



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

"BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED ECOLOGIA"

XXX CICLO

Regolazione trascrizionale del metabolismo della prolina in riso (*Oryza sativa* L.)

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Pierluigi Viaroli

Tutore:

Prof. Giuseppe Forlani

Dottorando: Dr. **Marco Zarattini**

A.A. 2014/2017

*A te nonno Emilio,
che con la tua semplicità d'animo
mi hai insegnato cos'è la Resistenza.*

INDICE

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Impatto socio-economico e ambientale degli stress abiotici e biotici	1
1.1.1. Variazioni del clima, effetto serra e surriscaldamento globale	3
1.1.2. Perdita di produttività delle colture indotta dagli stress abiotici	5
1.1.3. La siccità e lo stress salino come due facce della stessa medaglia	7
1.1.4. Importanza della ricerca biotecnologica sugli stress biotici e abiotici.....	10
1.2. La trascrizione genica.....	12
1.2.1. Le RNA polimerasi eucariotiche	13
1.2.2. Il ciclo trascrizionale della RNA polimerasi II	14
1.2.3. Il promotore minimo e la interazione enhancer-promotore	15
1.2.4. Principali classi di fattori di trascrizione in Arabidopsis e riso	18
1.2.5. Network di regolazione trascrizionale per il signaling degli stress abiotici	21
1.3. Lo stress iperosmotico	23
1.3.1. Trasduzione del segnale in risposta allo stress osmo-salino.....	24
1.3.2. Come la pianta percepisce lo stress: gli osmosensori.....	25
1.3.3. Trasduzione del segnale mediata dal Ca ²⁺	27
1.3.4. MAPKs (Mitogen Activated Proteins Kinases).....	30
1.3.5. SnRK (Sucrose nonfermenting Related Kinases).....	32
1.3.6. SOS (Salt Overly Sensitive) pathway	34
1.4. Risposte fisiologiche-molecolari indotte dall'acido Abscissico (ABA) nello stress osmotico	36
1.4.1. Signaling ABA-dipendente.....	39
1.4.2. Signaling ABA-indipendente.....	41
1.5. Gli osmoliti compatibili	42
1.6. Il metabolismo della prolina	44
1.6.1. La via biosintetica del glutammato	45
1.6.2. La via biosintetica dell'ornitina	48
1.6.3. Il catabolismo della prolina	49
1.6.4. Differenze fra procarioti ed eucarioti	51
1.7. Regolazione del metabolismo della prolina.....	54

1.7.1.	Regolazione della biosintesi della prolina in condizioni di stress osmo- salino	55
1.7.2.	Regolazione del catabolismo della prolina in condizioni di stress osmo- salino	57
1.7.3.	Regolazione del metabolismo della prolina mediata dai ROS	60
1.8.	Ruolo della prolina durante la morte cellulare programmata (Programmed Cell Death)	63
1.9.	Ruolo della prolina nella regolazione dello stato redox della cellula	65
1.10.	Applicazioni biotecnologiche dell'ingegnerizzazione del metabolismo della prolina	67
1.11.	Scopo del lavoro	69
2.	MATERIALI E METODI	70
2.1.	Crescita di colture cellulari in sospensione liquida e di plantule di riso	70
2.2.	Induzione di stress iperosmotico e trattamenti con prolina esogena, ABA e aminoacidi in colture cellulari in sospensione liquida	71
2.3.	Test di vitalità cellulare di Evans	72
2.4.	Misurazione della prolina e degli aminoacidi liberi con il metodo della ninidrina	72
2.5.	Espressione ectopica degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina	73
2.5.1.	Amplificazione dei plasmidi nel ceppo TOP10 di <i>E. coli</i> e successiva purificazione (MidiPrep)	74
2.5.2.	Trasformazione del ceppo BL21(DE3) pLysS di <i>E. coli</i>	74
2.5.3.	Espressione eterologa nel ceppo BL21(DE3) pLysS di <i>E. coli</i>	76
2.5.4.	Purificazione delle proteine espresse in <i>E. coli</i> mediante cromatografia per affinità su colonna HIS-Select	76
2.6.	Determinazione del contenuto proteico (metodo di Bradford)	77
2.7.	Separazione delle proteine mediante elettroforesi (SDS-PAGE)	78
2.8.	Saggi dell'attività in vitro della P5C sintetasi di riso	79
2.9.	Analisi dell'espressione genica	79
2.9.1.	Estrazione dell'RNA totale	79
2.9.2.	Trattamento con DNAsi e retrotrascrizione dell'RNA in cDNA	80
2.9.3.	Valutazione della bontà dei cDNA mediante PCR end point	80
2.9.4.	PCR quantitativa in tempo reale (qPCR)	82
2.9.5.	Elaborazione dati	84
2.10.	Analisi "in silico" delle regioni promotrici dei geni biosintetici della prolina	86
2.11.	Analisi dell'ontologia genica (GO)	86

3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	87
3.1.	Purificazione parziale delle due isoforme della P5C sintetasi (P5CS) di riso	87
3.2.	Prove di estrazione proteica dai corpi di inclusione	89
3.3.	Prove di attività della P5CS	91
3.4.	Individuazione della posizione genomica dei promotori dei geni della biosintesi di prolina	92
3.5.	L'analisi " <i>in silico</i> " dei promotori dei geni della biosintesi di prolina ha evidenziato un elevato numero di sequenze regolatrici in <i>-cis</i> e di putative famiglie di TF	94
3.6.	Modello teorico di regolazione trascrizionale della biosintesi di prolina ABA-dipendente e ABA-indipendente	100
3.7.	Individuazione di putativi TF e analisi dell'ontologia genica	103
3.8.	Valutazione della regolazione dell'anabolismo della prolina a seguito di trattamenti con auxina in riso	107
3.9.	Analisi dei livelli di espressioni in colture di riso trattate con polietilenglicole (PEG)	111
3.10.	Analisi dei livelli di espressioni in colture di riso trattate con prolina	113
4.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	117
5.	APPENDICE	121
5.1.	Sequenze analizzate " <i>in silico</i> " per l'individuazione delle sequenze CRE (<i>-cis</i> regulatory elements)	121
6.	BIBLIOGRAFIA	123
7.	PUBBLICAZIONI	135

ABSTRACT

As the world population grows constantly the food demand gets considerably higher. Along with the global climate changes this menace threatens food security worldwide, with a particular emphasis on developing countries. Moreover, within the scientific community there is a strong consensus that climate change–driven water scarcity, rising global temperatures and extreme weather will have severe long-term effects on crop yields.

Upon exposure to water-related stresses, plants activate a wide range of molecular and cellular responses, including morphological and developmental changes, ion adjustment as well as specific transcriptional reprogramming and signal transduction. A common response triggered by low water potential and high salinity is the cellular accumulation of non-toxic compounds called compatible osmolytes (CO). CO are low-molecular-weight metabolites, which include sugars, quaternary ammonium compounds and amino acids. Besides their role as osmoprotectant, CO have different functions such as stabilization of sub-cellular structures and free radicals scavenging. The importance of each osmolyte varies among species and following different environmental conditions, yet widely found is the imino acid proline.

