

Università degli Studi di Napoli Federico II

Dottorato di Scienze Chimiche XVIII ciclo

Tesi di dottorato

*Proteine chiave dei processi metabolici indotti dall'acido indolo-3-acetico
(IAA) in Rizobio*

Autore

Esther Imperlini

Relatore

Prof. A. Napolitano

Tutore

Prof. P. Pucci

Coordinatore

Prof. R. Lanzetta

Il lavoro di tesi di dottorato è stato svolto presso l'Istituto di Genetica e Biofisica (IGB) "Adriano Buzzati Traverso" CNR di Napoli, nel laboratorio del Dr. Roberto Defez, al quale vanno i più vivi ringraziamenti per il sostegno costante e la preziosa guida, favorendo e rendendo possibile l'evolversi e il compimento del progetto di ricerca.

ABSTRACT

Under conditions of limited nitrogen limitation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium*, collectively referred to as rhizobia, elicit the formation of nodules on their leguminous hosts plant. In these root or stem structures, the bacteria reduce atmospheric nitrogen into ammonia, which is used by the plant as a nitrogen source. The plant, in turn, provides the bacteria with a protective environment and the carbon compounds necessary to produce the energy required for nitrogen reduction. The formation of a nitrogen-fixing root nodule is a complex developmental event requiring the exquisite coordination of gene expression of two very distinct organisms, a prokaryote and an eukaryote. The developmental pathway giving rise to nodulation has extensively been investigated and plant hormones, especially auxin, cytokines and ethylene, have been implicated in such processes.

Indole-3-acetic acid (IAA) is the most important naturally occurring auxin and has a role in plant growth and development, as well as in nodule organogenesis. Root nodules have a content of IAA higher than uninfected root tissues. The source of IAA in nodule has not so far been definitely identified, but it has been suggested that the elevated levels of IAA may be of prokaryotic origin. In fact, free-living rhizobia can synthesize phytohormones, such as cytokines and auxins and there are two most common routes for IAA biosynthesis.

To demonstrate that the bacterial IAA biosynthesis can positively affect both nodule development and function, a second pathway for IAA biosynthesis was introduced in *Rhizobium*. The combined action of these gene products convert tryptophan to IAA and increase bacterial IAA production. IAA-overproducer Rhizobia increase nitrogen fixation (up to 50%), plant dry weight and nodule size, and development rate. The effects

of the IAA-overproducer rhizobia on symbiosis and nodule organogenesis provide evidence for the important role of IAA in the regulation of cellular processes and metabolic pathways.

In this work a comprehensive study of *Rhizobium* metabolism and proteins expression patterns in response to IAA treatment and its bacterial overproduction was performed with the aim to evaluate the exploitation of IAA-overproducer rhizobia in symbiosis.

The study was performed on the sequenced model micro-symbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021 in comparison with the same strain treated with 0,5 mM IAA and the same strain transformed with an episome carrying the genes for the IAA biosynthesis, to generate an IAA overproducer strain. GC/MS measurements of IAA content in culture supernatants of *S. meliloti* 1021 wild-type and IAA overproducer confirmed that the introduced IAA pathway was biochemically active. Free-living bacteria of this strain release in the growth media 80-fold more IAA than the wild type strain.

Metabolism in *S. meliloti* IAA treated and IAA overproducer strains was investigated by assaying the key enzymes of the major energy yielding pathway (glycolytic or Embden-Meyerhof-Parnas EMP, Entner-Doudoroff ED, pentose phosphate PP pathways and tricarboxylic acid cycle TCA). Enzymatic analyses revealed that cells of the wild-type strain treated with IAA and those overproducing IAA, possess a more active TCA cycle, the main energy-producing pathway. Overall data showed that IAA affects the rate of carbon flow through the glycolytic pathway and TCA cycle, since PP_i -dependent phosphofructokinase, citrate synthase and α -ketoglutarate dehydrogenase activities were higher than those of the wild type strain 1021. The IAA effect was more evident in the stationary than in the

exponential growth phase and in the *S. meliloti* overproducing IAA with respect to the IAA treated strain.

The firefly luciferase bioluminescence assay was used to estimate the intracellular ATP that reflects the energy status of living cells while a spectrophotometric method was employed to determine the endogenous NADH levels providing a measure of the cellular redox status. Interestingly, the intracellular ATP and NADH levels in the IAA overproducer strain were reduced in comparison with those measured in the wild-type strain. This would suggest that IAA plays a pivotal role in energy metabolism. The data obtained can be rationalized considering that both the IAA overproducer strain and the IAA treated one were in a low energy status; the ATP demand was high and as a consequence they both exhibited increased flow through the TCA cycle and the glycolytic pathway, in order to maintain a balanced free-energy metabolism.

Moreover, it is known that the α -ketoglutarate dehydrogenase is inhibited by NADH and our data showed that IAA caused a decrease in NADH:NAD ratio that activates the flux of substrates through the TCA cycle as it is confirmed also by activation of the α -ketoglutarate dehydrogenase.

In aerobic bacteria, the TCA cycle provides reduced nucleotides by the complete oxidation of pyruvate, which enters the cycle in the form of acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). The intracellular concentration of acetyl-CoA was increased in the IAA overproducer strains in comparison to the wild-type strain. Another major TCA cycle function is to produce intermediates for anabolism, and several anaplerotic reactions serve to replenish its intermediates which are consumed in these processes. One of the pathways which utilizes TCA cycle intermediates is fatty acids biosynthesis. This process requires NADPH as coenzyme and acetyl-CoA, formed in the

reaction catalyzed by ATP citrate lyase, with concomitant ATP hydrolysis. We observed that the ATP citrate lyase activity increased not only following the treatment of *S. meliloti* 1021 with IAA, but also in IAA overproducer strain. Another pathway which utilizes acetyl-CoA as substrate is the biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB), which represent the microbial reserve polyester accumulated by rhizobia in free-living state and during symbiosis as carbon storage compounds. Metabolic analysis revealed that activities of the key enzymes for PHB biosynthesis were increased following the IAA treatment and bacterial overproduction. Moreover, cells treated with IAA and IAA overproducer accumulated more PHB granules than the wild-type ones .

In addition to biochemical assays a proteomic approach was also used to study the *S. meliloti* proteins expression patterns in response to IAA treatment and its bacterial overproduction. The first sequenced *Rhizobium* strain, *Sinorhizobium meliloti* 1021 was analyzed using a combination of two-dimensional gel electrophoresis (2DE), mass spectrometry (MS) and bioinformatics. The method of 2DE allowed to discriminate the differentially expressed and distributed cytoplasmatic and membrane proteins of *S. meliloti* 1021 cells treated with IAA and those of the IAA-overproducer strain. Careful analysis of 2DE image and protein quantification was performed. This approach revealed an alteration of several proteins due to IAA addition or synthesis. An up regulation was taken as more than twofold induction with respect to controls and down regulation as less than 50% of controls. The differentially expressed proteins were identified by *in situ* hydrolysis of the protein spots, analysis of the peptide mixture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Among the cytoplasmatic proteins whose expression level was altered by IAA overproduction in *S. meliloti* was the heat shock protein (*dnaK* or SMc02857) and SSB protein (Single-Strand Binding protein). DnaK protein requires ATP for activity of molecular chaperones and plays an important role in response to nutritional and heat shock stress, in DNA damage process, in refolding normal and thermally damaged proteins. SSB protein is essential for replication of the chromosome and it is also involved in DNA recombination and repair. An interpretation of the data is that an increase of intracellular DnaK and SSB may allow IAA overproducer cells to perform more excision repair, thus increasing the survival. In line with this view it was found IAA treatment and its bacterial overproduction increase long-term survival capability, allowing the development of stress-resistant cells.

Finally, the symbiotic properties of *S. meliloti* IAA overproducer strain with its host plant *Medicago truncatula* were analyzed. A significant increase was observed in nitrogen fixation, measured as acetylene reduction activity by GC, in *Medicago* nodules elicited by *S. meliloti* IAA overproducer and in plant dry weight in comparison with control plants infected with wild-type strain. Light micrographs of transverse section of *Medicago* nodules, containing IAA overproducer rhizobia, showed enhanced meristematic activity. On this basis it is possible to conclude that bacterial IAA overproduction enhances biological nitrogen fixation, triggering an alteration in the nodule morphology and development. Moreover, electron micrographs showed that IAA overproducer rhizobia, in free-living state, had a morphology different from wild-type bacteria. It appears therefore that IAA may enhance bacterial development with important consequence on cellular metabolism.

In conclusion this research work allowed to correlate the metabolic modification of *S. meliloti* in response to IAA overproduction with its symbiotic efficiency.

Moreover the study showed the importance of integrating metabolic and proteomic data into post-genomic research, providing a new sensitive tool to examine plant-microbe interactions at molecular level.

INDICE

<i>PREMESSA</i>	13
<i>INTRODUZIONE</i>	17
1.1. Caratteristiche generali di <i>Rhizobium</i>	18
1.2. Simbiosi <i>Rhizobium</i>-Leguminose	21
1.3. Fissazione biologica dell'azoto	26
1.4. Acido indolo-3-acetico (IAA)	29
1.5. Rizobi iperproduttori di IAA	38
1.6. Metabolismo	45
1.7. Proteomica	55
<i>SCOPO DELLA TESI</i>	63
<i>RISULTATI</i>	66
2.1. Descrizione del trattamento esogeno con IAA in <i>S. meliloti</i> e della iperproduzione batterica di IAA in <i>S. meliloti</i>	67
2.1a. <u>Curve di crescita</u>	67
2.1b. <u>Analisi di IAA in colture batteriche di <i>S. meliloti</i> mediante gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS)</u>	71
2.2. Analisi del metabolismo energetico cellulare	75
2.2a. <u>Catabolismo dei carboidrati</u>	75
2.2b. <u>Glicolisi o via di Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)</u>	75
2.2c. <u>Via del Pentosio Fosfato (PP)</u>	80
2.2d. <u>Via di Entner-Doudoroff (ED)</u>	83
2.2e. <u>Ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)</u>	88
2.2f. <u>Reazioni e vie anaplerotiche</u>	95
2.2g. <u>Via del gliossilato</u>	96
2.2h. <u>Vie anaboliche, intermedi metabolici e cofattori enzimatici</u>	102
2.2i. <u>Acetil-coenzimaA (acetil-CoA)</u>	102
2.2l. <u>Citrato</u>	103
2.2m. <u>Adenosina trifosfato (ATP)</u>	106
2.2n. <u>Stato redox cellulare e potere riducente</u>	106
2.3. Analisi della viabilità e morfologia cellulare	109

2.3a. <u>Test di sopravvivenza cellulare</u>	109
2.3b. <u>Microscopia elettronica dei batteri</u>	111
2.4. Metabolismo dei poli-β-idrossibutirrati (PHB)	115
2.4a. <u>Isolamento dei PHB</u>	115
2.4b. <u>Enzimi della biosintesi di PHB</u>	116
2.5. Analisi dei profili di espressioni proteica	119
2.5a. <u>Separazione delle proteine citoplasmatiche e di membrana mediante elettroforesi bidimensionali (2DE)</u>	119
2.5b. <u>Analisi delle immagini 2DE mediante software</u>	125
2.5c. <u>Identificazione delle proteine citoplasmatiche da gel 2DE</u>	134
2.6. Analisi delle proprietà simbiotiche	138
2.6a. <u>Microscopia ottica dei noduli di <i>Medicago</i> generati da <i>S. meliloti</i></u>	138
2.6b. <u>Determinazione del peso secco</u>	139
2.6c. <u>Determinazione dell'attività nitrogenasica mediante saggio di riduzione dell'acetilene (saggio ARA)</u>	141
<i>DISCUSSIONE</i>	143
<i>MATERIALI E METODI</i>	155
3.1 Ceppi batterici e condizioni di crescita	156
3.1a. <u>Curve di crescita</u>	156
3.1b. <u>Crescita microaerobica</u>	157
3.2 Analisi quantitativa relativa di IAA mediante gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS)	158
3.3. Saggi enzimatici	160
3.3a. <u>Preparazione dell'estratto</u>	160
3.3b. <u>Attività enzimi del catabolismo dei carboidrati</u>	160
3.3c. <u>Attività enzimi del ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)</u>	165
3.3d. <u>Attività enzimi di vie anaplerotiche</u>	169
3.3e. <u>Attività ATP-citrato liasica</u>	171
3.3f. <u>Acetil-coenzimaA (acetil-CoA)</u>	171
3.3g. <u>Citrato</u>	172

3.3h. <u>Adenosina trifosfato (ATP)</u>	173
3.3i. <u>NAD(P)H/NAD(P)</u>	174
3.4. Test di sopravvivenza cellulare	176
3.5. Test di sopravvivenza a stress	176
3.6. Microscopia elettronica dei batteri	177
3.7. Isolamento dei poli-β-idrossibutirrati (PHB)	178
3.7a. <u>Attività enzimi della biosintesi di PHB</u>	178
3.8. Elettroforesi bidimensionale (2-DE)	180
3.8a. <u>Preparazione dell'estratto proteico citoplasmatico</u>	180
3.8b. <u>Preparazione dell'estratto proteico di membrana</u>	181
3.8c. <u>Determinazione della concentrazione proteica</u>	182
3.8d. <u>Idratazione delle strips</u>	182
3.8e. <u>Prima dimensione: focalizzazione isoelettrica (IEF)</u>	182
3.8f. <u>Equilibratura delle strips per la seconda dimensione</u>	183
3.8g. <u>Seconda dimensione: elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)</u>	184
3.8h. <u>Visualizzazione e analisi</u>	185
3.8i. <u>Identificazione delle proteine differenzialmente espresse mediante spettrometria di massa MALDI</u>	186
3.9. Procedura di inoculazione e crescita di piante	188
3.10. Microscopia ottica dei noduli	188
3.11. Determinazione del peso secco	190
3.12. Determinazione dell'attività nitrogenasica mediante saggio di riduzione dell'acetilene (saggio ARA)	190
<i>CONCLUSIONI</i>	<i>191</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>194</i>

PREMESSA

Le leguminose costituiscono un terzo delle proteine totali della dieta umana. Il loro elevato valore nutritivo deriva dalla caratteristica, unica nel mondo vegetale, di assimilare direttamente l'azoto atmosferico e convertirlo in amminoacidi. I batteri del suolo del genere *Rhizobium* sono capaci di fissare l'azoto atmosferico in simbiosi con le radici delle piante leguminose. I rizobi inducono la formazione di nuovi organi specializzati, i noduli radicali, sulle radici della pianta ospite, penetrando all'interno del citoplasma delle cellule vegetali. Qui i batteri si differenziano in batteroidi, grandi anche 30 volte in più dei batteri liberi, e riducono l'azoto atmosferico ad ammonio. Per rompere il triplo legame della molecola di azoto viene usato fino al 40 % del fotosintato prodotto dalla pianta ospite. Tale processo è antagonista alla somministrazione di fertilizzanti azotati di sintesi. L'agricoltura nei paesi sviluppati è diventata sempre più dipendente dall'uso di fertilizzanti di sintesi per il raggiungimento ed il mantenimento di elevate produzioni. La richiesta di fertilizzanti azotati, infatti, è aumentata da 3 a 100 milioni di tonnellate negli ultimi 55 anni. La semplice tecnologia per la sintesi chimica di ammonio e la disponibilità di combustibili a costi ridotti hanno promosso la produzione industriale di fertilizzanti azotati a prezzi non eccessivi e con norme limitate sull'impatto ambientale. Oggi per produrre tali fertilizzanti vengono usati tra il 2 ed il 5 % di tutti gli idrocarburi bruciati al mondo. Alla massiccia produzione di anidride carbonica derivante dalla combustione, si aggiunge l'ossidazione dei composti azotati a nitrati altamente inquinanti la falda acquifera, dove vengono ulteriormente ossidati ad ossidi nitrosi (NO), gas ad effetto serra con potere rifrangente 180 volte superiore a quello dell'anidride carbonica. Oltre ai numerosi problemi ambientali, alla salute umana ed animale legati all'uso dei fertilizzanti, l'agricoltura da sempre e soprattutto negli ultimi anni deve affrontare il problema dell'ottimizzazione della produzione e del

raggiungimento di rese soddisfacenti. In seguito agli accordi del 1992, detti di Blair House, ad esempio, l'Unione europea può coltivare un massimo di circa 5 milioni di ettari a soia (la principale leguminosa usata nei mangimi animali) che possono soddisfare meno del 10 % del fabbisogno zootecnico europeo: il contingentamento riguarda però la superficie e non le rese per ettaro. L'Unione europea produce oggi 1,8 milioni di tonnellate di soia a fronte di un fabbisogno di 28 milioni di tonnellate. L'agricoltura sostenibile ha, quindi, posto l'attenzione sul ruolo potenziale della fissazione biologica dell'azoto nella riduzione dell'uso di combustibili fossili richiesti per la produzione dei fertilizzanti azotati e nell'incremento della risorsa di azoto organico per avere rese maggiori. Tali obiettivi possono essere raggiunti aumentando l'efficienza del processo di fissazione e, in particolare, migliorando l'associazione simbiotica tra le piante e i batteri. Di particolare interesse per questa tesi di dottorato, basata sull'analisi della componente batterica di tale associazione, è l'utilizzo di ceppi di rizobi opportunamente ingegnerizzati al solo scopo di rendere più efficiente il sistema simbiotico. Tali rizobi sono stati trasformati con un costrutto che permette l'iperproduzione batterica di acido indolo-3-acetico (IAA), l'auxina meglio nota e caratterizzata. Sulla base di studi sullo sviluppo del nodulo, da molti anni è stato ipotizzato che l'IAA influenza la crescita e il differenziamento del nodulo, all'interno del quale l'IAA è presente in concentrazioni più elevate rispetto al resto della radice. Esistono, inoltre, evidenze che la sintesi batterica di IAA influenza positivamente lo sviluppo e la funzionalità del nodulo radicale; l'aumentata concentrazione di IAA, infatti, porta ad una serie di conseguenze che riguardano aspetti morfologici e applicativi e che lasciano ipotizzare il coinvolgimento di tale molecola in complessi circuiti regolativi e in importanti processi metabolici. La diversità delle funzioni svolte da IAA in vari sistemi

biologici (in pianta, in batteri che interagiscono con le piante, in batteri enterici come *E. coli*, e, persino, in organismi superiori) sembra avvalorare tale ipotesi. Negli ultimi anni studi biochimici e genetici hanno consentito il raggiungimento di significativi progressi nella comprensione dei meccanismi di biosintesi di questa molecola e del suo ruolo in pianta, dove presenta attività ormonale. Nonostante l'elevato numero di studi riguardanti i diversi effetti di questa molecola, i suoi meccanismi molecolari di azione sono poco conosciuti e la loro comprensione rappresenta, ancora oggi, una delle maggiori sfide nel campo della biologia dello sviluppo delle piante, nello studio del metabolismo e della regolazione genica in batteri, del processo di differenziamento morfologico e funzionale dei rizobi e, infine, dell'organogenesi del nodulo. L'obiettivo principale di questa tesi di dottorato è di fornire un contributo alla comprensione del processo di simbiosi, in cui si utilizzano batteri iperproduttori di IAA, attraverso l'analisi degli effetti di tale molecola sul proteoma e sul metabolismo cellulare di rizobio. Prima di presentare i risultati di questo lavoro, saranno introdotti gli aspetti fondamentali riguardanti le caratteristiche generali dei rizobi e della fissazione biologica dell'azoto, nonché i diversi ruoli dell'IAA e della sua relazione con il processo di formazione e sviluppo del nodulo radicale. Saranno discussi, inoltre, i principi basilari delle metodologie innovative utilizzate in analisi proteomica allo scopo di fornire informazioni circa le loro applicazioni e limiti, evidenziando l'importanza di integrare, oggi, la ricerca post-genomica con dati metabolici e proteomici.

INTRODUZIONE

1.1. Caratteristiche generali di *Rhizobium*

I batteri appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae* crescono come organismi liberi nel suolo (free-living) e possono vivere anche come simbionti azoto-fissatori. Alla famiglia delle *Rhizobiaceae* appartengono i generi *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*; sono tutti batteri gram-negativi, aerobi obbligati, bastoncellari e mobili, definiti genericamente rizobi. La fissazione dell'azoto, la riduzione dell'azoto molecolare ad ammonio, è una caratteristica peculiare dei batteri. Numerose piante beneficiano dell'associazione simbiotica procarioti-piante, ma di gran lunga la più rilevante per le quantità di azoto organico è quella tra rizobi e le piante appartenenti alla famiglia delle Leguminose [1]. Poiché gli animali e la maggior parte delle piante non sono in grado di fissare l'azoto, i batteri azoto-fissatori rappresentano il punto di partenza di molte catene alimentari della biosfera [2]. *Rhizobium* nel suolo sfugge alle condizioni di stress e di carenza nutrizionale colonizzando la pianta bersaglio [3]. Si è osservato che la bassa disponibilità di carbonio nel suolo e l'assenza di partner simbionti rallenta la crescita cellulare dei rizobi fino a ridurla a poche divisioni per anno. Non appena i nutrienti divengono nuovamente disponibili, o sono presenti piante simbionti, le cellule sono stimolate a ricominciare le divisioni cellulari e passare ad una fase di rapida crescita [4]. Il *Rhizobium* libero nel suolo non è in grado di effettuare la fissazione dell'azoto, ma compie tale funzione solo in associazione con le leguminose. La simbiosi tra *Rhizobium* e la sua pianta ospite è un processo specie-specifico ossia richiede il riconoscimento tra la pianta e i batteri, i quali entrano in simbiosi con un numero ristretto di piante ospiti. Nella tabella 1 sono evidenziate le relazioni specie-specifiche dei maggiori gruppi di

Rhizobiaceae con le rispettive piante ospiti. L'inizio della simbiosi rizobi-leguminose è un processo di sviluppo altamente specifico e complesso nel quale entrambi i partners si differenziano in maniera concertata, scambiandosi un certo numero di segnali molecolari. I rizobi, in particolare, sono in grado di indurre sulle radici delle leguminose la formazione di un nuovo organo: il nodulo, dove avviene la riduzione dell'azoto ad ammonio. I batteri, infatti, si attaccano alla radice della pianta ospite e inducono la formazione del canale di infezione e la divisione cellulare delle cellule vegetali della zona corticale interna della radice [5]. Il canale di infezione si ramifica nel primordio del nodulo e in questa sede i batteri, circondati da una membrana di origine vegetale, colonizzano il citoplasma delle cellule vegetali, differenziandosi nei cosiddetti batteroidi azoto-fissatori, i quali iniziano a sintetizzare l'enzima nitrogenasi e le altre proteine necessarie per la fissazione dell'azoto. I batteroidi, quindi, circondati da una membrana peribatteroidale di origine vegetale costituiscono una sorta di struttura ad organello chiamata simbiosoma, l'unità cellulare fondamentale per fissare l'azoto all'interno dei noduli radicali.

Tabella 1. Gruppi di batteri *Rhizobiaceae* e piante leguminose simbiotici

Specie batterica	Pianta nodulata
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	<i>Vicia, Pisum, Lathirus</i>
bv <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus (P. vulgaris, P. Coccineus)</i>
bv <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Glicine (soya spontanea, soya cinese)</i>
<i>Bradirhizobium japonicum</i>	<i>Glicine max</i>
<i>Bradirhizobium lupini</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

I vari stadi di sviluppo del batteroide sono stati descritti ad un livello ultrastrutturale per diversi ceppi di *Rhizobium*: in particolare, in noduli di alfalfa indotti da un ceppo selvatico di *Sinorhizobium meliloti* sono stati individuati ben cinque stadi di differenziamento dei batteroidi, ognuno dei quali ristretto in una regione ben definita del nodulo. L'attività nitrogenasica è associata con la differenziazione della parte centrale del nodulo, detta anche zona distale III, dove i batteroidi presentano un citoplasma eterogeneo, ricco di ribosomi e fibrille di DNA [6]. Il differenziamento morfologico dei rizobi dalla forma libera nel suolo a quella di batteroide comporta un'alterazione del loro destino cellulare [7]: i batteroidi fissanti l'azoto vivono all'interno delle cellule vegetali e non si dividono, ma subiscono modificazioni del proprio metabolismo come conseguenza dell'ambiente nuovo e microaerobico presente all'interno del nodulo [8]. Il differenziamento di *Rhizobium* comporta il passaggio da un metabolismo dei più svariati carboidrati, utilizzati come sorgente di carbonio allo stato free-living, a quello degli acidi C₄-dicarbossilici, fonte di energia fornita dalla pianta ai batteroidi per fissare l'azoto. Recenti studi basati sull'analisi dell'espressione genica tra lo stato free-living e quello di batteroide hanno evidenziato come il microsimbionte altera il proprio metabolismo per stabilire e mantenere l'interazione simbiotica con la specifica pianta [9] [10]. Inoltre, le strategie alla base dell'analisi proteomica, utilizzate per studiare la simbiosi tra *S. meliloti* 1021 e la leguminosa *Melilotus alba*, hanno permesso di caratterizzare nuove proteine coinvolte in tale processo, identificando i prodotti genici differenzialmente presenti nello stato simbiotico e non-simbiotico. *Natera et al.* hanno, infatti, assegnato putative identità ad un centinaio di proteine di nodulo, di batterio e di batteroide, utilizzando tecniche di spettrometria di massa, dopo aver osservato circa 250 proteine indotte nel nodulo rispetto

alla radice e più di 350 proteine represses in batteroide rispetto al batterio free-living. In conclusione, il differenziamento dei rizobi non solo comporta l'espressione di specifici geni tipici dei batteroidi, ma anche differenze nei profili di espressione proteica dei due stati [11] [12]. Per comprendere la complessità del processo di differenziamento dei rizobi, sono, di seguito, introdotti gli aspetti peculiari della simbiosi rizobi-leguminose.

1.2. Simbiosi *Rhizobium* –Leguminose

La simbiosi tra *Rhizobium* e leguminose è un evento biologico complesso che richiede numerosi determinanti genetici sia batterici che vegetali [1]. Questo adattamento richiede un drammatico passaggio nello scenario di repressione e induzione genica adottata da entrambi i simbionti. L'espressione genica di *Rhizobium* deve essere modificata sia per l'evento di formazione del nodulo, sia per la successiva fase di fissazione dell'azoto. Tra batterio e pianta si sviluppa una simbiosi mutualistica per cui è richiesta l'espressione simultanea di geni procariotici ed eucariotici [5]. La pianta, durante la simbiosi, fornisce ai batteri l'energia necessaria per la fissazione dell'azoto sotto forma di composti organici (carboidrati) e ricevendo in cambio azoto facilmente assimilabile [13].

La manifestazione macroscopica di tale associazione è rappresentata dalla formazione di un nuovo organo sulle radici delle piante: il nodulo. L'ospite determina, inoltre, il modo di sviluppo, la forma e la frequenza dei noduli [14]. La formazione del nodulo non è un programma di sviluppo obbligato della pianta, infatti, il processo di nodulazione (e la simbiosi con il batterio), avviene solo in condizioni di carenza di azoto disponibile nel terreno; la presenza di fonti alternative di azoto, quindi, inibisce il processo di nodulazione. I batteri si legano ai peli radicali quando la leguminosa è

allo stadio di plantula. Il processo d'infezione prevede il verificarsi di tre eventi fondamentali: a) il riconoscimento tra la pianta ospite ed il batterio (preinfezione); b) l'infezione e lo sviluppo dei noduli radicali; c) la fissazione dell'azoto nel nodulo [14]. Affinché ciascuno di tali eventi possa verificarsi, sia la pianta che il batterio subiscono un processo di differenziamento concertato che richiede variazioni specifiche nell'espressione genica di entrambi i simbionti. Gli eventi di preinfezione hanno luogo nella rizosfera. Il primo passo dell'interazione simbiotica è rappresentato dall'emissione di essudati radicali della pianta ospite. I batteri rispondono per chemiotassi positiva agli acidi organici, a quelli aromatici ed a specifici componenti fenolici triciclici, come i flavonoidi, secreti dalle radici, muovendosi verso di esse e colonizzandole [14]. I flavonoidi, unitamente all'attivatore trascrizionale batterico NodD [1], rappresentano un segnale chimico positivo che richiama i rizobi specifici per quella leguminosa. I flavonoidi, infatti, penetrano nelle cellule batteriche e stimolano la proteina NodD ad attivare i diversi geni che sintetizzano, modificano e secernono il fattore Nod: chimicamente un lipochitoooligosaccaride, che induce la divisione cellulare in cellule corticali della radice [15]. I rizobi, attratti dai segnali biochimici inviati dalla pianta, si legano ai peli radicali e producono sostanze che stimolano la crescita asimmetrica del pelo stesso provocando un suo arrotolamento [16] e la produzione di invaginazioni della membrana plasmatica, ossia dei cosiddetti canali di infezione. La progressione dei batteri nei canali d'infezione avviene per divisione cellulare: ossia la pianta fornisce ai batteri tanto nutrimento da consentire loro di riprodursi molto efficientemente. I canali d'infezione procedono in direzione opposta a quella della crescita del nodulo radicale ossia verso il centro della radice e, in radici di pisello o erba medica, varcano l'apice meristemato del nodulo

che guida la crescita del nodulo perpendicolarmente alla radice. Il meristema apicale è, infatti, la zona priva di batteri dalla quale si svilupperanno i tessuti centrali del nodulo. Il rilascio dei batteri dai canali d'infezione si verifica per endocitosi, solo in speciali cellule del tessuto centrale del nodulo, in una zona immediatamente prossimale al meristema. I batteroidi, circondati da una membrana di origine vegetale chiamata peribatteroidale, sono rilasciati dai canali d'infezione fino ad occupare gran parte del citoplasma della cellula. I batteroidi giovani smettono di dividersi e si differenziano nella forma matura capace di fissare l'azoto atmosferico. I noduli sono, organi a sé nei quali sono attivati i geni di rizobio responsabili del processo fissativo: i geni *nif* [5]. Criteri citologici permettono di definire varie zone del tessuto centrale di noduli maturi. Nella figura 1 è schematizzato il nodulo radicale generato sulle radice di piante leguminose quali *Viciae hirsuta*, *Pisum* e *Medicago*, classificato come nodulo indeterminato e di forma oblunga. La zona apicale del nodulo indeterminato (zona I) è la regione meristemica che è attraversata dal canale d'infezione. Nella zona sottostante (zona II) i batteroidi invadono le cellule vegetali e, in una parte più matura di tale zona di invasione, i batteri si dividono molte volte raggiungendo anche i 20.000 batteroidi per singola cellula vegetale. Raggiunta una concentrazione critica le divisioni cellulari cessano ed i batteroidi aumentano solo di volume arrivando ad oltre 30 volte il volume dei batteri liberi nel suolo. Nella zona III sono espressi tutti i geni batterici necessari per sintetizzare la nitrogenasi e tutti i geni vegetali dediti al trasporto ed assimilazione dei composti azotati. Nella zona di fissazione è presente una molecola molto simile, per struttura e per ruolo, all'emoglobina umana: la leghemoglobina che controlla la concentrazione di ossigeno, bilanciando da un lato la necessità di O₂ per la respirazione mitocondriale, ma evitando dall'altro l'inibizione della nitrogenasi ad opera

dell'ossigeno stesso. Tale proteina, responsabile del colore rosato che assume il nodulo proprio nella zona di fissazione, è una vera proteina simbiotica in quanto il gruppo eme (che contiene il ferro responsabile del legame con O₂) è sintetizzato dal batteroide, mentre la regione globinica è prodotta dalla cellula vegetale [17]. All'associazione simbiotica, dunque, partecipano attivamente e da essa traggono vantaggio sia il batterio che la pianta. Inoltre, le zone II e III sono nettamente divise dall'interzona II-III in cui si accumula amido sotto forma di granuli [6]. Alla zona di fissazione segue la zona IV o senescente, localizzata alla base del nodulo radicale, in essa i batteroidi smettono di fissare azoto e vanno incontro a morte cellulare, per cui si osserva un citoplasma vegetale degradato ed i batteroidi in decomposizione.

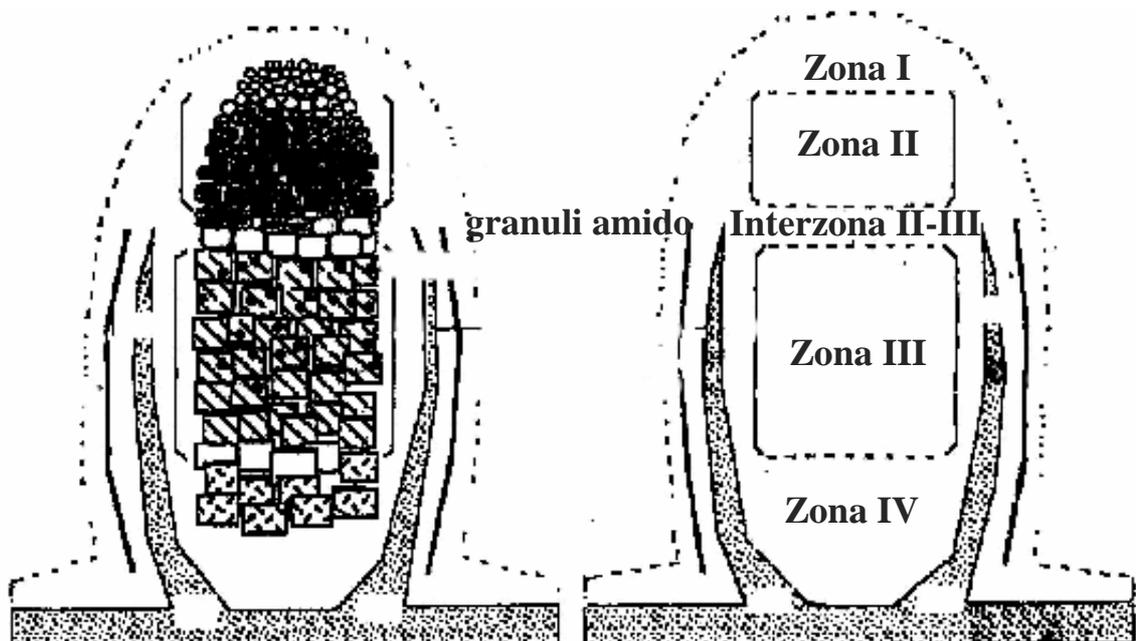


Figura 1. Sezione longitudinale di un nodulo radicale di tipo indeterminato; il nodulo ha forma oblunga. Si possono distinguere i vari stadi di sviluppo secondo un gradiente che va dall'alto verso il basso: zona I (zona apicale attraversata dal canale di infezione); zona II (zona di invasione dove i batteroidi sono in piena fase esponenziale); interzona II-III (regione di accumulo di amido sotto forma di granuli); zona III (zona di fissazione, i batteroidi fissano l'azoto atmosferico); zona IV (zona senescente alla base del nodulo radicale, i batteroidi vanno incontro a morte cellulare)

1.3. Fissazione biologica dell'azoto

La fissazione biologica dell'azoto rappresenta la maggiore risorsa di azoto nel suolo agricolo incluso quello nelle regioni aride. I maggiori sistemi di fissazione di azoto sono quelli simbiotici, che possono giocare un ruolo fondamentale nell'aumento della fertilità e della produttività nei suoli carenti di azoto. La produzione di alta qualità di cibi ricchi di proteine è estremamente dipendente dalla quantità di azoto. Sebbene l'azoto si trovi in misura abbondante nell'atmosfera terrestre (ne rappresenta circa l'80%), esso è presente nella forma molecolare biatomica non sfruttabile dalle piante né da alcun organismo complesso. Le piante, perciò, acquisiscono l'azoto da due fonti principali: a) l'atmosfera, attraverso la fissazione simbiotica dell'azoto, e b) il suolo, attraverso i fertilizzanti commerciali, il concime, e/o la mineralizzazione dei composti organici. L'industria dei fertilizzanti, infatti, provvede con importanti quantità di prodotti chimici contenenti azoto allo sviluppo agricolo di molte aree. I problemi legati all'azoto riguardano l'eccessivo uso nell'agricoltura intensiva, il costo del gas naturale, la deplezione dei combustibili fossili richiesti per la produzione dei fertilizzanti azotati.

La grande quantità di residui nel suolo dopo la fertilizzazione porta a numerosi problemi sia ambientali che alla salute umana ed animale [18] [19]. Le strategie che portano ad un aumento o una acquisizione migliore dell'azoto includono l'espansione della superficie radicale con l'aumento della crescita della radice e lo sviluppo dei peli radicali [20]; sintesi di acidi organici ed essudati; attivazione dell'espressione dei trasportatori dell' NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^- [20]; acquaporine e associazioni con micorrizze [21]; associazioni simbiotiche con formazione di noduli fissanti l'azoto [22]. L'agricoltura sostenibile ha posto l'attenzione sul ruolo potenziale della

fissazione biologica dell'azoto (BNF) [23]. La BNF può ridurre l'uso dei combustibili fossili e può essere di aiuto nella riforestazione e nella ristorazione delle terre marginali con scarsa produttività [24]. Gli organismi che possono fissare l'azoto appartengono al regno dei procarioti e convertono l'azoto gassoso stabile presente nell'atmosfera in una forma biologicamente utilizzabile. Perché l'azoto atmosferico possa essere incorporato nel materiale cellulare, è necessario rompere il forte legame chimico (triplo legame) tra i due atomi di azoto, in un processo che richiede un notevole apporto di energia [25] e in cui l'azoto N_2 viene ridotto ad ammonio NH_4^+ , molecola assimilabile dalle piante. Si calcola che quasi il 40% del fotosintato sia utilizzato dai batteroidi come sorgente energetica per scindere il triplo legame della molecola di azoto. Tale processo è antagonista alla somministrazione di fertilizzanti azotati di sintesi, la cui produzione richiede l'utilizzo tra il 2 ed il 5 % di tutti gli idrocarburi bruciati al mondo.

Il complesso enzimatico utilizzato per ridurre l'azoto molecolare ad ammonio è la nitrogenasi. La sua attività è strettamente dipendente dalla pressione di ossigeno presente nel nodulo e dalla disponibilità di ATP come è mostrato dalla reazione schematizzata in figura 2.

L'apporto di azoto al suolo ad opera dei microrganismi simbiotici ammonta al 25-30 % e può avere un ruolo chiave nella *remediation* dei terreni.

Le leguminose sono molto importanti sia dal punto di vista agronomico sia ecologico perché sono responsabili di una parte sostanziale del flusso globale di azoto da quello atmosferico. Mediante la fissazione le leguminose fissano azoto atmosferico in forme come ammonio, nitrato e azoto organico. La fissazione delle leguminose produce un aumento dei livelli di proteine nelle piante e la diminuzione della deplezione di azoto nel suolo [25].

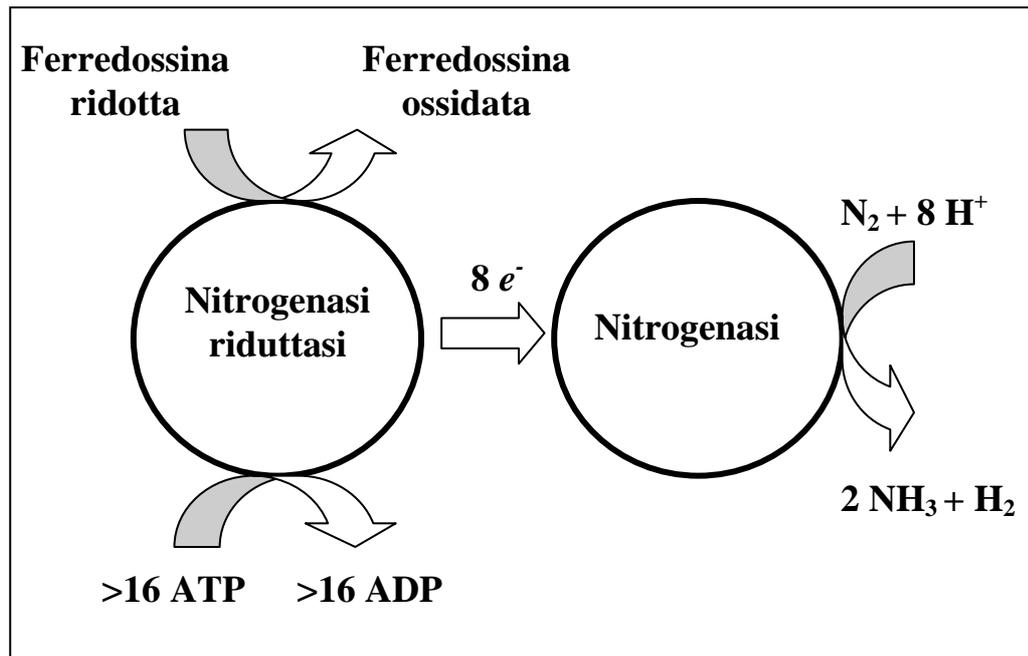


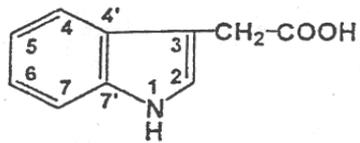
Figura 2. Reazione di riduzione dell'azoto molecolare catalizzata dal complesso multienzimatico della nitrogenasi

L'utilizzo di un sistema simbiotico come rizobio-leguminosa ad elevata efficienza potrebbe sostituire o far diminuire sensibilmente l'uso dei fertilizzanti a base di azoto, che contrastano l'opera dei batteri. Un miglioramento della fissazione biologica dell'azoto, inoltre, nel suolo agricolo di regioni aride, potrebbe incrementare la risorsa di azoto organico ottimizzando la produzione in queste aree molto povere [19]. Tali obiettivi, potrebbero essere raggiunti attraverso lo sviluppo di varietà di leguminose superiori, il miglioramento delle pratiche agronomiche e l'aumento dell'efficienza dei processi di fissazione tramite un miglior management delle relazioni simbiotiche tra le piante e i batteri.

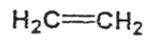
Su quest'ultimo punto è focalizzato questo lavoro di tesi di dottorato, basato essenzialmente sull'analisi della componente batterica di tale associazione simbiotica, utilizzando ceppi di rizobi opportunamente ingegnerizzati al solo scopo di rendere più efficiente il sistema simbiotico.

1.4. Acido indolo-3-acetico (IAA)

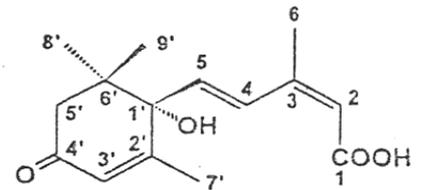
L'acido indolo-3-acetico (IAA) è la principale auxina di pianta [26], la cui biologia è uno dei campi più antichi della ricerca sperimentale vegetale. Nel 1880, infatti, Charles Darwin fu il primo ad osservare e parlare degli effetti di una ipotetica sostanza, l'auxina, coinvolta nel fenomeno del fototropismo [27]. Nel 1937, Went e Thimann pubblicarono il libro dal titolo "Fitormoni", classificando come i "cinque classici ormoni di pianta" i seguenti composti [28] (figura 3): le giberelline (GA), l'etilene, le citochinine, l'acido abscissico (ABA) e le auxine [acido indolo-3-acetico (IAA), acido indolo-3-propionico (IPA), acido indolo-3-butyrico (IBA), e indolo-3-acetamide (IAM)]. Le auxine influenzano numerosi processi in pianta, favorendone la crescita e lo sviluppo, stimolando i processi di proliferazione delle cellule e alcune fasi importanti del metabolismo energetico [29]. La loro principale funzione è quella dell'accrescimento per distensione (geotropismo e fototropismo) [30] [31] e per divisione (crescita dei frutti, formazione delle radici laterali, sviluppo di tessuti vascolari, controllo del dominio apicale e risposta tropica) [32] [33]. Le auxine sono sintetizzate nei meristemi apicali, ma anche nelle radici, nelle foglie, negli ovari e nei semi. Negli ultimi 60 anni e in seguito alla delucidazione della struttura di IAA, studi biochimici e genetici hanno consentito il raggiungimento di significativi progressi nella comprensione del ruolo, del metabolismo e del trasporto delle auxine; tuttavia, alcune fondamentali questioni e innumerevoli dettagli, quali il meccanismo di azione, restano irrisolti. E' noto, ad esempio, che le parti apicali di una pianta costituiscono la principale sorgente di IAA, che è, poi, trasportato nella radice attraverso lo stelo (figura 4). Recenti studi chimici e genetici hanno dimostrato che la regolazione, nelle cellule vegetali, del trasporto polare delle auxine,



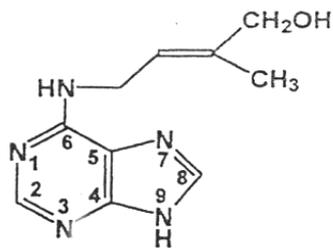
acido indolo-3-acetico



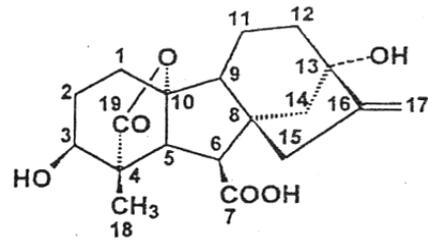
etilene



acido abscissico



zeatina



giberellina A₁

Figura 3. Strutture dei principali fitormoni



Figura 4. Rappresentazione dei fitormoni regolatori della crescita di una pianta leguminosa (*Pisum*) e del trasporto polare di auxine, prodotte negli apici meristematici

prodotte negli apici meristematici, è un aspetto chiave nei processi di crescita [34] [35]. E' stato proposto un modello in cui il movimento di IAA nelle cellule vegetali è mediato da AUX1, un carrier cellulare localizzato sulla membrana plasmatica [36]; l'efflusso di IAA è, invece, mediato da un'altra proteina transmembrana PIN1 [37] che presenta omologia con i carrier di efflusso batterici. I flavonoidi regolano negativamente il trasporto delle auxine [38] e influenzano la localizzazione e l'espressione delle proteine PIN [39]. Oltre alle proteine PIN, anche alcune proteine "MultiDrug Resistance" (MDR) simili alle MDR di mammifero sono necessarie per il trasporto polare delle auxine in *Arabidopsis* [40], eccellente sistema modello per studi di sviluppo vegetale. Le auxine determinano la proliferazione di radici laterali e piante che producono endogenamente quantità elevate di IAA o che vengono trattate esogenamente con questo fitormone producono un maggior numero di radici laterali [41], mentre piante mutanti che producono meno IAA [42] inducono minore formazione di radici laterali. E' chiara l'evidenza genetica e fisiologica che l'auxina è richiesta in due stadi durante lo sviluppo delle radici laterali: all'inizio delle divisioni del periciclo per dare il primordio ed alla formazione e al mantenimento del meristema [43]. Il meccanismo alla base di questo processo è ancora ignoto, è chiaro, però, che siano coinvolti diversi fattori che agiscono a cascata in seguito ad uno stimolo. Ad esempio in *Arabidopsis*, è stato osservato un gradiente di auxina, con elevati livelli di IAA nel meristema apicale [33] ed identificato un regolatore (NAC1) della cascata del segnale auxina-dipendente, che attiva dei geni coinvolti nella formazione delle radici laterali [44].

