMARCHAND S., GODFROY N., ROUX Y., BOUTIN J.-P., ROTHSTEIN S.: Regulation by light and metabolites of ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Physiologia Plantarum* *112*, 524-530 (2001).

TETLOW I.J. , BLISSETT K.J., EMES M.J.: A rapid method for the isolation of purified amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* *189*, 597-600 (1993).

TURANO F.J., MUHITCH M.J.: Differential accumulation of ferredoxin and NADH-dependent glutamate synthase activities, peptides, and transcripts in developing soybean seedlings in response to light, nitrogen and nodulation. *Physiologia Plantarum* *107*, 407-418 (1999).

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, CO₂ and NH₄⁺ 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).

WEBER A., FLUGGE U.-I.: Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* Vol. 53, 370, Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue, 865-874 (2002).

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 NO_2^- assimilation. *Plant Physiol.* *114*, 1413-1419 (1997).

XIONG L., ZHU J.-K.: Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* *25*, 131-139 (2002).

YEO A.: Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.*, *49*, 915-929 (1998).

ZIEGLER C., FERAUD M., JOUGLET T., VIRET L., SPAMPINATO A., PAGANELLI V., BEN HAMMOUDA M., SUZUKI A.: Regulation of the promoter activity of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Physiol. and Biochem.* *41*, 649–655 (2003).