Proline has long been known to play a key role as compatible osmolyte following drought and salinity stress, but increasing evidence also supports its involvement in plant responses to pathogen attacks, low temperature, heavy metals, nutrient deficit as well as in the regulation of the cellular redox-state. This requires that proline accumulation is regulated by numerous and different pathways. In plants, proline can be synthesized by two routes. Under high nitrogen availability and normo-osmotic conditions, ornithine is converted into pyrroline-5-carboxylate (P5C) by an ornithine- δ -aminotransferase. On the other hand, under hyperosmotic condition proline is synthesized from glutamate, which is reduced to proline by two enzymes, namely P5C synthetase (P5CS) and P5C reductase (P5CR). The catabolism proceeds through two oxidations catalyzed by proline dehydrogenase (ProDH) and P5C dehydrogenase (P5CDH), leading to the re-conversion of proline to glutamate.

The transcriptional and post-translational regulation underlying this metabolism is not yet fully understood. The present work focuses on the understanding of the transcriptional regulation of proline metabolism (a particular emphasis was placed towards the biosynthetic route) and on the biochemical characterization of two enzymes involved in proline biosynthesis such as the *P5CS1* and *P5CS2* in rice. Gene expression is regulated by Transcription Factors (TFs) binding to different *-cis*

regulatory elements (CRE) in the promoter region, therefore modulating transcription initiation. In order to identify different CREs in proline biosynthetic genes in rice, 1000 bp upstream of translation start site (ATG) of each gene were selected and analyzed “in silico” by using PlantPAN 2.0, a specific software for rice sequences. A total of 28 different classes of CRE were detected in *OsP5CS1*, *OsP5CS2* and *OsP5CR* promoters. These elements were then used to draw a structural map as well as two theoretical models for the transcriptional regulation mediated by ABA-dependent and ABA-independent pathways. Furthermore the “*in silico*” analysis revealed that other hormones might act on proline biosynthesis, such as auxin. qPCR analysis was then performed to evaluate the genes expression profiles following different treatments with osmotic stress or phytohormones. Due to problems with protein purification and the low enzymatic activity observed for the P5CS enzymes, only a partial characterization has been reached. Overall, the present work contributes to shed light on the complex transcriptional regulation underlying proline biosynthesis in rice.

1. INTRODUZIONE

1.1. Impatto socio-economico e ambientale degli stress abiotici e biotici

Le piante in quanto organismi sessili sono continuamente soggette a una vasta gamma di stress, i quali possono esser indotti sia da condizione pedoclimatiche sfavorevoli che dalla predazione da parte di organismi patogeni ed erbivori. Con la parola stress si definisce un fattore esterno che influenza la sopravvivenza, la crescita, le rese o i processi di assimilazione primari (come la CO₂ e l'assorbimento dei minerali) di una pianta al di sotto dei suoi livelli ottimali (Taiz and Zeiger, 2009). In base alla natura del fattore che causa un determinato stress si distinguono due grandi categorie: gli stress abiotici e quelli biotici. In particolare gli stress abiotici sono generati da quei fattori costituenti un determinato ecosistema e che non possiedono "vita propria" (dal greco "bios", vita, preceduto dal prefisso "a", senza), tra i quali si annoverano l'eccesso di irradiazione luminosa, la carenza idrica, l'elevata salinità, la carenza di microelementi e le temperatura estreme. Si definiscono stress biotici invece gli stress generati da organismi "viventi", come batteri, virus, funghi, nematodi ed insetti (Fig. 1). Le piante devono quindi adattarsi velocemente alle condizioni ambientali mutevoli. Difatti tra le grandi sfide della "Biologia moderna" vi è decifrare e capire nel dettaglio come la pianta percepisce il segnale esterno di stress. D'altro canto lo studio della trasduzione del segnale e di come le diverse vie di segnale agiscono ed interagiscono tra loro nella risposta allo stress risulta essere uno dei punti cardine nella futura ricerca in questo campo (Yoshida et al., 2014).

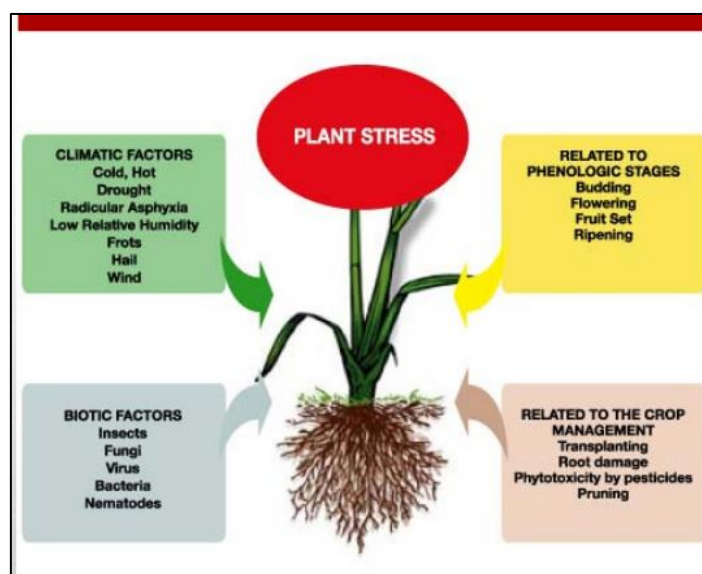


Fig. 1: rappresentazione dei principali stress abiotici e biotici per le colture vegetali.

L'impatto degli stress biotici e abiotici in agricoltura è rilevante in termini di perdite di rese delle colture tanto che, secondo alcune stime, molte specie coltivate non superano il 20% del proprio potenziale genetico produttivo (Boyer, 1982). Sebbene negli ultimi 50 anni, a livello globale, la superficie coltivata sia aumentata del 12%, la distribuzione delle terre e delle risorse idriche non favorisce i Paesi che hanno bisogno di produrre maggiormente nel prossimo futuro. La disponibilità media di terra coltivata pro-capite nei paesi a basso reddito è meno della metà di quella dei paesi ad alto reddito ed è generalmente meno adatta alla coltivazione (www.foodsustainabilityreport.org). Nel frattempo, la crescente pressione demografica e il benessere di fasce sempre più ampie di popolazione sta portando ad un nuovo aumento della domanda di produzione alimentare che, al 2050, è stimata crescere del 70% rispetto al 2009, con picchi del 100% nei paesi in via di sviluppo. A livello sociale, tali perdite di produttività sono fattori minacciosi per la sicurezza alimentare. A conferma di ciò, un'analisi effettuata dalla *Food and Agriculture Organization* (FAO), atta alla valutazione della sicurezza alimentare globale, ha evidenziato come, nel 2007, ben 75 milioni di persone in più rispetto agli anni 2003-05 siano risultate essere malnutrite (FAO, 2008). Paradossalmente però, sempre in base alle stime effettuate dalla FAO, nonostante le perdite dovute agli stress ambientali siano ingenti, l'attuale produzione agricola complessiva mondiale garantirebbe una quantità di calorie pro-capite superiori alle necessità giornaliere di una popolazione di dodici miliardi di persone (FAO 2010). Questo paradosso è spiegabile se vengono considerate le forti disuguaglianze sociali all'accesso al cibo. Nei paesi sviluppati l'abbondanza di cibo sta progressivamente comportando un preoccupante aumento di patologie legate ad un'alimentazione ipercalorica, quali l'obesità e le malattie cardiovascolari, mentre fame e malnutrizione regnano sovrane nei paesi del "Terzo mondo". Una delle principali cause di tale scenario è di natura economica e consiste nel prezzo delle materie prime commercializzate attraverso mercati globalizzati. Sebbene nel XX secolo il prezzo delle derrate alimentari fosse gradualmente diminuito, significativi aumenti sono stati registrati dalla presentazione del *Fourth Assessment Report* (AR4) emanato dall'*Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) (IPCC, 2007) (Fig. 2). Tra i principali fattori responsabili del rialzo del prezzo del cibo osservato tra il 2008-09 e tra il 2011-12 vi sono da un lato l'aumento della domanda di materie prime per la produzione di biocarburanti (situazione definita anche come il paradosso del cibo: competizione tra cibo e biocarburanti) e l'impatto degli eventi meteorologici estremi dall'altro (Porter et al., 2014). Senza attenzione e rispetto verso i beni della natura non si riuscirà mai a stabilire un ordine che garantisca la sicurezza globale. Pertanto, attuare strategie per incrementare la produttività delle risorse equivale ovunque ad una politica di pace. Non