Negli ultimi anni, se da un lato lo studio della biosintesi di IAA ha notevolmente aiutato a comprendere il suo ruolo nei processi di sviluppo della pianta, dall'altro è sorta la necessità di identificare i suoi possibili

recettori al fine di definire i meccanismi di azione. Notevoli progressi sono stati raggiunti in tal senso identificando diverse “Auxin Binding Protein” (ABP) sia nella frazione proteica di membrana sia in quella solubile di differenti famiglie di piante [45]. L’IAA, tuttavia, non ha necessariamente bisogno di un recettore presente sulla superficie esterna della membrana plasmatica, poiché la forma protonata (non carica) di questa molecola idrofobica può facilmente penetrare tale membrana. Inoltre, sono state descritti specifici sistemi di uptake dell’IAA in cellule vegetali e anche una ABP solubile, localizzata nel nucleo, che farebbe escludere la stringente necessità dell’esistenza di un recettore di membrana per l’IAA. Studi biochimici hanno mostrato che la coniugazione dell’IAA ad una grande varietà di molecole è parte di un meccanismo regolatorio per il controllo dei livelli di tale molecola. L’IAA in pianta non è presente soltanto nella forma libera, ma anche in forma coniugata con amminoacidi, peptidi o carboidrati; l’IAA coniugato non è biologicamente attivo, ma sembra avere funzione di riserva nei semi e nelle omeostasi ormonali, di protezione dalle degradazioni enzimatiche e di preparazione alla successiva fase di catabolismo. L’IAA coniugato, infatti, può essere idrolizzato [46] oppure, se conservato come acido indolo-3-butyrico (IBA), può essere β -ossidato [47] per rigenerare IAA libero. Recentemente è stata isolata in *Phaseolus vulgaris* la prima proteina covalentemente legata ad IAA [48], definendo così una nuova classe di fitormoni coniugati. Per quanto riguarda la sintesi di questa auxina, sono stati definiti mediante esperimenti di marcatura con isotopo stabile [49] due principali tipi di biosintesi: uno triptofano-dipendente e l’altro triptofano-indipendente. Per la biosintesi di IAA a partire dal triptofano, sono state proposte tre vie attraverso l’acido indolo-3-piruvico (IPA), la triptamina (TAM) e l’indolo-3-acetamide (IAM) (figura 5).

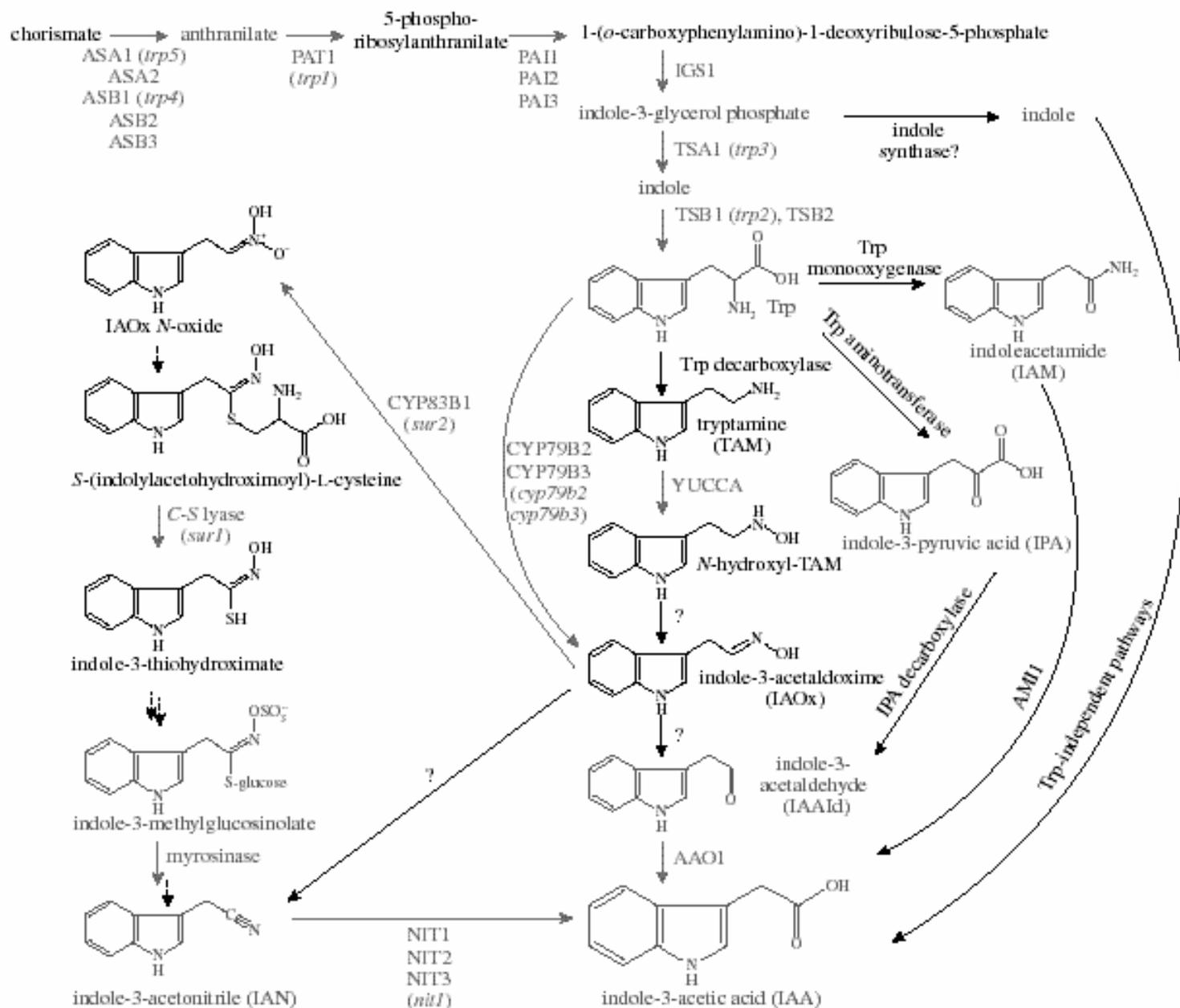


Figura 5. Schema della biosintesi triptofano-dipendente di acido indolo-3-acetico in *Arabidopsis* attraverso gli intermedi: indolo-3-acetamide (IAM), acido indolo-3-piruvico (IPA), triptamina (TAM). Le due monoossigenasi CYP79B2 e CYP79B3 ossidano il triptofano in indolo-3-acetaldoxime (IAOx), altro intermedio chiave perché può essere convertito, oltre ad IAA, anche in indolo-3-metilglucosinolato

Molti geni e famiglie geniche codificanti putativi enzimi della via triptofano-dipendente sono noti [50] e per alcuni di essi le analisi di espressione indirizzano verso una sintesi di IAA nelle radici di tipo triptofano-dipendente. L'indolo-3-acetaldossima (IAOx), derivante dalla triptamina, è anch'esso un precursore chiave perché può essere convertito, oltre ad IAA, anche ai glucosinolati indolici, metaboliti secondari in piante come *Arabidopsis*. CYP79B2 e CYP79B3 sono, infatti, le due monoossigenasi P450 di *Arabidopsis* che ossidano il triptofano ad IAOx in vitro [51]: piante che overesprimono CYP79B2 presentano livelli elevati di IAA e di glucosinolati, ma doppi mutanti CYP79B2 e CYP79B3, invece, mostrano una riduzione di IAA e glucosinolati non rilevabili [52].

La capacità di produrre IAA è molto diffusa anche tra i microrganismi del suolo capaci di associazioni patogene o simbiotiche con le piante [53]. È stato, per esempio, dimostrato che la produzione di IAA gioca un ruolo causale nello sviluppo dei sintomi delle malattie iperplastiche indotte da alcune specie di batteri fitopatogeni del genere *Agrobacterium* e *Pseudomonas*. Tali batteri e cellule di piante trasformate con *A. tumefaciens* sintetizzano IAA attraverso un singolo pathway, in cui il triptofano è convertito in IAA in due reazioni: nella prima, l'enzima triptofano monoossigenasi converte il triptofano in indolo-3-acetamide (IAM), che è poi convertita in IAA dall'indolo-3-acetamide idrolasi (figura 6A). I geni codificanti tali enzimi sono presenti sul plasmide Ti di *A. tumefaciens* e tale pathway biosintetico è determinante per la induzione della crescita di piante ipertrofiche dopo incorporazione del T-DNA, contenuto nel plasmide, all'interno del nucleo della cellula ospite [54]. Inoltre, l'induzione della formazione di tumori da parte di *Pseudomonas syringae* su piante di ulivo richiede la produzione batterica di IAA, che conferisce virulenza al batterio nelle piante ospiti [55]; la determinazione,

quindi, in *Pseudomonas* dei meccanismi di regolazione della produzione di IAA è importante per la comprensione dei meccanismi di controllo dell'espressione della virulenza. La produzione di IAA in *Pseudomonas savastanoi* avviene attraverso il pathway di IAM e i geni codificanti la triptofano monoossigenasi (*iaaM*) e la indolo-3-acetamide idrolasi (*iaaH*) sono presenti su un operone con *iaaH* prossimale al promotore. I geni codificanti per questi enzimi sono stati utilizzati anche per alterare i livelli di IAA in piante transgeniche [56].

Per quanto riguarda i batteri in associazione simbiotica con piante è stato osservato che sia gli Azospirilli (esosimbionti) sia i Rizobi (endosimbionti) sintetizzano IAA. La maggiore crescita delle piante, ad esempio, osservata in seguito all'inoculazione dei suoli con *Azospirillum brasilense* è dovuta alla produzione di auxine da parte del batterio stesso. In *Azospirillum* è stata dimostrata l'esistenza di almeno due differenti processi di biosintesi dell'IAA [57]: nel primo, l'intermedio chiave è l'indolo-3-acetamide come in *Agrobacterium tumefaciens* e in *Pseudomonas syringae*; nel secondo, il triptofano è convertito da una amminotransferasi aromatica in acido indolo-3-piruvico, che è trasformato dall'enzima indolo-3-piruvato decarbossilasi in indolo-3-acetaldeide, ossidata, poi, ad IAA da una ossidasi aldeidica non specifica. E' stato provato che anche in altri batteri come *Sinorhizobium meliloti* [58], un batterio simbiote dell'erba medica, l'intermedio principale della biosintesi di IAA è un indolopiruvato. Altri studi hanno dimostrato il coinvolgimento dell'IAA nella simbiosi rizobi-leguminose ed, in particolare, nella crescita e nel differenziamento del nodulo radicale [59] [14] [60]. Nel 1936, Thimann fu uno dei primi a sostenere il ruolo fondamentale delle auxine nell'organogenesi del nodulo. Esse sono state isolate da noduli radicali insieme con citochinine, gibberelline ed acido abscissico. Questi fitormoni sono presenti nei noduli in concentrazioni più

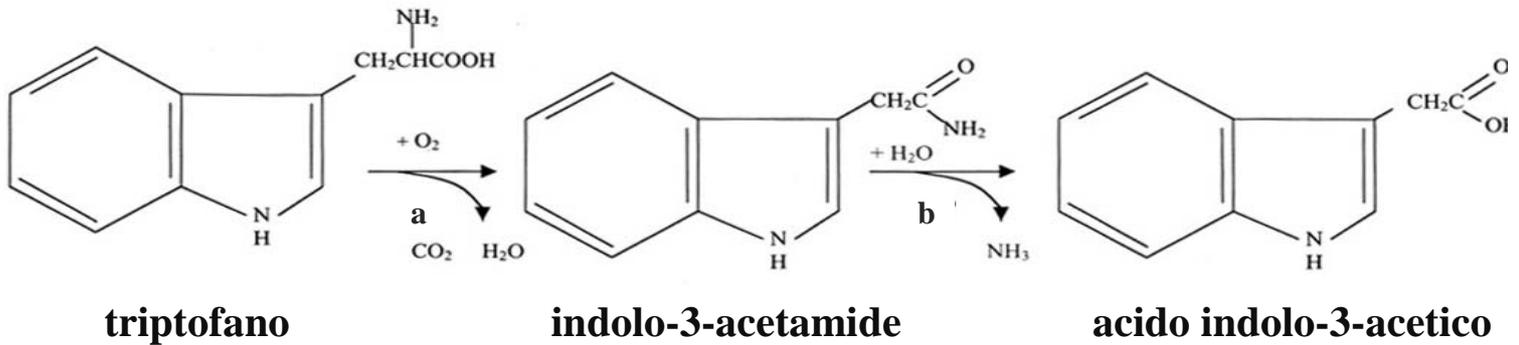
elevate rispetto alle radici non infettate [17]. Diversi studi hanno provato che non solo la sintesi di citochinine [61], ma anche il trasporto polare di auxine [62] sono determinanti nel processo di sviluppo del nodulo: l'incubazione di radici di leguminose con un inibitore sintetico del trasporto di auxine induce la formazione di strutture simili a noduli e all'espressione di quei geni normalmente espressi nelle prime fasi di sviluppo del nodulo [14]. Studi basati sull'analisi dell'espressione di geni sensibili all'attività auxinica hanno dimostrato che l'infezione delle radici con i Rizobi o il loro trattamento con i lipo-chitin-oligosaccaridi (LCO) provoca un accumulo di IAA [62] e una riduzione locale del trasporto di auxina che precede lo sviluppo del primordio del nodulo [63]. Inoltre, le auxine sembrano essere coinvolte non solo nelle primissime fasi del processo di formazione del nodulo, ma anche nel controllo del numero di noduli [64] e nel mantenimento della sua funzionalità. Le modificazioni nel rapporto tra i vari fitormoni, quindi, sono un prerequisito essenziale per l'organogenesi del nodulo, ma resta ancora da chiarire l'origine dell'accumulo di auxine ed, in particolare, di IAA nel nodulo; in parte, è possibile attribuirlo al trasporto polare [65] per cui l'IAA prodotto negli apici vegetali, è poi concentrato nei noduli radicali, ma è altrettanto probabile che sia prodotto dai batteri presenti negli stessi noduli [53]. Evidenze sperimentali ottenute mediante analisi con gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) indicano che sia i Rizobi sia i Bradirizobi producono e rilasciano IAA nel mezzo di coltura [66]. È stato anche dimostrato che l'uso di inoculi di Bradirizobi può avere una forte influenza sulla quantità di IAA presente nel nodulo: mutanti di *Bradyrhizobium japonicum* che producono quantità di IAA 30 volte maggiori rispetto al ceppo selvatico presentano una maggiore efficienza di nodulazione e producono quantità elevate di IAA nel nodulo [67].

Dall'altro canto, si è visto che mutanti di rizobio incapaci di nodulare sintetizzano minori quantità di IAA [68], ma mutanti batterici incapaci di sintetizzare IAA sono, invece, capaci di nodulare efficacemente e completamente [17]. Per dimostrare che la sintesi batterica di IAA può influenzare positivamente lo sviluppo e la funzione dei noduli, nel laboratorio dove è stato svolto questo lavoro di tesi, sono stati realizzati ceppi di *Rhizobium* iperproduttori di IAA dei quali, di seguito, è riportata una descrizione delle loro caratteristiche e degli effetti prodotti sui processi di nodulazione e di fissazione.

1.5. Rizobi iperproduttori di IAA

I ceppi di rizobio utilizzati in questo lavoro di tesi, sono stati trasformati in maniera transiente mediante elettroporazione con il vettore plasmidico pG14, un derivato di pMB393 [69], contenente i geni *iaaM* e *tms2* codificanti, rispettivamente, per gli enzimi indolacetamide idrolasi e triptofano monossigenasi, che convertono il triptofano in IAA mediante le reazioni descritte in figura 6A. Il gene *iaaM* è stato isolato dal batterio patogeno *Pseudomonas syringae* [54] e codifica per l'enzima che converte l'indolo-3-acetamide in IAA. Il gene *tms2* è stato isolato dal plasmide pTi di *Agrobacterium tumefaciens*; esso codifica per l'enzima che presiede la reazione di conversione del triptofano in indolo-3-acetamide [54]. Questa via metabolica per la produzione di IAA esiste già in natura, in particolare, in alcuni batteri come *A. tumefaciens* ed utilizza enzimi omologhi a quelli utilizzati nel costrutto di interesse. I geni *iaaM* e *tms2* sono coespressi e sono sotto il controllo di un unico promotore (figura 6B), definito promintrone in quanto è l'introne del gene *rolA* in cellule eucariotiche, ma è anche un promotore in batterio. Il promintrone, isolato da *A. rhizogenes*,

A)



B)

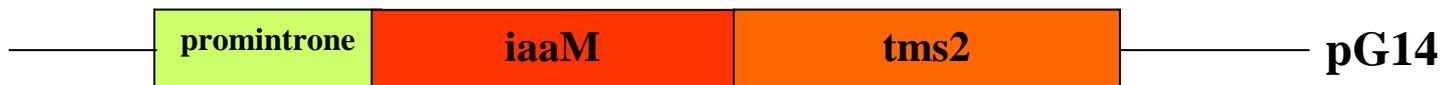


Figura 6. A) Schema della biosintesi di acido indolo-3-acetico attraverso l'intermedio indolo-3-acetamide (IAM) in due reazioni: la prima a) catalizzata dall'enzima triptofano monossigenasi che converte il triptofano in IAM e la seconda b) catalizzata dall'enzima indolo-3-acetamide idrolasi che converte l'intermedio in IAA.

B) Schema del costrutto clonato in ceppi di rizobio e contenente i geni *iaaM* e *tms2* codificanti, rispettivamente, gli enzimi indolacetamide idrolasi e triptofano monossigenasi sotto il controllo di un promotore di fase stazionaria, detto promintrone, attivo sia in batteri free-living sia in batteroidi

ceppo batterico appartenente anch'esso alla famiglia delle *Rhizobiaceae*, è, infatti, il primo promotore isolato, attivo in *Rhizobium* allo stabilirsi della fase stazionaria di crescita [70]. Il costrutto, mostrato in figura 6B, clonato in ceppi batterici di rizobio, attiva la trascrizione genica sia in rizobi free-living (cresciuti in opportuni mezzi di coltura), sia in batteroidi all'interno dei noduli; l'espressione genica è, inoltre, indotta allo stabilirsi della fase stazionaria di crescita, in carenza nutrizionale ed in condizioni di stress come pH acido.

Inoltre, allo scopo di comprendere la relazione esistente tra l'IAA e il processo di nodulazione, sono stati caratterizzati gli aspetti morfologici e applicativi dell'utilizzo di ceppi di *Rhizobium* iperproduttori di IAA nella simbiosi con le leguminose. L'introduzione dei due geni induce un aumento della produzione di IAA nel sovrinatante delle colture batteriche e nei noduli radicali; le piante leguminose infettate con il Rizobio capace di produrre aumentati livelli di IAA presentano un maggior numero di radici laterali, un maggiore ispessimento della radice principale e presenza di più peli sulla radice principale e su quelle laterali (figura 7). Il maggiore sviluppo dell'apparato radicale offre una superficie di assorbimento delle sostanze nutritive [20] più ampia e può indurre un miglioramento della fissazione dell'azoto. La produzione di IAA ha, inoltre, diversi effetti sullo sviluppo dei noduli radicali: il numero dei noduli è ridotto (figura 8) e le dimensioni aumentate oltre il 50% (figura 9); in particolare, si ha un aumento pari a circa l'80% della massa media dei noduli dopo 4 settimane dall'infezione con il ceppo iperproduttore di IAA. La valutazione di questi dati assieme a quelli derivanti dall'analisi microscopica dei noduli ha permesso di ipotizzare una via di sviluppo dei noduli, generati dai batteri iperproduttori di IAA, più rapida di quelli derivati dall'interazione con il ceppo selvatico.

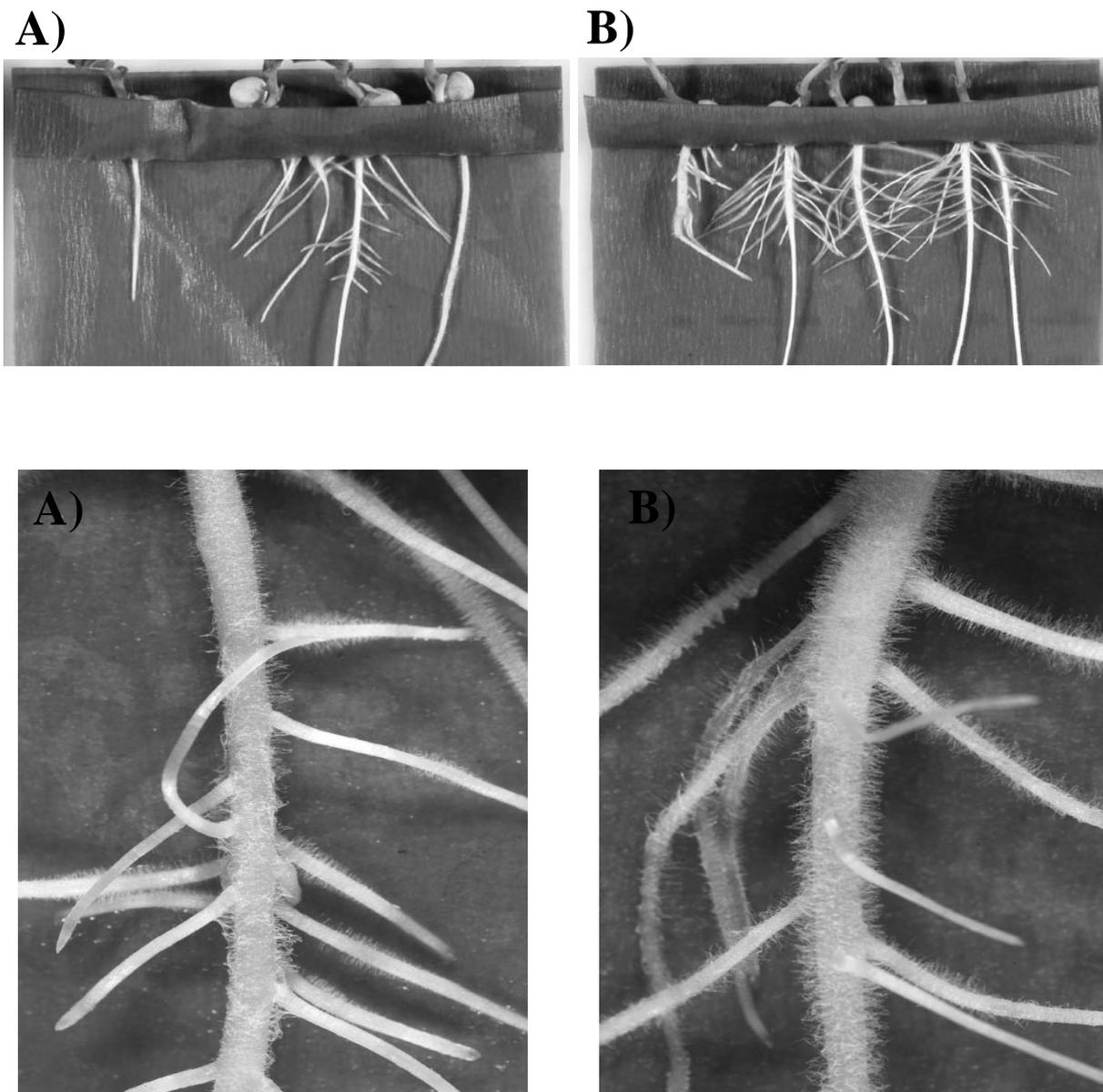


Figura 7. Radici di *Pisum* infettate con il ceppo di *R. leguminosarum viciae* wild-type A) e quello iperproduttore di IAA B); le piante nell'immagine ingrandita B) presentano un maggior numero di radici laterali, un maggiore ispessimento della radice principale e più peli sulla radice principale e su quelle laterali

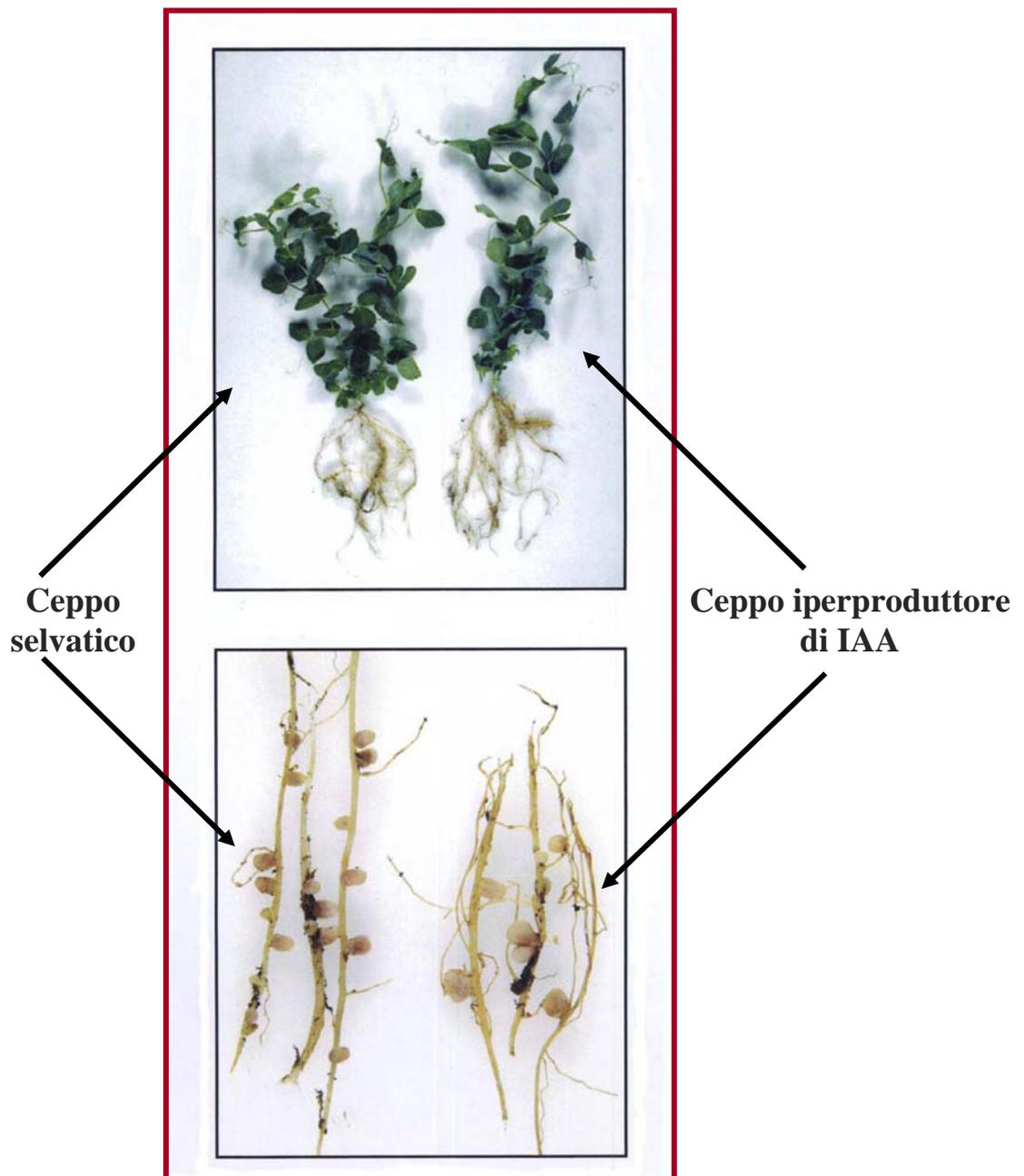
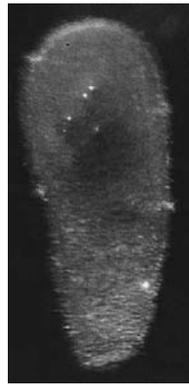


Figura 8. Piante leguminose di *Vicia hirsuta* infettate con il ceppo di *Rhizobium* wild-type e quello iperproduttore di IAA, dopo 73 giorni dall'infezione

L'aumento della velocità di formazione di nuovi strati cellulari, correlabile alla maggiore attività meristemica osservata nei noduli derivanti dal ceppo iperproduttore, può essere associata alla presenza, in questi noduli, di maggiori concentrazioni di IAA. E' noto che tale molecola influenza la divisione cellulare in nodulo [71], per cui l'aumento della concentrazione di IAA può condurre ad una accelerazione delle fasi di sviluppo. Inoltre, non solo i noduli, ma anche i batteroidi del ceppo selvatico sono morfologicamente diversi da quelli contenuti nei noduli derivanti dal ceppo iperproduttore: in particolare, questi ultimi generano formazioni allungate non riscontrate nei batteroidi selvatici e mostrano un ritardo nella senescenza (figura 9). L'aumentata produzione batterica di IAA comporta anche un aumento del 30 % dell'attività nitrogenasica nei noduli contenente i batteroidi del ceppo iperproduttore. Infine, le piante infettate con il rizobio iperproduttore di IAA, presentano un aumento del peso secco dei fusti pari a circa il 50 %, ed un aumento della produzione di semi pari a circa il 30%, dopo 73 giorni dall'infezione.

Da questi ultimi risultati di tipo applicativo nasce l'idea che l'uso di ceppi iperproduttori di IAA potrebbe sostituire quello dei fertilizzanti di sintesi, qualora analisi in campo dimostrino che la produttività di piante leguminose nodulate da tali ceppi sia maggiore o almeno paragonabile alla resa ottenuta con l'uso dei fertilizzanti. Risultati che confermano tale ipotesi sono stati ottenuti utilizzando un ceppo di *Azospirillum brasilense* iperproduttore di IAA. Esso porta ad un incremento della resa in granella in piante di grano, superiore a quella ottenuta se confrontate con le rispettive piante inoculate con il ceppo selvatico o non inoculate [72].

In generale, i dati sperimentali, fino ad ora riportati, evidenziano il coinvolgimento della produzione batterica di IAA nel processo di



A



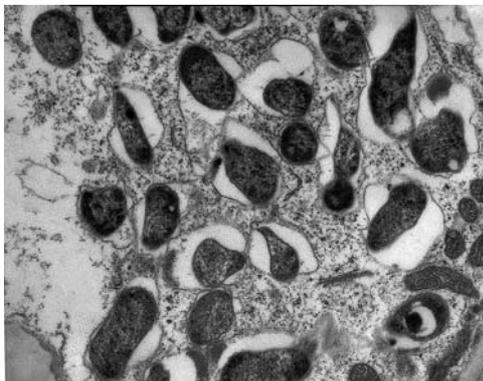
B



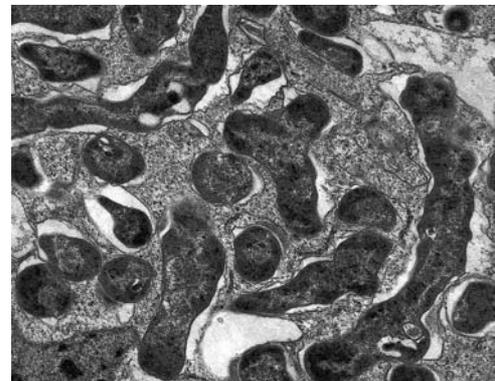
C



D



E



F

Figura 9. Immagini al microscopio ottico di noduli generati dal ceppo di *Rhizobium l. viciae* wild-type (A e C) e quello iperproduttore di IAA (B e D) dopo 3 (A e B) e 5 (C e D) settimane dall'infezione; E e F rappresentano le immagini al microscopio elettronico dei batteroidi, rispettivamente, del ceppo wild-type e iperproduttore di IAA

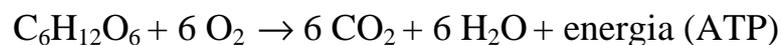
nodulazione, influenzando, in particolare, l'attività meristemica del nodulo e, di conseguenza, la sua morfologia e funzione. La iperproduzione di IAA da parte dei batteri simbiotici potrebbe influenzare non solo determinati processi metabolici della pianta ed, in particolare, il locale bilancio dei fitormoni, ma anche i circuiti regolativi e metabolici, altrettanto complessi e discussi nel prossimo paragrafo, del batterio nello stato simbiotico e non-simbiotico. Questa serie di dati, quindi, assieme a quanto precedentemente descritto sull'IAA lasciano ipotizzare, in una visione più generale della diversità degli effetti mediati da tale molecola, la sua capacità di alterare processi metabolici importanti per la cellula, per il cui studio è necessario una conoscenza molecolare molto vasta. Quanto fino ad ora descritto in letteratura ha evidenziato il fatto che le analisi riguardanti la biosintesi ed i pathway di trasduzione del segnale di questa molecola hanno fornito preziose informazioni; risulta, altrettanto evidente, che ci sono molti tasselli mancanti da riempire. Sicuramente, grazie all'applicazione delle nuove e potenti tecniche di analisi chimica e di genetica molecolare, la velocità con cui saranno effettuate nuove scoperte, in tal senso, subirà una notevole accelerazione rispetto al passato.

1.6. Metabolismo

I microrganismi sono caratterizzati da una grande versatilità metabolica, sia tra le varie specie sia all'interno della stessa specie o ceppo: essi, infatti, sono capaci di crescere in condizioni ambientali che cambiano continuamente e, molto spesso, rapidamente. Per fare questo, i batteri hanno sviluppato una serie di meccanismi regolativi che facilitano la conversione dei nutrienti disponibili nelle componenti dei pathway metabolici centrali e la produzione sia di energia sia di nuovo materiale

cellulare necessari per i processi biosintetici e la crescita. Parecchi aspetti del metabolismo microbico sono comuni a quelli degli organismi superiori: ad esempio, il trasporto di elettroni associato alle reazioni di ossidazione o l'uso della molecola di ATP (adenosina trifosfato) come principale fonte di energia chimica e forma di utilizzazione dell'energia. Le varie analogie sono alla base della teoria dell'unitarietà biochimica tra gli esseri viventi e i batteri sono stati spesso usati come modello sperimentale per studi di reazioni biochimiche, essendo sostanzialmente identiche, dal punto di vista molecolare, a quelle degli altri microrganismi. Tuttavia, nei procarioti, sono presenti diversi tipi di processi, ad esempio, per generare energia, che sono sconosciuti negli organismi superiori. Per i microrganismi classificati dal punto di vista nutrizionale e metabolico come eterotrofi chemiorganotrofi, l'energia si ottiene per ossidazione dei composti organici. I carboidrati sono i più comuni composti organici utilizzati sia come fonte di energia sia come fonte di carbonio, prelevata dalla cellula, riversata nei pathway metabolici centrali e convertita in biomassa. I pathway metabolici centrali contengono composti fosforilati, acidi carbossilici, tioesteri del Coenzima A (CoA) ed enzimi, i quali sono organizzati in pathway che variano a seconda della natura chimica della fonte di carbonio e classificabili come: glicolisi (Embden-Myerhoff-Parnas, EMP), via del pentosio fosfato (PP), via di Entner-Doudoroff (ED), ciclo di Krebs (ciclo degli acidi tricarbossilici, TCA). Molte reazioni coinvolgono cofattori (NADP⁺/NADPH, NAD/NADH, FAD/FADH, ATP/ADP/AMP, CoA, ioni inorganici come Mn²⁺ e fosfato) riciclati e mantenuti in quantità costanti. Il numero di enzimi coinvolti è più grande del numero dei prodotti poiché alcune reazioni hanno più di un enzima utilizzabile e alcune di esse, irreversibili, utilizzano differenti enzimi a seconda della loro direzione. L'ossidazione dei carboidrati ha come risultato la sintesi di ATP come

fonte di energia chimica utilizzabile per tutti i processi vitali. Quando l'ossidazione della molecola organica è completa e l'accettore finale di elettroni è l'O₂, si parla di respirazione (metabolismo aerobico). L'ossidazione completa del glucosio, che generalmente è considerato il composto carbonioso di riferimento, coinvolge tre vie biochimiche: glicolisi (EMP), ciclo di Krebs (ciclo TCA) e fosforilazione ossidativa. Un'altra via metabolica alternativa alla glicolisi è la via di Entner-Doudoroff (ED), che è tipica dei batteri aerobi-obbligati (ad esempio le specie appartenenti al genere *Rhizobium*). La glicolisi è una delle possibili vie, nei procarioti, di utilizzazione del glucosio ed è un processo comune anche al metabolismo anaerobico e fermentativo, che consiste nell'ossidazione parziale di una molecola organica. La respirazione è, invece, un processo in cui si ha una completa ossidazione del substrato organico e che richiede il ciclo di Krebs: infatti, l'acido piruvico, dopo la conversione in acetil-CoA, imbecca la via degli acidi tricarbossilici, ciò conduce a una completa ossidazione del glucosio a CO₂ e alla formazione di intermedi che saranno utilizzati per la biosintesi di molecole come gli amminoacidi (aspetto anabolico del ciclo di Krebs). La reazione generale del processo respiratorio che interessa il glucosio è:



A tale reazione esoergonica corrispondono circa 700000 calorie per molecola di glucosio; la produzione massima di energia utilizzabile è di 38 ATP/molecola di glucosio (pari a circa 380000 calorie), la resa energetica si avvicina quindi al 50 % (il resto dell'energia viene dissipato come calore).

Lo studio del metabolismo dei carboidrati, nei batteri azotofissatori appartenenti al genere *Rhizobium*, è stato inizialmente affrontato utilizzando metodi radiorespirometrici ed esperimenti enzimologici, al fine di definire i principali pathway di degradazione degli zuccheri. Tale approccio, basato sull'utilizzo dei più svariati substrati come uniche fonti di carbonio e di energia, ha evidenziato sostanziali differenze nel catabolismo dei composti carboniosi da parte dei vari ceppi di rizobio. Nel 1972, *Martinez-De Drets et al.* suddivisero, in base a determinazioni enzimatiche, ben 34 ceppi di rizobio in due gruppi: i rizobi "fast growing" con attività NADP-6-fosfogluconato deidrogenasica (NADP-6PGD), enzima della via PP, non riscontrabile nel secondo gruppo di rizobi "slow growing", caratterizzati da minori velocità di crescita [73]. Successivi studi di isolamento e caratterizzazione biochimica di mutanti in specifici pathway degradativi hanno permesso di definire la via ED come il principale pathway di degradazione dei carboidrati in *Rhizobium* (figura 10), la glicolisi e la via PP, invece, come vie in ogni caso operative, perché alcuni dei loro enzimi sono presenti in vari ceppi, ma incomplete [74]. Tuttavia, *Mulongoy et al.* hanno osservato che un ceppo derivativo di *R. japonicum* con elevata efficienza di fissazione dell'azoto e un attivo ciclo di Krebs, metabolizza il glucosio preferenzialmente attraverso la via EMP, che è noto essere una fonte di energia più efficiente del pathway ED [75].

Sin dai primi studi alla scoperta dei pathway metabolici di rizobio, si è cercato di relazionare il catabolismo dei carboidrati, sorgente di energia e fonte di metaboliti, alle proprietà simbiotiche dei vari ceppi di rizobio. Nella simbiosi rizobi-leguminose, infatti, la pianta fornisce ai batteri carbonio ridotto come fonte di energia necessaria per fissare l'azoto. La natura qualitativa di questa fonte di energia è oggetto di studio da molti anni, perché la determinazione delle vie metaboliche utilizzate dai

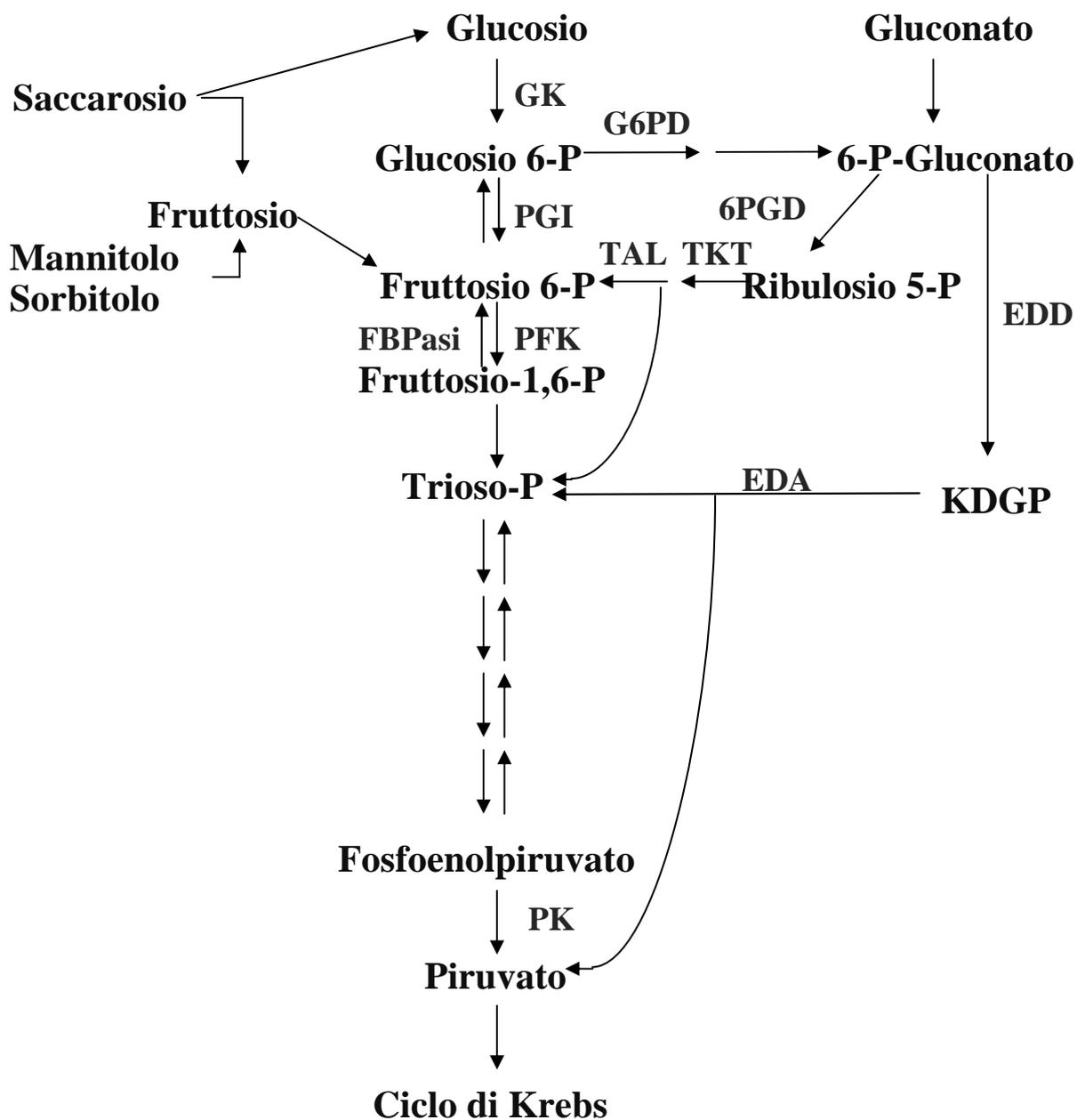


Figura 10. Schema del principale pathway di degradazione dei carboidrati in *S. meliloti*. Gli intermedi metabolici e gli enzimi sono così abbreviati: glucochinasi (GK); fosfoglucoisomerasi (PGI); fosfofruttochinasi (PFK); fruttosio-1,6-bisfosfato fosfatasi (FBPasi); piruvato chinasi (PK); glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD); 6-fosfogluconato deidrogenasi (6PGD); transchetolasi (TKT); transaldolasi (TAL); 6-fosfogluconato deidratasi (EDD); 2-cheto-3-deossi-6-fosfogluconato (KDPG); KDPG aldolasi (EDA)

batteroidi e la loro regolazione sono fondamentali per la comprensione del processo di differenziamento dei rizobi dallo stato non-simbiotico a quello simbiotico. Tuttavia, non è ancora chiaro se i batteroidi e i batteri free-living utilizzano gli stessi pathway catabolici, ma diversi studi hanno evidenziato l'importanza degli intermedi del ciclo di Krebs e non degli esosi come fonti di carbonio per i batteroidi. Infatti, in rizobi "fast growing" (*S. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum* bv *viciae*) mutanti con difetti nel metabolismo degli esosi sono risultati efficienti nella simbiosi (fenotipo Fix⁺) [76]; mutanti di tali rizobi, invece, difettivi nel uptake di acidi dicarbossilici sono Fix⁻. Alte concentrazioni di acidi dicarbossilici, malato e succinato, sono state determinate in nodulo [77] e a tali intermedi del ciclo di Krebs è stato riconosciuto un ruolo importante nel determinare l'efficienza del processo simbiotico. Enzimi del ciclo TCA (figura 11), quali citrato sintasi (CS), isocitrato deidrogenasi (ICD), fumarasi (FUM), malato deidrogenasi (MDH) e α -chetoglutarato deidrogenasi (α -KGD), sono stati trovati in batteroidi di diverse specie di *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Rizobi con mutazioni nei geni che codificano enzimi del ciclo di Krebs, come succinato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi, inducono la formazione di noduli inefficienti [78] [79]; in particolare, un mutante di *S. meliloti* privo di attività ICD forma su alfalfa noduli che non fissano l'azoto [80] e un mutante di *S. fredii* *gltA*, codificante l'enzima CS, presenta diminuite capacità di nodulazione, inducendo sulle radici di soia noduli inefficienti e contenenti pochi batteroidi, per lo più disintegrati all'interno dei vacuoli delle cellule vegetali [81]. Nonostante, l'evidente relazione tra enzimi del ciclo di Krebs ed efficienza della fissazione dell'azoto, alcuni studi su *B. japonicum* hanno dimostrato che tale pathway non opererebbe a piena capacità durante la fissazione [76]. E' noto, infatti, che gli enzimi MDH, α -KGD e ICD del ciclo di Krebs sono inibiti in vitro da alti valori

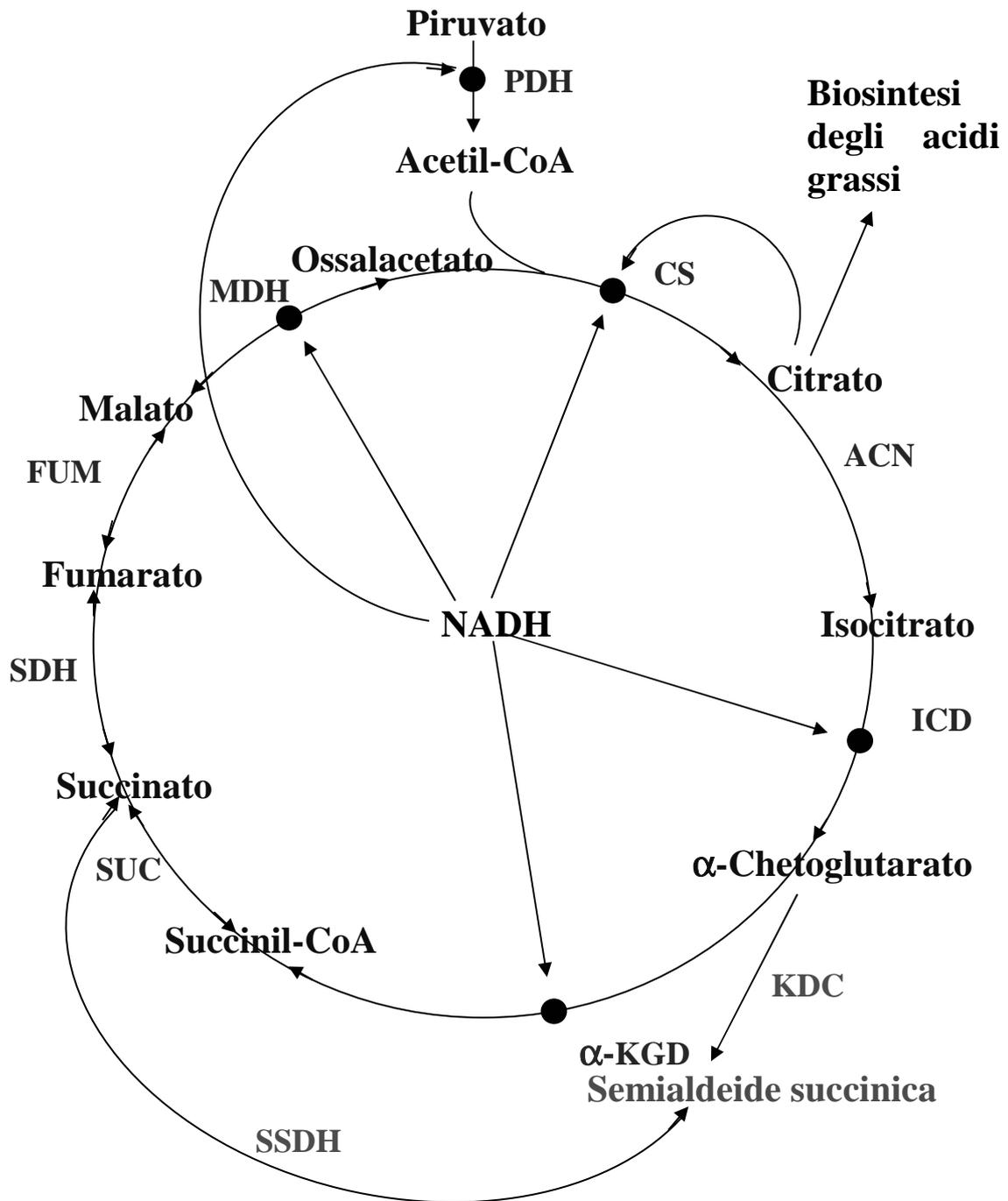


Figura 11. Ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Gli enzimi sono così abbreviati: citrato sintasi (CS); aconitasi (ACN); isocitrato deidrogenasi (ICD); α -chetoglutarato deidrogenasi (α -KGD); succinil-CoA sintasi (SUC); succinato deidrogenasi (SDH); fumarasi (FUM); malato deidrogenasi (MDH). E' rappresentato il pathway proposto per il catabolismo dell' α -chetoglutarato: α -chetoglutarato decarbossilasi (KDC) e succinico semialdeide deidrogenasi (SSDH). Sono indicati gli enzimi inibiti dal NADH, secondo un meccanismo di inibizione da prodotto, e tra questi l'enzima piruvato deidrogenasi (PDH), che catalizza la reazione di collegamento tra la glicolisi e il ciclo di Krebs

del rapporto NAD(P)H/NAD(P) [82]. A causa di tale regolazione metabolica, è stato ipotizzato che il flusso di carbonio, attraverso questi steps del ciclo, potrebbe essere bloccato dalla fosforilazione ossidativa e dalla rigenerazione dei nucleotidi piridinici, processi particolarmente favoriti dalla bassa concentrazione di O₂ presente nel nodulo. Perciò, i batteroidi, come conseguenza della inibizione dell' α -KGD, accumulano grandi quantità di glutammato e la biosintesi e la secrezione di amminoacidi, nonché la biosintesi di polidrossibutirati (PHB), sono parte di un meccanismo atto a rimuovere l'eccesso di carbonio e di potere riducente quando il ciclo di Krebs è limitato o bloccato [83]. Poiché la principale fonte di carbonio per i batteroidi sono gli acidi dicarbossilici, un'inibizione estensiva del ciclo di Krebs, durante la simbiosi, potrebbe compromettere la richiesta di ATP e potere riducente per la nitrogenasi. Per questo motivo, è stata ipotizzata l'esistenza, durante la simbiosi, di alternative vie cataboliche degli acidi dicarbossilici in grado di aggirare il blocco dell' α -KGD. Tuttavia, non si hanno evidenze biochimiche dell'esistenza in rizobio di tali alternativi e potenziali pathway metabolici. Tuttavia, un mutante α -KGD (*sucA*) di *B. japonicum*, diversamente da quelli di altri rizobi, è capace di crescere su substrati (malato, succinato, β -idrossibutirato) che normalmente richiedono un ciclo TCA completo per il loro catabolismo [84]; nonostante abbia un fenotipo di nodulazione ritardato, tale mutante *sucA* è in grado di formare batteroidi efficienti, perchè presenta una α -chetoglutarato decarbossilasi (KDC) attiva che, assieme alla succinico semialdeide deidrogenasi (SSDH) (figura 11), permetterebbe al TCA di funzionare nelle condizioni di inibizione dell' α -KGD [85].