si può pensare di ottenere una maggiore giustizia nel mondo diffondendo su scala planetaria il modello di benessere occidentale, perché esso ha un costo troppo alto, spreca troppe risorse e finirà per distruggere la biosfera. Lo sviluppo è di fronte quindi a un bivio: o continuiamo a escludere dalla ricchezza la maggior parte degli abitanti della Terra oppure modifichiamo il nostro modello di benessere affinché tutti possano usufruirne senza rendere inospitale il pianeta (Sachs and Santarius, 2007).

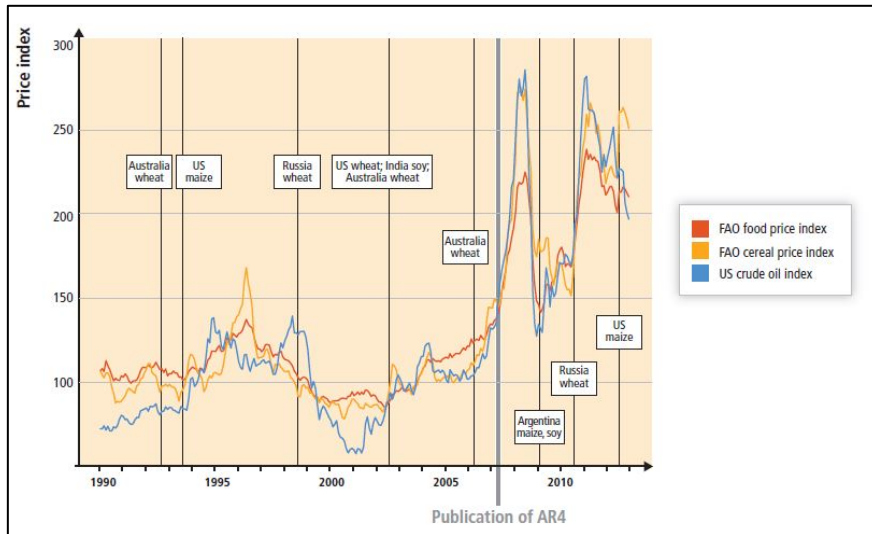


Fig. 2: variazioni storiche degli indici del prezzo del cibo, dei cereali e dell'olio crudo americano (Porter et al., 2014).

1.1.1 Variazioni del clima, effetto serra e surriscaldamento globale

Il clima di un luogo è, per definizione, lo stato atmosferico che lo caratterizza nelle sue manifestazioni meteorologiche tipiche. Il concetto di clima in sé, in senso generale, non si limita semplicemente alla valutazione dei suoi valori medi, né prevede una condizione statica, bensì la variabilità ha sempre avuto una grande importanza nella determinazione di un definito clima. Come si nota nella figura 3, nel corso della storia, il clima terrestre è variato costantemente alternando cicli periodici molto freddi, quali le ere glaciali, a successivi periodi più miti, le così dette ere interglaciali. Queste fluttuazioni sono state causate sia da fattori naturali come le variazioni periodiche dell'orbita terrestre che da cambiamenti della composizione dell'atmosfera (Zhang et al., 2015; Lohmann et al., 2004). Con l'avvento della rivoluzione industriale le attività antropiche sono aumentate considerevolmente nel tempo e con loro anche le concentrazioni di CO₂ atmosferiche (Fig. 3).

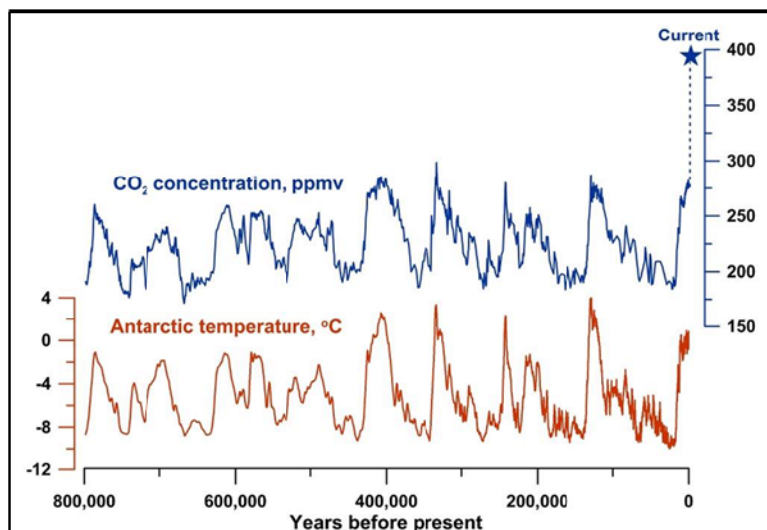


Fig. 3: andamenti climatici storici. Variazioni storiche della [CO₂] e delle temperature antartiche medie registrate nella stazione internazionale Concordia situata sul monte "Dome C" in Antartide. Ai giorni nostri è osservabile un picco di [CO₂] mai raggiunto in precedenza (Jouzel et al., 2007)

L'anidride carbonica è uno dei principali gas ad "effetto serra" e molti scienziati concordano sul fatto che la principale causa dell'attuale surriscaldamento globale sia dovuto a tale fenomeno (Oreskes, 2004). Per capire più nel dettaglio il problema è necessario specificare che entro una certa soglia l'effetto serra è un fenomeno indispensabile alla vita sul pianeta. Circa il 30% dei raggi solari viene riflesso nello spazio mentre il restante 70% in parte viene assorbito dalle superfici oceaniche e terrestri ed in parte viene assorbito dall'atmosfera. Una volta che la terra si è riscaldata, questa rilascia energia sotto forma di radiazioni infrarosse termiche che dalla superficie viaggiano verso l'atmosfera, dove vengono in parte riassorbite dal vapore acqueo e dai gas serra longevi (CO₂ e CH₄). Nel corso degli ultimi 250 anni, un considerevole aumento delle concentrazioni dei gas ad effetto serra (+38% CO₂ e +148% CH₄) è stato generato sia a causa del grande utilizzo di carburanti fossili che dalla crescente deforestazione (NASA, 2010). Tale aumento di gas nell'atmosfera ha indotto un aumento dell'efficienza dell'effetto serra generando così un aumento delle temperature globali (Fig. 3). Una recente studio svolto dagli scienziati afferenti al *Goddard Institute for Space Studies* (GISS) della Nasa, che si prefiggeva la valutazione delle temperature medie globali registrate tra il 1980 al 2016, ha difatti evidenziato come l'anno 2016 sia risultato il più caldo degli ultimi decenni con 1,78 gradi Fahrenheit (0,99°C) in più rispetto alle precedenti annate (NASA, 2017).

Il tasso di crescita e di sviluppo di una determinata pianta è fortemente dipendente dalle temperature dell'aria circostante tant'è che ogni singola specie è caratterizzata dal poter tollerare un definito range di temperature con un minimo e un massimo

all'interno dei quali è capace di crescere e un optimum nel quale la pianta cresce ottimamente (Fig. 4). In generale, il tasso di crescita vegetale rallenta quando le temperature superano l'*optimum* della specie in esame mentre cessa quando tale specie viene esposta alle temperature poste ai vertici del proprio range tollerato (Hatfield et al., 2015). Stime e predizioni effettuate dall'IPCC

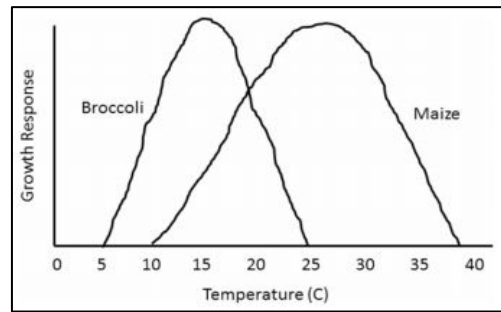


Fig. 4: effetto delle temperature sul tasso di crescita di due specie quali il mais e i broccoli (Hatfield and Prueger, 2015).

indicano che nei prossimi 30-50 anni le temperature aumenteranno di 2-3°C. In parallelo si prevede che ondate di calore anomale ed eventi di temperature estreme diventeranno sempre più intensi e frequenti di quello che è stato osservato fino ad ora (Meehl et al., 2007). Le ondate di calore potranno essere di breve-media durata (qualche giorno) dove le temperature aumenteranno anche fino a 5°C al di sopra delle temperature medie stagionali. Un articolo pubblicato recentemente (Barlow et al., 2015) sull'effetto delle temperature estreme in piante di grano ha rivelato che il congelamento causa principalmente sterilità e l'aborto della granella già sviluppata mentre l'eccessivo calore causa una sensibile diminuzione delle rese insieme ad una sensibile riduzione del periodo di maturazione della granella. Quanto riportato risulta essere solamente un esempio dei possibili danni causati da un innalzamento delle temperature medie terrestri. In ogni modo se i cambiamenti climatici previsti per i prossimi 30 anni avverranno, la comprensione dell'impatto che questi avranno sulla crescita e lo sviluppo delle piante risulterà di primaria importanza nell'aiutare la comunità scientifica e gli agricoltori a sviluppare strategie di adattamento e di resistenza riparatorie.

1.1.2 Perdita di produttività delle colture indotta dagli stress abiotici

Attualmente la produzione agricola globale sta affrontando tanto importanti quanto critiche sfide rivolte alla massimizzazione delle rese in un periodo storico nel quale l'agricoltura risulta essere fortemente lesa e le strategie riparatorie di intervento necessitano una sempre maggiore sostenibilità a livello ambientale (Ricroch et al., 2015). Difatti, fra le principali sfide che oggi giorno l'agricoltura si trova ad affrontare vi sono quelle di contrastare i danni indotti rispettivamente da fattori ambientali sempre più ostili, da mutevoli malattie causate da patogeni, dalla perdita di diversità genetica e dai cambiamenti climatici in continua evoluzione. Fra gli stress abiotici, la siccità risulta essere il fattore più impattante e diffuso tant'è che a livello globale è stato stimato che

più di un quarto delle aree arabili totali risultano essere aride mentre un terzo delle terre coltivate risultano essere caratterizzate da una situazione di scarsità d'acqua (Kirigwi et al. 2004). In termini di perdite di rese agricole il secondo più importante stress abiotico globale è rappresentato dallo stress salino. La superficie terrestre consiste di circa $13,2 \times 10^9$ ha, dei quali 7×10^9 ha rappresentano la superficie totale di terra arabile mentre solamente $1,5 \times 10^9$ ha sono coltivati. Di tutta le zone coltivate circa $0,34 \times 10^9$ ha (23%) sono zone saline mentre l'altro $0,56 \times 10^9$ ha (37%) risultano essere terreni sodici (Shahid and Rahman, 2007). Un altro importante fattore di stress abiotico è rappresentato dalle elevate temperature, considerato tale quando le temperature sono di 10-15 °C superiori delle temperature ambientali medie; comunque la probabilità della comparsa di questo stress dipende fortemente anche dal periodo (stagione, giorno/notte) nel quale tale fenomeno compare. Le elevate temperature possono condurre all'alterazione della distribuzione geografica di una data specie così come all'alterazione della stagionalità di una pianta influenzando e anticipando fortemente il periodo di maturazione della stessa (Porter 2005). Altri fattori ambientali, causanti danni di intensità relativamente inferiore ma altrettanto importanti, sono rappresentati dai contaminanti ambientali come la presenza nel suolo di metalli pesanti, di pesticidi e di fertilizzanti, così come prodotti petroliferi e composti chimici sia organici che inorganici. Analogamente, una cattiva gestione del terreno e il ricorso a pratiche agricole non sostenibili sono fattori minaccianti la produzione agricola mondiale (Shahid and Rahman, 2007). A livello complessivo si pensa che gli stress di natura abiotica siano responsabili fino al 70% delle perdite produttive delle principali colture alimentari, causando sia una drastica perdita economica che una seria minaccia per la sicurezza alimentare (Cramer et al., 2011). In aggiunta agli stress abiotici, anche gli stress biotici indotti da insetti, parassiti e patogeni di diversa natura contribuiscono significativamente alla perdita delle rese, anche se in maniera decisamente inferiore rispetto a quanto registrato per gli stress abiotici. Un'indagine svolta nel 2008 dall'azienda chimico-farmaceutica Bayer ha indicato come la perdita delle rese agricole causata dagli stress sia stata significativamente maggiore rispetto alle rese medie annue ottenute per le principali colture di interesse agronomico (mais, grano, soia, miglio, avena e orzo) (Bayer Crop Science, 2008). Dall'analisi si evince anche come le perdite dovute agli stress abiotici siano state significativamente maggiori rispetto a quelle causate dagli stress biotici (Fig. 5). La perdita maggiore nelle rese è stata osservata per il miglio, una coltura che viene principalmente coltivata in zone aride o semi-aride. La resa media globale stimata era di 3000 kg/ha mentre le perdite dovute agli stress biotici e abiotici sono state rispettivamente 1000 e 16000 Kg/ha. Analogamente, le rese medie globali di mais nel 2008 sono state di 4500 Kg/ha

mentre le perdite dovute sempre agli stress biotici e abiotici erano 2000 e 12000 Kg/ha. La terza coltura più impattata è stata il grano con perdite medie di 1000 e 11500 kg/ha (Fig. 5).