Quanto fino ad ora descritto ha evidenziato che la maggior parte degli studi fisiologici e metabolici di *Rhizobium* mirano a comprendere come questo

organismo partecipi alla simbiosi, tralasciando, invece, l'analisi di come questo processo correli con la fisiologia e il metabolismo del batterio nella forma free-living. E' noto, ad esempio, che batteroidi di *B. japonicum* accumulano polidrossibutirati (PHB) durante la simbiosi, mentre fissano l'azoto, e utilizzano tali composti come fonte di energia e di potere riducente per la fissazione in ambienti con bassi livelli di O₂ [76]. Molte specie appartenenti al genere *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* accumulano PHB, materiali poliesteri di riserva, sia nello stato simbiotico sia non-simbiotico [86] [87]. Differenti pathway di produzione dei PHB sono stati caratterizzati in diversi batteri, ma quello più comune comporta la condensazione di due molecole di acetil-CoA per formare acetoacetil-CoA, la cui riduzione e successive reazioni di polimerizzazione portano alla formazione di PHB (figura 12). Il flusso di carbonio attraverso questo pathway, come per il ciclo di Krebs, è fortemente influenzato dalle condizioni di crescita e, in particolare, i due cicli dovrebbero competere per il comune metabolita iniziale, l'acetil-CoA. Tuttavia, la funzione dei PHB nel metabolismo cellulare di *Rhizobium* non è stata ben definita. In mutanti di *R. etli* incapaci di sintetizzare PHB, i valori del rapporto NAD/NADH sono più bassi e la secrezione di composti quali lattato, acetato, piruvato, fumarato, malato e β-idrossibutirato è maggiore del ceppo selvatico [88]. In risposta ad uno stato metabolico fermentativo, caratterizzato da livelli ridotti di O₂, oltre all'accumulo di PHB, acidi organici e amminoacidi sono secreti nel mezzo di coltura di *R. etli* [89]. L'accumulo, la degradazione e l'utilizzo di PHB in alcuni batteri, in condizioni di stress, costituiscono un meccanismo che favorisce il ritardo della degradazione dei componenti cellulari e, quindi, la sopravvivenza in ambienti competitivi, come il suolo, ossia in condizioni limitanti di carbonio e di energia [86] [87]. Inoltre, è stato proposto che l'accumulo di PHB funzioni come fonte di potere

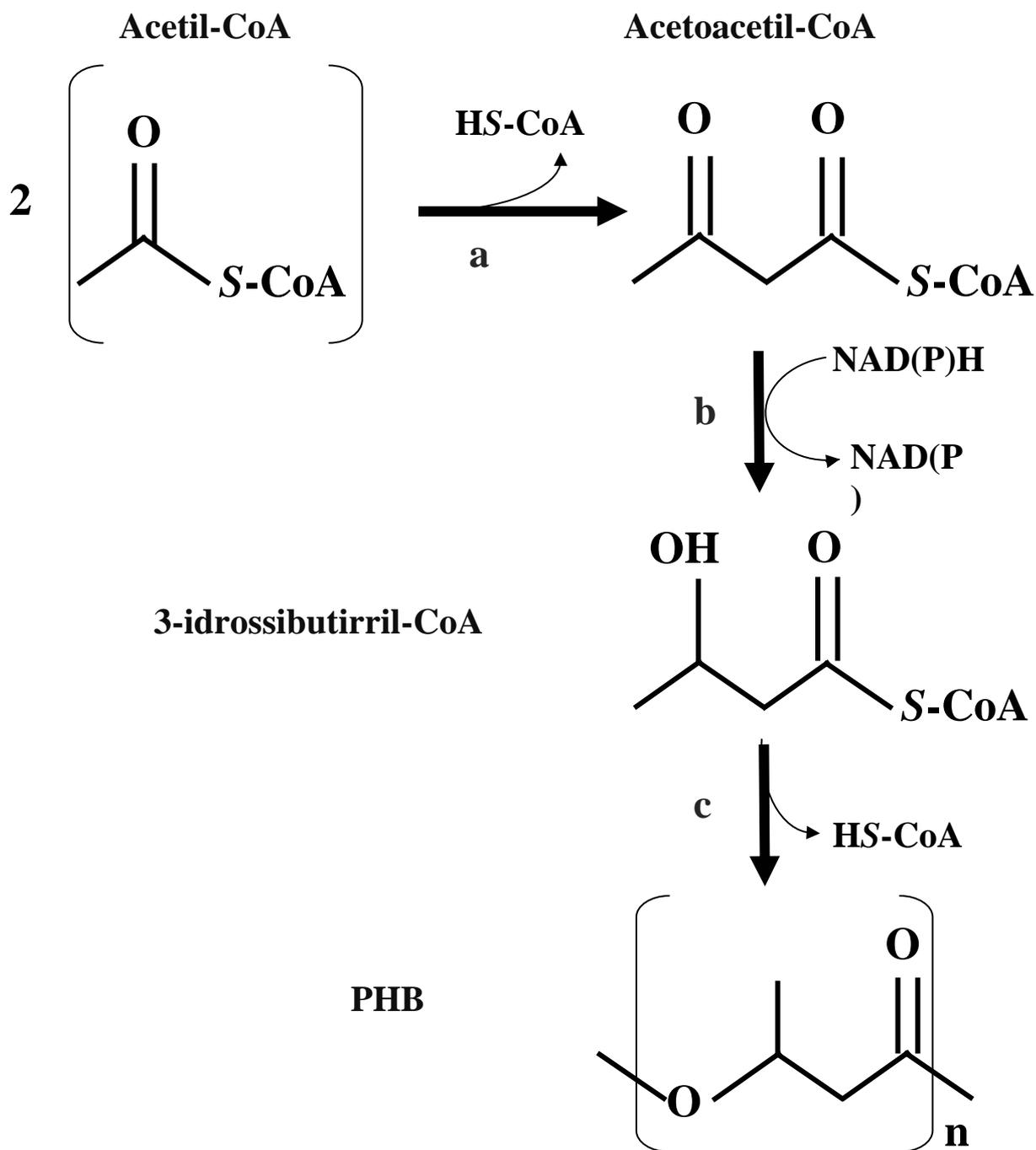


Figura 12. Schema della biosintesi di poli- β -idrossibutirradi (PHB) a partire dall'acetil-CoA in tre reazioni: la prima a), catalizzata dall'enzima β -chetotilasi, di condensazione di due molecole di acetil-CoA; la seconda b), catalizzata dall'enzima acetoacetyl-CoA riduttasi, di riduzione dell'acetoacetyl-CoA per formare il 3-idrossibutirril-CoA, che, poi, subisce una reazione c) di polimerizzazione catalizzata dall'enzima PHA sintasi

riducente in modo da permettere, sequestrando nucleotidi ridotti, al ciclo di Krebs di operare in condizioni microaerobiche [76]. Ciò suggerisce l'esistenza di un meccanismo regolatorio altamente sensibile che controlla l'accumulo o la degradazione di PHB, permettendo la rapida modulazione dei livelli di potere riducente e substrati ossidabili [88]. Nonostante l'accumulo di PHB consumi energia, carbonio e potere riducente che potrebbero essere utilizzati nel ciclo di Krebs, il loro utilizzo previene l'inibizione di diversi enzimi del ciclo stesso, in condizioni limitanti di O₂. L'osservazione che alte concentrazioni di O₂ sono richieste per la degradazione dei PHB conduce all'interessante domanda se questo processo avviene in nodulo; per tale motivo, *Stam et al.* hanno proposto due possibili ruoli per la degradazione dei PHB in *Rhizobium*: il primo, di protezione della nitrogenasi, quando la concentrazione di O₂ aumenta nel nodulo e il secondo, di fonte di carbonio e di energia durante i periodi di sopravvivenza nel suolo [90].

In conclusione, l'inaspettata flessibilità metabolica dei batteri e, in questo caso, di *Rhizobium*, evidenzia che c'è ancora molto da imparare circa i possibili circuiti biochimici e i potenziali meccanismi regolativi che questi organismi possono utilizzare nei processi metabolici cellulari.

1.7. Proteomica

La vita di una cellula dipende da una precisa organizzazione strutturale e da una serie di processi biochimici: entrambi sono garantiti dalla presenza di numerose molecole quali acidi nucleici, proteine e costituenti delle membrane biologiche. Esistono molte sostanze chimiche, come l'IAA, che giocano ruoli importanti nel controllare processi metabolici e regolativi. Per capire come funziona una cellula e, quindi, un organismo, nelle più

svariate condizioni sperimentali, è necessario avere informazioni quali la funzione delle varie macromolecole (RNA e proteine) codificate dal genoma dell'organismo, le loro modalità di interazione, quando esse sono prodotte e quando no, i loro livelli di espressione. Notevoli progressi sono stati fatti in tal senso grazie alla ricerca post-genomica, basata sui risultati del sequenziamento dei genomi. L'interpretazione delle informazioni contenute nella sequenza genomica di un organismo e riguardanti la struttura, la funzione e il controllo dei processi biologici rappresenta una delle principali sfide concettuali e tecniche per gli attuali metodi di ricerca [91]. L'analisi sistematica e quantitativa dell'espressione genica è un emergente strumento utilizzato per distinguere differenti tipi e stati cellulari (metabolici, di attivazione o patologici). In tale contesto, la proteomica, intesa come analisi globale dell'espressione genica a livello proteico e analisi funzionale delle proteine, è complementare alla genomica. La conoscenza della sequenza completa dei genomi non è, infatti, sufficiente per la comprensione della funzione biologica e la determinazione dell'espressione genica a livello proteico è potenzialmente più informativa della corrispondente determinazione a livello degli mRNA. Le proteine, i maggiori catalizzatori delle funzioni biologiche, contengono diverse dimensioni di informazioni che collettivamente indicano lo stato funzionale attuale e non quello potenziale rappresentato dall'analisi degli mRNA. Inoltre, la scoperta dei meccanismi post-trascrizionali che controllano la velocità di sintesi ed il tempo di vita medio delle proteine e la non predittiva relazione lineare tra i livelli di espressione degli mRNA e le corrispondenti proteine indicano che anche la diretta misurazione dell'espressione proteica è essenziale per l'analisi dei sistemi e dei processi biologici [92], ovvero per chiarire parte dei network genetici e studiare la regolazione di particolari pathway biologici all'interno di un organismo. La

proteomica, intesa come analisi delle proteine su vasta scala, è basata su tecniche e applicazioni, alcune già ampiamente utilizzate e altre di recente impiego e concezione; essa presenta diverse aree di investigazione raggruppabili nei termini di proteomica strutturale, di espressione e funzionale [93]: la prima basata sulla caratterizzazione di proteine mediante loro identificazione e determinazione delle modifiche post-traduzionali; proteomica di espressione o “differenziale” rivolta allo studio dei livelli di proteine espresse e l’ultima, volta allo studio delle interazioni specifiche proteina-proteina con l’ausilio della spettrometria di massa (MS).

Una metodica particolarmente adatta all’analisi dei profili di espressione proteica è costituita dalla combinazione dell’elettroforesi bidimensionale (2DE) e della spettrometria di massa (MS) accoppiate alla bioinformatica e all’analisi delle banche dati. Gli importanti progressi tecnici connessi alla 2DE e alla MS di proteine, hanno notevolmente aumentato la sensibilità e la riproducibilità dell’analisi proteomica, creando così una tecnologia integrata. L’elettroforesi bidimensionale consente di analizzare miscele complesse di proteine estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici. Questa tecnica separa le proteine in base a due differenti proprietà in due fasi separate: la prima dimensione, focalizzazione isoelettrica (IEF), separa le proteine in base al loro punto isoelettrico (pI); la seconda dimensione, elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE), separa le proteine in base al loro peso molecolare (MW). Poiché questi due parametri non sono relazionati, il gel 2DE è caratterizzato da una distribuzione piuttosto uniforme di spots, ciascuno dei quali corrisponde ad una singola specie proteica presente nel campione di partenza. Nella tecnica originale introdotta da *P. H. O’ Farrell* nel 1975, la separazione nella prima dimensione era condotta su gel di poliacrilammide contenenti ampholine e polimerizzati in tubi capillari di vetro [94]. La potenzialità

della 2DE come tecnica di separazione biochimica è stata riconosciuta sin dalla sua introduzione. La sua applicazione, tuttavia, è diventata significativa soltanto dal 1990, in seguito ad una serie di sviluppi riguardanti tale tecnica e con l'affermarsi delle nuove e rivoluzionarie tecniche di MS. Nella tecnica 2DE, oggi comunemente utilizzata e introdotta da A. Gorg *et al.* (1988), i gradienti di pH generati da carrier di ampholine sono stati sostituiti da gradienti di pH immobilizzati e i gel capillari sono stati sostituiti con gel supportati da un sostegno di plastica [95]. Inoltre, numerose altre innovazioni sono state introdotte al fine di migliorare la sensibilità e la riproducibilità del sistema 2DE e ridurre i limiti. Dal momento che l'elettroforesi 2DE può separare non più di 1000 proteine, se il campione di partenza è un estratto proteico totale, allora sul gel 2DE sono visualizzate le proteine più abbondanti. Una soluzione a tale limite è quello di effettuare prima dell'elettroforesi 2-DE un prefrazionamento del campione al solo scopo di ridurre la complessità del campione stesso e le differenze in abbondanza [93]. La preparazione del campione, prima della separazione mediante 2DE, è universalmente riconosciuta come la fase più critica in termini di riproducibilità e sensibilità: i protocolli variano enormemente a seconda della natura e varietà dei campioni. Inoltre, per migliorare la sensibilità di rivelazione delle proteine minoritarie, si utilizzano gel con estesi range di separazione e particolari coloranti di proteine fluorescenti. Per la separazione mediante 2DE delle proteine di membrana, invece, si effettua un pretrattamento con detergenti per renderle completamente solubili e quindi analizzabili [91]. Ma quella che probabilmente costituisce la prospettiva più interessante ed innovativa della proteomica è la possibilità di identificare mediante spettrometria di massa quelle proteine di particolare interesse, separandole meccanicamente dai gel 2DE. Dalla digestione enzimatica di tali proteine

con una proteasi sequenza specifica, come la tripsina, si ottiene una miscela di peptidi, le cui masse sono determinate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (ionizzazione mediante sorgente laser assistita da matrice, con analizzatore di massa “a tempo di volo”). Questo è l’approccio più utilizzato per l’identificazione di proteine da organismi il cui genoma è completamente sequenziato (figura 13). Le masse sperimentali così ottenute, infatti, sono confrontate con quelle, teoriche, calcolate utilizzando un database di sequenza (Peptide Mass Fingerprinting o PMF) e sfruttando la specificità dell’enzima utilizzato per ottenere i dati sperimentali. In seguito al confronto tra le masse dei peptidi calcolate teoricamente e quelle determinate sperimentalmente mediante analisi MALDI, è possibile identificare correttamente una proteina solo se il numero di peptidi è sufficiente e se l’identità di sequenza è alta [96]. Il motivo di analizzare peptidi, piuttosto che le proteine, risiede nel fatto che le proteine separate dal gel sono difficili da eluire e da analizzare mediante MS e il solo peso molecolare delle proteine non è sufficiente per una identificazione in databases. Altro approccio per l’identificazione di proteine mediante MS si basa sulla frammentazione di ciascun peptide nella miscela triptica per ottenere informazioni sulla sequenza. In tale metodo i peptidi sono ionizzati mediante “ionizzazione elettrospray” (ESI) direttamente dalla fase liquida e analizzati mediante MS tandem (MS/MS), capace di risolvere peptidi in una miscela, di isolare una specie alla volta e di dissociarli in amminoacidi o frammenti contenente l’estremità C-terminale. Uno spettrometro di massa MS/MS è più complesso del MALDI e il suo principale vantaggio è che, per l’identificazione di una proteina, le informazioni sulla sequenza dei peptidi sono molto più specifiche rispetto a quelle sulla massa. Parallelamente allo sviluppo della tecnologia 2DE-MS, si è avuta la creazione di vaste banche-dati di proteine ed, in particolare, la

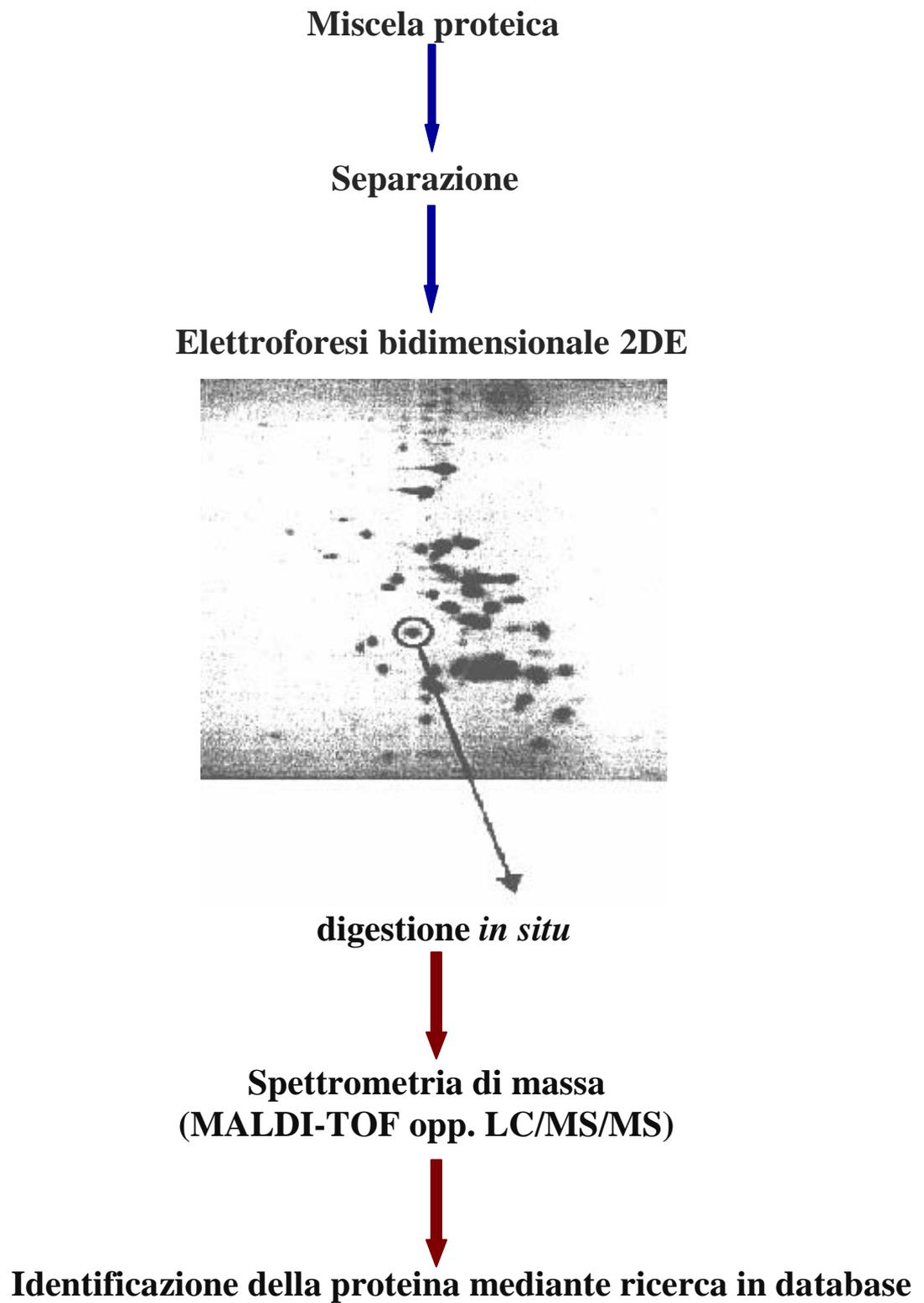


Figura 13. Schema-analisi proteomica basata sulla combinazione di elettroforesi bidimensionale (2DE) e spettrometria di massa (MS)

catalogazione delle proteine identificate da diversi gel 2DE per creare databases quali SWISS-2DPAGE, che per ogni proteina fornisce informazioni fisiologiche e patologiche, dati sperimentali (pI, MW, composizione amminoacidica, masse peptidiche), oltre alle referenze bibliografiche e alla localizzazione della proteina sulle mappe 2DE [97]. Attualmente anche l'analisi computazionale dei profili 2DE, altamente complessi, è economicamente fattibile rispetto al passato, grazie alla disponibilità di computer potenti e software adatti, che permettono grazie a sofisticati algoritmi di effettuare analisi quantitative dei profili di espressione proteica di differenti campioni.

Le possibili applicazioni della strategia 2DE-MS sono molteplici e, in generale, i risultati degli studi effettuati con questa tecnologia sono utilissimi per fare confronti tra il profilo di espressione proteica di un organismo in condizioni diverse. Tipicamente, si effettuano confronti tra cellule sane o cellule malate, oppure cellule selvatiche e cellule in qualche modo alterate, o ancora tra cellule cresciute in presenza o in assenza di un nutriente o di un particolare composto, come l'IAA, del quale si vogliono studiare gli effetti sul metabolismo cellulare. Ad esempio, studi proteomici di *Sinorhizobium meliloti*, l'unico rizobio dal genoma noto [98], sono iniziati nel 1999, prima della realizzazione del progetto di sequenziamento, da *Guerrero et al.* che confrontarono i profili di espressione proteica del batterio durante la fase esponenziale e stazionaria di crescita e anche in risposta al trattamento con un flavonoide, la luteolina [99]. Successivamente, *Djordjevic et al.* hanno analizzato il proteoma di *S. meliloti* 1021 cresciuto in definite condizioni (mezzi di coltura privati di particolari nutrienti) allo scopo di identificare proteine coinvolte in processi di adattamento a stress ambientali [12]. Quindi l'analisi proteomica, in generale, permette di individuare e identificare quali proteine sono

coinvolte in determinati processi metabolici e regolativi, poiché solo le proteine che in qualche modo prendono parte ad uno di questi processi mostreranno una variazione nel profilo di espressione in funzione di condizioni in cui quel processo viene alterato. In conclusione, la proteomica è una scienza multidisciplinare basata su tecniche molto diverse tra loro che coinvolgono biologi, chimici, biochimici ed bioinformatici; essa fornisce gli strumenti non solo per l'analisi funzionale delle proteine e della loro espressione, ma anche per lo studio di vie biochimiche complesse e per la comprensione di processi cellulari.

SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi di dottorato particolare attenzione è stata rivolta allo studio degli effetti indotti dalla somministrazione endogena ed esogena di IAA sui profili di espressione proteica e sul metabolismo cellulare di Rizobio, per una migliore comprensione del processo di simbiosi in cui si utilizzano ceppi iperproduttori di IAA al solo scopo di rendere più efficiente il sistema stesso. Le nostre analisi, quindi, sono state condotte essenzialmente sulla componente procariotica del sistema rizobi-leguminose. Dapprima sono stati analizzati gli effetti di IAA sulla velocità di crescita di cellule batteriche; sulla sopravvivenza cellulare mediante test su piastra e sulla morfologia dei batteri liberi mediante microscopia elettronica. La maggior parte delle nostre ricerche sono state attuate attraverso un insieme di approcci che sono alla base della “biochimica classica” e dell’analisi proteomica; quest’ultima è stata condotta utilizzando l’organismo modello *Sinorhizobium meliloti*, il rizobio più conosciuto e studiato perché il suo genoma, sequenziato nel 2001, è moderatamente grande (6.6 Mb) da permettere studi di tipo genetico. La combinazione dell’elettroforesi bidimensionale (2DE), della spettrometria di massa (MS) e della bioinformatica ha permesso di analizzare gli effetti di IAA sui profili di espressione delle proteine citoplasmatiche e di membrana. L’analisi metabolica, invece, è stata realizzata saggiando le attività di enzimi del metabolismo energetico e determinando i livelli di intermedi e cofattori metabolici. Inoltre, non è stata trascurata l’analisi in pianta necessaria a dimostrare l’efficienza del sistema utilizzato. A tale scopo sono stati analizzati gli effetti della iperproduzione batterica di IAA sulla morfologia dei noduli mediante microscopia ottica; sulla biomassa vegetale e sulla fissazione dell’azoto determinando l’attività nitrogenasica. Tali analisi sono state condotte sulla pianta ospite *Medicago truncatula*, che può considerarsi una leguminosa modello e il sistema sinorizobio-

leguminosa, di conseguenza, il paradigma per lo studio dell'associazione rizobi-leguminose.

RISULTATI

2.1. Descrizione del trattamento esogeno con IAA e della iperproduzione batterica di IAA in *S. meliloti*

2.1a. Curve di crescita

L'analisi delle curve di crescita ha consentito di determinare gli effetti di IAA esogeno ed endogeno sulla velocità di crescita di cellule batteriche di *S. meliloti* 1021. Nelle figure 14 e 15 sono riportate le curve di crescita di cellule di *S. meliloti* wild-type, di quelle trattate con IAA 0,5 mM e del ceppo iperproduttore di IAA, cresciute in terreno minimo, contenente mannitolo come unica fonte di carbonio. L'aggiunta di IAA 0,5 mM è stata effettuata in fase esponenziale (0,6-0,7 OD_{600nm}) e stazionaria (1,5-1,8 OD_{600nm}) come è indicato nelle rispettive curve di crescita. Dai grafici si evince che le aggiunte di IAA 0,5 mM, in entrambi le fasi, non influenzano in modo significativo la velocità di crescita di cellule wild-type, anche se le densità ottiche delle cellule trattate sono sempre leggermente inferiori a quelle delle cellule di controllo, ma mai al di sotto del 85-90%. Per quanto riguarda il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, l'andamento della curva di crescita, in fase esponenziale, è molto simile a quella del ceppo wild-type. Dall'analisi delle due curve, infatti, si può concludere che, per entrambi i ceppi, non esistono differenze nella velocità di raggiungimento della fase stazionaria (cioè fino a 48 ore nella figura 14 o analogamente fino a 2 giorni nella figura 15). Le differenze significative, invece, si hanno nella fase successiva di permanenza in fase stazionaria, caratterizzata da una riduzione delle OD_{600nm} del ceppo iperproduttore di IAA. Inoltre, è stato analizzato l'effetto dell'aggiunta, in fase stazionaria, di altre concentrazioni di IAA, sulla velocità di crescita di cellule wild-type, come riportato nel grafico di figura 16. Le cellule trattate con IAA 0,05

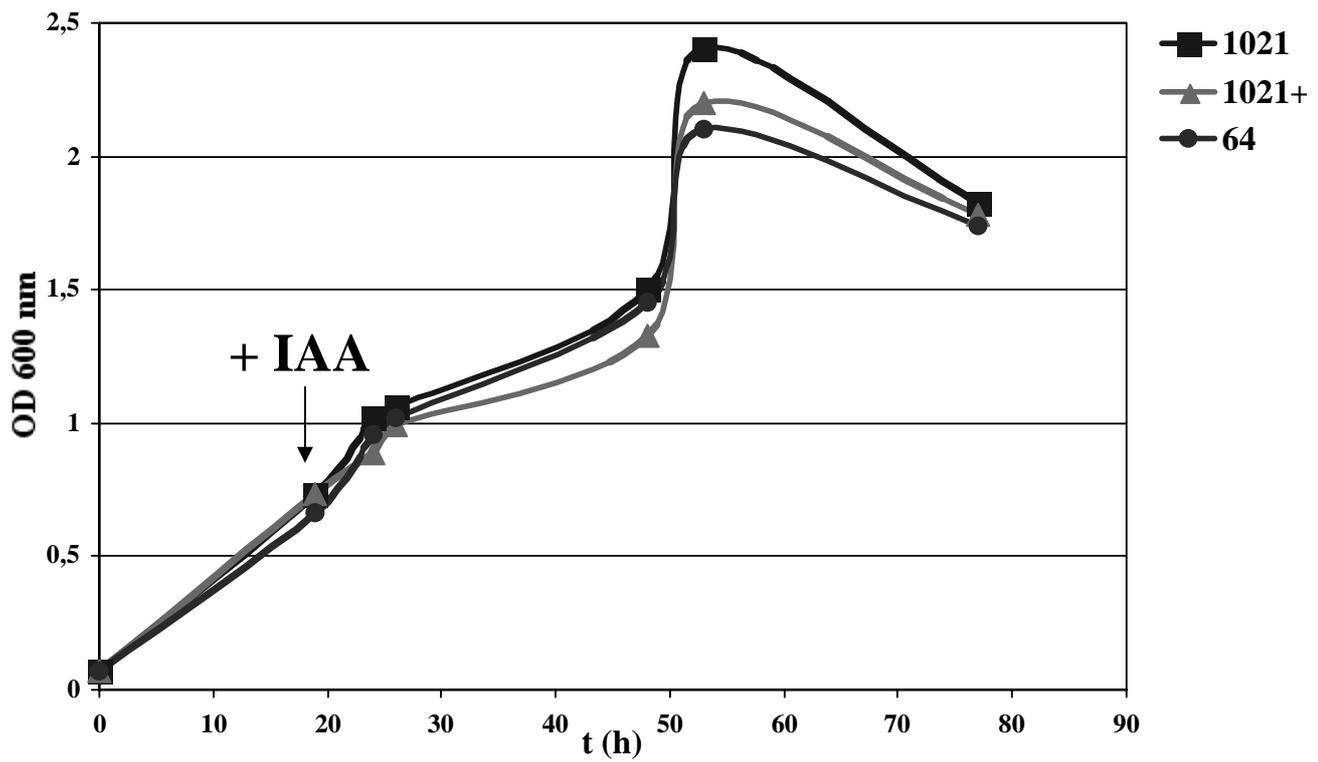


Figura 14. Curve di crescita di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), di cellule wild-type trattate con IAA 0,5 mM in fase esponenziale (1021+) e di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio

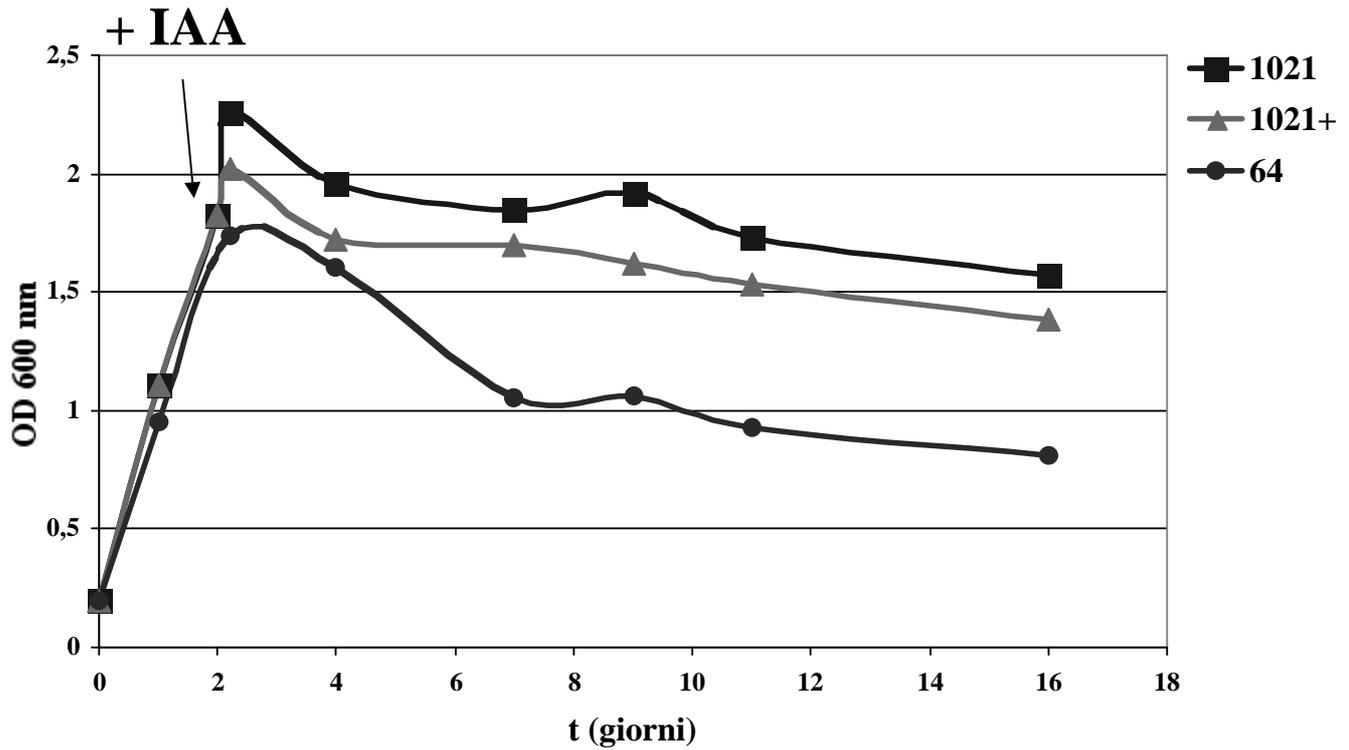


Figura 15. Curve di crescita di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), di cellule wild-type trattate con IAA 0,5 mM in fase stazionaria (1021+) e di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio

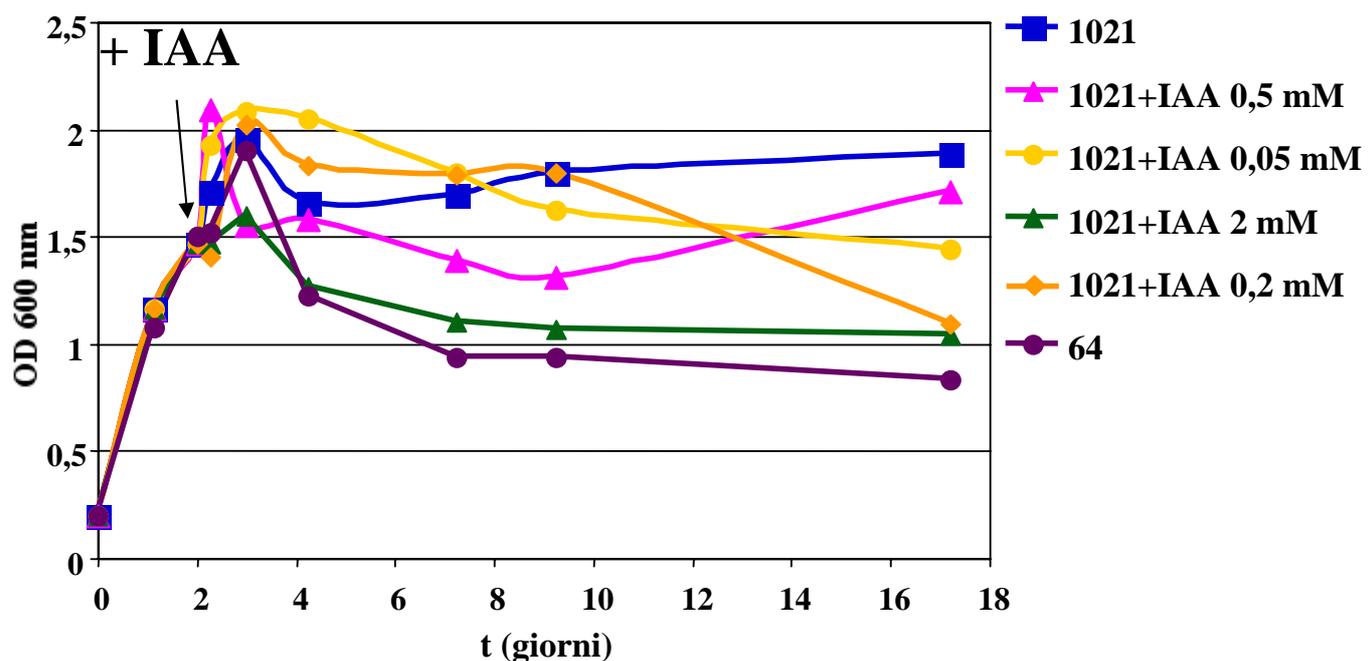


Figura 16. Curve di crescita di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), di cellule wild-type trattate con IAA 0,5 mM, 0,05 mM, 2 mM e 0,2 mM in fase stazionaria e di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio

mM e 0,2 mM presentano un andamento simile a quello delle cellule wild-type, ma con OD_{600nm} leggermente superiori solo nelle prime fasi di permanenza in fase stazionaria. Infine, le cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA 2 mM mostrano una velocità di crescita simile a quella del ceppo iperproduttore di IAA.

2.1b. Analisi di IAA in colture batteriche di *S. meliloti* mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS)

L'azione dei prodotti genici del pathway IAM nel costrutto di figura 6B, contenente il plasmide, in cui sono stati inseriti i geni *tms2* e *iaaM*, e utilizzato per trasformare i rizobi, è quella di aumentare la biosintesi batterica di IAA. Per dimostrare che i rizobi, modificati geneticamente, sono iperproduttori di IAA, è stata determinata la quantità di tale molecola prodotta e rilasciata nel mezzo di coltura, in fase stazionaria di crescita, da *S. meliloti* 1021 wild-type e da quello trasformato con l'opportuno plasmide. Tale analisi quantitativa è stata realizzata mediante gascromatografia combinata alla spettrometria di massa (GC/MS), utilizzando IAA deuterato (D5-IAA) come standard interno, aggiunto, in ogni campione, prima dell'estrazione di IAA con solventi organici e della sua derivatizzazione, come descritto in "Materiali e Metodi". Per effettuare l'analisi quantitativa relativa sono stati identificati i picchi cromatografici i cui spettri contenevano i valori di m/z 202 e 319 relativi, rispettivamente, al picco base e allo ione molecolare di IAA; le aree integrate di tali picchi sono state confrontate con quelle dei corrispondenti picchi, m/z 207 e 324, relativi, rispettivamente al picco base e allo ione molecolare di D5-IAA (figure 17 e 18). Da tale analisi è stato possibile risalire alle concentrazioni relative di IAA presente nei campioni analizzati e che sono risultate pari a

($0,005 \pm 0,002$) e ($0,39 \pm 0,02$) nmol/ml, rispettivamente, per il ceppo di *S. meliloti* wild-type e quello iperproduttore di IAA. Dal momento che la quantità di IAA nel ceppo modificato geneticamente è circa 80 volte maggiore di quella determinata nel ceppo wild-type, è possibile concludere che il pathway IAM è biochimicamente attivo in *S. meliloti* 1021.

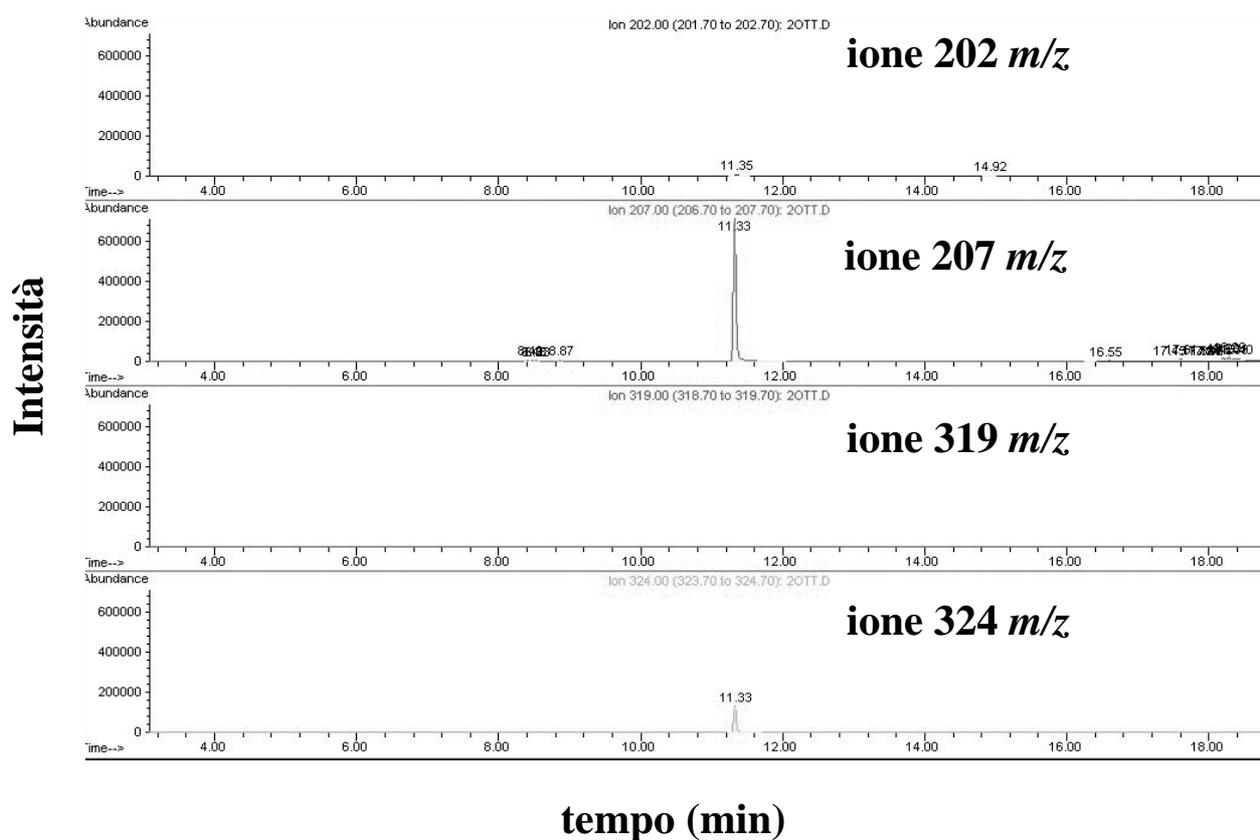


Figura 17. Analisi GC/MS di IAA dai sovrinatanti di colture batteriche di *S. meliloti* wild-type (1021), dopo aggiunta di 100 nmoli di D5-IAA. Per effettuare l'analisi quantitativa relativa sono stati identificati i picchi cromatografici i cui spettri contenevano la coppia di valori di m/z 202 e 319, 207 e 324, relativi al picco base e ione molecolare, rispettivamente, di IAA e D5-IAA

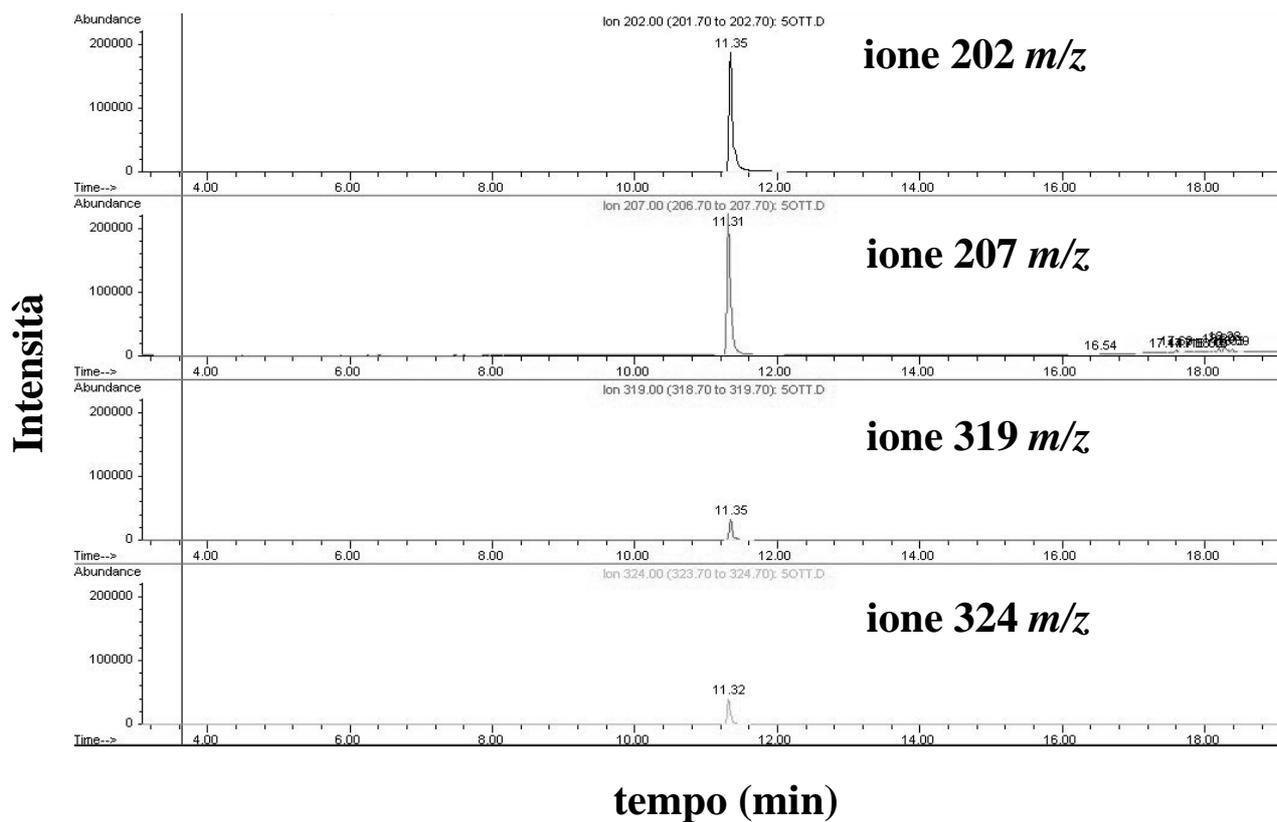


Figura 18. Analisi GC/MS di IAA dai sovranatanti di colture batteriche di *S. meliloti* iperproduttore di IAA (64), dopo aggiunta di 100 nmoli di D5-IAA. Per effettuare l'analisi quantitativa relativa sono stati identificati i picchi cromatografici i cui spettri contenevano la coppia di valori di m/z 202 e 319, 207 e 324, relativi al picco base e ione molecolare, rispettivamente, di IAA e D5-IAA

2.2. Analisi del metabolismo energetico cellulare

2.2a. Catabolismo dei carboidrati

L'attività di tutti gli enzimi chiave del catabolismo dei carboidrati (figura 10) è stata saggiata su estratti proteici totali di cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type, di cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA 0,5 mM e di cellule del ceppo iperproduttore di IAA (64), ossia del ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type trasformato con un opportuno plasmide allo scopo di aumentare la produzione endogena di IAA. Le proteine totali utilizzate sono estratte da cellule cresciute come descritto più in dettaglio nella sezione "Materiali e Metodi" e prelevate nelle fasi esponenziale e stazionaria di crescita.

2.2b. Glicolisi o via di Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)

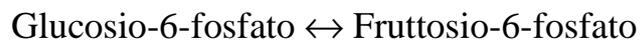
L'enzima *glucochinasi* (GC), responsabile della fosforilazione del glucosio, richiede la partecipazione di ATP come donatore del gruppo fosforico e un metallo, generalmente Mg^{2+} , per catalizzare la seguente reazione, altamente specifica, di trasferimento del gruppo fosfato terminale dell'ATP al glucosio:



L'attività dell'enzima è stata saggiata seguendo spettrofotometricamente la riduzione di NADP in presenza di un eccesso di glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Nelle condizioni del saggio utilizzato, le variazioni di assorbimento a 340 nm risultano proporzionali alla quantità di estratto e

lineari rispetto al tempo per alcuni minuti. I dati, riportati nelle tabelle 2 e 3, sono stati espressi come attività specifiche, che rappresentano le nanomoli di NADP ridotto per minuto per milligrammo di proteina saggata. Dai risultati ottenuti si evince che l'attività di tale enzima, in fase esponenziale di crescita, in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA e di cellule iperproduttrici di IAA sono leggermente diminuite rispetto a quella saggata in estratti proteici totali di cellule wild-type ed in particolare risultano essere, rispettivamente, il 74% e 79% del campione di controllo. In fase stazionaria di crescita, invece, non si apprezzano sostanziali differenze di attività nei tre campioni.

L'enzima *fosfoglucoisomerasi* (PGI) catalizza la seguente reazione di isomerizzazione di un aldoso a chetoso:



L'attività dell'enzima è stata determinata seguendo la riduzione del NADP a 340 nm mediante saggio spettrofotometrico. Dai valori delle attività specifiche riportate nelle tabelle 2 e 3 per i tre campioni, si evince che non sono state riscontrate significative differenze né in fase stazionaria né in fase esponenziale di crescita.

La *fosfofruttochinasi* (PFK) è un enzima chiave della glicolisi, in quanto determina la velocità del flusso di carbonio attraverso tale via metabolica. PFK catalizza la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bisfosfato; nella maggior parte degli organismi, l'ATP è il donatore del gruppo fosforico e la reazione, ATP-dipendente, è irreversibile. Esistono sottotipi di PFK che utilizzano il pirofosfato (PP_i) come donatore del

gruppo fosforico, rendendo la reazione reversibile e non soggetta a meccanismi di controllo allosterici tipici dell'ATP-PFK. Tale enzima è stato saggiato, quindi, utilizzando entrambi i donatori del gruppo fosforico e seguendo spettrofotometricamente le diminuzioni di assorbimento a 340 nm legate alla ossidazione di NADH. Le attività specifiche, riportate nelle tabelle 2 e 3, esprimono le nanomoli di NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina saggiata; tali attività sono state saggiate in cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute come descritto in "Materiali e Metodi", ma utilizzando mannitolo come unica sorgente di carbonio. Da tali dati risulta che le cellule dei tre campioni, cresciute in mannitolo, possiedono una PP_i-PFK attiva in modo significativo rispetto all'enzima ATP-dipendente. Inoltre, l'attività dell'enzima PP_i-PFK, in fase stazionaria di crescita, in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA e di cellule iperproduttrici di IAA è aumentata, rispettivamente, del 30% e del 33% rispetto a quella saggiata in estratti proteici totali di cellule wild-type. In fase esponenziale di crescita, invece, l'aumento, meno pronunciato, è di circa il 20% per entrambi i campioni. Inoltre, per *S. meliloti* iperproduttore di IAA, ma non per il ceppo cresciuto in presenza di IAA, in entrambe le fasi di crescita, si ha un aumento di attività dell'enzima ATP-PFK di circa 4-5 volte rispetto al ceppo selvatico. Le attività dei due tipi di PFK sono state saggiate in estratti proteici totali dei tre campioni, in fase stazionaria di crescita, utilizzando non solo altri carboidrati, diversi dal mannitolo, come unica sorgente di carbonio, ma anche in condizioni limitanti di carbonio (mannitolo 0,1% e 0,02%) e di ossigeno (crescita microaerobica); i relativi dati sono riportati in tabella 4 e 5. Per il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, l'aumento di attività dell'enzima PP_i-PFK (tabella 4) è mantenuto pari al 35% rispetto al wild-type, se le cellule sono cresciute in un terreno liquido contenente esosi (glucosio e fruttosio) come

unica fonte di carbonio. Per il ceppo di *S. meliloti*, cresciuto con IAA e con le stesse sorgenti di carbonio (glucosio e fruttosio), l'aumento di attività oscilla, rispettivamente, tra il 21% e il 28% rispetto al ceppo cresciuto in assenza di IAA. Se le cellule dei tre campioni sono cresciute utilizzando, come sorgente di carbonio, il succinato, acido dicarbossilico, nonché intermedio del ciclo di Krebs, come atteso, non si riscontrano significative differenze di attività dell'enzima PP_i-PFK. Un risultato analogo è stato riscontrato nel caso di crescita in condizioni limitanti di carbonio: in particolare, riducendo ulteriormente la percentuale finale di mannitolo (0,02%) nel mezzo di coltura di cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, si ha una riduzione di attività pari al 88% rispetto al ceppo selvatico. In seguito ad incubazione microaerobica delle cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, in fase esponenziale, si ha un aumento del 32% dell'attività PP_i-PFK rispetto a quella saggiata in cellule di *S. meliloti* wild-type ugualmente incubate in condizioni limitanti di O₂. Per quanto riguarda l'enzima ATP-PFK (tabella 5), in cellule di *S. meliloti*, cresciute in assenza e in presenza di IAA, in glucosio come unica sorgente di carbonio, è stata riscontrata la più bassa attività misurata; in cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, invece, è stato riscontrato un aumento di attività ATP-fosfofruttochinasi pari a 12 volte quella determinata in cellule wild-type cresciute in glucosio. Per quanto riguarda la crescita in fruttosio e succinato, l'aumento di attività ATP-PFK, in cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, è, rispettivamente, di 1,4 e 3 volte l'attività misurata in cellule wild-type. In seguito alla riduzione della percentuale finale di mannitolo nel mezzo di crescita (0,1% e 0,02%), l'attività dell'enzima ATP-PFK in *S. meliloti* iperproduttore di IAA risulta essere, rispettivamente, 4 e 1,5 volte maggiore di quella misurata nel ceppo wild-type, nelle stesse condizioni limitanti di crescita. Infine, le cellule di *S.*

meliloti iperproduttore di IAA cresciute in fase esponenziale e in condizioni microaerobiche presentano una attività ATP-fosfofruttochinasi 2 volte maggiore di quella determinata nelle cellule di controllo. Da tali risultati si evince il diverso ruolo delle due fosfofruttochinasi, PP_i-PFK e ATP-PFK, che, pur catalizzando la stessa reazione, sono due distinte proteine. Nonostante non sia chiaro il loro ruolo fisiologico in *S. meliloti* 1021, l'IAA influenza entrambe le chinasi, ma in modo differente.

L'enzima *fruttosio-1,6-bifosfato fosfatasi* (FBPasi) catalizza la reazione inversa della PFK, ossia l'idrolisi esoergonica del fruttosio-1,6-bifosfato:



L'attività di tale enzima è stata determinata accoppiando la formazione del fruttosio-6-fosfato dal fruttosio-1,6-bifosfato con le reazioni catalizzate dagli enzimi glucosio-6-fosfato isomerasi e glucosio-6-fosfato deidrogenasi in presenza di NADP, la cui riduzione è stata seguita spettrofotometricamente. Dai valori delle attività specifiche riportate nelle tabelle 2 e 3, è stata riscontrata una diminuzione dell'attività FBPasica in estratti proteici totali di cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA e trattato con IAA, solo in fase stazionaria di crescita, rispettivamente, del 78% e 73% di quella misurata in estratti proteici totali di cellule di *S. meliloti* wild-type. Se le cellule sono state cresciute in succinato, come unica sorgente di carbonio, e prelevate in fase stazionaria di crescita, si è riscontrato un aumento dell'attività FBPasica, lieve in estratti proteici di *S. meliloti* trattato con IAA, del 27%, invece, in *S. meliloti* iperproduttore di IAA (tabella 6). Inoltre, in estratti proteici di cellule di *S. meliloti*

iperproduttore di IAA, incubate in condizioni limitanti di O₂ in fase esponenziale e stazionaria di crescita, non sono state riscontrate significative differenze di attività rispetto al campione di controllo.

L'enzima *piruvato chinasi* (PK) catalizza l'ultima reazione della glicolisi, quella di formazione del piruvato e di sintesi di ATP, mediante trasferimento del gruppo fosforico dal fosfoenolpiruvato all'ADP:



L'attività di tale enzima è stata determinata seguendo spettrofotometricamente l'ossidazione della forma ridotta del NAD⁺ (NADH) in presenza di un eccesso dell'enzima lattato deidrogenasi. Dai dati riportati nelle tabelle 2 e 3, risulta che tutte le attività relative a tale enzima sono pressochè dello stesso ordine di grandezza, non riscontrando, quindi, significative differenze nelle attività piruvato chinasiche dei tre campioni, in entrambe le fasi di crescita.

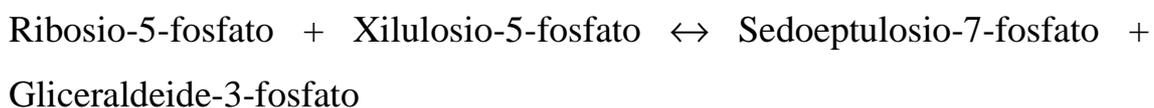
2.2c. Via del Pentosio Fosfato (PP)

L'enzima *glucosio-6-fosfato deidrogenasi* (G6PD) catalizza il trasferimento di uno ione idruro dal C(1) del glucosio-6-fosfato al NADP formando il 6-fosfoglucono- δ -lattone, idrolizzato, in seguito, a 6-fosfogluconato. Tale enzima è generalmente NADP-dipendente per cui è saggiato seguendo spettrofotometricamente la formazione del NADP ridotto. Dai dati riportati nelle tabelle 2 e 3, risulta che tutte le attività relative a tale enzima sono pressoché dello stesso ordine di grandezza, non

riscontrando, quindi, significative differenze nelle attività G6P deidrogenasiche dei tre campioni, in entrambe le fasi di crescita.

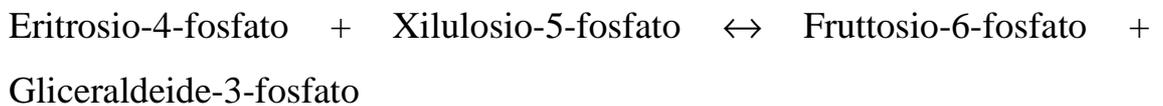
L'enzima *6-fosfogluconato deidrogenasi* (6PGD), NADP-dipendente, catalizza la decarbossilazione ossidativa del 6-fosfogluconato, un β -ossiacido, per formare ribulosio-5-fosfato e CO₂, in una reazione molto simile a quella catalizzata dalla isocitrato deidrogenasi, enzima del ciclo di Krebs. La formazione del ribulosio-5-fosfato completa la fase ossidativa della via del pentosio fosfato, nella quale si ha la formazione di due molecole di NADPH per ogni molecola di glucosio-6-fosfato che entra nella via. Dalle attività specifiche riportate nelle tabella 2 e 3, risulta che anche per tale enzima non sono state apprezzate significative differenze tra le attività saggate in estratti proteici totali del ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type, cresciuto in presenza di IAA e quello iperproduttore di IAA.

L'enzima *transchetolasi* (TKT) è parte della fase non-ossidativa della via PP, caratterizzata da una serie di reazioni, reversibili, di interconversione di pentosi fosfati in fruttosio-6-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato. La TKT, che ha come cofattore la tiamina pirofosfato (TTP), catalizza la seguente reazione:



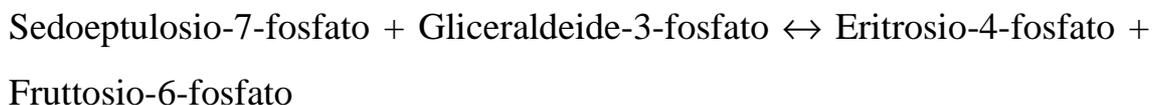
La miscela di reazione per il saggio della TKT contiene anche il substrato eritrosio-4-fosfato, oltre al NADP, allo scopo di seguire spettrofotometricamente, in presenza di un eccesso degli enzimi glucosio-

6-fosfato isomerasi e glucosio-6-fosfato deidrogenasi, la formazione del fruttosio-6-fosfato secondo la seguente reazione accoppiata:



Dai dati riportati nelle tabelle 2 e 3, si evince che, in fase esponenziale di crescita, l'enzima TKT presenta un aumento di attività del 56% e del 81%, rispettivamente, in estratti proteici totali provenienti dal ceppo di *S. meliloti* 1021 trattato con IAA e quello iperproduttore di IAA rispetto al ceppo di riferimento. In fase stazionaria di crescita, invece, l'attività di tale enzima in *S. meliloti* 1021 trattato con IAA non è significativamente diversa da quella saggiata in *S. meliloti* 1021 wild-type; in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, invece, presenta una diminuzione del 71% rispetto al campione di controllo.

L'enzima *transaldolasi* (TAL) catalizza il trasferimento di una unità di C₃ dal sedoeptulosio-7-fosfato alla gliceraldeide-3-fosfato, formando eritrosio-4-fosfato e fruttosio-6-fosfato secondo la seguente reazione:



L'attività di tale enzima è stata determinata accoppiando la formazione del fruttosio-6-fosfato all'ossidazione della gliceraldeide-3-fosfato, in presenza di un eccesso di α -glicerofosfato deidrogenasi e triosofosfato deidrogenasi. Dalle attività specifiche riportate nelle tabelle 2 e 3, risulta evidente che l'attività TAL presenta una diminuzione significativa (del 66%) solo in

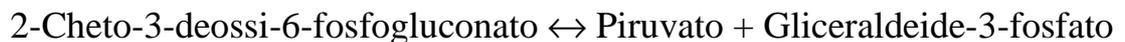
estratti proteici del ceppo iperproduttore di IAA, in fase stazionaria di crescita, rispetto a quella misurata nel ceppo wild-type.

2.2d. Via di Entner-Doudoroff (ED)

Il 6-fosfogluconato, oltre ad essere un substrato della via PP, può essere utilizzato nella via ED per generare piruvato. Il primo enzima di tale pathway è una deidratasi, la *6-fosfogluconato deidratasi* (EDD), che catalizza la seguente reazione:



Il prodotto (KDGP) di tale reazione è scisso da una aldolasi, *2-cheto-3-deossi-6-fosfogluconato aldolasi* (EDA) secondo la seguente reazione:



L'attività combinata dei due enzimi EDD e EDA è stata saggiata misurando la formazione, 6-fosfogluconato-dipendente, del piruvato, determinato colorimetricamente sottoforma di dinitrofenilidrazone. Le attività specifiche, riportate nelle tabelle 2 e 3, sono espresse come nanomoli di piruvato formato per milligrammo di proteina saggiata. Da tali dati risulta evidente che l'attività combinata dei due enzimi in cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA, in fase esponenziale, è ridotta al 76% di quella misurata nel ceppo selvatico. Inoltre, tale attività risulta ridotta al 67% di quella determinata in cellule wild-type anche in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, ma solo in fase stazionaria di crescita.

Tabella 2. Attività degli enzimi del catabolismo dei carboidrati in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio e *in fase esponenziale*

Enzima	Attività specifica ^a		
	1021	1021 +	64
GC	0,061±0,004	0,045±0,003	0,048±0,001
PGI	0,756± 0,01	0,747±0,02	0,823±0,01
ATP-PFK	0,011±0,001	0,011±0,001	0,048±0,003
PP_i-PFK	0,331±0,02	0,390±0,005	0,403±0,02
FBPasi	0,554±0,02	0,526±0,07	0,534±0,03
PK	0,045±0,002	0,041±0,001	0,039±0,001
G6PD	0,312±0,02	0,280±0,009	0,276±0,008
6PGD	0,094±0,005	0,078±0,001	0,092±0,001
TKT	0,106±0,005	0,165±0,009	0,191±0,01
TAL	0,176±0,01	0,194±0,01	0,168±0,007
EDD+EDA	2,15±0,2	1,64±0,1	2,01±0,1

^a Espresse come nanomoli di NADP ridotto o NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina, tranne per l'attività combinata EDD e EDA, che è espressa come nanomoli di piruvato formato per minuto per milligrammo di proteina

Tabella 3. Attività degli enzimi del catabolismo dei carboidrati in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio e *in fase stazionaria*

Enzima	Attività specifica ^a		
	1021	1021 +	64
GC	0,043±0,004	0,047±0,002	0,049±0,005
PGI	0,820± 0,06	0,888±0,01	0,781±0,08
ATP-PFK	0,010±0,001	0,012±0,0003	0,048±0,004
PP_i-PFK	0,251±0,02	0,326±0,01	0,333±0,02
FBPasi	0,798±0,08	0,581±0,05	0,621±0,03
PK	0,030±0,002	0,037±0,001	0,035±0,001
G6PD	0,211±0,01	0,216±0,003	0,227±0,01
6PGD	0,061±0,003	0,063±0,003	0,072±0,003
TKT	0,255±0,03	0,247±0,01	0,179±0,007
TAL	0,167±0,01	0,132±0,001	0,110±0,005
EDD+EDA	0,637±0,05	0,614±0,01	0,427±0,03

^a Espresse come nanomoli di NADP ridotto o NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina, tranne per l'attività combinata EDD e EDA, che è espressa come nanomoli di piruvato formato per minuto per milligrammo di proteina

Tabella 4. Attività dell'enzima *fosfofruttochinasi PP_i-dipendente* (PP_i-PFK) in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in differenti condizioni di crescita cellulare

Condizione di crescita	Attività specifica ^a PP _i -PFK		
	1021	1021+	64
Fruttosio	0,214±0,001	0,274±0,02	0,289±0,02
Glucosio	0,276±0,004	0,335±0,02	0,369±0,02
Succinato	0,356±0,002	0,368±0,006	0,357±0,01
Mannitolo (0,1%)	0,315±0,01	N.D. ^b	0,308±0,008
Mannitolo (0,02%)	0,385±0,01	N.D.	0,340±0,002
Microaerobica	0,445±0,02	N.D.	0,589±0,05

Tabella 5. Attività dell'enzima *fosfofruttochinasi ATP-dipendente* (ATP-PFK) in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in differenti condizioni di crescita cellulare

Condizione di crescita	Attività specifica ^a ATP-PFK		
	1021	1021+	64
Fruttosio	0,0097±0,001	0,0083±0,000	0,0138±0,002
Glucosio	0,0038±0,0001	0,0028±0,0003	0,0464±0,004
Succinato	0,0103±0,001	0,0110±0,001	0,0331±0,003
Mannitolo (0,1%)	0,0119±0,0001	N.D. ^b	0,0513±0,002
Mannitolo (0,02%)	0,0172±0,001	N.D.	0,0251±0,002
Microaerobica	0,0170±0,002	N.D.	0,0390±0,002

^a Espressa come nanomoli di NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina

^b Non determinata

Tabella 6. Attività dell'enzima *fruttosio-1,6-bifosfato fosfatasi* (FBPasi) in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in differenti condizioni di crescita cellulare

Condizione di crescita	Attività specifica ^a FBPasi		
	1021	1021+	64
Succinato	0,507±0,02	0,586±0,01	0,646±0,005
Microaerobica	0,741±0,007	N.D. ^b	0,666±0,04

^a Espressa come nanomoli di NADP ridotto per minuto per milligrammo di proteina

^b Non determinata

Tabella 7. Attività dell'enzima *piruvato deidrogenasi* (PDH) in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita cellulare

Condizione di crescita	Attività specifica ^c PDH		
	1021	1021+	64
A	0,0112±0,0002	0,0070±0,0004	0,0124±0,001
B	0,0100±0,0005	0,0146±0,0005	0,0119±0,0003

^c Espressa come nanomoli di NAD⁺ ridotto per minuto per milligrammo di proteina

2.2e. Ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)

I gruppi acetilici entrano nel ciclo di Krebs sotto forma di acetil-coenzima A (acetil-CoA), un prodotto del metabolismo degradativo, comune ai carboidrati, agli acidi grassi e agli amminoacidi. L'immediato precursore dell'acetil-CoA, nella sua via di sintesi a partire dai carboidrati, è il piruvato, prodotto glicolitico. L'acetil-CoA si forma dal piruvato mediante una decarbossilazione ossidativa catalizzata dal complesso multienzimatico della *piruvato deidrogenasi* (PDH). Tale enzima è stato saggiato seguendo spettrofotometricamente la riduzione del NAD^+ secondo la seguente reazione:

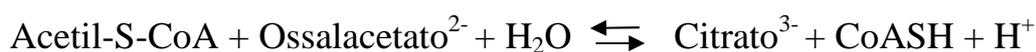


Dai dati sperimentali, riportati in tabella 7 ed espressi come attività specifiche, risulta che, in presenza di IAA e in fase stazionaria di crescita, l'attività dell'enzima PDH è aumentata del 46% rispetto a quella misurata in estratti proteici del ceppo di *S. meliloti* wild-type, cresciuto in assenza di IAA. Per il ceppo iperproduttore di IAA l'aumento dell'attività di tale enzima è lieve in fase esponenziale, del 19%, invece, in fase stazionaria.

Le attività di tutti gli enzimi del ciclo di Krebs (figura 11) sono state saggiate su estratti proteici totali di cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type, di cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA 0,5 mM e di cellule del ceppo iperproduttore di IAA (64), in fase stazionaria di crescita. Gli enzimi chiave (citrato sintasi, isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi) sono stati saggiati, nei tre campioni di *S. meliloti* 1021, anche in fase esponenziale, in condizioni limitanti di ossigeno (crescita

microaerobica) in entrambe le fasi di crescita e, infine, utilizzando una sorgente di carbonio, diversa dal mannitolo, ed, in particolare, il succinato, un acido dicarbossilico. Inoltre, gli enzimi citrato sintasi e α -chetoglutarato deidrogenasi sono stati saggiati anche in un altro ceppo di rizobio, *R. leguminosarum viciae* e, in modo analogo, in estratti proteici totali di cellule wild-type, trattate con IAA e iperproduttrici di IAA, in fase esponenziale e stazionaria di crescita.

La *citrato sintasi* (CS), primo enzima del ciclo di Krebs, catalizza la condensazione dell'acetil-CoA con l'ossalacetato per formare citrato, secondo la reazione:



Tale enzima è stato saggiato seguendo spettrofotometricamente la formazione di CoASH, che è stato fatto reagire con il composto cromogenico 5,5'-ditiobis-(2-nitro-acido benzoico) (DTNB) e la velocità di variazione dell'assorbimento è stata misurata a 412 nm.

I dati sperimentali, riportati nelle tabelle 8 e 9, sono stati espressi come attività specifica (unità totali di citrato sintasi per milligrammo di proteina). I risultati ottenuti mostrano che in estratti proteici provenienti da cellule di *S. meliloti*, cresciute in presenza di IAA e da quelle iperproduttrici di IAA, si ha un aumento graduale dell'attività citrato sintasica, passando dalla fase esponenziale a quella stazionaria di crescita, nella quale, l'aumento è, rispettivamente del 38% e 67% rispetto al campione di controllo. L'attività citrato sintasica in estratti proteici di cellule di *S. meliloti*, trattate con IAA e iperproduttrici di IAA, entrambe cresciute in succinato, come unica fonte di carbonio, e prelevate in fase stazionaria, presenta un aumento,

rispettivamente, del 22% e 35% rispetto a quella misurata nel campione di controllo (tabella 10). Inoltre, in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, incubate, in fase stazionaria, in condizioni limitanti di O₂, è stato riscontrato un aumento di attività citrato sintasica del 55% rispetto a quella misurata in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type cresciute in condizioni microaerobiche (tabella 11). Significative differenze di attività non sono state riscontrate nel caso in cui entrambi i tipi di cellule sono state incubate in condizioni limitanti di O₂ in fase esponenziale di crescita.

Per gli analoghi campioni del ceppo di *R. leguminosarum viciae* (tabella 12), l'aumento dell'attività citrato sintasica è maggiore in fase esponenziale rispetto a quella stazionaria ed, in particolare, in cellule del ceppo cresciuto in presenza di IAA e iperproduttore di IAA, l'aumento è, rispettivamente, del 44% e 183% rispetto alle cellule wild-type. In estratti proteici da cellule di *R. leguminosarum viciae* iperproduttrici di IAA, in fase stazionaria di crescita, come per l'analogo ceppo di *S. meliloti*, nella stessa condizione, l'aumento è del 60% rispetto al campione di controllo.

Nel ciclo di Krebs il citrato deve essere isomerizzato ad isocitrato per permettere all'unità a sei atomi di carbonio di subire una decarbossilazione ossidativa. L'isomerizzazione dell'isocitrato avviene attraverso una tappa di deidratazione seguita da una idratazione. Il risultato è uno scambio di posizione tra un atomo di idrogeno ed un gruppo ossidrilico. L'enzima che catalizza entrambe le tappe è chiamato *aconitasi* (ACN), in quanto il cis-aconitato è un intermedio della reazione:



I dati sperimentali, riportati in tabella 8, sono stati espressi come attività specifica (unità totali di enzima per milligrammo di proteina). I risultati ottenuti evidenziano che, per estratti proteici provenienti da cellule di *S. meliloti* wild-type cresciute in presenza di IAA, in fase stazionaria di crescita, si ha un aumento di attività pari al 36%, rispetto a cellule wild-type cresciute in assenza di IAA; l'aumento di attività in estratti proteici totali da cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, invece, è di minore entità.

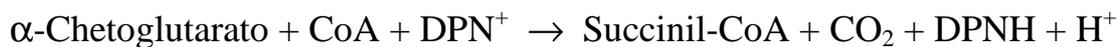
La prima delle quattro reazioni di ossido-riduzione del ciclo di Krebs, ovvero la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato, è catalizzata dalla *isocitrato deidrogenasi* (ICD) secondo la reazione:



L'intermedio di questa reazione è l'ossalsuccinato, un α -chetoacido instabile. Quando questo composto è legato all'enzima, perde CO_2 e forma l' α -chetoglutarato, la cui velocità di formazione è importante in quanto si riflette sulla velocità complessiva dell'intero ciclo. Dai dati riportati nelle tabelle 8 e 9, espressi come attività specifica (unità totali di enzima per milligrammo di proteina) risulta che per tale enzima non sono state apprezzate significative differenze di attività, saggiate in estratti proteici totali del ceppo di *S. meliloti* wild-type, cresciuto in presenza di IAA e quello iperproduttore di IAA, sia in fase esponenziale sia stazionaria di crescita e anche se le cellule sono cresciute, come descritto in "Materiali e Metodi", utilizzando il succinato come unica sorgente di carbonio al posto del mannitolo (tabella 10). Inoltre, estratti proteici di cellule di *S. meliloti*

iperproduttore di IAA, incubate in condizioni microaerobiche, sia in fase esponenziale sia stazionaria di crescita, non presentano attività ICD significativamente diverse da quelle saggate in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type nelle stesse condizioni di crescita (tabella 11).

L'*α-chetoglutarato deidrogenasi* (α -KGD), quarto enzima del ciclo di Krebs, catalizza la decarbossilazione ossidativa di un α -chetoacido (l' α -chetoglutarato), generando una molecola di CO₂ e di NADH. Tale enzima è stato saggiato seguendo spettrofotometricamente la riduzione del DPN (difosfopiridina nucleotide, meglio conosciuto come NAD⁺) secondo la seguente reazione:

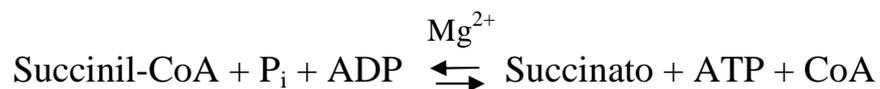


I dati sperimentali, riportati nelle tabelle 8 e 9, sono stati espressi come attività specifica (unità totali di enzima per milligrammo di proteina). I risultati ottenuti evidenziano che, in presenza di IAA 0,5 mM, si ha un aumento del 36% e 100% dell'attività α -chetoglutarato deidrogenasica, rispettivamente, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, rispetto a quella saggiata in estratti proteici provenienti da cellule di *S. meliloti* wild-type, cresciute in assenza di IAA. Per il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, invece, l'aumento è del 130% e 86%, rispettivamente, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, rispetto al ceppo wild-type. Quando tali cellule sono state cresciute in succinato come unica fonte di carbonio, l'aumento di attività in estratti proteici provenienti dal ceppo wild-type trattato con IAA e da quello iperproduttore è, rispettivamente del 27% e del 36% rispetto a quella determinata nel ceppo wild-type (tabella 10). Inoltre, in seguito a crescita microaerobica, non sono stati riscontrati significativi

aumenti dell'attività α -KDG né in fase esponenziale né stazionaria di crescita (tabella 11).

Dai dati riportati in tabella 12 e relativi agli analoghi campioni del ceppo di *R. leguminosarum viciae*, risulta che, in presenza di IAA, solo in fase esponenziale di crescita, si ha un aumento del 63% dell'attività α -chetoglutarato deidrogenasica; in fase stazionaria di crescita, invece, l'attività è ridotta al 62% di quella misura in estratti proteici da cellule wild-type cresciute in assenza di IAA. Per il ceppo di *R. leguminosarum viciae* iperproduttore di IAA, l'aumento è del 56% e 109%, rispettivamente in fase esponenziale e stazionaria di crescita, rispetto al ceppo wild-type.

Il legame tioestere tra il succinato ed il CoA è un legame ad alta energia e la sua scissione è accoppiata alla fosforilazione della adenosina difosfato (ADP) secondo la reazione, reversibile, catalizzata dalla *succinil-CoA sintasi* (SUC):



Dai dati sperimentali, riportati in tabella 8 e espressi come attività specifica, si evince che solo per estratti proteici provenienti da cellule di *S. meliloti* wild-type cresciute in presenza di IAA, in fase stazionaria di crescita, si ha un significativo aumento di attività pari al 32%, rispetto a cellule wild-type, cresciute in assenza di IAA.

La *succinato deidrogenasi* (SDH), sesto enzima del ciclo di Krebs, catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato, con la concomitante riduzione del coenzima FAD a FADH₂. Tale enzima può catalizzare l'ossidazione del succinato anche in presenza di diversi accettori artificiali di elettroni, tra i quali il ferrocianuro di potassio; infatti, il metodo

utilizzato si basa sulla determinazione dell'attività artificiale dell'enzima secondo la seguente reazione:



In tabella 8 sono riportate le attività specifiche della succinato deidrogenasi espresse come micromoli per minuto per milligrammo di proteina saggata. I risultati ottenuti mostrano che tutte le attività relative a tale enzima sono pressochè dello stesso ordine di grandezza, non riscontrando, quindi, significative differenze nelle attività succinato deidrogenasiche dei tre campioni in fase stazionaria di crescita.

La *fumarasi* (FUM) catalizza la reazione di idratazione del fumarato per formare L-malato secondo la reazione:



In tale reazione stereospecifica, l'addizione del gruppo OH⁻ avviene solo su di un lato del doppio legame, generando l'isomero L del malato. Dai valori delle attività specifiche riportate in tabella 8 e relative alla fase stazionaria di crescita, risulta evidente che non sono state riscontrate significative differenze di attività fumarasica nei tre campioni di *S. meliloti*.

Nell'ultima reazione del ciclo di Krebs il malato viene ossidato ad ossalacetato secondo la reazione, catalizzata dalla *malato deidrogenasi* (MDH), in cui l'accettore di atomi di idrogeno è il NAD⁺:



I dati sperimentali, riportati in tabella 8, sono stati espressi come attività specifiche (unità totali di enzima per milligrammo di proteina). I risultati ottenuti evidenziano che le attività saggiate, in fase stazionaria di crescita, in estratti proteici da cellule di *S. meliloti* wild-type, cresciute in presenza di IAA e iperproduttrici di IAA, non sono significativamente diverse.

2.2f. Reazioni e vie anaplerotiche

La principale reazione anaplerotica, che rifornisce di intermedi il ciclo di Krebs, è quella catalizzata dalla *piruvato carbossilasi* (PC), che produce ossalacetato secondo la reazione:



La necessità di produrre intermedi del ciclo di Krebs è controllata mediante l'acetil-CoA, attivatore dell'enzima PC. Ogni diminuzione della velocità del ciclo, infatti, determinata da un'insufficiente quantità di ossalacetato porta ad un aumento dei livelli di acetil-CoA che attiva la PC, la quale, a sua volta, rifornendo il ciclo di ossalacetato, ne aumenta la velocità. L'attività di tale enzima è stata saggiata accoppiando tale reazione con quella di riduzione dell'ossalacetato a malato, catalizzata dalla malato deidrogenasi NAD^+ -dipendente e seguendo, quindi, spettrofotometricamente l'ossidazione del NADH. Dai valori delle attività specifiche riportate in tabella 13, è stato riscontrato in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* cresciute in presenza di IAA un aumento del 34% e 35%, rispettivamente in fase esponenziale e stazionaria di crescita, rispetto a quella misurata nel campione di riferimento. In estratti proteici del ceppo iperproduttore, invece, l'aumento di attività dell'enzima PC, in fase

esponenziale e stazionaria, è, rispettivamente, del 33% e 17% di quella misurata nel ceppo wild-type.

2.2g.Via del gliossilato

La via del gliossilato è un “pathway anaplerotico”, utilizzato dai batteri per ripristinare il pool di intermedi necessari per la biosintesi di diverse macromolecole cellulari. Tale via implica due steps ossidativi, legati al trasporto di elettroni e che, quindi, generano energia, con la conseguente conversione dell’acetil-CoA in gliossilato, invece, che in due molecole di CO₂, come avviene nel ciclo di Krebs.

Gli enzimi della via del gliossilato sono stati saggiati in estratti proteici totali provenienti da cellule di *S. meliloti* e di *R. leguminosarum viciae* wild-type, dalle rispettive cellule wild-type cresciute in presenza di IAA 0,5 mM e da quelle iperproduttrici di IAA, in fase stazionaria di crescita.

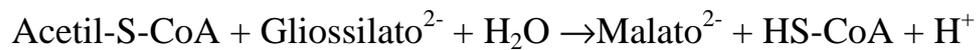
L’*isocitrato liasi* catalizza la scissione dell’isocitrato in succinato (intermedio del ciclo di Krebs) e gliossilato secondo la reazione:



Questa reazione richiede una quantità di isocitrato piuttosto alta poiché l’enzima ha una bassa affinità per questo substrato. I dati sperimentali, riportati in tabella 14 ed espressi come attività specifiche, evidenziano che in estratti proteici totali provenienti da cellule di *S. meliloti* wild-type cresciute in presenza di IAA e da quelle iperproduttrici di IAA, l’attività isocitrato liasica è, rispettivamente, ridotta del 59% e 67% di quella misurata nel campione di controllo. La riduzione, invece, nei corrispondenti campioni di *R. leguminosarum viciae* è, rispettivamente, del

70% e 36% dell'attività determinata in estratti proteici totali di cellule di *R. leguminosarum viciae* wild-type (tabella 15).

L'enzima *malato sintasi* catalizza la condensazione dell'acetil-CoA con il gliossilato per formare malato (un intermedio del ciclo di Krebs) secondo la reazione:



Nel metodo utilizzato per saggiare l'attività dell'enzima, la quantità di malato formato nella miscela di reazione corrisponde alla quantità di acetil-CoA utilizzato. Nelle condizioni di tale saggio spettrofotometrico la velocità iniziale di diminuzione dell'assorbimento a 232 nm è proporzionale alla quantità di malato sintasi presente. Dai valori delle attività specifiche riportate in tabella 14 risulta che in estratti proteici totali provenienti da cellule di *S. meliloti* wild-type cresciute in presenza di IAA e da quelle iperproduttrici di IAA, l'attività malato sintasica è, rispettivamente, ridotta al 65% e 53% di quella misurata nel campione di controllo. La riduzione, invece, nei corrispondenti campioni di *R. leguminosarum viciae* è, rispettivamente, del 70% e 40% dell'attività determinata in estratti proteici totali di cellule di *R. leguminosarum viciae* wild-type (tabella 15).

Tabella 8. Attività degli enzimi del ciclo di Krebs in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio e *in fase stazionaria*

Enzima	Attività specifica ^a		
	1021	1021 +	64
CS	0,109±0,006	0,150±0,008	0,182±0,006
ACN	0,056±0,003	0,076±0,003	0,066±0,003
ICD	0,361±0,01	0,349±0,005	0,388±0,006
α-KGD	0,0070±0,0008	0,014±0,001	0,013±0,001
SUC	0,098±0,006	0,129±0,01	0,108±0,002
SDH	0,013±0,001	0,012±0,001	0,014±0,001
FUM	0,793±0,02	0,827±0,03	0,800±0,01
MDH	0,652±0,03	0,604±0,03	0,715±0,05

Tabella 9. Attività degli enzimi del ciclo di Krebs, citrato sintasi, isocitrato deidrogenasi e α-chetoglutarato deidrogenasi in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio e *in fase esponenziale*

Enzimi	Attività specifica ^a		
	1021	1021 +	64
CS	0,140±0,002	0,163±0,005	0,168±0,007
ICD	0,540±0,008	0,476±0,03	0,545±0,02
α-KGD	0,0053±0,0001	0,0072±0,0006	0,0122±0,0006

^a Espresse come U/mg o (ΔA/min)/mg

Tabella 10. Attività degli enzimi del ciclo di Krebs, citrato sintasi, isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente *succinato* come unica fonte di carbonio e *in fase stazionaria*

Enzimi	Attività specifica ^a		
	1021	1021 +	64
CS	0,0094±0,001	0,0115±0,001	0,0127±0,0005
ICD	0,287±0,004	0,255±0,002	0,338±0,002
α -KGD	0,0011±0,0001	0,0014±0,0002	0,0015±0,0001

Tabella 11. Attività degli enzimi del ciclo di Krebs, citrato sintasi, isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio e incubate, in fase esponenziale (A) e stazionaria (B), *in condizioni microaerobiche*

Enzimi	Attività specifica ^a			
	A		B	
	1021	64	1021	64
CS	0,122±0,01	0,119±0,02	0,166±0,01	0,257±0,01
ICD	0,284±0,03	0,312±0,01	0,359±0,02	0,397±0,02
α -KGD	0,011±0,001	0,012±0,001	0,039±0,03	0,038±0,002

^a Espresse come U/mg o ($\Delta A/min$)/mg

Tabella 12. Attività degli enzimi del ciclo di Krebs, citrato sintasi e α -chetoglutarato deidrogenasi in estratti proteici di cellule di *R. leguminosarum viciae* wild-type (1004), trattato con IAA 0,5 mM (1004+) e iperproduttore di IAA (207), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio, *in fase esponenziale* (A) e *stazionaria* (B)

Enzimi	Attività specifica ^a		
	1004	1004+	207
A			
CS	0,110±0,005	0,158±0,008	0,311±0,02
α-KGD	0,043±0,001	0,070±0,004	0,067±0,006
B			
CS	0,152±0,01	0,120±0,02	0,244±0,02
α-KGD	0,021±0,002	0,013±0,002	0,044±0,002

^a Espresse come U/mg o ($\Delta A/min$)/mg

Tabella 13. Attività dell'enzima *piruvato decarbossilasi* (PC) in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita cellulare

Condizione di crescita	Attività specifica ^a		
	1021	1021+	64
A	0,0070±0,0006	0,0094±0,0004	0,0093±0,0007
B	0,023±0,002	0,031±0,002	0,027±0,001

^a Espresa come nanomoli di NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina

Tabella 14. Attività degli enzimi della via del gliossilato, isocitrato liasi e malato sintasi in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase stazionaria di crescita

Enzimi	Attività specifica ^a		
	1021	1021 +	64
Isocitrato liasi	0,091±0,01	0,054±0,003	0,061±0,001
Malato sintasi	0,255±0,02	0,167±0,009	0,135±0,01

Tabella 15. Attività degli enzimi della via del gliossilato, isocitrato liasi e malato sintasi in estratti proteici di *R. leguminosarum viciae* wild-type (1004), trattato con IAA 0,5 mM (1004+) e iperproduttore di IAA (207) in fase stazionaria di crescita

Enzimi	Attività specifica ^a		
	1004	1004 +	207
Isocitrato liasi	0,061±0,008	0,043±0,002	0,022±0,004
Malato sintasi	0,283±0,019	0,199±0,03	0,113±0,009

^a Espresse come U/mg o ($\Delta A/min$)/mg

2.2h. Vie anaboliche, intermedi metabolici e cofattori enzimatici

Alcune vie biosintetiche utilizzano gli intermedi del ciclo di Krebs come materiale di partenza (anabolismo). La biosintesi degli acidi grassi è uno di tali pathway che richiede la presenza di acetil-CoA e di NADPH come cofattore. La formazione dell'acetil-CoA è catalizzata dall'enzima *ATP-citrato liasi* secondo la reazione:



Tale reazione assomiglia all'inverso della reazione della citrato sintasi, tranne per il fatto che l'idrolisi di ATP è necessaria per sostenere la sintesi del legame tioestere ad alta energia.

I dati riportati in tabella 16 rappresentano le attività specifiche, espresse come nanomoli di NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina. Da tali risultati si evince che l'attività dell'enzima ATP-citrato liasi, in estratti proteici di cellule di *S. meliloti* cresciute in presenza di IAA, in fase esponenziale e stazionaria, è aumentata, rispettivamente, del 22% e 100% di quella misurata nel ceppo wild-type. In estratti proteici del ceppo iperproduttore, invece, è stato riscontrato, in fase esponenziale e stazionaria, un aumento, rispettivamente del 134% e 85% dell'attività determinata nel ceppo wild-type.

2.2i. Acetil-coenzimaA (acetil-CoA)

L'acetil-CoA è un composto ad "alta energia": il coenzima A (CoASH/CoA) è un gruppo β -mercaptoetilamminico, il cui gruppo SH è legato con un legame tioestere al gruppo acetilico dell'acetil-CoA. Il CoA

funziona, quindi, come trasportatore di gruppi acetilici e di altri gruppi acilici. La reazione di idrolisi del legame tioestere è poco più esoergonica di quella dell'idrolisi di ATP.