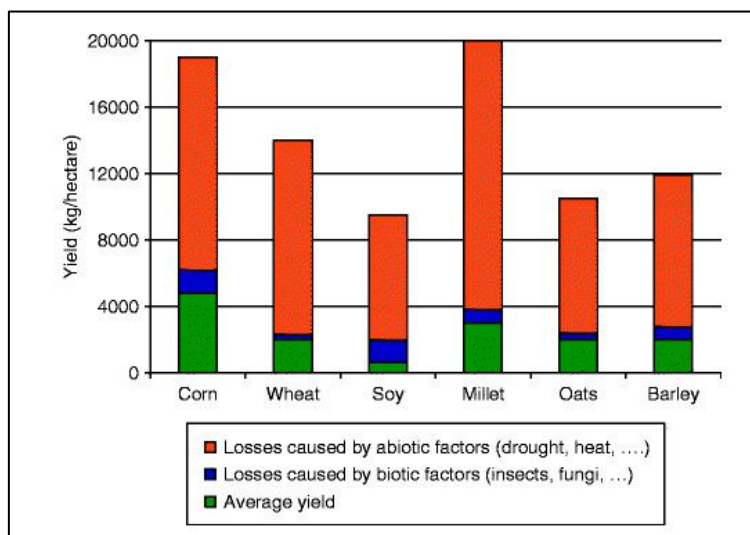


Fig. 5: stime delle perdite di coltura indotte dagli stress biotici e abiotici (Bayer Crop Science 2008).

1.1.3. La siccità e lo stress salino come due facce della stessa medaglia

“La condizione di siccità non è causata solamente dalla scarsità di piogge o dalle alte temperature ma può presentarsi anche a seguito di un sovra utilizzo delle risorse idriche”, disse David Miskus, esperto meteorologo afferente al *National Oceanic and Atmospheric Administration's Climate Prediction Center*. A sostegno di ciò già negli anni '80 due ricercatori americani, Wilhite e Glantz, notarono che nella letteratura scientifica erano presenti oltre 150 definizioni di siccità per cui decisero di meglio definire questo scenario ed in base alla natura delle cause scatenanti tale condizione coniarono quattro grandi categorie: la siccità meteorologica, idrologica, agricola e socio-economica. In particolare:

- la siccità meteorologica è correlata con la frequenza, la quantità e i periodi delle precipitazioni peculiari di una determinata regione.
- La siccità agricola mette in correlazione l'impatto che le condizioni meteorologiche hanno sull'agricoltura, considerando tutti quei parametri relazionati alla disponibilità d'acqua da un lato e allo stadio di sviluppo della pianta dall'altro (caratteristiche biologiche, proprietà del suolo, umidità relativa ecc.).

- La siccità idrologica si riferisce alla persistenza dei bassi volumi idrici nei corsi d'acqua, nei fiumi e nei serbatoi naturali. Questa tipologia di siccità è fortemente influenzata dalle attività antropiche.
- La siccità socio-economica invece si verifica quando la domanda di acqua eccede l'offerta. Esempi di questa tipologia di siccità includono l'eccesso di irrigazione o l'utilizzo massiccio dei flussi d'acqua per la produzione di energia idroelettrica o per altre attività antropiche (Wilhite and Glantz, 1985).

A livello biologico invece lo stress idrico può essere definito come una situazione nella quale la quantità d'acqua disponibile per la pianta risulta insufficiente a compensare il processo di traspirazione delle colture per cui il potenziale idrico ed il turgore cellulare vengono ridotti a tal punto da interferire con le normali funzioni fisiologiche della pianta (Tuberosa, 2012). Quando si parla di stress idrico (*water stress*) si considera una situazione di perdita moderata d'acqua che conduce alla chiusura stomatica e alla limitazione dello scambio gassoso con l'esterno mentre con il termine disidratazione (*desiccation*) si considera uno stress più severo che può potenzialmente portare alla perturbazione del metabolismo primario e delle strutture cellulari così come ad una cessazione delle reazioni catalizzate da enzimi. Tali condizioni possono indurre l'appassimento fogliare (*wilting*), la diminuzione dell'allungamento cellulare e della crescita della pianta fino ad arrivare ad un arresto del processo fotosintetico, disturbi metabolici e la morte cellulare (Shao et al., 2008).

Con il termine salinità invece ci si riferisce alla presenza nel suolo o nell'acqua di soluti in concentrazioni dannose per la maggior parte delle colture agricole. Frequentemente le condizioni di carenza d'acqua e di aridità possono condurre alla salinizzazione del suolo. Lo stress indotto dalla siccità e quello indotto dalla salinità sono strettamente interconnessi tra di loro causando danni cellulari simili (Fig. 6). Ad esempio entrambi gli stress a livello cellulare si manifestano con un iniziale stress osmotico il quale provocherà uno squilibrio dell'omeostasi e della distribuzione ionica cellulare (Wang et al., 2003). Come conseguenza queste diverse condizioni di stress attivano vie di trasduzione del segnale simili per cui anche le risposte di tolleranza messe in atto dalla pianta risultano essere comuni (Seki et al., 2003). Uno schema generico delle risposte fisiologiche, biochimiche e molecolari provocate da ambedue gli stress è raffigurato nella figura 6. Sia la salinità che la siccità esercitano la loro tossicità alterando l'equilibrio osmotico cellulare. L'eccesso degli ioni Na^+ e la perturbazione osmotica verificatasi sotto forma di una diminuzione della pressione di turgore sono gli inneschi che conducono ad una cascata di eventi che possono essere raggruppati in due grandi pathways: dipendenti dallo stress osmotico o dallo stress ionico (Fig. 6) (Mahajan and

Tuteja, 2005). Questi stress a livello macroscopico si evidenziano con sintomi che vanno dalla clorosi fino ad arrivare alla necrosi fogliare, mentre a livello cellulare influenzano negativamente la divisione cellulare conducendo ad un rallentamento della crescita della pianta. La riduzione dell'espansione fogliare risulta essere benefica per la pianta in quanto l'area esposta alla traspirazione viene ridotta diminuendo così anche la perdita d'acqua. Sempre in questo contesto, come strategia di adattamento, le piante possono sacrificare le loro foglie più vecchie riducendo ulteriormente il tasso di traspirazione fogliare. Inoltre, un abbassamento del rapporto fra gli apici vegetativi e le radici sembra possa avere effetti positivi in condizioni di stress osmotico (Carmo-Silva et al., 2009) A livello biochimico-molecolare il danno cellulare può verificarsi sia attraverso la denaturazione delle proteine sia attraverso la produzione di radicali dell'ossigeno (ROS) con una conseguente perturbazione dell'integrità delle membrane cellulari (Mahajan and Tuteja, 2005). Per far fronte a questi danni la pianta è capace di innescare precisi processi di detossificazione che prevedono l'espressione di geni codificanti per i chaperoni molecolari, per diverse proteinasi così come ulteriori enzimi responsabili dello scavenging dei ROS (Fig. 6). Tali processi servono per il controllo e il riparo del danno indotto dallo stress osmo-salino risultando così utili nella tolleranza (Mahajan and Tuteja, 2005).