I livelli intracellulari di acetil-CoA sono stati determinati in cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type, del ceppo wild-type trattato con IAA 0,5 mM e di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, cresciute in terreno minimo contenente mannitolo, come unica fonte di carbonio, e prelevate in fase esponenziale e stazionaria di crescita.

I dati riportati in tabella 17 rappresentano la concentrazione di acetil-CoA, espressa come μM per cellula. Da essi risulta evidente, per il ceppo iperproduttore di IAA, un significativo aumento dei livelli intracellulari di acetil-CoA, pari al 91% e 47% di quelli determinati per il ceppo wild-type, rispettivamente, in fase esponenziale e stazionaria di crescita.

2.21. Citrato

Il citrato, intermedio del ciclo di Krebs, è un potente inibitore della fosfofruttochinasi e, quindi, della glicolisi, ma anche dell'enzima citrato sintasi, mediante inibizione da prodotto.

I livelli intracellulari di citrato sono stati determinati nelle stesse condizioni sperimentali dell'acetil-CoA e, riportati in tabella 18, sono stati espressi come nanomoli per milligrammo di cellula. Da tali dati risulta che non sono state riscontrate significative differenze nell'accumulo di citrato in cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type, di *S. meliloti* wild-type cresciuto in presenza di IAA e del ceppo iperproduttore, né in fase esponenziale né stazionaria di crescita.

Tabella 16. Attività dell'enzima *ATP-citrato liasi* in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita cellulare

Condizione di crescita	Attività specifica ^a		
	1021	1021+	64
A	0,0088±0,0004	0,0107±0,0005	0,0206±0,001
B	0,0066±0,0005	0,0132±0,0002	0,0122±0,001

^a Espressa come nanomoli di NADH ossidato per minuto per milligrammo di proteina

Tabella 17. Livelli intracellulari di *acetil-CoA* nei ceppi di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita cellulare

Condizione di crescita	Acetil-CoA ^b (µM/cellula)		
	1021	1021+	64
A	11±1	10±1	21±3
B	17±1	21±1	25±1

^b La concentrazione di acetil-CoA è espressa come µM per cellula, assumendo un volume cellulare di 10^{-12} l e 5×10^{11} cellule per l per OD₆₁₀

Tabella 18. Livelli intracellulari di *citrato* nei ceppi di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita cellulare

Condizione di crescita	Citrato ^a (nmol/mg)		
	1021	1021+	64
A	1,68±0,1	1,31±0,06	1,41±0,02
B	0,271±0,02	0,321±0,01	0,311±0,01

^a Espresso come nanomoli per milligrammo di cellula

Tabella 19. Livelli intracellulari di *ATP* nei ceppi di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita cellulare

Condizione di crescita	ATP ^b (10 ⁻¹⁶ mol/CFU)		
	1021	1021+	64
A	0,051±0,008	0,031±0,006	0,028±0,002
B	10,3±1,1	7,74±0,7	0,061±0,005

^b Espresso come moli per “colony forming units” (CFU)

2.2m. Adenosina trifosfato (ATP)

Per una migliore comprensione degli effetti di IAA sul metabolismo energetico, i livelli intracellulari di ATP, rappresentante lo stato energetico cellulare, sono stati determinati utilizzando la reazione bioluminescente della luciferina-luciferasi. I dati riportati in tabella 19 esprimono la quantità di ATP (espressa come moli per Colony Forming Units) estratta e saggiata in cellule di *S. meliloti* wild-type, cresciute con IAA e iperproduttrici di IAA, in fase esponenziale e stazionaria di crescita.

I livelli intracellulari di ATP, in fase esponenziale, nel ceppo trattato con IAA e quello iperproduttore, sono, rispettivamente, ridotti al 61% e 55% della quantità determinata nel ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type. Tale effetto di riduzione è ancora più drastico per il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA in fase stazionaria di crescita.

2.2n. Stato redox cellulare e potere riducente

E' noto che gli enzimi-chiave del ciclo di Krebs (citrato sintasi, isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi) sono inibiti dal NADH (nicotinamide adenin dinucleotide, forma ridotta), secondo un meccanismo di inibizione da prodotto. I livelli endogeni di NAD e NADH sono stati determinati in colture, in fase stazionaria di crescita, di *S. meliloti* 1021 wild-type, di *S. meliloti* trattato con IAA e iperproduttore di IAA, contenenti mannitolo come unica sorgente di carbonio. Il livello di NADH e, di conseguenza, il rapporto NADH/NAD, nel ceppo iperproduttore di IAA, sono ridotti, rispettivamente al 56% e 74% di quelli misurati nel ceppo 1021 wild-type (tabella 20).

La forma ridotta del NADP (nicotinamide adenin dinucleotide fosfato) è utilizzata nelle reazioni biosintetiche perché rappresenta il potere riducente di una cellula. I livelli endogeni di NADPH sono stati determinati nelle stesse condizioni sperimentali del NADH. Dai dati riportati in tabella 21 risulta che i livelli di NADPH in cellule trattate con IAA e iperproduttrici di IAA sono maggiori, rispettivamente, del 49% e 107% di quelli determinati in cellule wild-type.

Tabella 20. Livelli endogeni di *NAD(H)* in colture di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase stazionaria di crescita

Ceppo	(NADH+NAD)^a	NADH	NAD	NADH/NAD
	[$\mu\text{mol (mg proteina)}^{-1}$]^b			
1021	0,400±0,08	0,117±0,01	0,588±0,006	0,199±0,02
1021+	0,350±0,09	0,103±0,01	0,620±0,06	0,166±0,02
64	0,407±0,07	0,066±0,009	0,448±0,02	0,147±0,01

Tabella 21. Livelli endogeni di *NADP(H)* in colture di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase stazionaria di crescita

Ceppo	(NADPH+NADP)^a	NADPH	NADP	NADPH/NADP
	[$\mu\text{mol (mg proteina)}^{-1}$]^b			
1021	0,308±0,04	0,195±0,05	0,148±0,03	1,34±0,1
1021+	0,383±0,04	0,290±0,07	0,030±0,005	10,8±1
64	0,425±0,08	0,404±0,05	0,155±0,03	2,64±0,2

^a La determinazione dei livelli totali di NADH+NAD e NADPH+NADP è indipendente da quella di NADH, NADPH o di NAD, NADP

^b Espressi come micromoli per milligrammo di proteina

2.3. Analisi della viabilità e morfologia cellulare

2.3a. Test di sopravvivenza cellulare

La sopravvivenza, a lungo termine, di *S. meliloti* 1021, del ceppo wild-type trattato con diverse concentrazioni di IAA e di quello iperproduttore di IAA, è stata analizzata seguendo nel tempo la vitalità cellulare. Il test su piastra, come descritto in “Materiali e Metodi”, consiste nel determinare il numero di colonie capaci di riprodursi su un adatto mezzo solido di agar, a vari tempi di permanenza in fase stazionaria di crescita. Per sopravvivenza, infatti, si intende il mantenimento della vitalità in condizioni di crescita avverse, caratterizzate, ad esempio, da carenze di nutrienti per prolungata esposizione in fase stazionaria. Nei grafici di figura 19 è riportata, per ciascun ceppo, la percentuale di cellule sopravvissute in funzione del tempo di permanenza in fase stazionaria, che per i ceppi trattati con IAA rappresenta anche i giorni trascorsi dall’aggiunta di tale molecola. Dal primo grafico si evince che la percentuale di cellule sopravvissute, in seguito al trattamento con IAA 0,5 mM, aumenta gradualmente nei primi 10 giorni raggiungendo un valore massimo del 60% rispetto al ceppo wild-type. Per quanto riguarda il ceppo di *S. meliloti* 1021 trattato con IAA 0,05 mM, la più alta percentuale di cellule sopravvissute (136%) è stata riscontrata dopo 14 giorni dall’aggiunta di IAA in fase stazionaria. Il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA mostra una maggiore capacità di generare colonie, rispetto al ceppo di riferimento, non solo a tempi brevi (4 giorni), ma anche dopo 14 e 28 giorni di permanenza in fase stazionaria: in particolare, a questi tempi, le percentuali di cellule sopravvissute sono, rispettivamente, aumentate del 174% e 166% rispetto alle cellule wild-type. Dal secondo grafico di figura 19, relativo ad un esperimento indipendente

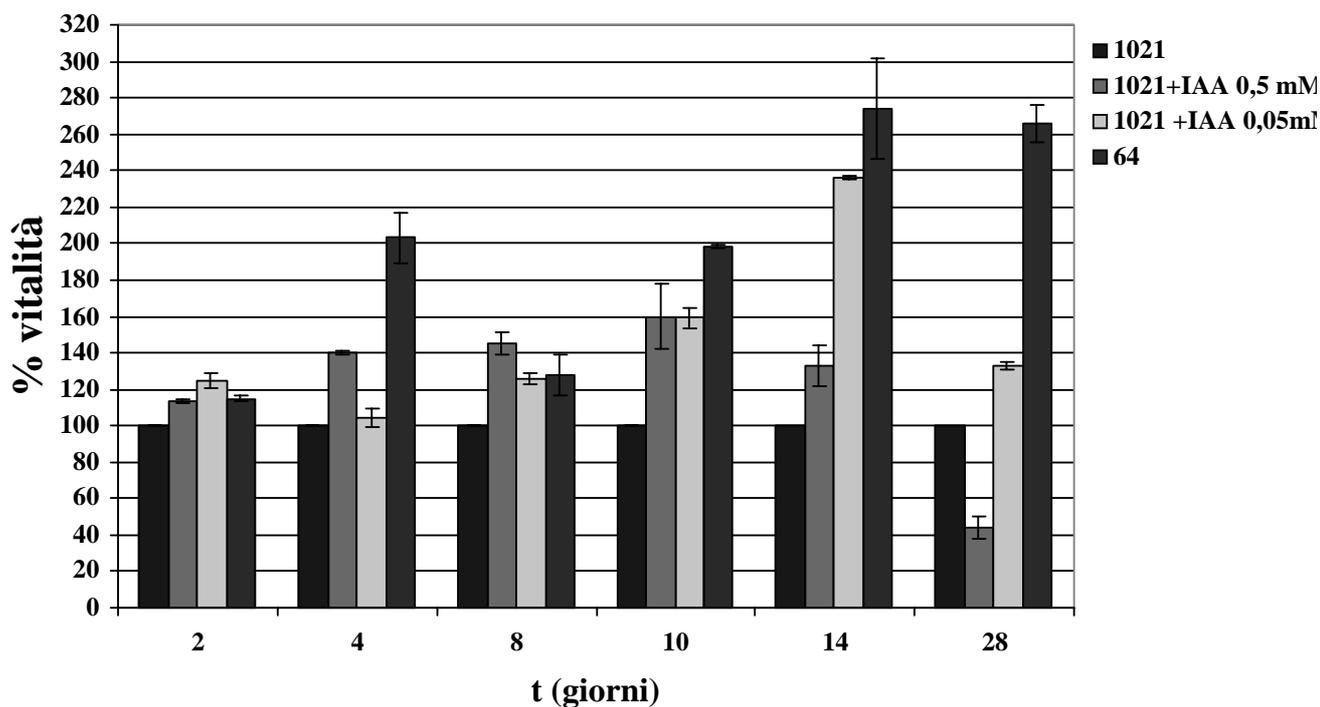
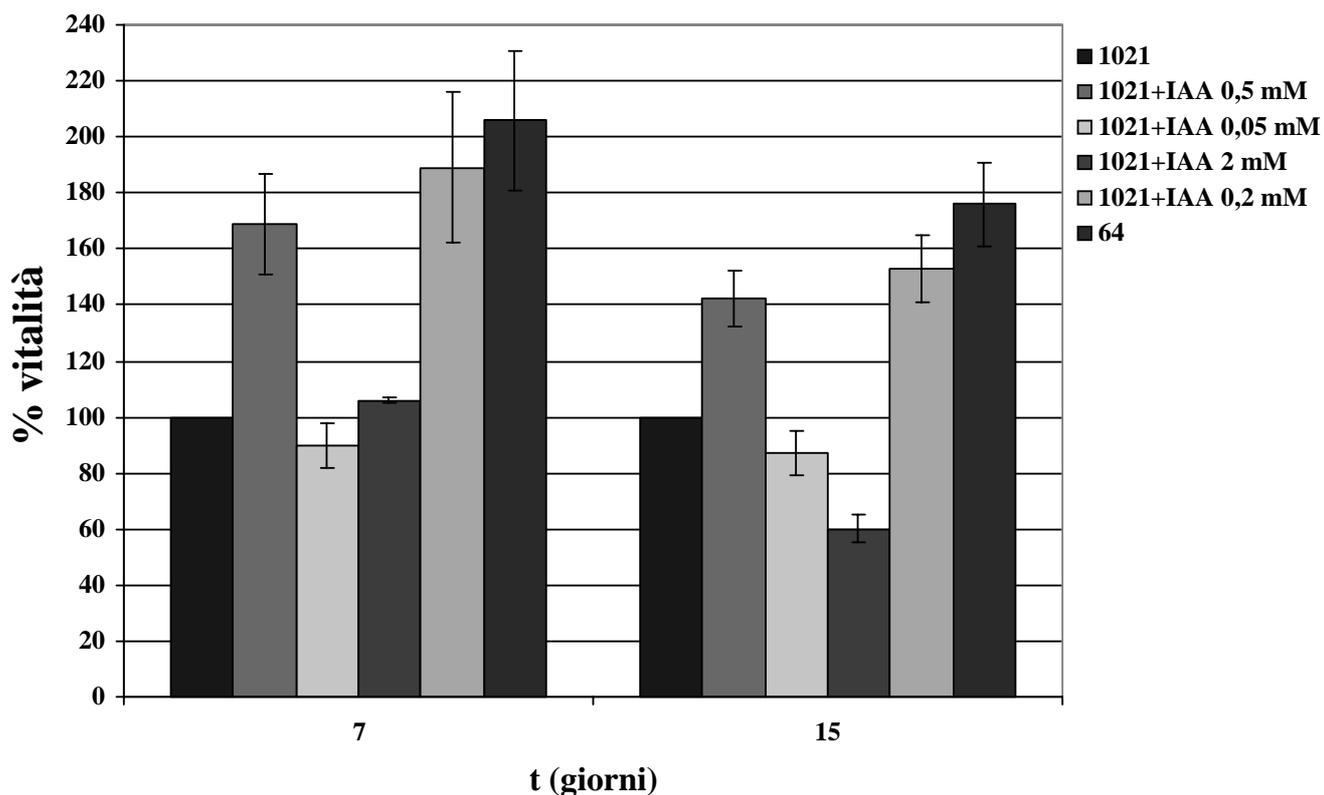


Figura 19. Sopravvivenza, in fase stazionaria di crescita, di cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), di cellule wild-type trattate con IAA 0,5 mM, 0,05 mM, 0,2 mM e 2 mM (1021+) e di *S. meliloti* iperproduttore di IAA (64)

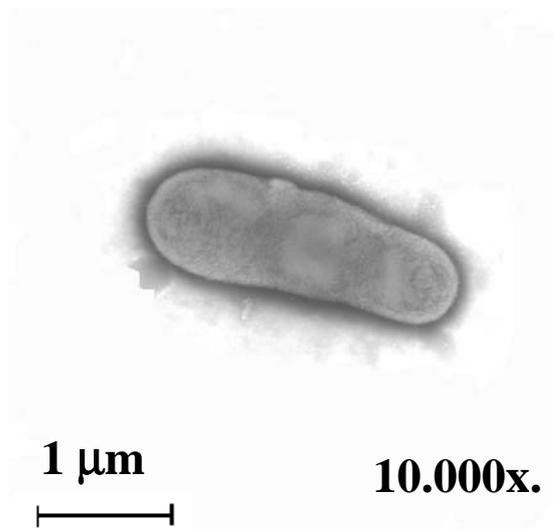
dal primo, si evince che cellule trattate con IAA 2 mM, la cui cinetica di sopravvivenza in fase stazionaria è simile a quella di cellule iperproduttrici di IAA (figura 16), presentano, dopo 15 giorni, una vitalità ridotta al 60% di quella determinata per cellule non trattate. La vitalità di cellule di *S. meliloti* wild-type trattate con IAA 0,2 mM, invece, è aumentata del 89% e 53%, rispetto a cellule non trattate, dopo, rispettivamente, 7 e 15 giorni dall'aggiunta. Infine, si può concludere che la iperproduzione batterica di IAA consente una maggiore sopravvivenza cellulare in fase stazionaria di crescita; per quanto riguarda il trattamento esogeno, le aggiunte di IAA alle concentrazioni di 0,05 mM, 0,5 mM e 0,2 mM sono efficaci per aumentare la vitalità di cellule wild-type.

2.3b. Microscopia elettronica dei batteri

I batteri del ceppo wild-type di *S. meliloti* 1021 e quello iperproduttore di IAA, prelevati in fase esponenziale e stazionaria di crescita, sono stati osservati al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Nelle figure 20 e 21 sono riportate le immagini al microscopio elettronico dei batteri, ritenute più significative sulla base di numerose osservazioni effettuate per almeno tre diverse preparazioni batteriche per ciascun ceppo. Dall'osservazione delle foto ottenute al microscopio con un ingrandimento di 10000X risulta che i batteri del ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, in fase esponenziale, mostrano differenze di dimensione e di forma rispetto a quelli wild-type: in particolare, essi presentano un fenotipo più rotondeggiante ed accorciato. Infatti, il diametro, $(1,7 \pm 0,2)$ cm di tali batteri è aumentato del 21% rispetto a quello misurato in *S. meliloti* wild-type, $(1,4 \pm 0,1)$ cm. In fase stazionaria, invece, non si osservano significative differenze di dimensioni, ma formazioni di aggregati più

frequenti nel ceppo iperproduttore di IAA rispetto a quello wild-type. E' ipotizzabile, infine, che la presenza di aggregati tra cellule batteriche sia correlata alla presenza di strutture filamentose sulla parete batterica che tendono a mantenere adese le cellule tra loro.

A



B

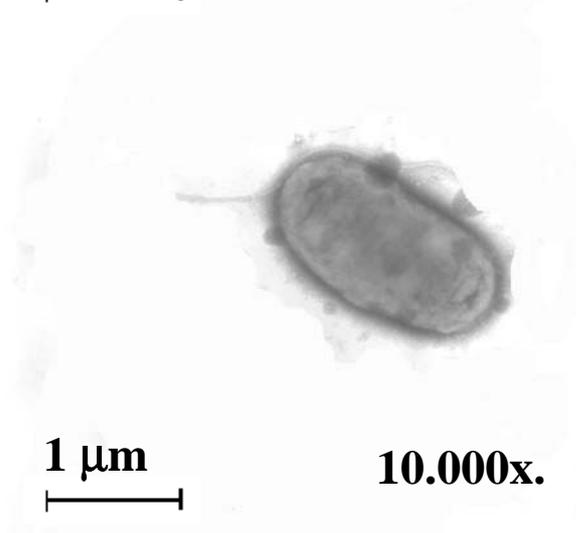


Figure 20. Microscopia elettronica di batteri dei ceppi di *S. meliloti* wild-type 1021 (A) e iperproduttore di IAA 64 (B) in fase esponenziale di crescita. Il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA mostra un fenotipo più rotondeggiante ed accorciato rispetto al ceppo wild-type

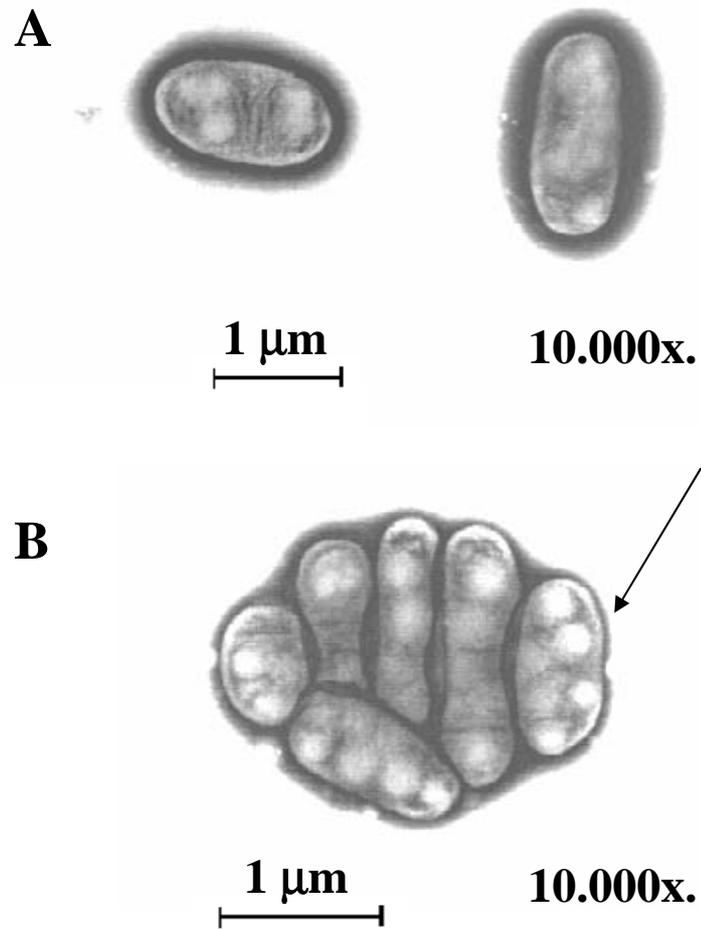


Figure 21. Microscopia elettronica di batteri dei ceppi di *S. meliloti* wild-type 1021 (A) e iperproduttore di IAA 64 (B) in fase stazionaria di crescita. Il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA forma aggregati cellulari e accumula granuli di PHB, come indicato dalla freccia, in quantità maggiore del ceppo wild-type

2.4. Metabolismo dei poli- β -idrossibutirradi (PHB)

2.4a. Isolamento dei PHB

I batteri del genere *Rhizobium*, nello stato simbiotico e non-simbiotico, accumulano i poli- β -idrossibutirradi come materiali di riserva di carbonio e di energia. Uno dei vantaggi della sintesi di questi materiali ad alto peso molecolare è che i microrganismi sono in grado di conservare grandi quantità di carbonio ridotto senza influenzare, in modo significativo, la pressione osmotica delle cellule. Per quanto riguarda gli effetti di IAA sull'accumulo di PHB in *S. meliloti* 1021, le immagini al microscopio elettronico, riportate in figura 21, mostrano che, nel ceppo iperproduttore di IAA, in fase stazionaria di crescita, i granuli di PHB sono ben definiti e in quantità maggiori di quelli presenti nel ceppo wild-type. A conferma di ciò, le quantità di PHB sono state determinate nei ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type, cresciuto in presenza di IAA e iperproduttore di IAA, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, nonché in seguito ad incubazione microaerobica delle colture cellulari. Il saggio spettrofotometrico dei PHB, come descritto in "Materiali e Metodi", consiste nella conversione quantitativa di tali composti in acido crotonico, che ha un massimo di assorbimento a 235 nm, fornendo, così, una determinazione accurata di tali composti.

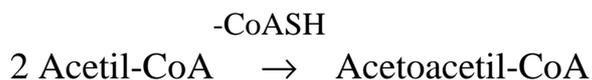
Dai dati riportati in tabella 22, risulta che la produzione di PHB, nel ceppo trattato con IAA in fase esponenziale di crescita, è aumentata del 28% rispetto a quella determinata nel ceppo wild-type; in fase stazionaria, invece, i livelli di PHB nel ceppo cresciuto in presenza di IAA e quello iperproduttore di IAA sono aumentati, rispettivamente, del 65% e 40% di quelli misurati nel ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type. In seguito ad

incubazione microaerobica delle colture in fase esponenziale non sono state riscontrate significative differenze nei livelli di PHB prodotti dal ceppo di *S. meliloti* wild-type e iperproduttore di IAA.

2.4b. Enzimi della biosintesi di PHB

I PHB sono, generalmente, sintetizzati a partire dall'acetil-CoA in un pathway biosintetico caratterizzato da tre reazioni (figura 12), catalizzate dagli enzimi: β -chetotilasi (acetil-CoA acetiltransferasi), acetoacetil-CoA reduttasi (idrossibutiril-CoA deidrogenasi) e poli- β -idrossibutirrato sintasi. Il metabolismo dei PHB è controllato dallo stato redox cellulare e dalla disponibilità di acetil-CoA, piruvato e α -chetoglutarato.

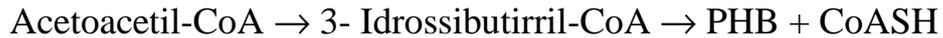
L'enzima *β -chetotilasi* ha un ruolo di regolazione nella biosintesi di PHB e catalizza la reazione di condensazione di due molecole di acetil-CoA:



La determinazione dell'attività di tale enzima, basata sulla combinazione di saggi enzimatici e spettrofotometrici, consiste nel seguire la diminuzione di assorbimento a 303 nm, dovuta alla formazione di CoASH.

Dai dati riportati in tabella 23 risulta che l'attività dell'enzima β -chetotilasi, in estratti proteici provenienti da cellule di *S. meliloti* 1021 cresciute in presenza di IAA e da quelle iperproduttrici di IAA, in fase stazionaria di crescita, è aumentata, rispettivamente, del 85% e 31% di quella misurata in cellule wild-type.

L'enzima *acetoacetyl-CoA reduttasi* catalizza la seguente reazione di riduzione dell'acetoacetyl-CoA, producendo il composto 3-idrossibutirril-CoA, che poi subisce una reazione di polimerizzazione catalizzata dalla PHA sintasi:



In alcuni batteri sono state identificate due tipi di acetoacetyl-CoA reduttasi che differiscono per il tipo di substrato (L-(+) o D-(-)-3- idrossibutirril-CoA) e di cofattore (NADH o NADPH).

Tale enzima è stato saggiato seguendo spettrofotometricamente l'ossidazione del NADPH o del NADH. Le attività dell'enzima acetoacetyl-CoA reduttasi NADPH-dipendente e NADH-dipendente sono state determinate nelle stesse condizioni sperimentali della β -chetotiasi.

Dai dati riportati in tabella 23 si evince che l'attività dell'acetoacetyl-CoA reduttasi NADH-dipendente, in *S. meliloti* trattato con IAA e iperproduttore di IAA è, rispettivamente, aumentata del 62% e 50% rispetto a quella determinata in *S. meliloti* 1021 wild-type. Per quanto riguarda l'enzima NADPH-dipendente, invece, non sono state riscontrate significative differenze di attività tra i tre campioni.

Tabella 22. Produzione di *poli- β -idrossibutirrati* (PBH) nei ceppi di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase esponenziale (A), stazionaria (B) di crescita e in seguito ad incubazione microaerobica

Condizione di crescita	PBH ^a [mg (mg proteina) ⁻¹]		
	1021	1021+	64
A	0,169±0,01	0,217±0,03	0,159±0,01
B	0,173±0,02	0,285±0,006	0,241±0,008
Microaerobica	0,309±0,01	N.D. ^b	0,302±0,04

^a La quantità di PHB è espressa come milligrammo prodotto per milligrammo di proteina

^b Non determinata

Tabella 23. Attività degli enzimi della biosintesi di PHB, β -chetotilasi e acetoacetyl-CoA reduttasi in estratti proteici di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64) in fase stazionaria di crescita

Enzimi	Attività specifica ^c		
	1021	1021 +	64
β-Chetotilasi	0,048±0,004	0,089±0,008	0,063±0,006
NADH-Acetoacetyl-CoA reduttasi	0,016±0,002	0,026±0,001	0,024±0,001
NADPH-Acetoacetyl-CoA reduttasi	0,015±0,001	0,014±0,001	0,016±0,001

^c Espressa come nanomoli di NADH o NADPH ossidato per minuto per milligrammo di proteina per l'acetoacetyl-CoA reduttasi e come (ΔA /min)/mg per la β -chetotilasi

2.5. Analisi dei profili di espressioni proteica

2.5a. Separazione delle proteine citoplasmatiche e di membrana mediante elettroforesi bidimensionali (2DE)

Le variazioni dei profili di espressione proteica in *S. meliloti* 1021 in risposta al trattamento con IAA e alla iperproduzione batterica di IAA sono state analizzate, in differenti fasi di crescita, mediante le tecnologie che sono alla base della proteomica. Infatti, le proteine citoplasmatiche e di membrana, estratte da cellule di *S. meliloti* wild-type, cresciute in assenza e in presenza di IAA 0,5 mM e da cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale (2-DE). Le proteine citoplasmatiche, in particolare, sono state estratte da cellule cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica sorgente di carbonio e prelevate in fase esponenziale e stazionaria di crescita; le proteine di membrana, invece, sono state estratte da cellule cresciute nelle stesse condizioni sperimentali, ma prelevate solo in fase esponenziale. Dall'analisi dei gel 2-DE (figure 22-25) ottenuti e, in particolare, dal numero e dalla intensità degli spots, risulta che tale sistema si è rivelato efficiente in termini di risoluzione e riproducibilità per la separazione non solo delle proteine di membrana, ma anche di quelle citoplasmatiche, che costituiscono una frazione dominante di un estratto proteico totale. Questa tecnica ha permesso di effettuare delle separazioni preparative, rivelando le proteine separate mediante colorazione con Blue di Coomassie colloidale, senza perdita di risoluzione; in particolare, circa 150 proteine citoplasmatiche e 100 proteine di membrana sono state risolte nell'intervallo 4-7 di pH utilizzato nella prima dimensione 2DE. L'analisi bioinformatica delle immagini relative alla scansione dei gel 2DE,

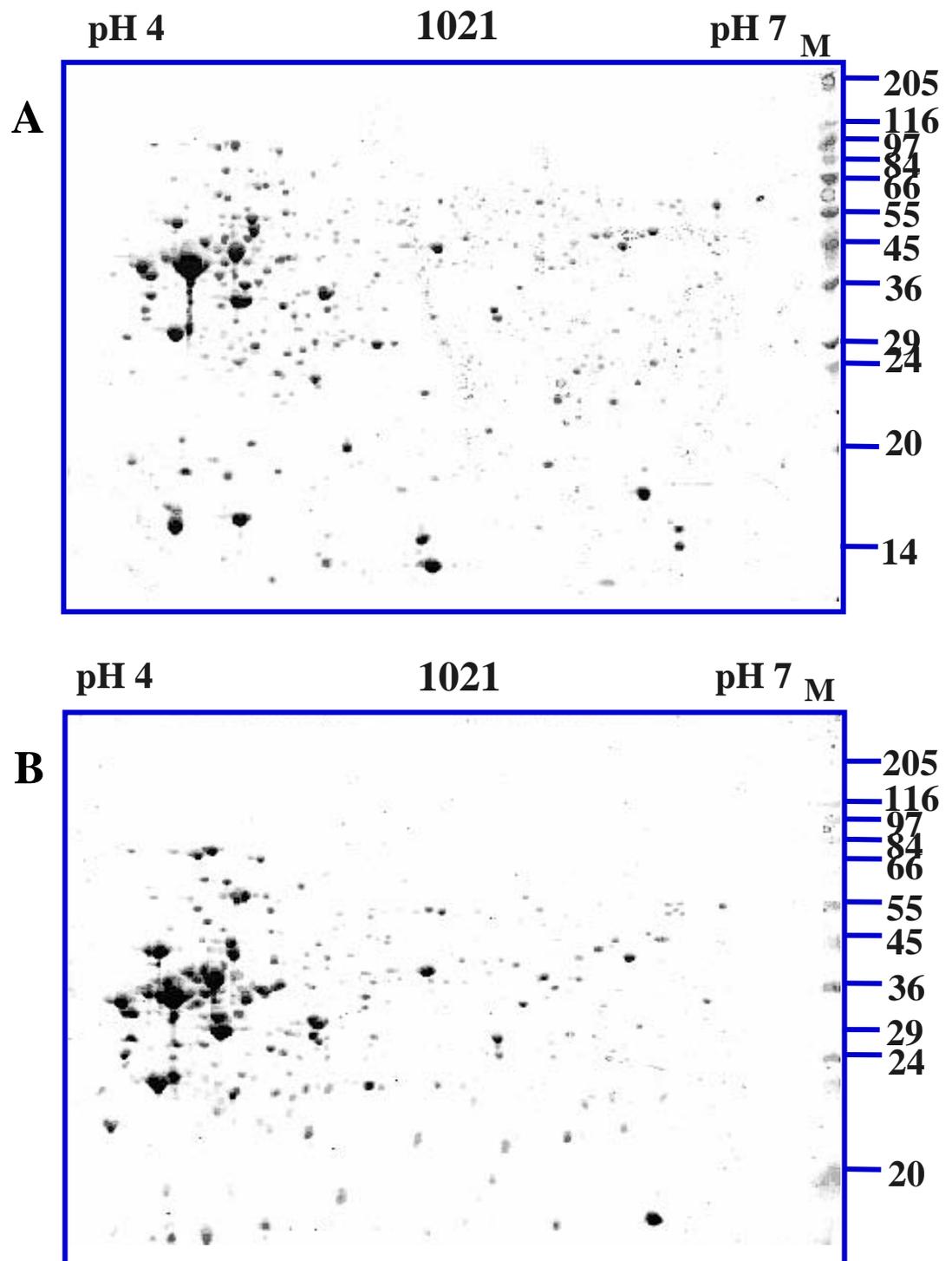


Figura 22. Separazione delle proteine citoplasmatiche estratte da cellule di *S. meliloti* wild-type (1021) cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio, in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita

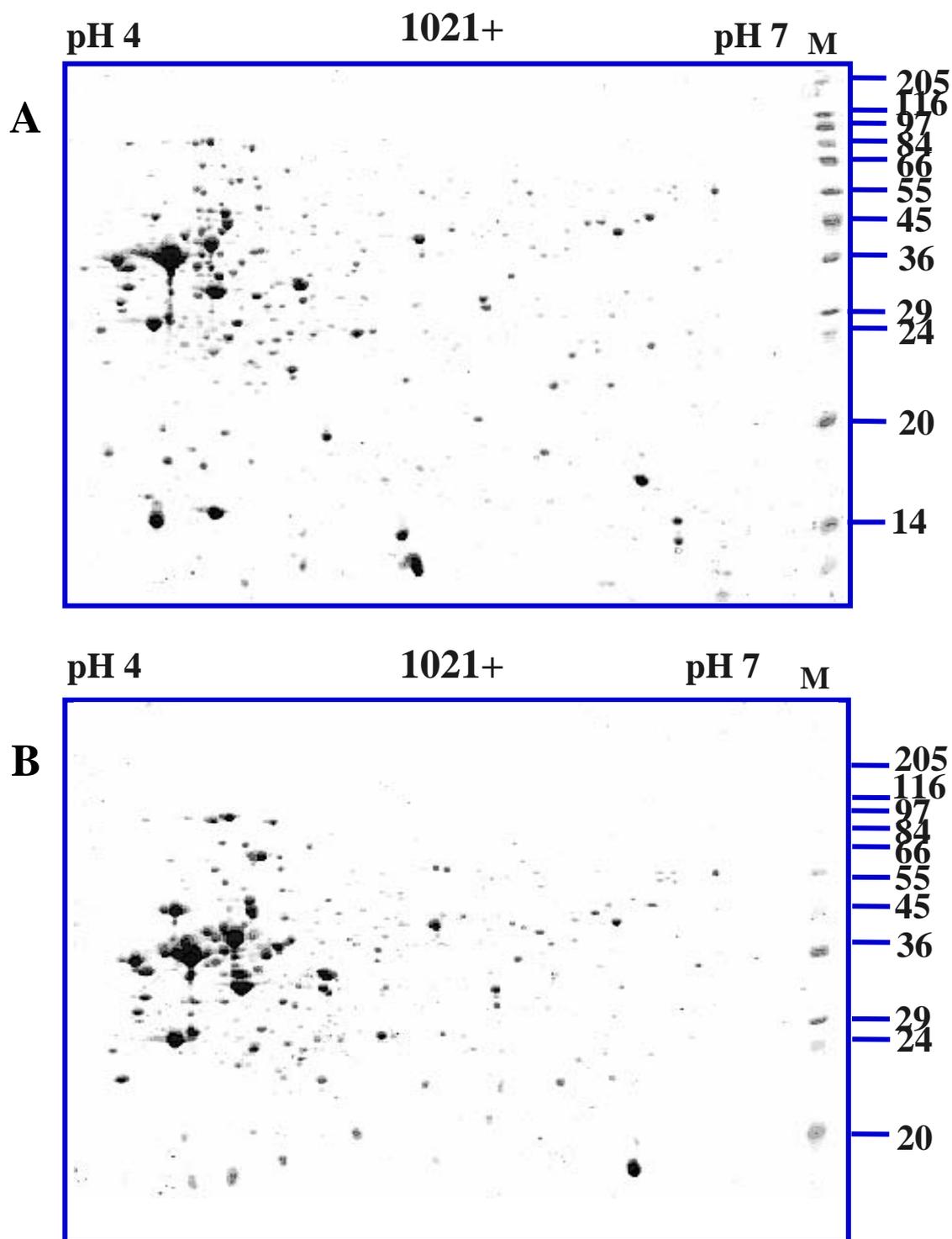


Figura 23. Separazione delle proteine citoplasmatiche estratte da cellule di *S. meliloti* wild-type trattate con IAA 0,5 mM (1021+) in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita, cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio

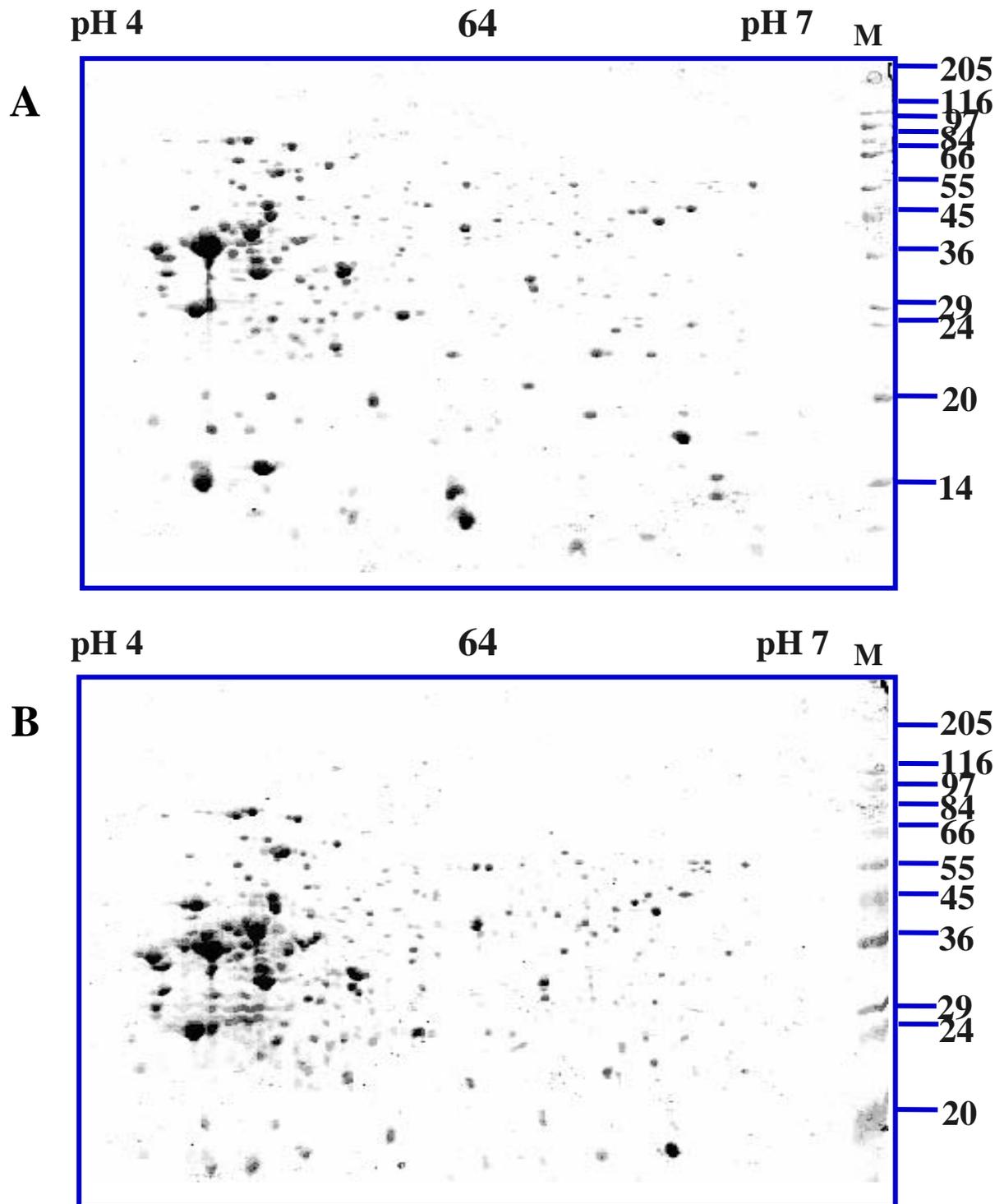


Figura 24. Separazione delle proteine citoplasmatiche estratte da cellule di *S. meliloti* iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio, in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita

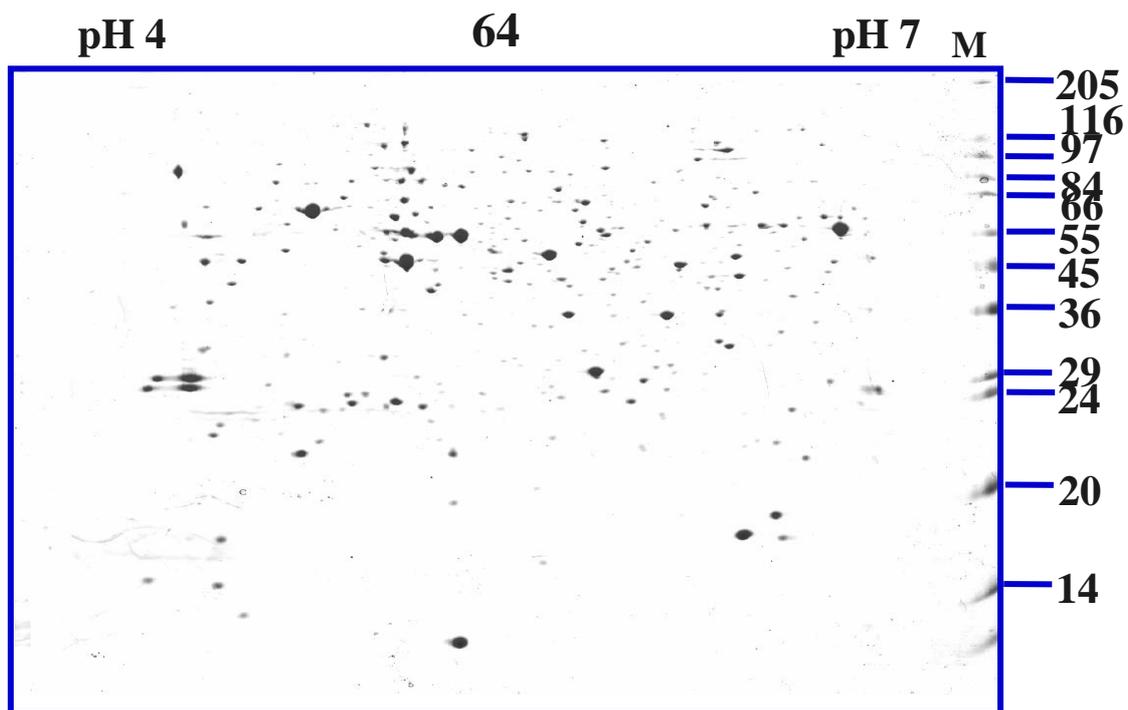


Figura 25. Separazione delle proteine di membrana estratte da cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattate con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttrici di IAA, in fase esponenziale di crescita, cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio

completamente decolorati, ottenuti caricando uguali quantità di proteine estratte dai campioni di controllo, trattato con IAA e iperproduttore di IAA, ha permesso di rilevare differenze nei relativi livelli di espressione proteica, ossia nelle intensità di un certo numero di spot corrispondenti, presenti sui tre gel 2DE.

2.5b. Analisi delle immagini 2DE mediante software

L'analisi computazionale dei profili 2DE, altamente complessi e derivanti da 5 esperimenti indipendenti, è stata realizzata con un adatto software di analisi delle immagini 2DE che ha consentito, sulla base delle intensità relative delle proteine, di quantificare i livelli di espressione proteica.

I moderni algoritmi, alla base di tali software, sono stati sviluppati, negli ultimi anni, allo scopo di superare molte delle difficoltà legate alla significatività delle determinazioni quantitative, quali differenze nel caricamento dei campioni o nella sensibilità del sistema di visualizzazione delle proteine presenti sui gel da comparare. Una tipica analisi consiste nel selezionare automaticamente la stessa zona, contenente un certo numero di spot, sui gel 2DE, dopo aver scelto il gel di riferimento (coincidente, nel nostro caso, con quello relativo al ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type). Dopo la fase più critica di “matching”, ossia di confronto degli spot che rappresentano la stessa proteina nei differenti gel, il software calcola la quantità di proteina presente in ciascuno spot, esprimendola sotto forma di volume, definito come volume sopra il bordo dello spot situato al 75% della sua altezza e normalizzato secondo la formula:

$$V = V_n * 100 / (\Sigma V_i)$$

ossia espresso come volume dello spot n , per un fattore 100, diviso la somma dei volumi di tutti gli spots (Σ per $i=1,n$) presenti nella stessa regione del gel 2DE selezionata.

Le proteine, differenzialmente espresse nei ceppi di *S. meliloti* iperproduttore di IAA e trattato in modo esogeno con IAA, sono state definite indotte se i loro livelli di espressione sono almeno 2 volte maggiori del controllo e represses se presentano una diminuzione di almeno il 50% rispetto ai livelli di espressione riscontrati nel ceppo selvatico.

Tale analisi ha permesso di evidenziare 15 proteine citoplasmatiche differenzialmente espresse in *S. meliloti* wild-type trattato con IAA e iperproduttore di IAA, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, rispetto al ceppo di controllo (figure 26-28). In tabella 24 sono riportati per tali campioni i relativi livelli di espressione, calcolati dividendo il volume normalizzato di uno spot per quello del corrispondente spot del gel di riferimento. Il tipo di variazione dell'espressione proteica (induzione o repressione) è indicato dal segno di ciascun valore; variazioni significative, invece, sono quelle con valori dei livelli di espressione $> |2|$. In tabella 24 sono, inoltre, riportati i punti isoelettrici (pI) e i pesi molecolari (MW) apparenti calcolati dal software, per ciascuno spot, mediante l'utilizzo di standard proteici migrati con il campione nelle condizioni di elettroforesi. Per quanto riguarda le proteine di membrana, infine, l'analisi computazionale, condotta nelle stesse condizioni di quella per le proteine citoplasmatiche, ha rilevato 12 proteine differenzialmente espresse nei tre campioni (figure 29) e i relativi livelli di espressione sono riportati in tabella 25.

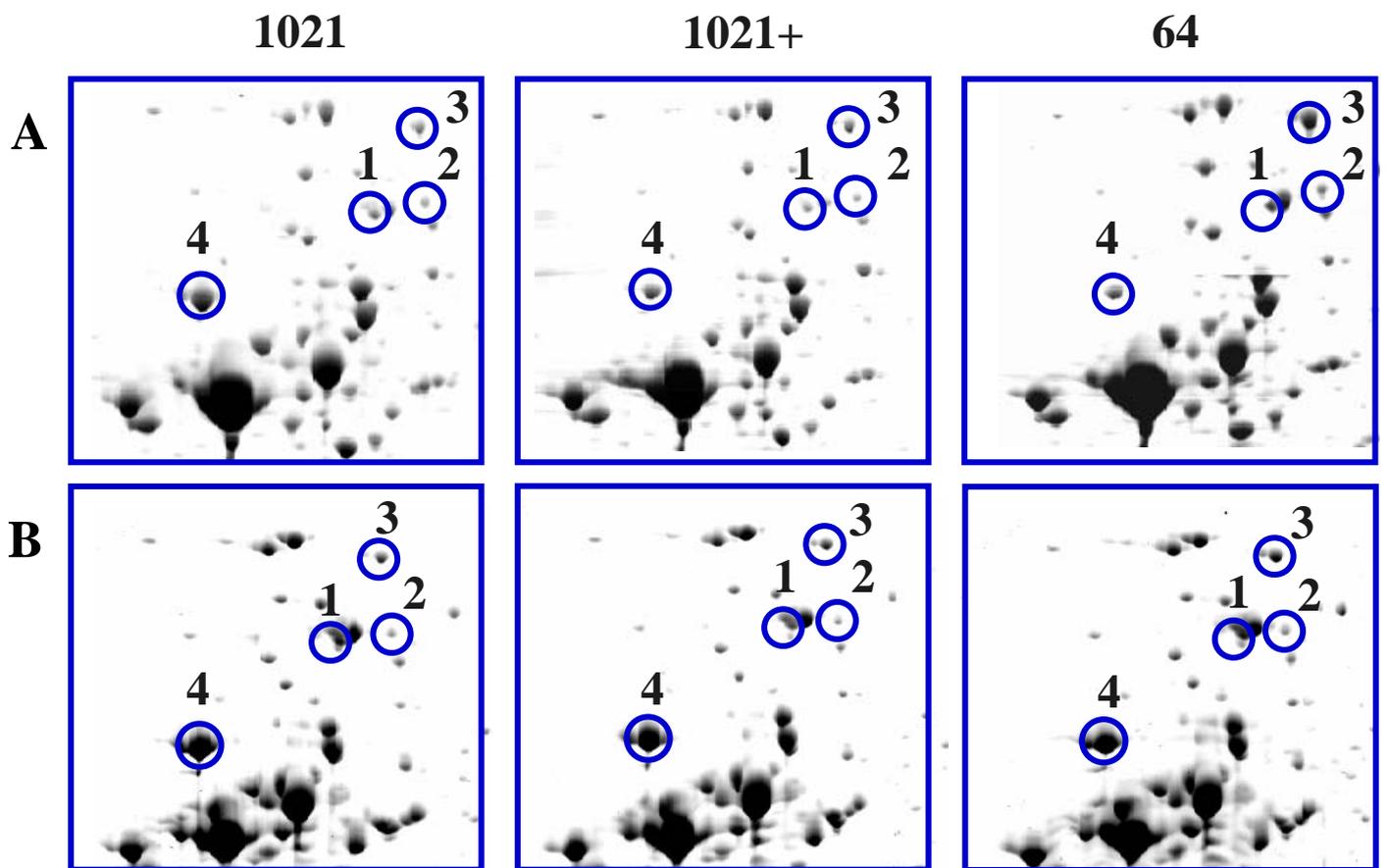


Figura 26. Proteine citoplasmatiche differenzialmente espresse in *S. meliloti* wild-type (1021) nel ceppo trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e in quello iperproduttore di IAA (64), in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita

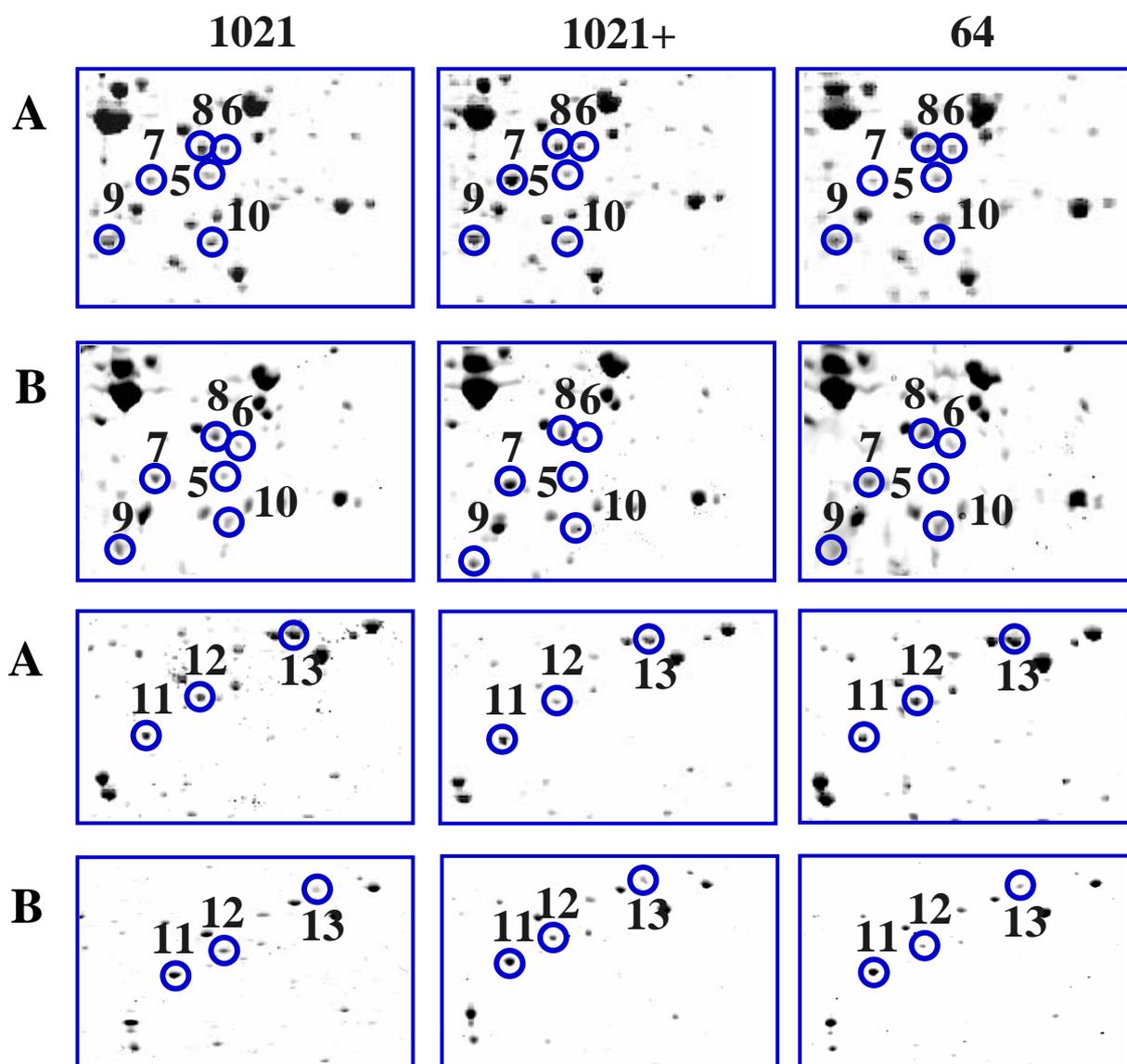


Figura 27. Proteine citoplasmatiche differenzialmente espresse in *S. meliloti* wild-type (1021) nel ceppo trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e in quello iperproduttore di IAA (64), in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita

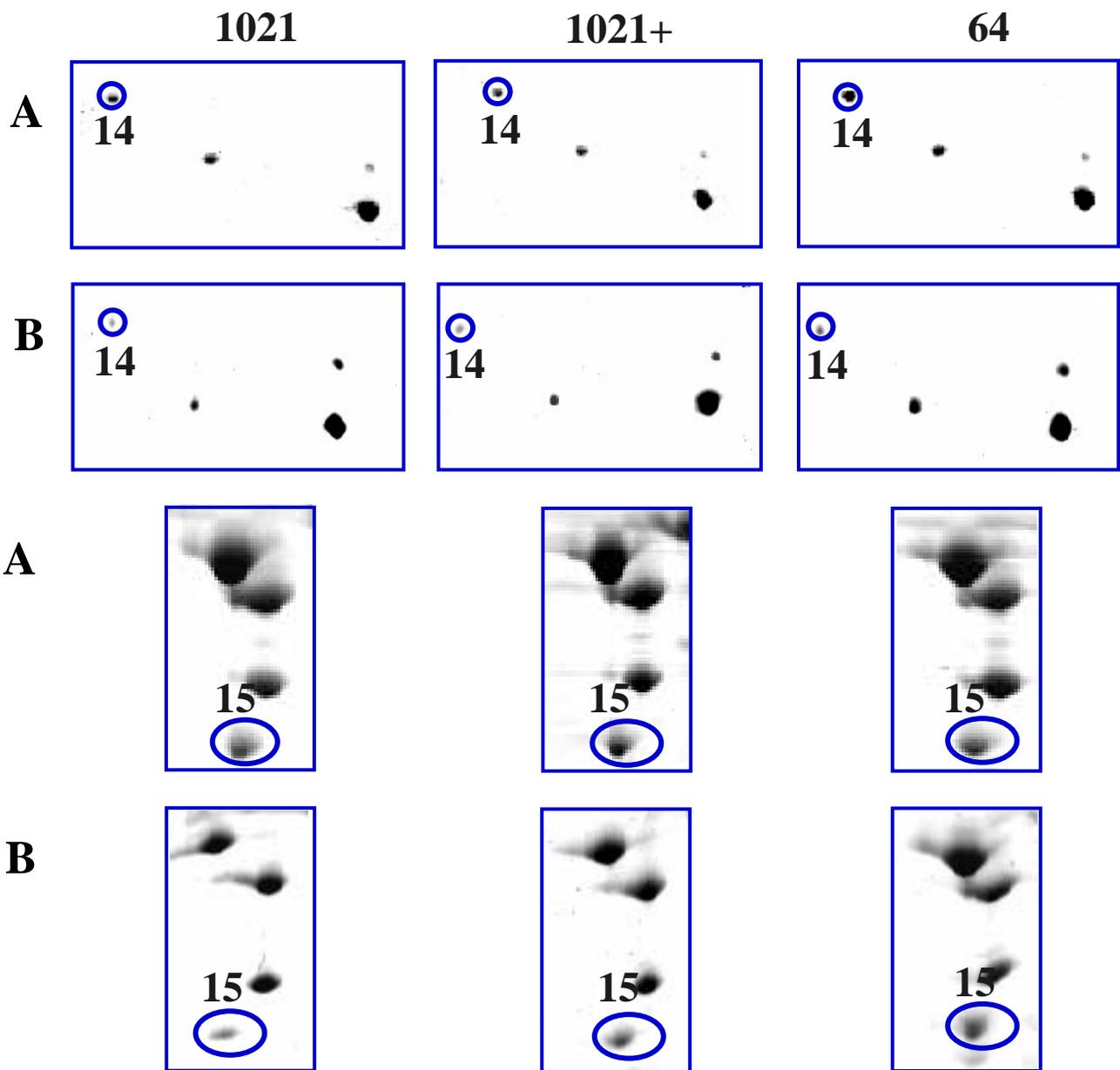


Figura 28. Proteine citoplasmatiche differenzialmente espresse in *S. meliloti* wild-type (1021) nel ceppo trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e in quello iperproduttore di IAA (64), in fase esponenziale (A) e stazionaria (B) di crescita

Tabella 24. Livelli di espressione di proteine citoplasmatiche estratte da cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio, in fase esponenziale (A) e stazionaria di crescita (B)

Spot	pI/MW ^b	Variazione livelli di espressione ^a			
		1021 +		64	
		A	B	A	B
1	4,77/56,9	-(2,7 ± 0,9)	-(1,2 ± 0,1)	-(1,6 ± 0,5)	1,3 ± 0,2
2	4,87/57,9	-(3,0 ± 0,9)	-(1,4 ± 0,2)	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,2
3	4,86/65,8	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,4
4	4,44/45,8	-(1,5 ± 0,5)	1,2 ± 0,1	-(2,3 ± 0,6)	-(2,2 ± 0,4)
5	4,93/29,2	-(2,8 ± 0,3)	-(1,5 ± 0,1)	-(4,4 ± 1)	-(1,1 ± 0,1)
6	4,97/31,2	-(3,2 ± 1)	-(1,3 ± 0,2)	-(1,4 ± 0,4)	1,6 ± 0,02
7	4,78/28,9	4,2 ± 0,7	1,7 ± 0,2	-(1,6 ± 0,4)	-(3,4 ± 0,5)
8	4,82/31,3	-(1,4±0,2)	-(2,6 ± 0,5)	-(1,4±0,1)	2,0 ± 0,3
9	4,55/28,0	1,2±0,1	2,5 ± 0,1	-(1,3±0,3)	-(2,9 ± 0,2)
10	4,86/28,3	-(1,5±0,5)	-(2,4 ± 0,8)	-(1,2±0,2)	1,3 ± 0,1
11	5,87/37,2	2,4 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2
12	6,00/41,9	-(3,6 ± 0,7)	-(1,2 ± 0,1)	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2
13	6,25/44,7	-(1,2±0,2)	2,1 ± 0,4	-(1,2±0,1)	2,1 ± 0,8
14	5,73/19,5	1,3 ± 0,1	-(1,1 ± 0,1)	2,5 ± 0,9	2,3 ± 0,5
15	4,15/31,5	1,4 ± 0,3	3,9 ± 1	1,2 ± 0,1	3,3 ± 0,3

^a Espressi come rapporti dei volumi normalizzati di 1021+ o 64 per quelli del campione di controllo (1021). Le proteine indotte presentano livelli di espressione (indicati con valori positivi) almeno 2 volte maggiori del controllo e quelle represses, invece, una

diminuzione dei livelli di espressione (indicati con valori negativi) di almeno il 50% rispetto a quelli riscontrati nel ceppo selvatico

^b Punti isoelettrici (pI) e pesi molecolari (MW, espressi in kDa) apparenti calcolati dal software mediante l'utilizzo di standard proteici migrati con il campione nelle condizioni di elettroforesi

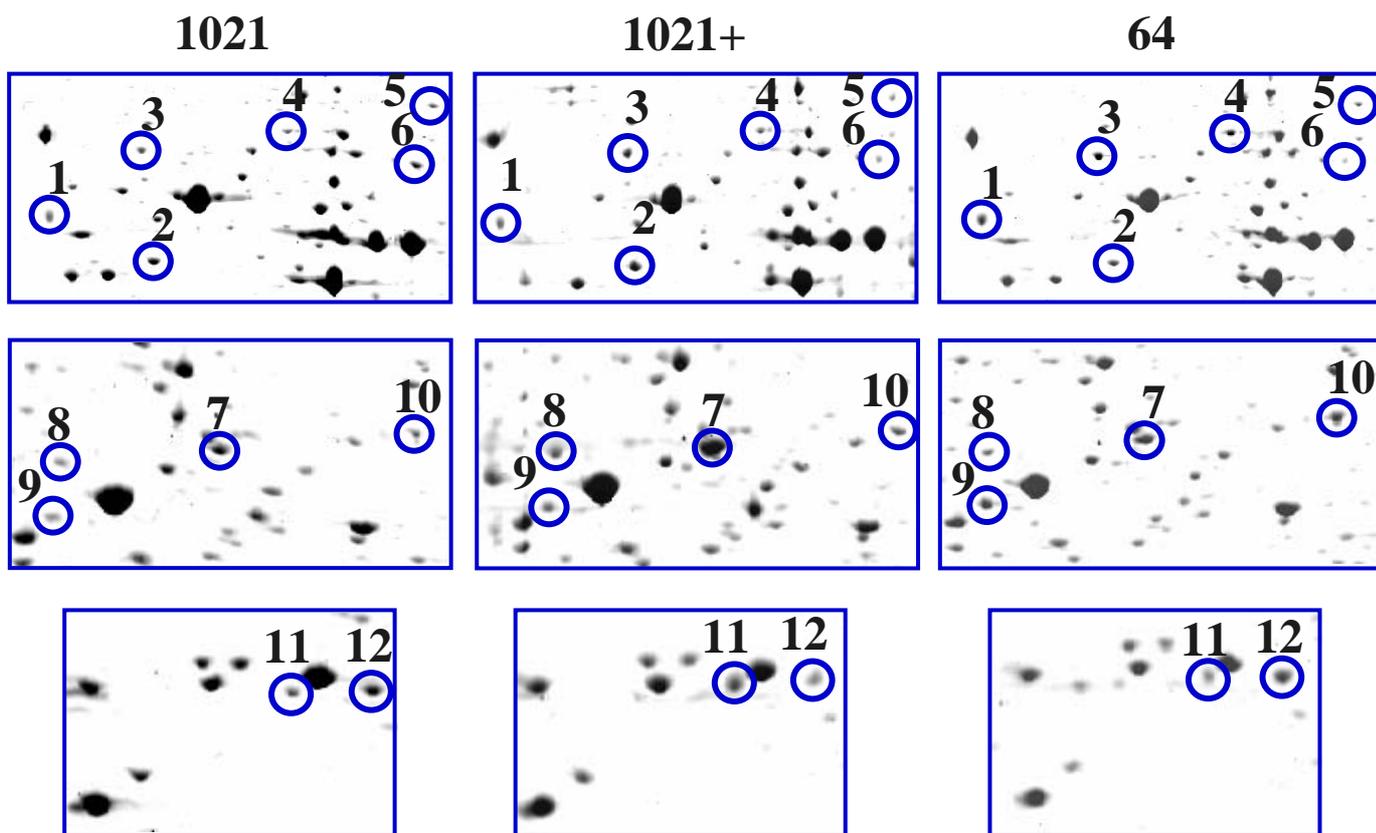


Figura 29. Proteine di membrana differenzialmente espresse in *S. meliloti* wild-type (1021) nel ceppo trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e in quello iperproduttore di IAA (64), in fase esponenziale di crescita

Tabella 25. Livelli di espressione di proteine di membrana estratte da cellule di *S. meliloti* wild-type (1021), trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), cresciute in terreno minimo contenente mannitolo come unica fonte di carbonio, in fase esponenziale di crescita

Spot	Variazione livelli di espressione ^a		
	pI/MW ^b	1021 +	64
1	4,32/ 56,2	1,3 ± 0,3	3,1 ± 0,6
2	4,60/50,7	2,4 ± 0,8	1,7 ± 0,2
3	4,57/73,7	1,3 ± 0,1	3,2 ± 1
4	4,97/82,3	2,4 ± 0,7	2,3 ± 0,1
5	5,37/93,6	-(6,4 ± 2)	1,2 ± 0,1
6	5,33/67,5	-(2,9 ± 0,6)	-(7,0 ± 1)
7	5,81/53,3	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,2
8	5,52/51,9	2,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2
9	5,50/45,9	1,3 ± 0,1	3,1 ± 0,7
10	6,15/55,0	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,8
11	5,03/24,6	3,2 ± 0,4	-(1,9 ± 0,2)
12	5,18/24,7	-(1,5 ± 0,4)	2,2 ± 0,4

^a Espresi come rapporti dei volumi normalizzati di 1021+ o 64 per quelli del campione di controllo (1021). Le proteine indotte presentano livelli di espressione (indicati con valori positivi) almeno 2 volte maggiori del controllo e quelle represses, invece, una diminuzione dei livelli di espressione (indicati con valori negativi) di almeno il 50% rispetto a quelli riscontrati nel ceppo selvatico

^b Punti isoelettrici (pI) e pesi molecolari (MW, espressi in kDa) apparenti calcolati dal software mediante l'utilizzo di standard proteici migrati con il campione nelle condizioni di elettroforesi

2.5c. Identificazione delle proteine citoplasmatiche da gel 2DE

Delle 15 proteine citoplasmatiche differenzialmente espresse in seguito al trattamento con IAA e alla sua iperproduzione, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, 6 sono state identificate determinando mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, la masse dei peptidi ottenuti dalla digestione enzimatica *in situ* degli spot proteici. Dal confronto delle masse determinate sperimentalmente con quelle calcolate utilizzando un database di sequenza (Matrix Science, Mascot Search Results e/o ProFound) è stato possibile identificare correttamente ciascuna proteina (tabella 26). In particolare, la **proteina 1** presenta una identità di sequenza con il 22% della probabile proteina (*dppA* o SMc00786) periplasmatica legante dipeptidi di *S. meliloti* 1021. Dall'analisi dei profili proteici mediante software, l'espressione di tale proteina risulta repressa, in modo significativo, solo in *S. meliloti* 1021 wild-type trattato con IAA in fase esponenziale (tabella 24). La proteina DppA di *S. meliloti* 1021 (di peso molecolare di 59064 Da, di pI pari a 4.93 e costituita da 531 residui aa) presenta un'alta identità di sequenza (73%) con la corrispondente proteina di *R. leguminosarum*. Tale proteina fa parte della famiglia di ABC (ATP-Binding Cassette) trasportatori di dipeptidi, tripeptidi e oligopeptidi, composti esogeni o prodotti di degradazione delle proteine componenti la parete cellulare batterica. E' noto, in particolare, che mutazioni nell'operone *dppABCD* di *R. leguminosarum* influenzano il trasporto dell'acido δ -amminolevulinico, un precursore dell'heme, lasciando inalterate le proprietà simbiotiche di fissazione dell'azoto [100].

La **proteina 3** presenta una identità di sequenza con il 17% della proteina heat shock 70 HSP70 (*dnaK* o SMc02857) di *S. meliloti* 1021 e uno score di identificazione piuttosto alto come riportato in tabella 26. La proteina

HSP70, di peso molecolare 68950 Da e pI 4.91, costituita da 641 aa, in base ai livelli di espressione riportati in tabella 24, è indotta in maniera significativa in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, sia in fase esponenziale sia stazionaria di crescita. In *S. meliloti* 104A14, *dnak* appartiene al gruppo di geni *psi* (Phosphate Stress Inducibile) indotti in condizioni limitanti di fosforo inorganico (P_i). DnaK, infatti, è una proteina con attività ATPasica che risponde attivamente agli shock termici ed iperosmotici, a stress di carenza nutrizionale (da carbonio e fosforo); inoltre, agisce nel refolding delle proteine tra cui quelle danneggiate termicamente, ma anche nei processi proteolitici e di esporto di proteine. Infine, non sorprende che mutanti *dnak* di *S. meliloti* sono meno efficienti nella fissazione dell'azoto [101]. A conferma di tale dato proteomico, è stata paragonata la sopravvivenza di cellule di *S. meliloti* wild-type e del ceppo iperproduttore di IAA in risposta a shock termico. In seguito al trattamento delle colture a 55°C, sopravvivono lo 0,30 % ($\pm 0,02$) di cellule iperproduttrici di IAA, rispetto a cellule iperproduttrici non sottoposte allo stress, mentre lo 0,17 % ($\pm 0,01$) di cellule wild-type stressate termicamente, rispetto a quelle wild-type non trattate.

La **proteina 4** presenta un'alta identità di sequenza con il 30% della putativa periplasmatica proteina del sistema di ABC-trasporto di *S. meliloti* 1021 (r00476 o SMc02171). L'espressione di tale proteina risulta repressa, in modo significativo, in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, sia in fase esponenziale sia stazionaria di crescita. Tale proteina è costituita da 341 aa e ha un MW pari a 35261 Da e un pI di 4.62. In batteri la superfamiglia di ABC-proteine trasporta una varietà di substrati, incluso monosaccaridi, disaccaridi e oligosaccaridi. La proteina identificata presenta un'altissima identità di sequenza (96%) con la proteina FrcB di *S. meliloti*, una ABC-proteina citoplasmatica responsabile dell'uptake di fruttosio. In particolare,

mutanti *frc* di *S. meliloti* sono incapaci di crescere utilizzando fruttosio come unica fonte di carbonio, perché incapaci di trasportare tale zucchero [102]. Tuttavia, tali mutanti presentano proprietà simbiotiche inalterate, confermando l'ipotesi, generalmente accettata, che l'uptake di esosi, quali il fruttosio, non sono necessari alla nodulazione.

Le **proteina 7 e 11**, con livelli di espressione indotti in *S. meliloti* trattato con IAA in fase esponenziale, presentano un'alta identità di sequenza, rispettivamente, con il 33% di una ipotetica proteina (SMb21574) e con il 25% di un'altra ipotetica proteina (SMa1507) di *S. meliloti* 1021.

Infine, la **proteina 14** presenta un'elevata identità di sequenza con il 57% della proteina SSB (Single-Strand Binding) (SMc01233) di *S. meliloti* 1021. I livelli di espressione di tali proteine sono significativamente indotti in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, sia in fase esponenziale sia in fase stazionaria (tabella 24). La proteina SSB, di MW 18963 Da e pI 5.54, è costituita da 174 residui aa e, generalmente, interviene nei processi di replicazione del cromosoma, di ricombinazione e di riparo del DNA danneggiato [103]. A conferma di tale dato proteomico, è stata paragonata la sensibilità a 100 J/m^2 di radiazione UV (254 nm) delle cellule di *S. meliloti* wild-type e del ceppo iperproduttore di IAA. In seguito ad irradiazione UV delle colture in fase esponenziale [stazionaria] di crescita, sopravvivono il 92 % (± 8) [91 % (± 4)] di cellule iperproduttrici di IAA, rispetto a cellule iperproduttrici non irradiate, mentre il 67 % (± 6) [77 % (± 5)] di cellule wild-type, rispetto a quelle wild-type non irradiate.

Tabella 26. Identificazione delle proteine citoplasmatiche, da gel 2DE, differenzialmente espresse in *S. meliloti* wild-type trattato con IAA 0,5 mM (1021+) e iperproduttore di IAA (64), in fase esponenziale e stazionaria di crescita, mediante spettrometria di massa MALDI-TOF

Spot	pI/MW teorici	Gene	Descrizione	% Sequenza	Score di identificazione^a
1	4,93/ 59,1	<i>dppA</i>	probabile proteina periplasmatica legante dipeptidi	22	125
3	4,91/ 68,6	<i>dnaK</i>	proteina heat shock 70 HSP70	17	95
4	4,62/ 35,2	SMc02171	putativa periplasmatica proteina ABC-trasporto	30	138
7	7,75/13,3	SMb21574	ipotetica proteina SMb21574	33	103
11	6,33/38,5	SMa1507	ipotetica proteina SMa1507	25	131
14	5,54/18,9	<i>ssb</i>	proteina SSB (Single-Strand Binding)	57	175

^a Score, fornito da Mascot Search Results, è espresso come $-10*\text{Log}(P)$, dove P è la probabilità che il match osservato è un evento casuale; score maggiori di 56 sono significativi ($p<0,05$)

2.6. Analisi delle proprietà simbiotiche

I ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA sono stati utilizzati per inoculare la pianta ospite *Medicago truncatula*. Il metodo di infezione e i successivi processi di mantenimento e processamento delle piante sono descritti, in dettaglio, nella sezione “Materiali e Metodi”.

2.6a. Microscopia ottica dei noduli di *Medicago* generati da *S. meliloti*

I noduli generati da *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA sulle radici della pianta ospite sono stati prelevati dopo 42 giorni dall’infezione. Le sezioni sottili di nodulo, ottenute mediante taglio all’ultramicrotomo, sono state osservate, dopo colorazione con blu di toluidina, al microscopio ottico con un ingrandimento 4X e dopo colorazione con KI/I₂, specifica per l’amido, con ingrandimento 10X. Le sezioni sono state ottenute tagliando il nodulo lungo un asse di simmetria passante per l’apice e la radice. In figura 30 sono riportate le sezioni di nodulo ritenute più significative sulla base di numerosi tagli effettuati per ogni campione. Morfologicamente ed istologicamente sono state riscontrate delle differenze: i noduli generati dal ceppo wild-type hanno una forma più allungata rispetto a quelli derivanti dal ceppo iperproduttore di IAA, che appaiono più tondeggianti (figura 30 A e B); inoltre, a questa età l’attività meristemica di questi ultimi noduli è apparentemente maggiore e le cellule meristematiche occupano una zona più ampia rispetto a quelle dei noduli generati da *S. meliloti* wild-type (figura 30 C e D). I noduli del ceppo iperproduttore di IAA, quindi, mantengono, in modo efficiente, la capacità meristemica di divisione, tipica della zona I del nodulo priva di batteri, aggiungendo continuamente nuove cellule invase al tessuto centrale del nodulo.

Infine, la colorazione specifica dell'amido (figura 30 E ed F) ha evidenziato un maggiore accumulo di granuli nell'interzona II-III dei noduli derivanti dall'infezione con il ceppo iperproduttore di IAA rispetto a quelli generati dal ceppo wild-type.

2.6b. Determinazione del peso secco

La determinazione del peso secco di leguminose è un metodo semplice e relativamente empirico per stimare la fissazione biologica dell'azoto (BNF). Dal momento che le leguminose possono soddisfare fino al 90% della loro richiesta di azoto attraverso la fissazione e la biomassa delle piante è dipendente dalla quantità di azoto, il peso secco può essere utilizzato per confrontare l'efficienza di fissazione dell'azoto da parte di differenti piante. Le piante di *Medicago truncatula*, utilizzate per la determinazione della biomassa, sono state prelevate e processate, come descritto in "Materiali e Metodi", dopo 6 settimane dall'infezione con i ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA. Da tale analisi è stato riscontrato un aumento del 28% del peso secco di piante nodulate dal ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA [(68,6 ± 12,0) mg/pianta] rispetto al ceppo wild-type [(53,5 ± 14,3) mg/pianta]. Per avere una migliore stima della differenza osservata riguardo la biomassa vegetale secca, la media del peso secco delle piante inoculate con il ceppo iperproduttore di IAA è stata confrontata con quella delle piante inoculate con il ceppo wild-type, utilizzando il metodo statistico del t-Test. Da tale analisi è stata confermata la significatività della differenza osservata: n = 41 (numero di piante per ciascun ceppo) e P < 0,04.

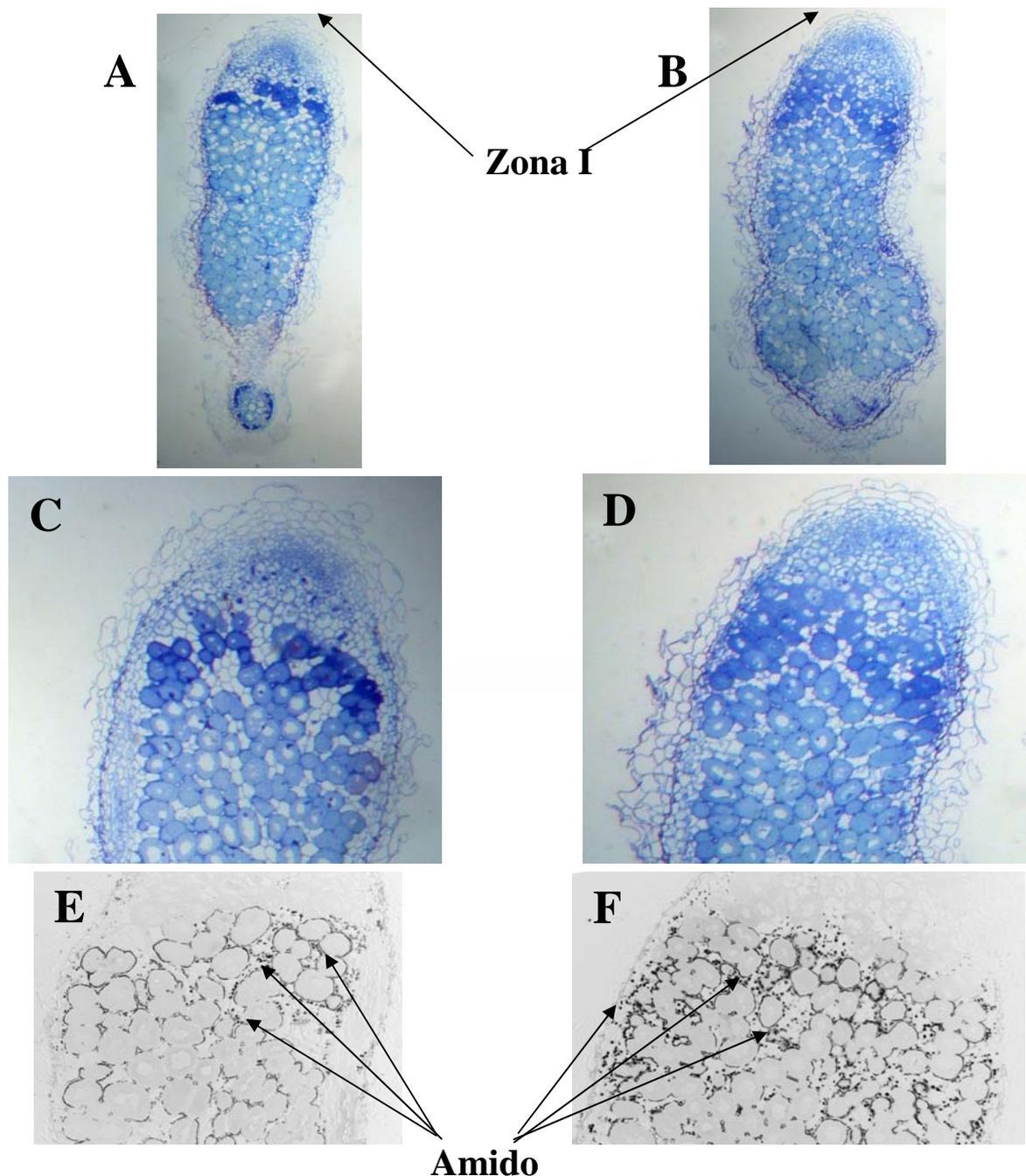


Figura 30. Sezioni di noduli di *Medicago truncatula* generati dal ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type (A) e iperproduttore di IAA (B) dopo 42 giorni dall'infezione. I noduli generati dal ceppo iperproduttore di IAA presentano un'attività meristemica (zona I) maggiore [ingrandimento (D)] e un accumulo maggiore di granuli di amido (F), come è indicato dalle frecce, rispetto ai noduli derivanti dal ceppo wild-type [ingrandimento (C)] ed (E)

2.6c. Determinazione dell'attività nitrogenasica mediante saggio di riduzione dell'acetilene (saggio ARA)

Il saggio ARA (Acetilene Reduction Assay) è un metodo rapido, sensibile ed accurato per la determinazione della fissazione biologica dell'azoto attraverso la misura dell'attività enzimatica della nitrogenasi, contenuta nei noduli delle piante leguminose, essendo noti il numero di piante, il numero e/o la massa dei noduli. La nitrogenasi è in grado non solo di catalizzare, in condizioni fisiologiche, la riduzione dell'azoto atmosferico ad ammonio, ma anche di altri composti. Tale saggio, infatti, sfrutta la capacità della nitrogenasi di catalizzare la riduzione dell'acetilene (C_2H_2) ad etilene (C_2H_4) sotto un'atmosfera contenente più del 10% di C_2H_2 . Le due reazioni, però, non sono equivalenti dal punto di vista stechiometrico: infatti, la nitrogenasi richiede una coppia di elettroni per ridurre C_2H_2 a C_2H_4 , ma tre coppie di elettroni per la riduzione di N_2 a due molecole di NH_3 . Per tale motivo, il rapporto fra le attività nelle due reazioni è pari a 1/3 e l'attività che viene misurata con tale metodo è il triplo di quella fisiologica: una unità enzimatica di nitrogenasi, che catalizza la riduzione di una mole di N_2 , è in grado di catalizzare la riduzione di 3 moli di acetilene nella stessa unità di tempo. Il metodo utilizzato consiste, come descritto in "Materiali e Metodi", nell'incubare, in un sistema chiuso, con C_2H_2 i campioni di radici con noduli, ottenuti prelevando tutte le piante infettate con lo stesso ceppo. L'atmosfera di incubazione è analizzata mediante un gas-cromatografo, con un detector a ionizzazione di fiamma, in grado di separare una miscela di acetilene ed etilene, ed effettuando almeno 5 prelievi, per ciascun campione, a diversi e brevi intervalli di tempo dall'incubazione. Si effettua, quindi, un'analisi cinetica basata sulla determinazione della velocità con la quale aumenta il numero totale di moli di etilene prodotte dal campione nel

tempo. Con tale metodica l'attività è valutata come pendenza di una retta che interpola i cinque punti sperimentali mediante il metodo statistico dei minimi quadrati, che consente di trovare la migliore linea retta che interpola i 5 punti sperimentali. L'intercetta, invece, tiene conto dell'incertezza sullo zero dovuta all'accuratezza dello strumento ed all'eventuale presenza di etilene rilasciato dalle piante in seguito al taglio delle radici o presente nella colonna cromatografia quale impurezza. Tale metodica tiene conto della variabilità delle piante ponendole in unico tubo di incubazione e rendendo, quindi, omogenei i campioni da analizzare.

L'analisi cinetica supera il problema della forte inibizione, da parte di C_2H_2 , dell'attività nitrogenasica che diminuisce entro 30 minuti dall'incubazione, effettuando i prelievi a brevi intervalli di tempo dall'incubazione. Inoltre, tale analisi fornisce un accurato valore dell'attività nitrogenasica totale presente nel campione definendo un errore relativo al massimo dell'1%, notevolmente ridotto rispetto a quello tradizionale del 30-70% del metodo classico, basato su un unico prelievo a tempi lunghi dall'incubazione. Il saggio ARA, quindi, ha permesso di rilevare, dopo 6 settimane dall'infezione, un aumento statisticamente significativo (del 35%) dell'attività nitrogenasica in noduli contenenti batteroidi del ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA. In particolare, le attività saggiate sono state espresse come $(98,5 \pm 0,4)$ e $(133 \pm 0,4)$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ per nodulo, per noduli derivanti, rispettivamente, dal ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type e quello iperproduttore di IAA.

DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi di dottorato ha avuto come obiettivo quello di studiare gli effetti indotti dall'azione dell'acido indolo-3-acetico (IAA) sul metabolismo energetico cellulare e sui profili di espressione proteica in *S. meliloti*, il rizobio più adatto per un'analisi metabolica e proteomica. Tali analisi sono state condotte su *S. meliloti* 1021 wild-type trattato con IAA e su quello trasformato con il plasmide contenente i geni codificanti per un secondo pathway di biosintesi di IAA, che, per semplicità, è sempre stato denominato ceppo iperproduttore di IAA (64). E' noto che *S. meliloti* normalmente produce IAA attraverso l'intermedio acido indolo-3-piruvico (IPA); l'intermedio, invece, della produzione batterica di IAA nel ceppo 64, utilizzato in questo lavoro, è l'indolo-3-acetamide (IAM). Da quanto detto, è risultato necessario verificare che il pathway IAM introdotto, di biosintesi di IAA dal triptofano, sia biochimicamente attivo in *S. meliloti*. Dall'analisi quantitativa relativa di IAA mediante GC/MS, è risultato che il ceppo iperproduttore produce e rilascia nel sovrinatante una quantità di IAA 80 volte maggiore di quella determinata in colture wild-type. Non devono, perciò, sorprendere gli effetti differenti, ma non contrastanti, del trattamento esogeno e quello endogeno di IAA, data la diversità dei due sistemi utilizzati: nel primo, le colture batteriche di *S. meliloti* wild-type sono state trattate per 5 h con IAA ad una concentrazione finale, al momento dell'aggiunta, pari a 0,5 mM (500 nmol/ml); nel secondo, invece, si ha una produzione di IAA e un suo locale rilascio, che, al momento del prelievo delle colture, è pari a 0,39 nmol/ml. Successivamente è stato verificato che il ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA presentasse quelle proprietà simbiotiche tipiche di altri rizobi (*R. leguminosarum viciae* e *R. etli*) iperproduttori di IAA (paragrafo 1.5.). Dall'analisi delle proprietà simbiotiche è risultato che le piante di *Medicago truncatula*, infettate con *S. meliloti* iperproduttore di IAA, presentano un aumento della biomassa

secca pari al 28 % rispetto a piante infettate con *S. meliloti* wild-type e prelevate dopo 6 settimane. L'aumentata produzione batterica di IAA comporta anche un aumento del 35 % dell'attività nitrogenasica in noduli contenenti i batteroidi del ceppo 64. Infine, i noduli derivanti dal ceppo 64 presentano un'attività meristemica maggiore di quella osservata, mediante microscopia ottica, in noduli del ceppo wild-type. La valutazione di questi dati permette di affermare che l'utilizzo del ceppo di *S. meliloti* iperproduttore di IAA, nel processo di simbiosi, consente una fissazione biologica dell'azoto più efficiente rispetto al ceppo wild-type. Tale osservazione è correlabile all'ipotesi di una diversa fase di sviluppo dei noduli generati dal ceppo iperproduttore di IAA, il cui aumento di concentrazione comporterebbe un'accelerazione della formazione di strati cellulari legata ad una maggiore attività meristemica osservata in nodulo. Tale ipotesi sarebbe estendibile anche allo sviluppo del batterio nella forma libera, in quanto l'analisi microscopica ha evidenziato che la morfologia del batterio iperproduttore di IAA in fase esponenziale è diversa da quella del batterio wild-type nella stessa condizione di crescita (figura 20), ma molto simile a quella del batterio wild-type in fase stazionaria (figura 21). L'iperproduzione endogena di IAA determinerebbe un'accelerazione delle fasi di sviluppo del batterio con importanti conseguenze sul suo metabolismo, come di seguito è riportato.

Allo scopo di comprendere la relazione esistente tra l'IAA e il processo di simbiosi, si è rivelata particolarmente utile l'analisi degli effetti di tale molecola sulle attività degli enzimi chiave del metabolismo energetico, saggiate in estratti proteici totali provenienti da cellule di controllo, trattate con IAA e iperproduttrici di IAA. L'analisi metabolica è stata realizzata in batteri liberi e non in batteroide, quest'ultima sarebbe stata particolarmente adatta per il raggiungimento del nostro scopo principale; ma tale

restringimento dell'analisi non deve essere visto come una limitazione o semplificazione, perché tiene conto delle difficoltà legate allo studio dei batteroidi, quali il loro isolamento e mancanza di omogeneità dei campioni per l'esistenza di ben 5 stadi di differenziamento a seconda delle zone e delle fasi di sviluppo del nodulo. Inoltre, nonostante non sia ancora chiaro se i batteroidi e i batteri free-living utilizzano gli stessi pathway metabolici, diversi studi hanno sempre relazionato le proprietà metaboliche dei rizobi nello stato non-simbiotico con le loro caratteristiche simbiotiche. Da un'analisi globale dei dati metabolici ottenuti si evince che le cellule sottoposte al trattamento con IAA e quelle iperproduttrici di IAA presentano un ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) attivo e metabolizzano il mannitolo principalmente attraverso la glicolisi o via EMP. Gli effetti di IAA sulla velocità del flusso di carbonio attraverso la via glicolitica e il ciclo di Krebs sono maggiormente evidenti in fase stazionaria di crescita rispetto a quella esponenziale e per il ceppo 64 rispetto al ceppo wild-type trattato con IAA; per tale motivo, saranno, di seguito, discussi i dati relativi al ceppo 64 in fase stazionaria di crescita. È noto che la via ED è il principale pathway di degradazione dei carboidrati in *S. meliloti* e la via EMP, invece, anche se operativa, è incompleta [74]. In contrapposizione a ciò, è stato riscontrato, per effetto della iperproduzione batterica di IAA, una diminuzione dell'attività combinata degli enzimi della via ED e un considerevole aumento di attività per l'enzima fosfofruttochinasi, enzima chiave della glicolisi, che è noto essere una fonte energetica per la cellula più efficiente del pathway ED. Per quanto riguarda le due possibili fosfofruttochinasi, una ATP-dipendente (ATP-PFK) e l'altra PP_i-dipendente (PP_i-PFK), entrambe saggiate e indotte nel ceppo iperproduttore, quella maggiormente attiva in *S. meliloti* è la PP_i-PFK. L'induzione dell'attività di tale enzima in *S. meliloti* iperproduttore di

IAA è dipendente dal tipo di sorgente di carbonio e dalla sua disponibilità (tabella 4) ed, in particolare, è mantenuta anche utilizzando nel mezzo di coltura, al posto del mannitolo, glucosio e fruttosio (esosi degradati secondo lo schema di figura 10), ma non succinato, intermedio del ciclo di Krebs, e, perciò, degradato diversamente e senza l'attivazione degli enzimi delle vie EMP o ED (figura 11). Sorprendentemente, è stato riscontrato un aumento di attività PP_i -PFK, anche in estratti proteici provenienti da cellule iperproduttrici di IAA cresciute in condizioni microaerobiche. Le condizioni sperimentali della crescita microaerobica, ossia condizioni limitanti di ossigeno, sono molto vicine a quelle effettivamente presenti nel nodulo, ambiente a bassa concentrazione di ossigeno, potente inibitore della nitrogenasi. Questo dato è coerente con i possibili ruoli fisiologici attribuiti all'enzima PP_i -PFK: uno di incrementare la produzione di energia in particolari condizioni in cui la carica energetica cellulare è bassa e, di conseguenza la richiesta energetica di ATP è alta; l'altro come enzima glicolitico anaerobico [132].