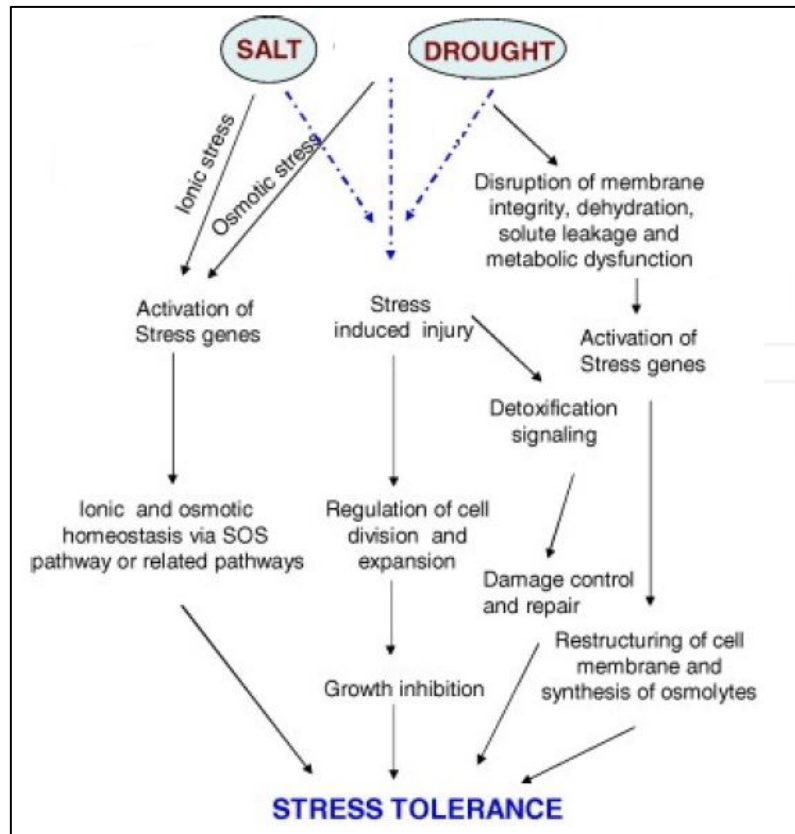


Fig. 6: rappresentazione generale dei danni cellulari e delle conseguenti risposte di tolleranza messe in atto dalle piante a seguito di stress salino e siccità.

1.1.4. Importanza della ricerca biotecnologica sugli stress biotici e abiotici

Oggi, la portata e il ritmo dei progressi scientifico-tecnologici nel campo delle biotecnologie vegetali sono senza precedenti nella storia umana. Numerosi approcci sperimentali sono stati sviluppati per migliorare il contenuto nutrizionale degli alimenti, per combattere i parassiti in maniera più sostenibile, per aumentare la produttività agricola e per poter sviluppare piani agricoli anche in regioni dove persistono condizioni ambientali ostili (Marrapese and Matthews, 2014). Nel corso del XX secolo il miglioramento genetico classico (breeding) ha contribuito significativamente allo sviluppo di varietà tolleranti, attraverso questo approccio, però, il tempo richiesto per lo sviluppo di nuove varietà è estremamente elevato e le limitazioni dovute alla compatibilità sessuale hanno permesso solamente l'ibridazione tra specie simili o molto affini (Brescaglio, 2013). Negli anni '80, l'ottenimento di nuovi geni chimerici portò ad un ampliamento delle tecnologie per la produzione di piante GM (Fraley et al., 1983), di nuovi vettori di espressione vegetale, (Bevan, 1984), e di nuovi sistemi di trasferimento del DNA (Fromm et al., 1985; Sanford et al., 1987) aprendo così una nuova finestra di successo per le biotecnologie vegetali. I vari metodi di trasformazione oggi disponibili sono classificati come diretti o indiretti. Attualmente i metodi di trasformazione diretti più utilizzati sono il bombardamento cellulare con micro-particelle rivestite di DNA e la trasformazione dei protoplasti mentre il metodo di trasformazione indiretto più diffuso nei laboratori di tutto il mondo è basato sull'introduzione di DNA nella cellula vegetale mediante l'utilizzo dell'*Agrobacterium tumefaciens* (Fig. 7).

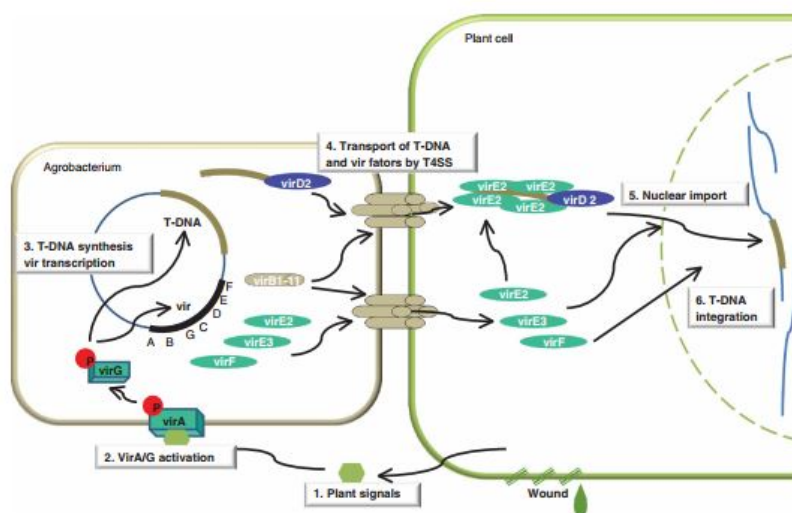


Fig. 7: raffigurazione semplificata del trasferimento e dell'integrazione del T-DNA di Agrobatterio nel genoma vegetale. (1) Diversi segnali chimici prodotti dalla pianta inducono l'attivazione dei geni per la virulenza (*virA/G*) dell'Agrobatterio i quali a loro volta attivano la sintesi del DNA transfer (T-DNA) (3). L'Agrobatterio trasferisce il T-DNA nella cellula vegetale attraverso un sistema di secrezione del IV tipo (TT4S) (4) il quale una volta entrato nel nucleo della cellula ospite (5) si andrà ad integrare nel genoma mediante ricombinazione illegittima (6).

L'Agrobacterium è un batterio gram negativo naturalmente presente nel uolo capace di trasferire alla pianta DNA esogeno (T-DNA) che si andrà a integrare nel genoma ospite (Hoekema, 1983). Attraverso l'ingegnerizzazione del T-DNA è stato possibile trasferire pressoché qualunque frammento di DNA creando così una varietà transgenica includente un tratto di interesse desiderato. I T-DNA sintetici possono essere ingegnerizzati con geni di qualsiasi origine rendendo potenzialmente possibile l'aggiunta di caratteri rari o del tutto assenti in una data specie o in quelle con essa sessualmente compatibili. Di conseguenza, tale tecnologia si è rivelata estremamente potente per conferire caratteristiche di grande utilità. A più di vent'anni dalla loro introduzione in agricoltura, le piante OGM sono coltivate su una superficie di circa 180 milioni di ettari, corrispondenti a circa 15 volte la superficie coltivata italiana e a più del 12% della superficie coltivata a livello globale (Altman, 1999).

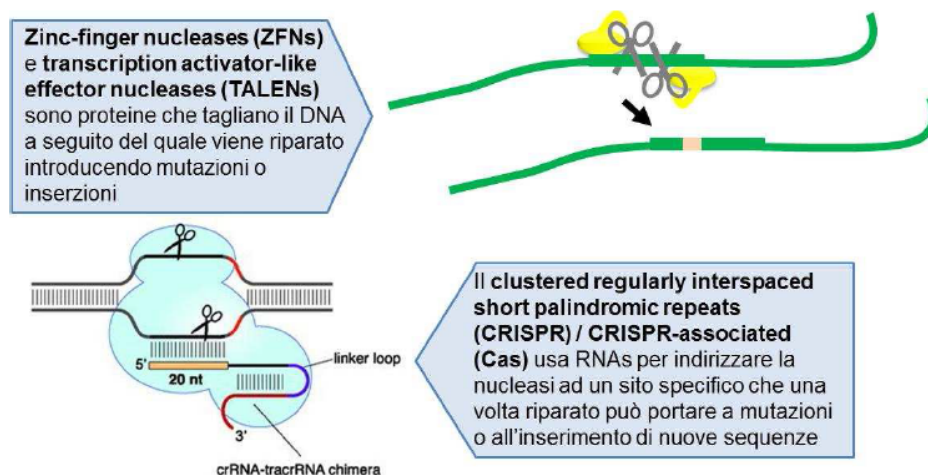


Fig. 8: rappresentazione del funzionamento della tecnica di “genome editing” CRISPR. Attraverso un taglio sito mirato e una successiva riparazione si può ottenere una mutazione, una sostituzione di uno o pochi nucleotidi o inserzione di DNA omologo o eterologo.

Negli ultimi anni sono state messe a punto nuove tecniche, definite “genome editing”. Queste tecnologie permettono di apportare modifiche a precise sequenze di DNA velocizzando enormemente i progressi nella ricerca biologica (Troost and Morgante, 2016). Attraverso queste tecnologie è stato difatti possibile oltrepassare una delle principali criticità della trasformazione mediata dall'Agrobacterium quale il problema dell'integrazione casuale del DNA esogeno nel genoma ospite. Difatti, il “genome editing” permette l'inserimento del DNA di interesse in maniera sito-specifica evitando così possibili disfunzioni indotte da integrazioni casuali nel genoma. Tra esse, il sistema più recente e promettente è la tecnica CRISPR (*Clustered Regularly*

Interspaced Short Palindromic Repeats) (Fig. 8), basata sull'utilizzo di Nucleasi Sito-Diretta (SDN). Questa tecnica utilizza l'enzima nucleasi Cas9 (CRISPR/Cas9) che è stato isolato dal batterio *Streptococcus pyogenes*.

Cas9 viene veicolato nel genoma tramite una molecola di RNA-guida che sarà disegnata in maniera specifica per il sito che deve riconoscere e mutagenizzare. La molecola di RNA-guida indirizza la nucleasi sul sito bersaglio dove la nucleasi taglierà il DNA per cui attraverso questa tecnologia è possibile ottenere vari risultati:

- mutazione casuali: la nucleasi opera il taglio nella molecola di DNA quindi il meccanismo di riparazione cellulare del DNA provvederà a risaldare le estremità. Questo processo di riparazione produce mutazioni nel sito scelto per il taglio che possono consistere in sostituzioni nucleotidiche oppure in un'addizione o in una perdita di uno o pochi nucleotidi.
- Mutazione con stampo di DNA: oltre all'utilizzo delle nucleasi, nella reazione di neo-sintesi viene accoppiata anche una molecola di DNA che nella cellula funziona come "stampo" per riparare la lesione del DNA. In questo modo, invece di ottenere mutazioni casuali si ottengono mutazioni specifiche su un determinato gene creandone così una variante (Jiang and Doudna, 2017).

La ricerca e lo studio nel campo delle biotecnologie agrarie costituisce quindi una promettente risorsa utile sia per mitigare l'impatto che i cambiamenti climatici hanno sull'agricoltura sia per fronteggiare l'aumento della richiesta di cibo derivante dalla crescente popolazione globale. Queste nuove tecniche sono relativamente semplici, economiche e veloci rappresentando così un'ottimo strumento per fronteggiare le future sfide dell'agricoltura globale (Marrapese and Matthews, 2014).

1.2 La trascrizione genica

La regolazione della trascrizione è uno dei più importanti processi che stanno alla base del controllo del funzionamento, della crescita e del differenziamento cellulare. La trascrizione è svolta dall'enzima RNA polimerasi (RNA pol) in comunione ad altri elementi definiti fattori di trascrizione (TF) generali, i quali cooperano nel riconoscimento e nella variazione conformazionale dei promotori (Hahn 2004). Sebbene la trascrizione genica proceda seguendo gli stessi meccanismi fondamentali in tutte le cellule (eucariotiche e procariotiche), negli eucarioti avviene in maniera decisamente più complessa rispetto a come avviene nei procarioti. Questa maggiore complessità è sostanzialmente spiegabile considerando tre grandi differenze:

- diversamente dai batteri, dove tutti i geni vengono trascritti da un'unica molecola di RNA polimerasi, le cellule eucariotiche contengono differenti tipologie di RNA polimerasi che trascrivono distinte classi di sequenze;
- le RNA polimerasi eucariotiche, per essere capaci di iniziare e regolare specificamente la trascrizione, devono *in primis* esser reclutate sul DNA in corrispondenza dei promotori, quindi interagiranno con ulteriori classi di proteine definite fattori di trascrizione generali;
- la trascrizione negli eucarioti è fortemente influenzata dallo stato fisico della cromatina piuttosto che dalle molecole di DNA libere, per cui anche le componenti cromatiniche rivestono un ruolo essenziale nei meccanismi di regolazione trascrizionale (Copper and Hausman, 2006).

Verosimilmente, si pensa che la maggiore complessità della trascrizione eucariotica faciliti la sofisticata regolazione dell'espressione genica necessaria per governare le attività delle svariate tipologie di cellule presenti negli organismi multicellulari.

1.2.1. Le RNA polimerasi eucariotiche

Le cellule eucariotiche possiedono tre distinte tipologie di RNA polimerasi le quali sono capaci di trascrivere differenti classi geniche. A livello generale l'RNA polimerasi II trascrive i geni codificanti rilasciando molecole di mRNA mentre le polimerasi I e III producono rispettivamente gli RNA ribosomiali (rRNA) e l'RNA transfer (tRNA). In particolare, in base ai loro coefficienti di sedimentazione, la RNA polimerasi I è devota alla trascrizione delle tre più grandi subunità di rRNA (28S, 18S e 5,8S) mentre la polimerasi III trascrive i geni per i tRNA e per alcuni piccoli RNA nucleari (5S rRNA). Inoltre, anche i piccoli RNA coinvolti nello splicing e nel trasporto delle proteine (snRNA e scRNA) sono trascritti dalla polimerasi III. La RNA polimerasi II è responsabile anche della trascrizione dei microRNA, importanti regolatori operanti sia durante la trascrizione che durante la traduzione nelle cellule eucariotiche (Copper and Hausman, 2006). Tutte le tre RNA polimerasi nucleari sono eteropolimeri costituiti da 12÷17 differenti subunità. Sebbene ogni singola RNA polimerasi sia capace di riconoscere differenti tipologie di promotori queste presentano svariate caratteristiche in comune le une con le altre, così come con la RNA polimerasi batterica. In particolare tutte le RNA polimerasi eucariotiche contengono nove subunità conservate, cinque delle quali sono relazionate alle subunità α , β , β' e ω costituenti la RNA polimerasi batterica. Anche la struttura della RNA polimerasi II di lievito è strettamente simile a quella batterica suggerendo che le RNA polimerasi si sono fortemente conservate durante l'evoluzione