Per quanto riguarda il ciclo di Krebs, un considerevole aumento di attività è stato riscontrato per gli enzimi citrato sintasi e α -chetoglutarato deidrogenasi, che controllano la velocità dell'intero ciclo in modo coordinato ed attraverso tre semplici vie: disponibilità di substrato (acetil-CoA e ossalacetato); inibizione da prodotto (NADH) e inibizione "feedback" competitiva mediante gli intermedi del ciclo stesso. I risultati ottenuti sono molto significativi in quanto il ciclo di Krebs è la principale fonte di energia per i batteroidi durante la fase di fissazione dell'azoto. L'effetto di IAA sull'attività degli enzimi chiave del ciclo di Krebs è stata, infatti, confermata anche in condizioni microaerobiche e utilizzando, nel mezzo di coltura, succinato, che è un acido dicarbossilico, principale fonte di carbonio per i batteroidi. Inoltre, dai dati ottenuti è possibile affermare

l'esistenza di una correlazione tra IAA e velocità del ciclo di Krebs anche in un altro ceppo di rizobio, *R. leguminosarum* biovar *viciae*, che nodula in maniera specifica piante di *Vicia* e *Pisum*. L'insieme dei dati metabolici lasciano ipotizzare che l'IAA determinerebbe nelle cellule uno stato energetico basso e un aumento del consumo di ossigeno. A conferma di ciò, è stato riscontrato, in cellule iperproduttrici di IAA, una riduzione dei livelli intracellulari di ATP, rappresentante lo stato energetico cellulare, e dei livelli di NADH e del rapporto NADH/NAD, rappresentante lo stato redox cellulare. La stimolazione del consumo di ossigeno potrebbe condurre alla riduzione del rapporto NADH/NAD che attiva il flusso di substrati attraverso il ciclo di Krebs, allo scopo di mantenere un metabolismo energetico bilanciato. Volendo correlare le proprietà metaboliche, finora descritte, del ceppo di *S. meliloti* iperproduttore con le sue ottime capacità di fissazione, è noto che l'enzima nitrogenasi, per catalizzare la reazione di riduzione dell'azoto ad ammonio, necessita di disponibilità di ATP, di NADPH come potere riducente e bassa concentrazione di ossigeno. Se da un lato l'aumento del consumo di ossigeno per effetto di IAA correla bene con la richiesta di un ambiente microaerobico per la reazione di fissazione dell'azoto, dall'altro uno stato energetico basso, sempre per azione di IAA, non soddisferebbe la richiesta di ATP da parte della nitrogenasi. E', quindi, ipotizzabile che lo stato energetico dei batteroidi, derivanti dal ceppo iperproduttore di IAA, sia diverso da quello dei batteri liberi o che esiste un alternativo meccanismo in grado di rispondere alla richiesta di ATP. Tuttavia, i batteri iperproduttori di IAA sarebbero in grado di soddisfare la necessità di potere riducente: in particolare, è stato riscontrato in essi un aumento dei livelli endogeni di NADPH, utilizzato nelle reazioni biosintetiche assieme agli intermedi del ciclo di Krebs. A tale proposito, l'acetil-CoA, prodotto del

metabolismo degradativo, comune ai carboidrati, agli acidi grassi e agli amminoacidi, si è rivelato un intermedio chiave nello studio degli effetti di IAA sul metabolismo cellulare. Per il ceppo iperproduttore di IAA, infatti, i livelli intracellulari di acetil-CoA sono significativamente aumentati rispetto al ceppo wild-type. Tale intermedio è il prodotto delle reazioni catalizzate dagli enzimi piruvato deidrogenasi e ATP-citrato liasi, le cui attività sono aumentate in estratti proteici provenienti da cellule trattate con IAA e iperproduttrici di IAA. L'enzima ATP-citrato liasi catalizza, per la biosintesi degli acidi grassi, la reazione di formazione dell'acetil-CoA, che richiede l'idrolisi di ATP per sostenere la sintesi del legame tioestere ad alta energia. Tuttavia, l'acetil-CoA è anche il substrato delle reazioni catalizzate dal primo enzima del ciclo di Krebs, citrato sintasi, e dalla β -chetotiolasi, primo enzima del pathway biosintetico dei poli- β -idrossibutirrati (PHB). L'attività di tale enzima, come quella dell'enzima citrato sintasi, è aumentata per effetto del trattamento esogeno con IAA e della iperproduzione batterica di IAA. L'acetil-CoA è, infatti, il metabolita iniziale, comune sia al ciclo di Krebs sia alla biosintesi dei PHB. Dall'analisi degli effetti di IAA sul metabolismo dei PHB, è risultato un aumento delle attività degli enzimi per la biosintesi di tali composti e un accumulo maggiore di PHB in cellule trattate con IAA e in quelle iperproduttrici di IAA. Poiché è stato provato che in *R. etli* uno stato metabolico fermentativo, caratterizzato da livelli ridotti di ossigeno, determina un accumulo di PHB [89], la loro maggiore produzione in *S. meliloti* trattato con IAA e iperproduttore di IAA può essere correlata all'ipotesi precedente che l'IAA provoca un aumento del consumo di ossigeno. Inoltre, è stato proposto che l'accumulo di PHB funzioni come fonte di potere riducente che, sequestrando i nucleotidi ridotti, permetterebbe al ciclo di Krebs di operare in condizioni microaerobiche.

Tuttavia, non è stata trovata conferma di tale ipotesi, almeno in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, dal momento che non sono state riscontrate significative differenze di accumulo di PHB nel ceppo wild-type e iperproduttore, in seguito a crescita microaerobica. La maggior parte degli studi ultrastrutturali, finora riportati, hanno osservato un accumulo di PHB in cellule di *S. meliloti* nello stato free-living oppure, contrariamente ad altri rizobi, allo stato simbiotico solo all'interno dei canali di infezione, mai in batteroidi maturi [133]. Nelle prime fasi di sviluppo del nodulo, le riserve di PHB, quindi, sarebbero degradate dai batteri, quando essi lasciano il canale di infezione, per innescare il metabolismo del carbonio necessario a convertirli dalla forma free-living a quella più voluminosa e differenziata del batteroide [134]. Non è possibile, quindi, affermare che i batteroidi, derivanti dal ceppo iperproduttore di IAA, accumulino PHB come fonte di energia per la fissazione dell'azoto. E' ipotizzabile, però, che l'accumulo di PHB, osservato in *S. meliloti* free-living per effetto di IAA, possa funzionare come fonte di energia e di carbonio sia per i lunghi periodi di sopravvivenza nel suolo in assenza di partner simbiotici, in condizioni di stress e di carenza nutrizionale, sia per il processo di differenziamento a batteroide. La conferma alla prima ipotesi deriva dai risultati del test della vitalità cellulare: il trattamento esogeno di IAA e la iperproduzione batterica di IAA consentono una maggiore sopravvivenza cellulare in fase stazionaria di crescita. Per quanto riguarda l'ipotesi sulla relazione tra PHB e differenziamento a batteroide, invece, si può solo ipotizzare che l'alta incidenza di tali granuli nel batterio iperproduttore di IAA allo stato free-living, assieme all'accumulo maggiore di amido osservato nelle cellule interstiziali dei noduli generati da tale ceppo rispetto a quelli del ceppo selvatico, siano correlabili alla maggiore efficienza di fissazione dell'azoto.

Oltre all'attivazione degli enzimi chiave del metabolismo energetico, altro effetto di IAA è quello di promuovere vie biosintetiche, come quelle degli acidi grassi o dei PHB. Questi processi, ovviamente, consumano energia e carbonio: ciò potrebbero spiegare lo stato energetico basso delle cellule trattate con IAA e iperproduttrici di IAA, e, di conseguenza, la loro elevata richiesta di ATP e l'aumentato del flusso di carbonio attraverso la glicolisi e il ciclo di Krebs. In conclusione, la maggioranza degli studi metabolici su rizobi, riguardano essenzialmente mutanti batterici con difetti nel metabolismo che presentano particolari fenotipi simbiotici, spesso aberranti; per la prima volta, in tale lavoro sono state correlate le efficienti caratteristiche simbiotiche di un rizobio con proprietà metaboliche indotte per effetto di IAA.

Parallelamente all'analisi metabolica ora descritta, è stata condotta un'analisi dei profili di espressione proteica di cellule di controllo, trattate con IAA e iperproduttrici di IAA, mediante l'uso dell'elettroforesi bidimensionale (2DE), accoppiata alla bioinformatica e spettrometria di massa (MS). In particolare, è stata analizzata l'espressione delle proteine citoplasmatiche e di membrana, in risposta al trattamento di IAA e alla sua iperproduzione batterica, separandole mediante 2DE. La fase più elaborata di tale analisi proteomica è stata il confronto dei profili 2DE, nelle condizioni sperimentali considerate, mediante un software di analisi delle immagini 2DE. L'ausilio della bioinformatica, infatti, ha permesso di rilevare tutte le differenze esistenti tra spot proteici corrispondenti presenti sui tre gel 2DE e di quantificare i relativi livelli di espressione proteica. La significatività e, soprattutto, la riproducibilità dei dati proteomici sono state ottenute effettuando, per ciascuna condizione sperimentale, almeno 5 esperimenti indipendenti, per un totale di 15 gel 2DE a condizione, contenente ognuno circa 100-150 proteine. Da tale analisi è risultato che

l'IAA è in grado di influenzare, in modo significativo, i livelli di espressione di circa il 10 % e 8 %, rispettivamente, delle proteine citoplasmatiche e di membrana, separate e visualizzate con il metodo descritto in tale lavoro di ricerca, e che, di certo, non rappresentano la totalità delle proteine citoplasmatiche o di membrana di *S. meliloti*. Ciò significa che gli effetti di IAA sui profili di espressione proteica su scala proteomica, ossia sulla totalità delle proteine espresse da un organismo, potrebbero essere maggiori di quelli finora evidenziati. In tal senso la tecnica 2DE ha fatto grandi progressi, soprattutto negli ultimi 2 anni, per migliorare la sensibilità di rivelazione delle proteine totali, sviluppando la tecnologia 2-D DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) che utilizza coloranti fluorescenti, particolarmente adatti ad una proteomica differenziale, mirata allo studio delle differenze tra profili proteici in condizioni diverse. Purtroppo, come tutte le innovazioni, anche questa ha i suoi limiti, o meglio, deve trovare dei compromessi: la prospettiva più interessante ed innovativa della proteomica è la possibilità di identificare mediante MS quelle proteine con livelli di espressione indotti o repressi in particolari condizioni sperimentali, ma le piccolissime quantità di campione adoperate con le nuove tecnologie e, soprattutto, l'incompatibilità del sistema di rivelazione a fluorescenza, rendono spesso non realizzabili le identificazioni di tutte le proteine differenzialmente espresse, ma solo di quelle maggioritarie o rivelabili con i convenzionali sistemi di visualizzazione (Coomassie e Silver staining), nonostante la disponibilità, oggi, di potenti spettrometri di massa.

Tra le proteine citoplasmatiche, finora identificate mediante MS, sono risultate di particolare interesse la proteina heat shock 70 HSP70 (*dnaK* o SMc02857) e la proteina SSB (Single-Strand Binding o SMc01233). I livelli di espressione di entrambe le proteine sono significativamente indotti

in *S. meliloti* iperproduttore di IAA, sia in fase esponenziale sia stazionaria di crescita (tabelle 24 e 26). DnaK è una proteina con attività ATPasica dai molteplici ruoli in diversi processi biologici: in particolare, di chaperones molecolare per il folding di proteine citoplasmatiche e di quelle danneggiate termicamente; di riparo mediante interazione con la proteina UvrA nel riconoscimento di DNA danneggiato e assemblaggio di nucleasi [135]. La proteina SSB interviene, assieme alle proteine del pathway RecBCD, in processi, che richiedono ATP, di riparo della doppia elica del DNA (ssDNA) mediante ricombinazione omologa, agendo sulla struttura secondaria della ssDNA e rendendo più efficiente l'assemblaggio delle ricombinasi sulla doppia elica [136]. A conferma dei dati proteomici, è stato riscontrato che l'iperproduzione batterica di IAA aumenta la sopravvivenza cellulare in seguito a shock termico a 55°C e rende le cellule meno sensibili al trattamento UV rispetto alle cellule di controllo. E', quindi, ipotizzabile che l'aumento intracellulare, per effetto di IAA, di DnaK e SSB permetterebbe la ricombinazione cellulare realizzando maggiori interventi di riparo, aumentando, in questo modo, da un lato, la sopravvivenza durante permanenza in fase stazionaria e in risposta a shock termici e dall'altro, riducendo la sensibilità agli agenti fisici che danneggiano il DNA. In conclusione, un possibile ruolo di IAA è quello di protezione dei costituenti cellulari da danni causati da condizioni ambientali difficili o drastici cambiamenti ambientali. Ciò è di notevole importanza per i rizobi durante il periodo di sopravvivenza nel suolo e per il loro passaggio da tale fase di latenza a quella di rapida crescita in presenza di disponibilità di nutrienti o di piante simbiotici.

Infine, l'identificazione delle altre proteine citoplasmatiche e di membrana differenzialmente espresse per effetto di IAA completerà l'analisi proteomica, presentata in questo lavoro, e permetterà di evidenziare altri

possibili ruoli di tale molecola che, assieme a quelli finora dedotti anche con l'ausilio dell'analisi metabolica, rappresentano un contributo alla comprensione più approfondita della relazione tra IAA, simbiosi e differenziamento morfologico dei rizobi dallo stato libero a batteroide.

MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici e condizioni di crescita

I ceppi batterici utilizzati in questo lavoro di tesi sono: *S. meliloti* 1021 wild-type (genotipo: str^R), che nodula in maniera specifica piante di *Melilotus*, *Trigonella*, *Medicago truncatula* e *sativa*; *R. leguminosarum viciae* 1004 wild-type (genotipo: rif^R), che nodula in maniera specifica piante di *Vicia hirsuta* e *pisum* (tabella 1); *S. meliloti* 64 (genotipo: str^R e spm^R) e *R. leguminosarum viciae* 207 (genotipo: rif^R e spm^R), ceppi iperproduttori di IAA, derivanti, rispettivamente, da *S. meliloti* 1021 e *R. leguminosarum viciae* 1004, wild-type, trasformati con il vettore plasmidico pG14, che porta la resistenza all'antibiotico spectinomomicina (spm) alla concentrazione di 200 µg/ml. La crescita in fase liquida è stata condotta a 30°C, nel mezzo minimo contenente: K₂HPO₄/KH₂PO₄ 1 mg/ml, MgSO₄ 0,25 mg/ml, NH₄Cl 0,1 mg/ml, CaCl₂ 0,1 mg/ml, MnSO₄ 0,02 mg/ml, ZnSO₄ 0,02 mg/ml, CuSO₄ 0,02 mg/ml, H₃BO₃ 0,02 mg/ml, Na₂MoO₄ 0,02 mg/ml, CoCl₂ 2 µg/ml, FeCl₃ 0,01 mg/ml; a tale terreno è stato aggiunto mannitolo 1% (w/v), vitamine (biotina, calcio pantotenato e tiamina) 0,01 mg/ml, streptomomicina (str) 200 µg/ml per entrambi i ceppi di *S. meliloti*, spectinomomicina (spm) 200 µg/ml per il ceppo 64, rifampicina (rif) 100 µg/ml per entrambi i ceppi di *R. leguminosarum viciae*, spectinomomicina (spm) 200 µg/ml per il ceppo 207.

3.1a. Curve di crescita

La crescita in fase liquida è stata seguita spettrofotometricamente misurando l'aumento di assorbanza a 600 nm, utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU800.

Per i ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA (64), la crescita è stata condotta a 30°C preinoculando i batteri nel mezzo minimo, sopra descritto, contenente mannitolo 1% come unica fonte di carbonio e integrato in base alle rispettive e specifiche richieste nutrizionali. Le colture, poste in apposite beute, sono state mantenute sotto costante agitazione su piastra agitante a 200 riv/min. Raggiunta la fase di crescita esponenziale, le colture sono state diluite nel mezzo minimo in modo da avere una OD_{600nm} di circa 0,05. L'aggiunta di IAA, in fase esponenziale di crescita (0,6-0,7 OD_{600nm}) e ad una concentrazione finale di 0,5 mM, è stata effettuata dividendo la coltura di *S. meliloti* 1021 wild-type in due aliquote uguali: in una metà è stato aggiunto IAA 0,5 mM, mentre l'altra metà è stata usata come controllo. Per i tre campioni, la crescita delle colture batteriche è stata seguita periodicamente fino ad un massimo di 78 h.

Per l'analisi delle curve di crescita in fase stazionaria, le colture di *S. meliloti* wild-type e iperproduttore di IAA sono state diluite nel mezzo minimo in modo da avere una OD_{600nm} di circa 0,2. L'aggiunta di IAA, in fase stazionaria di crescita (1,5-1,8 OD_{600nm}) e alle concentrazioni finali di 0,5, 0,05, 2, 0,2 mM, è stata effettuata nelle stesse condizioni del trattamento in fase esponenziale. La crescita delle colture batteriche, in fase stazionaria, è stata seguita periodicamente fino ad un massimo di 16-17 giorni.

3.1b. Crescita microaerobica

L'incubazione di colture di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA (64) in microaerobiosi è stata realizzata ponendo 150 ml di tali colture, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, in beute da 1 l, sigillate ermeticamente con tappi di gomma [104]. L'atmosfera

microaerobica è stata realizzata insufflando N₂ per 10 min e il livello di O₂ richiesto (concentrazione iniziale pari a 1 %) è stato iniettato con una siringa nell'appropriato volume di aria. Le colture sono state incubate a 30°C per 24 h e i pellet batterici, utilizzati per analisi successive, sono stati recuperati per centrifugazione a 5000 rpm, per 15 min a 4°C.

3.2 Analisi quantitativa relativa di IAA mediante gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS)

I ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA 64, utilizzati per l'analisi quantitativa di IAA, sono stati cresciuti in 50 ml di mezzo minimo, come descritto in "Curve di crescita", e prelevati in fase stazionaria di crescita (1,8-2,0 OD_{600nm}). Le colture batteriche sono state centrifugate a 4000 rpm per 10 min, a 4°C e sono stati prelevati 4 ml di ciascun sovranatante, contenente BHT (2,6-Dibutil-4-metilfenolo) 1 mM come agente antiossidante. A ciascun sovranatante batterico sono state aggiunte 100 nmol di IAA deuterato, D5-IAA, come standard interno, prima delle due estrazioni con etil acetato a pH=9. Le fasi acquose estratte sono state, poi, miscelate con etere dietilico a pH=3, effettuando due successive estrazioni di 30 min, sotto agitazione. Le fasi organiche estratte sono state riunite e portate a secco sotto flusso di N₂ [105]. I campioni secchi sono stati solubilizzati in 100 µl di CH₃CN e la reazione di derivatizzazione è stata eseguita a 50°C per 30 min, dopo aver aggiunto 100 µl di N,O bis(trimetilsil)trifluoroacetamide (BSTFA). Al termine della reazione i campioni, portati a secco sotto flusso di N₂, sono stati analizzati mediante GC/MS (Hewlett Packard 5890). I campioni sono stati sciolti in 20 µl di esano e 1 µl è stato iniettato nella colonna gas-cromatografica capillare (HP-5 Agilent technology, con lunghezza pari a 30 m e con 0,25

mm ID). Per l'analisi gascromatografica è stato utilizzato elio come gas di trasporto con velocità di flusso pari a 1 ml/min. Le condizioni analitiche sono state le seguenti: iniettore a 280°C, programma di temperatura della colonna che prevede 70°C per 1 min, il raggiungimento di 150°C con un incremento di 20°C/min, di 200°C con un incremento di 10°C/min, di 280°C con un incremento di 30°C/min ed infine 280°C per 15 min. Gli spettri di massa ad impatto elettronico sono stati ottenuti mediante uno spettrometro di massa quadrupolare con energia di ionizzazione di 70 eV.

3.3. Saggi enzimatici

3.3a. Preparazione dell'estratto

Le cellule di *S. meliloti* 1021 e *R. leguminosarum viciae* 1004 wild-type, trattate con IAA 0,5 mM in fase esponenziale e stazionaria di crescita e quelle iperproduttrici di IAA sono state cresciute come precedentemente descritto (vedi "Curve di crescita") e, per alcuni saggi enzimatici, anche in mezzi di coltura contenenti fonti di carbonio (fruttosio, glucosio, succinato 1 %) diverse dal mannitolo.

Le colture batteriche, prelevate in entrambe le fasi di crescita e, in particolare, quelle cresciute con IAA 5 h dopo il trattamento, sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 min, a 4°C; i pellet cellulari sono stati risospesi nel tampone di estrazione contenente: EDTA 1 mM, Glicerolo 10%, KCl 20 mM, DTT 1 mM, PMSF 1mM in Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Le sospensioni ottenute sono state lisate mediante sonicazione (Cellai Soniprep 150) in un bagno di acqua e ghiaccio (7 cicli da 30 sec, intervallati da 50 sec di pausa, ad una potenza di 16-18 µm) e poi centrifugate a 14000 rpm (Eppendorf 5415 C), per 10 min, a 4°C. Il sovranatante recuperato contiene l'estratto proteico totale. Tutti i saggi enzimatici sono stati effettuati almeno in triplicato.

3.3b. Attività enzimi del catabolismo dei carboidrati

L'attività dell'enzima *glucochinasi* (EC 2.7.1.2) è stata saggiata seguendo spettrofotometricamente le variazioni di assorbanza a 340 nm dovute alla riduzione di NADP, in presenza di un eccesso di glucosio-6-fosfato deidrogenasi [106]. La miscela di saggio contiene: Tris-HCl 0,05 M pH

7,6, MgCl₂ 0,01 M, NADP 0,2 mM, glucosio 0,5 mM, adenosina trifosfato (ATP) 2 mM, glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Sigma) 1µg ed estratto proteico per un volume finale di 1 ml.

Il coefficiente di estinzione molare della specie (NADPH) misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 µmole di NADPH al minuto nelle condizioni di saggio descritte.

L'enzima *fosfoglucoisomerasi* (EC 5.3.1.9) è stato saggiato seguendo spettrofotometricamente a 340 nm la riduzione del NADP [74]. La miscela di reazione contiene in un volume totale di 1 ml: fruttosio-6-fosfato 2 mM, Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Sigma) 1µg, NADP 0,5 mM ed estratto proteico.

Il coefficiente di estinzione molare della specie (NADPH) misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 µmole di NADPH al minuto nelle condizioni sperimentali.

L'attività dell'enzima *fosfofruttochinasi* è stata determinata accoppiando la formazione del fruttosio-1,6-bifosfato con le reazioni catalizzate dagli enzimi aldolasi, triosofosfato isomerasi e α-glicerofosfato deidrogenasi [107]. La formazione di ogni mole di fruttosio-1,6-bifosfato comporta l'ossidazione di 2 moli di NADH. Il saggio enzimatico è stato realizzato a pH 8,0 in quanto l'attività enzimatica è massima. La miscela di reazione (1 ml) contiene: Tris-HCl 33 mM pH 8,0, MgSO₄ 5 mM, fruttosio-6-fosfato 2 mM, NADH 0,16 mM, KCl 0,05 M, DTT 1 mM, aldolasi 33 µg/ml, triosofosfato isomerasi 6,7 µg/ml, α-glicerofosfato deidrogenasi 6,7 µg/ml ed estratto proteico. La reazione, iniziata con l'aggiunta di ATP 2 mM pH

7,0 (per la fosfofruttochinasi ATP-dipendente, ATP-PFK; EC 2.7.1.11) o di PP_i 2 mM pH 7,0 (per la fosfofruttochinasi PP_i -dipendente, PP_i -PFK; EC 2.7.1.90) è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la conversione di 1 μ mole di fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bifosfato al minuto nelle condizioni sperimentali.

L'attività dell'enzima *fruttosio-1,6-bifosfato fosfatasi* (EC 3.1.3.11) è stata determinata accoppiando la conversione del fruttosio-1,6-bifosfato dal fruttosio-6-fosfato con le reazioni catalizzate dagli enzimi glucosio-6-fosfato isomerasi e glucosio-6-fosfato deidrogenasi e seguendo spettrofotometricamente a 340 nm la riduzione di NADP [75]. La miscela di reazione (1ml) è composta da: tampone glicilglicina 40 mM pH 8,0, $MgSO_4$ 12 mM, fruttosio-1,6-bifosfato 3 mM, glucosio-6-fosfato isomerasi (Sigma) 0,5 U, glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Sigma) 0,5 U, NADP 1 mg/ml ed estratto proteico. Il coefficiente di estinzione molare della specie (NADPH) misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μ mole di NADPH al minuto nelle condizioni di saggio descritte.

L'attività dell'enzima *piruvato chinasi* (EC 2.7.1.40) è stata determinata seguendo spettrofotometricamente a 340 nm l'ossidazione del NADH in presenza di un eccesso di lattato deidrogenasi [75]. La miscela di reazione contiene in un volume finale di 1 ml: Tris-HCl 0,16 M pH 7,5, $MgSO_4$ 25 mM, KCl 25 mM, adenosina difosfato (ADP) 1,67 mM, NADH 0,2 mM, fosfoenolpiruvato 1,67 mM, lattato deidrogenasi (Sigma) 0,17 U ed estratto proteico. L'assorbanza a 340 nm è stata misurata azzerando contro il

bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne il NADH e il fosfoenolpiruvato. Il coefficiente di estinzione molare della specie misurata a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'attività dell'enzima *glucosio-6-fosfato deidrogenasi* (EC 1.1.1.49) è stata determinata seguendo spettrofotometricamente la variazione di assorbanza a 340 nm legata alla formazione del NADP ridotto [74]. La miscela di reazione (1ml) contiene: tampone glicilglicina 80 mM pH 8,0, MgSO_4 10 mM, glucosio-6-fosfato 2 mM, NADP 0,3 mM ed estratto proteico. L'attività è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare del NADPH pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'attività dell'enzima *fosfogluconato deidrogenasi* (EC 1.1.1.43) è stata determinata nelle stesse condizioni sperimentali dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, ma utilizzando 6-fosfogluconato 2,5 mM nella miscela di reazione al posto del glucosio-6-fosfato [74].

L'attività dell'enzima *transchetolasi* (EC 2.2.1.1) è stata determinata seguendo spettrofotometricamente la formazione del fruttosio-6-fosfato secondo le reazioni accoppiate degli enzimi glucosio-6-fosfato isomerasi e glucosio-6-fosfato deidrogenasi, in presenza di NADP [108]. La miscela di reazione in un volume finale di 1 ml contiene: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, MgCl_2 0,01 M, ribosio-5-fosfato 0,5 mM, eritrosio-4-fosfato 0,3 mM, NADP 0,2 mM, glucosio-6-fosfato isomerasi (Sigma) 4 μg , glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Sigma) 2 μg , tiamina pirofosfato 0,1 mM ed estratto proteico. L'attività è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare del NADPH pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'attività dell'enzima *transaldolasi* (EC 2.2.1.2) è stata saggiata misurando spettrofotometricamente le variazioni di assorbanza a 340 nm [109]. La gliceraldeide-3-fosfato prodotta nella reazione catalizzata da tale enzima è convertita a diidrossiacetone fosfato dall'enzima triosofosfato isomerasi. La formazione di tale prodotto è seguita in presenza dell'enzima α -glicerofosfato deidrogenasi e di NADH, la cui velocità di ossidazione è proporzionale alla quantità di enzima. La miscela di reazione (1 ml) contiene: trietanolamina (TEA) 0,1 M pH 7,8, EDTA 20 mM, fruttosio-6-fosfato 2,8 mM, NADH 0,1 mM, eritrosio-4-fosfato 0,2 mM, α -glicerofosfato deidrogenasi-triosofosfato isomerasi (Sigma) 10 μ g/ml ed estratto proteico. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima necessaria a consumare 1 μ moles di fruttosio-6-fosfato al minuto nelle condizioni del saggio spettrofotometrico.

L'attività combinata degli enzimi *6-fosfogluconato deidratasi* (EC 4.2.1.12) e *2-cheto-3-deossi-6-fosfogluconato aldolasi* (EC 4.1.2.14) è stata saggiata seguendo la variazione di assorbanza a 450 nm dovuta alla formazione di piruvato, determinato colorimetricamente sotto forma di dinitrofenilidrazone [110]. La miscela di saggio (0,5 ml) contiene: Tris-HCl 0,2 M pH 7,2, 6-fosfogluconato 5 mM, MgSO₄ 10 mM. La miscela di reazione è stata incubata a 30°C per 30 minuti e, poi, la reazione bloccata mediante l'aggiunta di 0,5 ml di HCl 0,5 N contenente dinitrofenilidrazina 0,02% (w/v). Dopo incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti, alla miscela di reazione è stato aggiunto 1 ml di NaOH 2 N e l'assorbanza determinata a 450 nm. L'attività è stata determinata considerando un valore unitario di assorbanza corrispondente alla formazione di 2 μ mol di piruvato nelle condizioni sperimentali descritte.

L'attività dell'enzima *piruvato deidrogenasi* (EC 1.2.2.2) è stata saggiata spettrofotometricamente seguendo la formazione di NADH a 340 nm [89]. La miscela di saggio contiene: MgCl₂ 1 mM, NAD⁺ 2 mM, cisteina 3 mM (neutralizzata prima dell'uso), tiamina pirofosfato 0,2 mM, CoA 0,06 mM, piruvato di potassio 1 mM ed estratto proteico in tampone fosfato di potassio 50 mM pH 8,0 per un volume finale di 1 ml. L'attività è stata determinata misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm, azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne il CoA e il piruvato di potassio. Il coefficiente di estinzione molare del NADH misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μmole di NADH al minuto nelle condizioni di saggio.

3.3c. Attività enzimi del ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)

L'attività *citrato sintasica* (EC 4.1.3.7) è stata saggiata, a temperatura ambiente, misurando l'aumento di assorbanza a 412 nm dovuto alla formazione del prodotto cromogenico 5,5'-ditiobis-(2-nitro-acido benzoico) (DTNB) [111].

La miscela di saggio contiene: acetil-CoA 0,16 mM, DTNB 0,1 mM, ossalacetato di sodio 0,2 mM ed estratto proteico in tampone Tris-HCl 93 mM pH 8,0, per un volume finale di 1 ml. L'assorbanza a 412 nm è stata misurata azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne l'ossalacetato. Il coefficiente di estinzione molare della specie misurata a 412 nm è pari a $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività enzimatica è stata espressa definendo come un'unità di citrato sintasi la quantità di

enzima che catalizza la formazione di 1 μ mole di CoASH al minuto nelle condizioni di saggio.

L'attività dell'enzima *aconitasi* (EC 4.2.1.3) è stata misurata spettrofotometricamente seguendo la scomparsa, in funzione del tempo, del cis-aconitato a 240 nm [112]. La miscela di saggio contiene: NaCl 0,1 M, cis-aconitato 0,2 mM (neutralizzato con NaOH) ed estratto proteico in tampone Tris-HCl 20 mM pH 7,4, per un volume finale di 1 ml. La diminuzione di assorbimento a 240 nm è stata seguita per tre minuti azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne il cis-aconitato. Il coefficiente di estinzione molare della specie misurata a 240 nm è pari a $4,88 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività enzimatica è stata espressa definendo come un'unità di aconitasi la quantità di enzima che catalizza la scomparsa di 1 μ mole di cis-aconitato al minuto nelle condizioni descritte.

L'attività dell'enzima *isocitrato deidrogenasi* (EC 1.1.1.42) è stata misurata spettrofotometricamente seguendo l'aumento di assorbimento a 340 nm dovuto alla formazione di NADPH dal NADP^+ come conseguenza della ossidazione del D-isocitrato [80].

La miscela di saggio contiene: MgCl_2 3 mM, NADP^+ 0,4 mM, DL-isocitrato 1 mM ed estratto proteico in tampone fosfato di potassio 50 mM pH 7,5, per un volume finale di 1 ml. La variazione di assorbimento a 340 nm è stata misurata azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne l'isocitrato. Il coefficiente di estinzione molare della specie (NADPH) misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità

di enzima che catalizza la formazione di 1 μ mole di NADPH al minuto nelle condizioni di saggio descritte.

L'attività *α -chetoglutarato deidrogenasica* (EC 1.2.4.2) è stata saggiata spettrofotometricamente seguendo la formazione di DPNH (forma ridotta del DPN, difosfopiridina nucleotide) a 340 nm [113].

La miscela di saggio contiene: MgCl₂ 1 mM, DPN 2 mM, cisteina 3 mM (neutralizzata prima dell'uso), tiamina pirofosfato 0,2 mM, CoA 0,06 mM, α -chetoglutarato di potassio 1 mM ed estratto proteico in tampone fosfato di potassio 50 mM pH 8,0, per un volume finale di 1 ml. L'attività è stata determinata misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm, azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne il CoA e l' α -chetoglutarato di potassio. Il coefficiente di estinzione molare del DPNH misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività è stata espressa definendo come un'unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μ mole di DPNH al minuto nelle condizioni di saggio.

L'attività dell'enzima *succinil-CoA sintasi* (EC 6.2.1.5) è stata saggiata misurando spettrofotometricamente la variazione di assorbimento a 230 nm dovuta alla formazione del legame tioestere [114].

La miscela di saggio contiene: KCl 0,1 M, sodio succinato 10 mM, ATP 0,4 mM, CoA 0,1 mM ed estratto proteico in tampone Tris-HCl 50 mM pH 7,2, per un volume finale di 1 ml.

L'aumento di assorbimento a 230 nm è stato seguito azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne il succinato. Il coefficiente di estinzione molare della specie misurata a 230 nm è pari a $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività enzimatica è stata espressa

definendo come un'unità di succinil CoA sintasi la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μ mole di succinil CoA al minuto nelle condizioni descritte.

L'attività *succinato deidrogenasica* (EC 1.3.99.1) è stata saggiata spettrofotometricamente utilizzando il ferrocianuro di potassio come accettore di elettroni nella reazione di ossidazione catalizzata da tale enzima [115].

La miscela di saggio contiene: succinato 60 mM pH 7,8, BSA (albumina da siero bovino) 0,15%, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}$ 0,5 mM ed estratto proteico in tampone fosfato di sodio 0,15 M pH 7,8, per un volume finale di 1,5 ml. La riduzione del ferricianuro di potassio è stata seguita registrando la diminuzione di assorbanza a 420 nm, azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne il ferrocianuro di potassio. L'attività è stata espressa come ΔA_{420} al minuto per milligrammo di proteina.

L'attività *fumarasica* (EC 4.2.1.2) è stata saggiata misurando spettrofotometricamente la variazione di assorbimento a 250 nm [116].

La miscela di saggio contiene: L-malato 50 mM ed estratto proteico in tampone fosfato di sodio 50 mM pH 7,3, per un volume finale di 1 ml. L'aumento di assorbimento a 250 nm è stato seguito azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne il malato.

L'attività enzimatica è stata espressa come ΔA_{420} al minuto per milligrammo di proteina.

L'attività *malato deidrogenasica* (EC 1.1.1.37) è stata saggiata seguendo spettrofotometricamente la formazione di DPNH, forma ridotta del DPN (difosfopiridina nucleotide), a 340 nm [117].

La miscela di saggio contiene: ossalacetato 0,33 mM, NADH 0,14 mM ed estratto proteico in tampone fosfato di potassio 0,1 M pH 7,5, per un volume finale di 1 ml. La variazione di assorbimento a 340 nm è stata seguita per tre minuti azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne il NADH.

Il coefficiente di estinzione molare della specie misurata a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'attività enzimatica è stata espressa definendo come un'unità di malato deidrogenasi la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μmole di DPNH al minuto nelle condizioni descritte.

3.3d. Attività enzimi di vie anaplerotiche

L'attività dell'enzima *piruvato carbossilasi* (EC 6.4.1.1) è stata saggiata accoppiando la reazione di carbossilazione del piruvato con quella di riduzione dell'ossalacetato, catalizzata dall'enzima malato deidrogenasi, in presenza di NADH [118]. La miscela di reazione (1 ml) contiene: Tris-HCl 37 mM pH 7,2, MgCl_2 5 mM, piruvato di sodio 0,7 mM, bicarbonato di potassio 6,7 mM, NADH 0,17 mM, ATP 0,7 mM pH 7,2, BSA (albumina da siero bovino) 0,3 mg/ml, malato deidrogenasi (Sigma) 0,8 μg ed estratto proteico. L'ossidazione del NADH è stata seguita spettrofotometricamente a 366 nm e la diminuzione di assorbanza è stata utilizzata per calcolare l'attività enzimatica, considerando il coefficiente di estinzione molare del NADH a 366 nm pari a $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'attività enzimatica dell'*isocitrato liasi* (EC 4.1.3.1) è stata determinata misurando la quantità di gliossilato che si forma a partire dal D-isocitrato in 10 minuti a 30°C, mediante un saggio colorimetrico specifico [119].

La miscela di saggio contiene: MgCl₂ 2 mM, glutatione (GSH) 12,5 mM, DL-isocitrato 4 mM ed estratto proteico in tampone Tris-HCl 75 mM pH 7,7, per un volume finale di 2 ml. La miscela di reazione è stata incubata a 30°C per 10 minuti e poi bloccata mediante l'aggiunta di 1 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 10% (w/v). Dopo l'incubazione 1 ml della miscela di reazione è stato prelevato, trasferito in provette di vetro tarate e trattato con 6 ml di una soluzione contenente acido ossalico 8,3 mM e fenilidrazina 0,83%, riscaldando la miscela fino all'ebollizione. I campioni sono stati, poi, rimossi, raffreddati a temperatura ambiente per 5 minuti e posti in un bagno di acqua per 2 minuti. Dopo il raffreddamento i campioni sono stati rimossi e trattati con 4 ml di HCl concentrato ed 1 ml di potassio ferricianuro al 5% (w/v). Trascorsi 7 minuti dall'aggiunta del ferricianuro, l'assorbimento a 520 nm è stato letto contro un bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne l'isocitrato. La quantità, in µmoli, di gliossilato per miscela di reazione (2 ml della miscela originaria di incubazione) è dato da: $(O.D_{520} - 0,05)/1,15$.

L'attività è stata espressa definendo come unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la scomparsa di 1 µmole di isocitrato al minuto nelle condizioni di saggio descritte.

L'attività *malato sintasica* (EC 2.3.3.13) è stata saggiata misurando la diminuzione di assorbanza a 232 nm dovuta alla rottura del legame tioestere dell'acetil-CoA in presenza di gliossilato [120].

La miscela di saggio contiene: MgCl₂ 3,5 mM, acetil-CoA 47 µM, sodio gliossilato 47 µM ed estratto proteico in tampone Tris-HCl 0,1 M pH 8,0,

per un volume finale di 0,8 ml. L'assorbanza a 232 nm è stata misurata azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne il gliossilato. L'attività enzimatica è stata espressa definendo come unità enzimatica la quantità di enzima che catalizza la rottura di una μ mole di acetil-CoA per minuto. Il ΔA_{232} per la rottura del legame tioestere dell'acetil-CoA, alla concentrazione di 1 μ mole/ml, è 4,5; quindi, 1 unità di enzima nel presente saggio catalizza un ΔA_{232} di 10,7 al minuto e, viceversa, un ΔA_{232} di 0,100 al minuto è equivalente a 0,00935 unità.

3.3e. Attività ATP-citrato liasica

L'attività dell'enzima ATP-citrato liasi (EC 4.1.3.8) è stata saggiata determinando l'ossalacetato formato mediante la reazione accoppiata della malato deidrogenasi, in presenza di NADH [121]. La miscela di reazione (1 ml) contiene: Tris-HCl 0,13 M pH 8,4, MgCl₂ 6,7 mM, 2-mercaptoetanololo 6,7 mM, citrato di potassio 13 mM, CoA 0,13 mM, ATP 6,7 mM, NADH 0,13 mM, malato deidrogenasi (Sigma) 0,13 U ed estratto proteico. L'attività è stata determinata misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm, azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela tranne il CoA e ATP. Il coefficiente di estinzione molare del NAD⁺ misurato a 340 nm è pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3f. Acetil-coenzimaA (acetil-CoA)

Le cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type, trattate con IAA 0,5 mM, in fase esponenziale e stazionaria di crescita, e iperproduttrici di IAA (64) sono state cresciute come precedentemente descritto nel paragrafo "Curve di

crescita". Le colture batteriche (5 ml) sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 min a 4°C e i pellet recuperati sono stati risospesi nel seguente tampone di lavaggio: fosfato di sodio 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, HClO₄, raffreddato in ghiaccio, 3 M. Dopo incubazione in ghiaccio per 30 min, la miscela è stata centrifugata a 2800 g per 5 min e il sovrantante recuperato è stato neutralizzato con KHCO₃ e centrifugato nelle stesse condizioni precedenti. L'estratto ottenuto (450 µl) è stato utilizzato per saggiare l'acetil-CoA, seguendo spettrofotometricamente la formazione di NADH dall'acetil-CoA attraverso gli enzimi malato deidrogenasi e citrato sintasi [122]. La miscela di reazione (1 ml) contiene: Tris-HCl 150 mM pH 7,8, acido malico 10 mM, MgCl₂ 3 mM, NAD⁺ 7,55 mM, malato deidrogenasi (Sigma) 10 µg ed estratto. Dopo incubazione della miscela a 30°C per 30 min, è stato aggiunto l'enzima citrato sintasi (Sigma) 20 µg e le densità ottiche iniziali OD_i sono state misurate a 340 nm. Dopo 45 min sono state determinate le densità ottiche finali OD_f e la concentrazione di acetil-CoA è stata calcolata come OD_f - OD_i.

3.3g. Citrato

I livelli intracellulari di citrato sono stati determinati mediante il metodo chimico dell'anidride acetica-piridina [123]. Gli estratti sono stati preparati in modo da contenere una concentrazione finale di acido tricloroacetico (TCA) pari al 5% (w/v). La miscela è stata riscaldata a 60 °C per 10 minuti e raffreddata a temperatura ambiente in un bagno di acqua e ghiaccio. Dopo aver aggiunto 200 µl di piridina, la miscela è stata riscaldata a 60°C per 40 minuti in tubi di reazione sigillati. Dopo raffreddamento, è stato determinato l'assorbimento a 428 nm. La quantità, in µmoli, di citrato è stata calibrata con una retta di taratura, ottenuta preparando soluzioni di

tampone di estrazione e TCA al 5 %, contenente differenti concentrazioni di citrato e trattate nelle stesse condizioni sperimentali dei campioni.

3.3h. Adenosina trifosfato (ATP)

Le cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type, trattate con IAA 0,5 mM e iperproduttrici di IAA (64) sono state cresciute, per il saggio bioluminescente dell'ATP, in fase esponenziale e stazionaria di crescita come precedentemente descritto nel paragrafo "Curve di crescita". Il numero di colonie è stato determinato come CFU (colony-forming units) per ml, piastrando i campioni, diluiti in modo opportuno, su piastre di triptone-agar e contando le colonie sviluppatesi in seguito ad incubazione a 30°C (vedi "Test di sopravvivenza cellulare"). Per l'estrazione dell'ATP [124], 0,5 ml di coltura cellulare è stata miscelata, a temperatura ambiente, con 0,5 ml di fenolo pH 8,0, contenente 8-idrossichinolino 0,1%. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio e, poi, centrifugati a 14000 rpm per 5 min; la fase acquosa è stata rimossa ed estratta con cloroformio-alcol isoamilico (24:1 v/v). Il saggio dell'ATP è stato realizzato a temperatura ambiente utilizzando la reazione bioluminescente della luciferina-luciferasi, basata sulla risposta lineare di luminescenza della luciferasi in presenza di ATP e di un eccesso di tutti gli altri fattori. La miscela di reazione bioluminescente contiene [125]: tampone tricina 25 mM pH 7,5, luciferasi (Sigma) 0,53 mg/ml, luciferina 1,5 mM, EDTA 6 mM, acetato di magnesio 15 mM, DTT 0,2 mM, BSA 0,2%, saccarosio 0,37%. Dopo l'aggiunta di 100 µl di miscela di reazione a 100 µl di estratto, l'intensità bioluminescente è stata misurata con un luminometro "TopCount NXT microplate scintillation and luminescence counter" (Packard Instrument

Company). I livelli intracellulari di ATP sono stati calibrati con una retta di taratura: 1 ml di mezzo minimo è stato trattato nelle stesse condizioni sperimentali dei campioni e l'intensità di bioluminescenza è stata misurata dopo l'aggiunta di 100 µl di miscela di reazione a 100 µl di diverse aliquote di mezzo contenenti differenti concentrazioni di ATP.

3.3i. NAD(P)H/NAD(P)

I sovrantanti, ottenuti come descritto nel paragrafo "Preparazione dell'estratto", sono stati utilizzati per determinare i livelli di NAD(P)(H) [82]. NADH e NADPH sono molto stabili in NaOH 0,04 M contenente cisteina 0,5 mM per prevenire l'ossidazione durante il riscaldamento a 60°C per 10 min, richiesto per distruggere le loro forme ossidate. NAD e NADP sono, invece, stabili in 0,01 M H₂SO₄/0,1M Na₂SO₄ contenente ascorbato 30 mM (aggiunto prima dell'acidificazione per prevenire l'ossidazione delle forme ridotte), mentre NADH e NADPH sono distrutte per riscaldamento a 60°C per 30 min. Per la determinazione della quantità totale NAD(P)+NAD(P)H, gli estratti cellulari sono stati diluiti in NaOH 0,04 M contenente cisteina 0,5 mM e raffreddati in ghiaccio dopo il riscaldamento. Per le determinazioni dei livelli di NAD(P)+NAD(P)H e NAD(P)H, sono stati utilizzati, come standard, quantità, comprese tra 2 e 20 µl, di NAD(P)H 1mM, aggiunte a 1 ml di 0,04 M NaOH/0,5 mM cisteina. Per la deteminazione dei livelli di NAD(P), invece, sono stati utilizzati, come standard, quantità, comprese tra 2 e 20 µl, di NAD(P) 1 mM, aggiunte a 0,5 ml di 0,01 M H₂SO₄/0,1M Na₂SO₄ (contenente ascorbato 30 mM). Inoltre, aliquote di tali standard, assieme ai bianchi costituiti da NaOH-cisteina o H₂SO₄/Na₂SO₄-ascorbato, sono stati trattati nelle stesse condizioni sperimentali dei campioni. La specificità del saggio

per il NAD(H) o NADP(H) è stabilita dall'enzima e dal substrato. Il saggio è stato realizzato in condizioni minime di luce, seguendo a 570 nm la riduzione del blu di tiazolile, mediata dal etosolfato di fenazina, dopo 30 minuti dall'aggiunta dei campioni alla miscela di reazione. La miscela di reazione per la determinazione di NAD(H) contiene: tampone bicina [*N,N*-bis(2-idrossietil)glicina] 40 mM con EDTA 1mM pH 7,8, etanolo 0,5 M, etosolfato di fenazina 1,7 mM, blu di tiazolile 0,4 mM, alcol deidrogenasi (Sigma) 0,4 U/ml e campione in un volume finale di 1 ml.

La miscela di reazione per la determinazione di NADP(H) contiene: tampone Tris-HCl 67 mM con MgCl₂ 4,5 mM pH 7,4, glucosio-6-fosfato 5 mM, etosolfato di fenazina 1,7 mM, blu di tiazolile 0,4 mM, glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Sigma) 0,07 U/ml e campione in un volume finale di 1 ml.

3.4. Test di sopravvivenza cellulare

Le cellule batteriche dei ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA (64) sono state cresciute in terreno minimo e l'IAA è stato aggiunto, alle concentrazioni finali di 0,5, 0,05, 0,2 e 2 mM, alle colture del ceppo wild-type in fase stazionaria di crescita come precedentemente descritto nella sezione "Curve di crescita". La vitalità cellulare, ossia il numero di colonie sopravvissute, è stata determinata a diversi tempi di permanenza in fase stazionaria, che per i ceppi trattati con IAA rappresentano anche i giorni trascorsi dall'aggiunta di tale molecola. Le colture sono state diluite di 10^4 volte in acqua sterile e 100 μ l della diluizione sono stati spatolati su piastre contenenti: triptone (Difco, Laboratories, Detroit, Mich.) 5 g/l, estratto di lievito (Difco) 3 g/l, agar 15 g/l, CaCl_2 6 mM, streptomicina (str) 200 μ g/ml per tutti i campioni e spectinomomicina (spm) 200 μ g/ml solo per il ceppo 64. Le piastre sono state incubate a 30°C e il numero di colonie ottenute su tali piastre è stato confrontato con quello della piastra di controllo. Il test è stato effettuato almeno in triplicato.

3.5. Test di sopravvivenza a stress

Le cellule batteriche dei ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA (64) sono state cresciute in terreno minimo, contenente mannitolo come unica sorgente di carbonio, come precedentemente descritto nella sezione "Curve di crescita". Tali cellule sono state sottoposte a due tipi di trattamento: irradiazione UV per danneggiare il DNA e shock termico a 55°C. L'irradiazione UV delle sospensioni cellulari (10 ml), prelevate in fase esponenziale e stazionaria di

crescita, è stata realizzata con una lampada germicida (254 nm) a 100 J/m^2 in piastre Petri (diametro 5 cm). Per quanto riguarda lo stress termico, invece, le colture, in fase esponenziale di crescita, sono state incubate per 5 min in un bagno di acqua a 55°C , sotto costante agitazione. Le cellule trattate e quelle non trattate sono state diluite di 10^4 volte in acqua sterile e 50 μl della diluizione sono stati spatolati su piastre contenenti: triptone (Difco, Laboratories, Detroit, Mich.) 5 g/l, estratto di lievito (Difco) 3 g/l, agar 15 g/l, CaCl_2 6 mM. Le piastre sono state incubate a 30°C e il numero di colonie ottenute è stato confrontato con quello delle piastre di controllo, per determinare la sopravvivenza al trattamento UV e allo shock termico. Entrambi i test sono stati effettuati almeno in triplicato.

3.6. Microscopia elettronica dei batteri

Il ceppo di *S. meliloti* 1021 wild-type e quello iperproduttore di IAA (64) sono stati cresciuti come precedentemente descritto nel paragrafo “Curve di crescita”. I batteri prelevati in fase esponenziale e stazionaria di crescita sono stati posti su una griglia di rame di 3 mm di diametro, che è il supporto per il microscopio elettronico a trasmissione (TEM), sul quale è stato precedentemente depositato un film di formovar. Dopo aver eliminato con carta da filtro un eventuale eccesso di batteri dal film, è stata aggiunta una goccia di colorante (acido fosfotungstico 2% pH 7,0) su ciascun preparato. La reazione è stata bloccata dopo pochi secondi e l'eccesso di colorante eliminato con carta da filtro. Dopo aver fatto asciugare i preparati, è stato possibile osservarli al microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 208 con una tensione d'accelerazione di 80 KV e un ingrandimento di 10000X.

3.7. Isolamento dei poli- β -idrossibutirradi (PHB)

I ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type, trattato con IAA 0,5 mM e iperproduttore di IAA (64) sono stati cresciuti come precedentemente descritto in “Curve di crescita” e “Crescita microaerobica”. Le colture batteriche (25 ml) sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 min a 4°C, per allontanare il mezzo di crescita e raccogliere il pellet batterico, risospeso in 15 ml di sodio ipoclorito (Sigma). La sospensione ottenuta e opportunamente diluita è stata incubata a 37°C per 1 h. Dopo incubazione, i granuli lipidici sono stati centrifugati a 8000 rpm a 4°C per 10 min, lavati, prima, con acqua e, poi, con acetone e alcol. Il polimero è stato dissolto mediante estrazione con cloroformio bollente, che è poi stato evaporato sotto flusso di N₂. Dopo aggiunta di 10 ml di H₂SO₄ concentrato, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 min. Dopo raffreddamento in ghiaccio, è stata misurata l’assorbanza a 235 nm azzerando contro un bianco di acido solforico. La quantità di acido crotonico è stata calcolata considerando un coefficiente di estinzione molare pari a $1,55 \times 10^4$ [126].

3.7a. Attività enzimi della biosintesi di PHB

L’attività dell’enzima *β -chetotiolasi* (EC 2.3.1.9) è stata saggiata seguendo spettrofotometricamente la diminuzione di assorbanza a 303 nm, dovuta alla conversione del complesso Mg²⁺-enolo dell’acetoacetil-CoA in acetil-CoA [127]. La miscela di reazione (1 ml) contiene: Tris-HCl 5 mM pH 7,88, MgCl₂ 20 mM, DTT 0,5 mM, CoASH (forma ridotta del CoA) 57 μ M, acetoacetil-CoA 23 μ M ed estratto proteico. La miscela di reazione, prima dell’aggiunta di CoASH, è stata incubata a 30 °C per 2 min.

L'attività enzimatica è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare della specie misurata a 303 nm pari a $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'attività dell'enzima *acetoacetyl-CoA reduttasi* (EC 1.1.1.36) è stata saggiata seguendo spettrofotometricamente la variazione di assorbanza a 340 nm dovute all'ossidazione del NADH o del NADPH [127]. La miscela di reazione (1 ml) contiene: tampone fosfato di potassio 60 mM pH 5,5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 12 μM , DTT 0,5 mM, NADPH o NADH 0,24 mM, acetoacetyl-CoA 28 μM ed estratto proteico. La miscela di reazione, priva del substrato e prima dell'aggiunta di NADPH o NADH, è stata incubata a 30 °C per 3 min. L'assorbanza a 340 nm è stata misurata azzerando contro il bianco contenente tutti i componenti della miscela di reazione tranne acetoacetyl-CoA e NADPH o NADH. L'attività enzimatica è stata calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare della specie (NADP^+ o NAD^+) a 340 nm pari a $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.8. Elettroforesi bidimensionale (2-DE)

3.8a. Preparazione dell'estratto proteico citoplasmatico

I ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type, trattato con IAA 0,5 mM in fase esponenziale e stazionaria di crescita, iperproduttore di IAA (64) sono stati cresciuti come precedentemente descritto in "Curve di crescita". Le colture batteriche, prelevate in entrambe le fasi di crescita e, in particolare, quelle cresciute con IAA 5 h dopo il trattamento, sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 min a 4°C, per allontanare il mezzo di crescita e raccogliere le cellule batteriche. Il pellet cellulare ottenuto è stato lavato tre volte a 9000 rpm per 10 min a 4 °C con un tampone a bassa salinità composto da: NaCl 68 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaH₂PO₄ 9 mM [128]. Le cellule sono state risospese nel tampone di estrazione contenente: Urea 8 M, EDTA 1 mM, Triton X-100 4 %, DTT 20 mM, PMSF 8 mM, Ampholine 0,5 % (IPG buffer pH 3,5-10, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) in Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Il pellet così risospeso è stato posto in ghiaccio per 10 min. Successivamente le cellule sono state lisate mediante sonicazione in un bagno di acqua e ghiaccio, effettuando 13 cicli da 30 sec intervallati da 30 sec di pausa, ad una potenza di 16-18 μm (Cellai Soniprep 150). Le cellule non lisate e i debris cellulari sono stati allontanati mediante ultracentrifugazione a 40000 rpm per 2 h, a 15°C (Beckman LE80, rotore 70.1 Ti) ed è stato recuperato il sovrantante contenente l'estratto proteico totale.

3.8b. Preparazione dell'estratto proteico di membrana

I ceppi di *S. meliloti* 1021 wild-type, trattato con IAA 0,5 mM in fase esponenziale di crescita e iperproduttore di IAA (64) sono stati cresciuti come precedentemente descritto in “Curve di crescita”. Le colture batteriche sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 min a 4°C e il pellet cellulare ottenuto è stato lavato tre volte a 9000 rpm per 10 min a 4 °C con un tampone a bassa salinità contenente: NaCl 68 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaH₂PO₄ 9 mM [128]. Le cellule sono state risospese in tampone Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e lisate mediante sonicazione in un bagno di acqua e ghiaccio, effettuando 10 cicli da 20 sec intervallati da 30 sec di pausa, ad una potenza di 10 µm (Cellai Soniprep 150). Tale sospensione cellulare è stata successivamente sottoposta al trattamento con DNasi 10 U ed RNasi 10 µg/ml per 1 h a temperatura ambiente, sotto costante agitazione. Dopo il trattamento con DNasi ed Rnasi la sospensione è stata centrifugata a 8000 rpm per 10 min. Per l'isolamento delle frazioni di membrana il sovranatante recuperato è stato centrifugato a 40000 rpm per 2 h a 4°C (Beckman LE80, rotore 70.1 Ti). Il pellet recuperato è stato lavato due volte a 40000 rpm per 1 h a 4°C (Beckman LE80, rotore 70.1 Ti) in tampone Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Il pellet così ottenuto è stato dissolto nel seguente tampone di estrazione: Urea 7 M, tiourea 2 M, Triton X-100 1 %, CHAPS 2 %, DTT 20 mM, Ampholine 0,4 % (IPG buffer pH 3,5-10, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) ed incubato per 2 h a temperatura ambiente, sotto costante agitazione. Infine il campione è stato centrifugato a 12000 rpm per 10 min a 4 °C, per allontanare il materiale non solubilizzato.

3.8c. Determinazione della concentrazione proteica

La quantizzazione degli estratti è stata effettuata determinando la concentrazione proteica mediante il metodo Bradford [129] ed utilizzando il reattivo commerciale della Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Munchen, Germania) secondo le istruzioni suggerite dalla casa. Come standard è stata usata l'albumina da siero bovino (BSA).

3.8d. Idratazione delle strips

Per l'isoelettrofocalizzazione (IEF) sono state utilizzate le ImmobilineTMDryStrips (Pharmacia) della lunghezza di 24 cm e con un gradiente lineare di pH nell'intervallo 4-7, disponibili in forma disidratata. L'idratazione di tali strips è stata effettuata utilizzando una soluzione di idratazione contenente: Urea 8 M, Triton 4%, DTT 18 mM, Ampholine 0,5%, blu di bromofenolo in tracce in H₂O MilliQ per un volume finale di 450 µl. Le ImmobilineTMDryStrips sono state reidratate, individualmente, nell'IPGphor General Strip Holder (Pharmacia); ciascun holder è costituito da sottili strati di ossido di alluminio ceramico capace di trasferire efficacemente il calore. La soluzione di idratazione è stata distribuita lungo tutta la superficie dell'holder e le strips sono state poi posizionate in tali holder con il gel rivolto verso il basso e ricoperte di olio minerale. L'idratazione è stata effettuata a 20 °C, per circa 18 h.

3.8e. Prima dimensione: focalizzazione isoelettrica (IEF)

L'isoelettrofocalizzazione è stata condotta utilizzando il sistema di elettroforesi IPGphor Isoelectric Focusing Unit (Pharmacia), fornito del

Cup Loading Manifold, secondo le istruzioni suggerite dalla casa. In particolare, le ImmobilineTMDryStrips sono state focalizzate nel vassoio, Manifold, di ceramica e con rivestimento in ossido di alluminio, particolarmente adatto per un efficiente trasferimento di calore e controllo della temperatura durante l'IEF. Dopo aver riempito il vassoio con 108 ml di olio minerale, ogni strips è stata posizionata in ciascun canale di alloggiamento del Manifold, con il gel rivolto verso l'alto. Sull'estremità anodica di ciascuna strip, a circa 1 cm dalla fine della porzione di gel, sono state posizionate le "cups", da riempire con olio minerale e con un volume che permette di caricare fino ad un massimo di 150 µl di campione (750 µg per le proteine citoplasmatiche e 80 µg per le proteine di membrana). Inoltre, strisce di carta inumidite con acqua deionizzata sono poste alle estremità di ciascuna strip per garantire il contatto con gli elettrodi. La focalizzazione delle proteine è stata realizzata attraverso 4 fasi, di durata totale 16 h e 40 min e un V•h di 55000, in ciascuna delle quali è stato imposto un limite di corrente per strip pari a 50 µA e una temperatura di 20 °C. La prima fase è stata condotta a 300 V per 3 h; la seconda fase consiste nel raggiungimento di 1000 V con un gradiente della durata di 6 h; la fase successiva consiste nel raggiungimento di 8000 V in 3 h e la fase finale è stata condotta ad 8000 V per 4 h e 40 min.

3.8f. Equilibratura delle strips per la seconda dimensione

Prima di sottoporre le strips alla seconda dimensione (SDS-PAGE) esse sono state equilibrate in 5 ml di un tampone contenente ditiotreitolo (DTT) per la prima equilibratura e iodoacetamide per la seconda, entrambe effettuate sotto agitazione per 15 min nello stesso vassoio Manifold, utilizzato per la prima dimensione.

In particolare, il tampone utilizzato per la prima equilibratura contiene: Urea 6 M, glicerolo 30 %, SDS 2%, blu di bromofenolo 0,001 % e DTT 65 mM in Tris-HCl 50 mM pH 8,8.

Il tampone utilizzato per la seconda equilibratura contiene: Urea 6 M, glicerolo 30 %, SDS 2%, blu di bromofenolo 0.001 % e iodoacetamide 135 mM in Tris-HCl 50 mM pH 8,8.

3.8g. Seconda dimensione: elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)

La seconda dimensione è stata condotta utilizzando il sistema Ettan DALTsix Electrophoresis System (Pharmacia Biotech) su gel di poliacrilamide al 12,5% (25,5 x 20,5 cm, spessore 0,5 mm), seguendo le istruzioni suggerite dalla casa. La preparazione dei gels verticali di SDS-poliacrilamide è stata eseguita come descritto da *Gorg et al.* [95], in apposite cassette (Pharmacia).

La corsa elettroforetica è stata condotta in tampone Tris-glicina 0,1 M pH 8,3 e a 25 °C; per il mantenimento di tale temperatura il sistema elettroforetico è stato collegato al termostato MultiTemp III Thermostatic Circulator (Pharmacia LKB). Sulla estremità superiore di ciascun gel sono state posizionate le strips equilibrate, come precedentemente descritto, e lavate con il tampone per l'elettroforesi. Il contatto tra la superficie del gel e quella delle strips, durante la corsa elettroforetica, è stato ottenuto bloccando tali strips con una soluzione di agarosio allo 0,5% nel tampone per l'elettroforesi. La corsa elettroforetica è stata condotta a potenza costante, attraverso due fasi: una prima fase ad una potenza di 2,5 W/gel per 30 minuti ed una seconda fase ad una potenza di 100 W totali per circa 4 h.

3.8h. Visualizzazione e analisi

Gli spots proteici sono stati rivelati mediante colorazione al Brilliant Blue Coomassie G-Colloidal (Sigma): i gel 2DE sono stati incubati per 1 h in una soluzione contenente acido acetico 7 % e metanolo 40 % (v/v) e colorati per 1 h e 30 min nella sospensione ottenuta miscelando la soluzione di Brilliant Blue Coomassie G-Colloidal, diluita in acqua deionizzata, e metanolo nel rapporto 4:1. Dopo breve decolorazione dei gel (60 sec) con una soluzione contenente acido acetico 10 % e metanolo 25 % (v/v), i gel 2DE sono stati decolorati per 24 h in metanolo 25 % e conservati a temperatura ambiente in una soluzione di solfato di ammonio 25 % (v/v).

I gel così colorati sono stati scannerizzati utilizzando un ImageScanner (Amersham Pharmacia biotech). Le immagini 2DE sono state digitalizzate a 600 dpi con una lampada scanner UMAX fornita di adattatore di trasparenza UTAlII, utilizzando i programmi ImageMasterTM Labscan 3.01 (Amersham Pharmacia biotech) e Adobe Photoshop 5.0 (Adobe, Mountain View, CA, USA). La rivelazione degli spot proteici, il loro confronto su differenti gel e la conseguente quantizzazione sono state effettuate con il software ImageMasterTM 4.01 (Amersham Pharmacia biotech). La determinazione dei pesi molecolari apparenti delle proteine è stata effettuata mediante co-elettroforesi con la seguente miscela di proteine standard: miosina (209 kDa), β -galattosidasi (124 kDa), albumina da siero bovino (80 kDa), ovalbumina (49,1 kDa), anidrasi carbonica (34,8 kDa), inibitore di tripsina di soia (28,9 kDa), lisozima (20,6 kDa), aprotinina (7,1 kDa).

3.8i. Identificazione delle proteine differenzialmente espresse mediante spettrometria di massa MALDI

Le proteine di interesse (o gli spot corrispondenti sul gel 2D) sono state sottoposte a digestione *in situ* con tripsina. Esse sono state prima escisse dal gel e sminuzzate, e poi completamente decolorate in un volume minimo di ammonio bicarbonato 0,1 M ed acetonitrile in un rapporto 1:1. I campioni sono stati quindi ridotti con DTT 10 mM/bicarbonato di ammonio 0,1 M a 56 °C per 45 minuti e poi alchilati con iodoacetamide 55 mM/bicarbonato di ammonio 0,1 M, al buio per 30 minuti e a temperatura ambiente (questo per carbossiammidometilare le cisteine precedentemente ridotte). Rimossa la soluzione e ripetuto il lavaggio con bicarbonato di ammonio/acetonitrile, i campioni sono stati incubati con una soluzione 12,5 ng/μl di tripsina in bicarbonato di ammonio 50 mM, e lasciati per 45 minuti a 4°C. La reazione è stata fatta proseguire per 18 ore a 37°C; i peptidi ottenuti dall'idrolisi sono stati recuperati dal gel effettuando successive estrazioni con bicarbonato di ammonio 25 mM, acetonitrile, e acido formico 5%. La miscela peptidica proveniente dalla digestione triptica è stata liofilizzata e successivamente analizzata mediante MALDI/MS, utilizzando uno spettrometro di massa Perseptive Biosystem mod Voyager-De con sorgente di ionizzazione laser equipaggiato con un analizzatore a tempo di volo (TOF) e provvisto di un sistema di acquisizione e gestione dati computerizzato. Il campione è stato bombardato mediante un raggio laser pulsato ($\lambda=337$ nm) ed ogni spettro è stato ottenuto sommando le intensità ioniche provenienti da diverse irradiazioni.

La matrice impiegata per l'analisi MALDI dei peptidi è costituita da una soluzione 10 mg/ml di α ciano in 70% acetonitrile e 30% TFA 0,2%.

L'intervallo di massa analizzato è stato calibrato con il segnale ad m/z 379 proveniente dalla matrice, e con il segnale ad m/z 5734,6 dell'insulina.

3.9. Procedura di inoculazione e crescita di piante

I semi di *Medicago truncatula* 2HA3-9-10-3, derivata da Jemalong, sono stati sterilizzati superficialmente con una soluzione di etanolo 95% per 45 min e, poi, con una soluzione di ipoclorito di sodio al 5,25 % per 15 min. Dopo intensivi lavaggi con acqua sterile, i semi sono stati lasciati per una notte a 4°C al buio per sincronizzare la germinazione. Successivamente i semi sono stati trasferiti in apposite buste e lasciati a temperatura ambiente al buio per una notte. Le radici dei semi germinati sono state inoculate con cellule di *S. meliloti* 1021 wild-type e iperproduttore di IAA (64), cresciute nel seguente mezzo di coltura: triptone (Difco, Laboratories, Detroit, Mich.) 5 g/l, estratto di lievito (Difco) 3 g/l, CaCl₂ 6 mM, streptomicina (str) 200 µg/ml per entrambi i ceppi e spectinomicina (spm) 200 µg/ml solo per il ceppo 64. L'inoculazione è realizzata con 10⁵ batteri per seme. Le piante sono state cresciute in una stanza sterile al 75 % di umidità relativa, a 23°C nel ciclo diurno (16 ore) e a 19°C nel ciclo notturno. Settimanalmente alle piante è stato aggiunto il mezzo Jensen [130] privo di sorgente azotate.

3.10. Microscopia ottica dei noduli

I noduli di piante di *Medicago truncatula* sono stati separati dalla radice 42 giorni dopo l'infezione e preparati per la microscopia ottica. I noduli sono stati fissati in una soluzione di glutaraldeide 5% (Fluxa) in tampone D-PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) per una notte a 4°C, successivamente trasferiti per 1 h in una soluzione di fissazione contenente OsO₄ 1% in tampone fosfato. I campioni sono stati poi disidratati a 4°C in soluzioni a crescente percentuale di etanolo (dal 10 % al 100 %). I noduli

sono stati immersi in una soluzione di ossido di propilene al 100 % per 20 min e a 20°C, dopo il trattamento con etanolo 100 % per 20 min a 20°C. Tutte le fasi sono realizzate in agitazione continua e sono automatizzate in un processatore per l'inclusione (modello LEICA EM TP). L'inclusione è completata tramite graduale diminuzione della concentrazione del solvente e proporzionale aumento della concentrazione del mezzo per l'inclusione, contenente una resina ottenuta miscelando tre resine (20 ml Embed 812, 9 ml DDSA, 12 ml NMA) ed una catalizzatore che innesca la polimerizzazione (0,66 ml DMP-30, Electorn Microscopy Sciences), ad una temperatura compresa tra i 35-60 °C.

L'inclusione comprende due primi passaggi in resina al 25 % e 50 %, ciascuno di 2 h e a 20°C, seguiti da altri due passaggi a 20°C, ma di 4 h ciascuno, in resina al 75 % e 100 %. I noduli, posti in un supporto, in cui è stata aggiunta altra resina al 100%, sono stati polimerizzati per 24 h in stufa a 55°C. I blocchetti di resina ottenuti, in cui è incluso il nodulo, sono stati tagliati all'ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT), per ottenere sezioni semifini da osservare al microscopio ottico. L'ultramicrotomo è stato tarato con una velocità di taglio di 1 mm/sec e con un avanzamento automatico per sezioni semifini di 2,0 micron. Le sezioni di nodulo ottenute, fissate su un vetrino, sono state colorate con blu di toluidina 0,02% in PBS oppure, per la colorazione specifica dei granuli di amido, con una soluzione di KI 5% e I₂ 1,7% in H₂O distillata, I noduli sono stati, poi, fotografati con il microscopio ottico (Axiophot Zeiss West Germany), utilizzando un obiettivo con ingrandimento 4X e 10X.

3.11. Determinazione del peso secco

I fusti con foglie di piante di *Medicago truncatula* sono stati separati dalle radici contenenti i noduli 6 settimane dopo l'infezione. Per la determinazione del peso secco, le piante sono state seccate in stufa a 180°C fino al raggiungimento di un peso costante.

3.12. Determinazione dell'attività nitrogenasica mediante saggio di riduzione dell'acetilene (saggio ARA)

Il saggio di riduzione dell'acetilene (saggio ARA) è stato realizzato come descritto da *Hardy et al.* [131], ma con alcune importanti modifiche. Le radici con noduli derivanti da piante infettate con lo stesso ceppo batterico sono state incubate in condizioni saturanti di acetilene, in tubi di propilene da 14 ml con guarnizione. La produzione di etilene è stata seguita effettuando 5 prelievi (1 ml) di miscela gassosa dal tubo, nell'intervallo di tempo 10-30 min dall'aggiunta di acetilene. Ad ogni prelievo di campione, è stato iniettato 1 ml di aria nel tubo, per minimizzare le differenze di pressione dovute al prelievo della miscela gassosa e per consentire alla reazione catalizzata dalla nitrogenasi di proseguire senza essere alterata dal prelievo. L'etilene prodotto è stata analizzato mediante un gas-cromatografo Perkin Elmer Sigma 3B, fornito di colonna PoraPackQ. Per la separazione dei picchi relativi all'acetilene ed all'etilene è stato impostato un programma di temperatura consistente in un'isoterma di 3 min. Il gas-cromatografo è dotato di un detector a ionizzazione di fiamma (FID) in grado di analizzare la quantità dei gas provenienti dalla colonna.

CONCLUSIONE

L'analisi metabolica e proteomica, presentata in questo lavoro di tesi, ha permesso di comprendere i principali ruoli di IAA nei processi metabolici cellulari di Rizobio e di formulare valide ipotesi sulla relazione esistente tra IAA e simbiosi. La combinazione dei diversi approcci biochimici utilizzati, infatti, ha consentito di dimostrare l'esistenza di una correlazione tra le efficienti capacità simbiotiche di *S. meliloti* che iperproduce IAA con le sue proprietà morfologiche e metaboliche. Dal punto di vista morfologico, l'aumentata efficienza della fissazione biologica dell'azoto è correlabile ad una diversa e, in particolare, accelerata fase di sviluppo sia del batterio sia del nodulo radicale.

Per quanto riguarda l'aspetto metabolico, è noto che, nello stato free-living, *S. meliloti* utilizza come fonte di carbonio una grande varietà di carboidrati, che rappresentano, anche, i principali tipi di fotosintato, trasportati nel nodulo radicale della pianta ospite. Allo stato simbiotico, invece, è universalmente riconosciuto che gli acidi dicarbossilici rappresentano la fonte di energia fornita ai batteroidi per fissare l'azoto e che gli intermedi metabolici del ciclo di Krebs hanno un ruolo importante nel determinare l'efficienza della simbiosi. Le analisi enzimatiche evidenziano che il nostro *S. meliloti*, che iperproduce IAA e che migliora la fissazione dell'azoto, presenta un ciclo di Krebs attivo e metabolizza il mannitolo principalmente attraverso la glicolisi o via EMP, la più efficiente fonte di energia tra i diversi pathway catabolici. L'induzione per effetto di IAA delle attività degli enzimi chiave del ciclo di Krebs e della via EMP è mantenuta anche utilizzando un acido dicarbossilico come fonte di carbonio e in condizione limitante di ossigeno, tipica dell'ambiente microaerobico del nodulo. L'attivazione, per effetto di IAA, del flusso di substrati attraverso il ciclo di Krebs è conseguenza di un basso stato energetico cellulare e di un aumento

del consumo di ossigeno che conduce alla riduzione dello stato redox cellulare, necessaria per bilanciare il metabolismo energetico.

E' noto che le cellule cresciute in terreno minimo hanno la necessità di sintetizzare tutti gli intermedi necessari per la biosintesi delle macromolecole fondamentali a partire da una singola sorgente di carbonio e di energia. Dalle nostre analisi risulta che questa necessità viene ulteriormente intensificata in presenza di IAA comportando: a) l'accensione di pathways biosintetici come quelli degli acidi grassi; b) l'accumulo di composti da utilizzare potenzialmente come fonte di energia per la simbiosi e per il processo di differenziamento a batteroide, o come materiale di riserva per la sopravvivenza nel suolo, allo stato free-living, in ambienti difficili ed ostili; c) l'aumento di espressione di proteine coinvolte nelle funzioni di protezione dei costituenti cellulari da diversi tipi di danni, con conseguente maggiore sopravvivenza cellulare in risposta alla somministrazione endogena ed esogena di IAA.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano e giustificano l'importanza della iperproduzione batterica di IAA per il miglioramento del processo di fissazione biologica dell'azoto con vantaggi per l'agricoltura, economici e ambientali.

BIBLIOGRAFIA

1. **Stougaard J.** Regulators and regulation of Legume root nodule development. *Plant Physiol.*, 2000. **124**: p. 531-540.
2. **Gray T. R. and Williams S. T.** Microbial productivity in soil. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1971. **21**: p. 255-286.
3. **Smit G., Swart B. J., Lugtenberg B. J. J. and Kijne J. W.** Molecular mechanism of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant-roots. *Molecular Microbiol.*, 1992. **6**: p. 2897-2903.
4. **Thorne S. H. and Williams H. D.** Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*: analysis of survival, stress resistance, and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase. *J. Bacteriol.*, 1997. **179**: p. 6894-6901.
5. **Long S. R.** Genes and signals in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Plant Physiol.*, 2001. **125**: p. 69-72.
6. **Vasse J., de Billy F., Camut S. and Truchet G.** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.*, 1990. **172**: p. 4295-4306.
7. **Paau A. S., Bloch C. B. and Brill W. J.** Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.*, 1980. **143**: p. 1480-1490.
8. **Oke V. and Long S. R.** Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiol.*, 1999. **32**: p. 837-849.
9. **Becker A., Berges H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F. J., Fourment J., Francez-Charlot A., Kahn D., Kuster H., Liebe C., Puhler A., Weidner S. and Batut J.** Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2004. **17**: p. 292-303.
10. **Ampe F., Kiss E., Sabourdy F. and Batut J.** Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biology*, 2003. **4**: p. R15.
11. **Natera S. H. A., Guerreiro N. and Djordjevic M. A.** Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2000. **13**: p. 995-1009.
12. **Djordjevic M. A., Chen H. C., Natera S., van Noorden G., Menzel C., Taylor S., Renard C., Geiger O., the *Sinorhizobium* DNA Sequencing Consortium and Weiller G. F.** A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium*

- meliloti*: discovery of new genes for nodules occupancy and stress adaptation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2003. **16**: p. 508-524.
13. **van Rhijn P. and Vanderleyden J.** The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.*, 1995. **59**: p. 124-142.
 14. **Hirsch A. M.** Developmental biology of legume nodulation. *New Phitol.*, 1992. **122**: p. 211-237.
 15. **Niwa S., Kawaguchi M., Imazumi-Anraku H., Chechetka S. A., Ishizaka M., Ikuta A. and Kouchi H.** Responses of a model legume *Lotus japonicus* to lipochitin oligosaccharide nodulation factors purified from *Mesorhizobium loti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2001. **14**: p. 848-856.
 16. **Tatè R., Patriarca E. J., Riccio A., Defez R. and Iaccarino M.** Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1994. **7**: p. 582-589.
 17. **Hirsch A. M. and Fang Y.** Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Molec. Biol.*, 1994. **26**: p. 5-9.
 18. **Galloway N. J., Schlesinger W. H., Levy H., Michaels A. and Schnoor J. L.** Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement-environmental response. *Glob. Biogeochem. Cycles*, 1995. **9**: p. 235-252.
 19. **Zahran H. H.** *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999. **63**: p. 968-989.
 20. **Gilroy S. and Jones D. I.** Through form to function Broot hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci.*, 2000. **3**: p. 56-60.
 21. **Harrison M. J.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground associaton. *Trends Plant Sci.*, 1997. **2**: p. 54-60.
 22. **Vance C. P.** Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.*, 2001. **127**: p. 390-397.
 23. **Dixon R. O. D. and Wheeler C. T.** Nitrogen Fixation in plants. *Blackie Glasgow, United Kingdom*, 1986.
 24. **Sprent J. I. and Sprent P.** Nitrogen fixing organism. Pure and applied aspects. *Chapman & Hall, London, United Kingdom*, 1990.
 25. **Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W. J., Rosenthal A. and Perret X.** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 1997. **387**: p. 394-401.

26. **Woodward A. W. and Bartel B.** Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Annals of Botany*, 2004. doi:10.1093/aob/mci083, available online at www.aob.oupjournals.org.
27. **Darwin C.** The power of movement in plants. *London: John Murray*, 1880.
28. **Went F. W. and Thimann K. V.** Phytohormones. *New York: McMillan*, 1937.
29. **Kende H. and Zeevaart J. A. D.** The five "classical" plant hormones. *Plant Cell*, 1997. **9**: p. 1197-1210.
30. **Muday G.** Auxins and tropisms. *J. Plant Growth Regul.*, 2001. **20**: p. 226-243.
31. **Rashotte A., Brady S. R., Reed R. C., Ante S. J. and Muday G. M.** Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2000. **122**: p. 481-490.
32. **Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. and Bennett M. J.** Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.*, 2003. **4**: p. 165-171.
33. **Bhalerao R. P., Eklof J., Ljung K., Marchant A., Bennett M. and Sandberg G.** Shoot derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, 2002. **29**: p. 325-332.
34. **Estelle M.** Polar auxin transport: new support for an old model. *Plant Cell*, 1998. **10**: p. 1775-1778.
35. **Friml J.** Auxin transport: shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003. **6**: p. 7-12.
36. **Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurum S., Moore I., Napier R., Kerr I. D. and Bennet M. J.** Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *The Plant Cell*, 2004. **16**: p. 3069-3083.
37. **Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. and Palme K.** Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 1998. **282**: p. 2226-2230.
38. **Brown D. E., Rashotte A. M., Murphy A. S., Normanly J., Tague B. W., Peer W. A., Taiz L., Muday G.K.** Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2001. **126**: p. 524-535.
39. **Peer W. A., Bandyopadhyay A., Blakeslee J. J., Makam S. N., Chen R. J., Masson P. H. and Murphy A. S.** Variation in expression and protein localization of

- the PIN family auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 2004. **16**: p. 1898-1911.
40. **Noh B., Murphy A. S. and Spalding E. P.** Multidrug Resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell*, 2001. **13**: p. 2441-2454.
41. **Boerjan W., Cervera M. T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., van Onckelen H., van Montagu M. and Inze D.** Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell*, 1995. **7**: p. 1405-1419.
42. **Hobbie L. and Estelle M.** Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell Environ.*, 1994. **17**: p. 525-540.
43. **de Billy F., Grosjean C., May S., Bennet M. and Cullimore J. V.** Expression studies on AUX1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2001. **14**: p. 267-277.
44. **Xie Q., Frugis G., Colgan D. and Chua N. H.** *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, 2000. **14**: p. 3024-3026.
45. **Jones A. M.** Do we have the auxin receptor yet? *Physiol. Plant*, 1990. **80**: p. 154-158.
46. **Bartel B. and Fink G. R.** ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 1995. **268**: p. 1745-1748.
47. **Zolman B. K., Yoder A. and Bartel B.** Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics*, 2000. **156**: p. 1323-1337.
48. **Walz A., Park S., Slovin J. P., Ludwig-Muller J., Momonoki Y. S. and Cohen J. D.** A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002. **99**: p. 1718-1723.
49. **Bialek K., Michalczyk L. and Cohen J. D.** Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, 1992. **100**: p. 509-517.
50. **Ljung K., Hull A. K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. and Sandberg G.** Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 2005. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.104.029272.

51. **Mikkelsen M. D., Hansen C. H., Wittstock U. and Halkier B. A.** Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**: p. 33715-33717.
52. **Zhao Y., Hull A. K., Gupta N. R., Goss K. A., Alonso J., Ecker J. R., Normanly J., Chory J. and Celenza J. L.** Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.*, 2002. **16**: p. 3100-3112.
53. **Lambrecht M., Okon Y., Vande Broek A. and Vanderleyden J.** Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.*, 2000. **8**: p. 298-300.
54. **Klee H., Montoya A., Horodyski F., Lichtenstein C., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Peschon J., Nester E. and Gordon M.** Nucleotide sequence of the *tms* genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: two gene products involved in plant tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984. **81**: p. 1728-1732.
55. **Yamada T., Palm C. J., Brooks B. and Kosuge T.** Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985. **82**: p. 6522-6526.
56. **Klee H. J. and Romano C. P.** The roles of phytohormones in development as studied in transgenic plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1994. **13**: p. 311-324.
57. **Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Onckelen, H.** *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1993. **6**: p. 609-615.
58. **Lewis Kittell B., Helinski D. R. and Ditta G. S.** Aromatic aminotransferase activity and indoleacetic acid production in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 1989. **171**: p. 5458-5466.
59. **Fang Y. and Hirsch A. M.** Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in alfalfa. *Plant Physiol.*, 1998. **116**: p. 53-68.
60. **Ferguson B. J. and Mathesius U.** Signaling interactions during nodule development. *J. Plant Growth Regul.*, 2003. **22**: p. 47-72.

61. **Lohar D. P., Schaff J. E., Laskey J. G., Kieber J. J., Bilyeu K. D. and Bird D. M.** Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J.*, 2004. **38**: p. 203-214.
62. **Mathesius U., Schlaman H. M., Spaik H. P., Sautter C., Rolfe B. G. and Djordjevic M. A.** Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.*, 1998. **14**: p. 23-34.
63. **Boot K. J. M., van Brussel A. A. N., Tak T., Spaik H. P. and Kijne J. W.** Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1999. **12**: p. 839-844.
64. **Varma R., Penmetsa J. A., Frugoli L., Smith S., Long S. R. and Cook D. R.** Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 2003. **131**: p. 998-1008.
65. **Federova E., Redondo F. J., Koshiba T., Pueyo J. J., de Felipe M. R. and Lucas M. M.** Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and *Medicago truncatula*: identification of AO in meristematic and infection zones. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2005. **18**: p. 405-413.
66. **Kaneshiro T. and Kwolek W. F.** Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3yl-acetic acid. *Plant Science*, 1985. **42**: p. 141-146.
67. **Hunter W. J.** Indole-3-acetic acid production by bacteroids from soybean root nodules. *Physiol. Plant.*, 1987. **76**: p. 31-36.
68. **Wnag T. L., Wood E. A. and Brewin N. J.** Growth regulators. *Rhizobium* and nodulation in peas. Indole-3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strain of *R. leguminosarum*. *Planta*, 1982. **155**: p. 345-349.
69. **Gage D. J., Bobo T. and Long S. R.** Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.*, 1996. **178**: p. 7159-7166.
70. **Pandolfini T., Storlazzi A., Calabria E., Defez R. and Spena A.** The spliceosomal intron of the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* is a prokaryotic promoter. *Mol. Microbiol.*, 2000. **35**: p. 1326-1334.

71. **Mathesius U.** Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot.*, 2001. **52**: p. 419-26.
72. **Basaglia M., Casella S., Peruch U., Poggiolini S., Camerali T., Mosca G., Vanderleyden J., De Troch P. and Nuti M. P.** Field release of genetically marked *Azospirillum brasilense* in association with *Sorghum bicolor* L. *Plant and Soil*, 2003. **00**: p. 1-10.
73. **Martinez-De Drets G. and Arias A.** Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups. *J. Bacteriol.*, 1972. **109**: p. 467-470.
74. **Arias A., Cervenansky C., Gardiol A. and Martinez-Drets G.** Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 1979. **137**: p. 409-414.
75. **Mulongoy K. and Elkan G. H.** Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen-fixing efficiency. *J. Bacteriol.*, 1977. **131**: p. 179-187.
76. **McDermott T. R., Griffith S. M., Vance C. P. and Graham P. H.** Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1989. **63**: p. 327-340.
77. **Streeter J. G.** Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiol.*, 1987. **85**: p. 768-773.
78. **Duncan M. J. and Fraenkel D. G.** α -ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 1979. **137**: p. 415-419.
79. **Gardiol A., Arias A., Cervenansky C. and Martinez-Drets G.** Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 1982. **151**: p. 1621-1623.
80. **McDermott T. R. and Kahn M. L.** Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.*, 1992. **174**: p. 4790-4797.
81. **Krishnan H. B., Kim W. S., Sun-Hyung J., Yong Kim K. and Jiang G.** Citrate synthase mutants of *Sinorhizobium fredii* USDA257 form ineffective nodules with aberrant ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003. **69**: p. 3561-3568.
82. **Salminen S. O. and Streeter J. G.** Factors contributing to the accumulation of glutamate in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids under microaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 1990. **136**: p. 2119-2126.

83. **Walshaw D. L., Wilkinson A., Mundy M., Smith M. and Poole P. S.** Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol.*, 1997. **143**: p. 2209-2221.
84. **Green L. S. and Emerich D. W.** *Bradyrhizobium Japonicum* not require α -ketoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *J. Bacteriol.*, 1997. **179**: p. 194-201.
85. **Green L. S., Li Y., Emerich D. W., Bergersen F. J. and Day D. A.** Catabolism of α -ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.*, 2000. **182**: p. 2838-2844.
86. **Anderson A. J. and Dawes E. A.** Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 1990. **54**: p. 450-472.
87. **Kadouri D., Jurkevitch E. and Okon Y.** Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003. **69**: p. 3244-3250.
88. **Cevallos M. A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y. and Mora J.** Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.*, 1996. **178**: p. 1646-1654.
89. **Encarnacion S., Dunn M., Willms K. and Mora J.** Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.*, 1995. **177**: p. 3058-3066.
90. **Stam H., van Verseveld W., de Vries W. and Stouthamer A. H.** Utilization of poly- β -hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1986. **35**: p. 215-220.
91. **Griffin T. J. and Aebersold R.** Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**: p. 45497-45500.
92. **Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y. and Aebersold R.** Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *PNAS*, 2000. **97**: p. 9390-9395.
93. **Pandey A. and Mann M.** Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000. **405**: p. 837-846.
94. **O'Farrell P. H.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 1975. **250**: p. 4007-4021.

95. **Gorg A., Postel W. and Gunther S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1988. **9**: p. 531-546.
96. **Patterson S. D.** Mass spectrometry and proteomics. *Physiol. Genomics*, 2000. **2**: p. 59-65.
97. **Hoogland C., Sanchez J. C., Tonella L., Binz P. A., Bairoch A., Hochstrasser D. F. and Appel R. D.** The 1999 SWISS-2DPAGE database update. *Nucleic Acids Res.*, 2000. **28**: p. 286-288.
98. **Galibert F., Finan T. M., Long S. R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M. J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cardieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R. W., Dreano S., Federspiel N. A., Fisher R. F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy G., Gurjal M., Hernandez-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R. W., Jones T., Kahn D., Kahn M. L., Kalman S., Keating D. H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Psck M., Pohl T. M., Potetelle D., Pumelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandenbol M., Vorholter F. J., Weidner S., Wells D. H., Wong K., Yeh K. C. and Batut J.** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 2001. **293**: p. 668-672.
99. **Guerreiro N., Djordjevic M. A. and Rolfe B. G.** Proteome analysis of the model microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*: isolation and characterisation of novel proteins. *Electrophoresis*, 1999. **20**: p. 818-825.
100. **Carter R. A., Yeoman K. H., Klein A., Hosie H. F., Sawers G., Poole P. S. and Johnston A. W. B.** *dpp* genes of *Rhizobium leguminosarum* specify uptake of δ -aminolevulinic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2002. **15**: p. 69-74.
101. **Summers M. L., Elkins J. G., Elliott B. A. and McDermott T. R.** Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1998. **11**: p. 1094-1101.
102. **Lambert A., Osteras M., Mandon K., Poggi M. C. and Le Rudulier D.** Fructose uptake in *Sinorhizobium meliloti* is mediated by a high-affinity ATP-Binding Cassette transport system. *J. Bacteriol.*, 2001. **183**: p. 4709-4717.
103. **Tapias A. and Barbe J.** Regulation of divergent transcription from the *uvrA*-*ssb* promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.*, 1999. **262**: p. 121-130.

104. **Palacios J. M., Murillo J., Leyva A., Ditta G. and Argueso T. R.** Differential expression of hydrogen uptake (*hup*) genes in vegetative and symbiotic cells of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.*, 1990. **221**: p. 363-370.
105. **Alvarez R., Nissen S. J. and Sutter E. G.** Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila Mill*) rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. *Plant Physiol.*, 1989. **89**: p. 439-443.
106. **Fraenkel D. G. and Levisohn S. R.** Glucose and gluconate metabolism in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase. *J. Bacteriol.*, 1967. **93**: p. 1571-1578.
107. **Ling K. H., Paetkau V., Marcus F. and Lardy H. A.** Phosphofructokinase. *Methods Enzymol.*, Vol. IX. **77**: p. 425-429.
108. **Josephson B. L. and Fraenkel D. G.** Transketolase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1969. **100**: p. 1289-1295.
109. **Tsolas O. and Joris L.** Transaldolase. *Methods Enzymol.*, Vol. XLII. **47**: p. 290-297.
110. **Allenza P. and Lessie T. G.** *Pseudomonas cepacia* mutants blocked in the Entner-Doudoroff pathway. *J. Bacteriol.*, 1982. **150**: p. 1340-1347.
111. **Weitzman P. D. J.** Citrate Synthase from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **5**: p. 22-26.
112. **Fansler B. and Lowenstein J. M.** Aconitase from Pig Heart. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **6**: p. 26-28.
113. **Reed L. J. and Mukherjee B. B.** α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **12**: p. 55-61.
114. **Bridger W. A., Ramaley R. F. and Boyer P. D.** Succinyl Coenzyme A Synthase from *E. coli*. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **14**: p. 70-71.
115. **King T. E.** Preparation of Succinate Dehydrogenase and Reconstitution of Succinate Oxidase. *Methods in Enzymol.*, Vol. X. **58**: p. 322-331.
116. **Hill R. L. and Bradshaw A.** Fumarase. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **17**: p. 91-93.
117. **Kitto B. G.** Intra- and Extramitochondrial Malate Dehydrogenase from Chicken and Tuna Heart. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **19**: p. 106-107.

118. **Saubert W. and Weicker H.** Pyruvate carboxylase from *Pseudomonas*. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **40**: p. 258-262.
119. **McFadden A. B.** Isocitrate lyase. *Methods in Enzymol.* Vol. XIII. **29**: p. 163-165.
120. **Dixon G. H. and Kornberg H. L.** Malate Synthase from Baker's Yeast. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **86**: p. 633-634.
121. **Takeda Y., Suzuki F. and Inoue H.** ATP Citrate Lyase. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **27**: p. 153-155.
122. **Pruss B. M. and Wolfe A. J.** Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1994. **12**: p. 973-984.
123. **Lowenstein J. M.** Chemical methods for citrate and aconitate. *Methods in Enzymol.*, Vol. XIII. **66**: p. 513-515.
124. **Jensen P. R. and Michelsen O.** Carbon and energy metabolism of *atp* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1992. **174**: p. 7635-7641.
125. **Hattori N., Sakakibara T., Kajiyama N., Igarashi T., Maeda M. and Murakami S.** Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride. *Anal. Biochem.*, 2003. **319**: p. 287-295.
126. **Law J. H. and Slepecky R. A.** Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.*, 1961. **82**: p. 33-42.
127. **Senior P. J. and Dawes E. A.** The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.*, 1973. **134**: p. 225-238.
128. **Guerreiro N., Redmond J. W., Rolfe B. G. and Djordjevic M. A.** New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997. **10**: p. 506-516.
129. **Bradford M. M.** *Anal. Biochem.*, 1976. **72**: p. 248-254.
130. **Jensen H. L.** Nitrogen fixation in leguminous plant. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium*. *Aust. Proc. Linn. Soc.*, 1942. **66**: p. 98-108.
131. **Hardy R. W. F., Burns R. C. and Holston R. D.** Applications of the acetylene reduction assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem.*, 1973. **5**: 47-81.
132. **Mertens E.** Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS Lett.*, 1991. **285**: p. 1-5.

133. **Hirsch A. M., Bang M. and Ausubel F. M.** Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif*: Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 1983. **155**: p. 367-380.
134. **Lodwig E. M., Leonard M., Marroqui S., Wheeler T. R., Findlay K., Downie J. A. and Poole P.S.** Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2005. **18**: p. 67-74.
135. **Zou Y., Crowley D. J. and Van Houten B.** Involvement of molecular chaperonins in nucleotide excision repair. DnaK leads to increased thermal stability of UvrA, catalytic UvrB loading, enhanced repair, and increased UV resistance. *J. Biol.Chem.*, 1998. **273**: p. 12887-12892.
136. **Thoms B. and Wackernal W.** Interaction of RecBCD enzyme with DNA at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: requirement for DNA end processing. *J. Bacteriol.*, 1998. **180**: p. 5639-5645.