(Copper and Hausman, 2006). Lo scenario diventa maggiormente complesso se si considerano i meccanismi trascrizionali specifici per gli organelli semi-autonomi, quali i mitocondri e i plastidi, in quanto entrano in gioco due ulteriori tipologie di RNA polimerasi. La trascrizione nel mitocondrio avviene grazie al funzionamento di una RNA polimerasi fago-simile che, nella maggioranza delle cellule eucariotiche così come nella licofita *Selaginella moellendorffii*, viene codificata da un singolo gene nucleare mentre nelle angiosperme è codificata da una piccola famiglia di geni nucleari *RpoT* (Liere et al., 2011). Nei cloroplasti è stato osservato che nel plastoma delle alghe e delle piante superiori sono presenti i geni *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* e *rpoC2* responsabili della codifica della subunità cianobatterio-simile che viene comunemente abbreviata come PEP (plastid encoded plastid RNA polymerase) (Liere et al., 2011). Oltre a queste classi di RNA polimerasi le piante presentano due ulteriori tipologie di RNA polimerasi conosciute come RNA pol IV e RNA pol V entrambe evolute dalla Pol II e specializzate per svolgere la metilazione del DNA diretta dall'RNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM).

1.2.2 Il ciclo trascrizionale della RNA polimerasi II

La RNA pol II generalmente incomincia la trascrizione di un determinato gene legandosi a specifici fattori di trascrizione in prossimità del sito di inizio della trascrizione. Questi fattori possono agire indirettamente sulla macchina trascrizionale reclutando altre proteine che regolano la struttura della cromatina, o interagendo direttamente con le componenti della macchina trascrizionale. Nella forma più semplice di attivazione genica, in entrambi i meccanismi diretti e indiretti vi è il reclutamento del complesso di trascrizione sul "core promoter", la sequenza minima di promotore indispensabile all'espressione basale (Fig. 9). Il promotore minimo ha la funzione di collocare la RNA polimerasi in uno stato definito complesso di preiniziazione (PIC). In questo stato la RNA pol II e i fattori di trascrizione generali sono ancorati al promotore causandone un marcato cambiamento conformazionale. In particolare i 10-15 nucleotidi fiancheggiati il sito di inizio della trascrizione vengono aperti e il promotore si posiziona all'interno del sito attivo della polimerasi formando così il Complesso aperto (Fig. 9), quindi l'inizio della trascrizione comincia con la sintesi del primo legame fosfodiesterico dell'RNA nascente (Hahn, 2004).

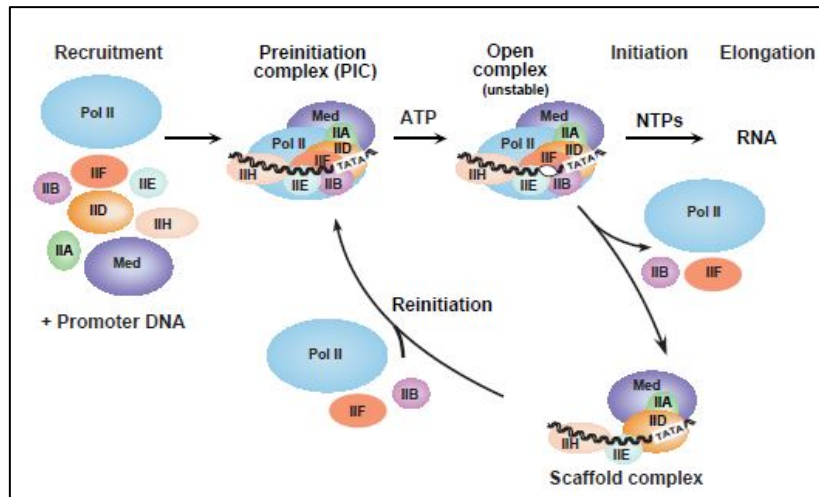


Fig. 9 ciclo di inizio della trascrizione mediata dalla macchina trascrizionale. I fattori generali di trascrizione IIA, IIB, IID, IIE, IIF, IIH cooperano con la RNA polimerasi II per legare il promotore nonché per abbandonare il promotore e passare alla fase di allungamento. Il gruppo completo dei fattori di trascrizione e della polimerasi, legati assieme al promotore e pronti per l'inizio, viene chiamato complesso pre-inizio. Il Mediatore è una proteina regolatoria che stabilizza il legame tra i TF, la polimerasi e il promotore.

Dopo la sintesi delle prime 30 paia di basi (pb) di RNA si pensa che la polimerasi si sganci dal promotore minimo e dal resto della macchina trascrizionale transitando così nella fase di allungamento del trascritto. Una volta che la RNA pol II ha iniziato il processo di trascrizione, molti dei fattori di trascrizione generali rimangono ancorati al promotore creando un complesso definito Scaffold (Fig. 9). Presumibilmente il complesso Scaffold ha il compito di marcare quei geni che sono già stati trascritti bypassando così il lento e laborioso step di reclutamento dei TF nel secondo ciclo di trascrizione. Inoltre certi domini di attivazione trascrizionale possono stabilizzare il complesso Scaffold accelerando la fase di reclutamento dei fattori di trascrizione generali utili a reiniziare il ciclo della trascrizione (Hahn, 2004).

1.2.3. Il promotore minimo e la interazione enhancer-promotore

Il riconoscimento del promotore minimo da parte della macchina trascrizionale è essenziale per il corretto posizionamento e l'assemblaggio della RNA pol II. Molte sequenze costituenti il promotore minimo sono comuni in un grande numero di geni e si sono ben conservate durante l'evoluzione. Il promotore minimo comprende elementi che si possono estendere da ~35 pb a monte del sito di inizio della trascrizione così come elementi a valle (Fig. 10). Nel corso degli anni i principali elementi individuati nei promotori minimi vegetali includevano gli elementi TATA-box (sito di legame per TBP), gli elementi Inr (elementi di iniziazione) e DPE (elementi a valle del promotore), mentre

altri elementi come gli elementi riconosciuti dalla TFIIB (BRE) e il motivo dieci elementi (MTE) non sono stati individuati (Bilas et al., 2016). D'altro canto, sebbene molti promotori contengano uno o più di questi elementi, nessuno di essi risulta essere indispensabile per il buon funzionamento del promotore. Inoltre, nonostante la struttura del promotore minimo fosse originariamente ritenuta essere uniforme ed invariabile, un notevole grado di diversità è stato recentemente riscontrato. Tale diversità è stata vista contribuire significativamente alla regolazione combinatoria dell'espressione genica (Smale and Kadonaga 2003).

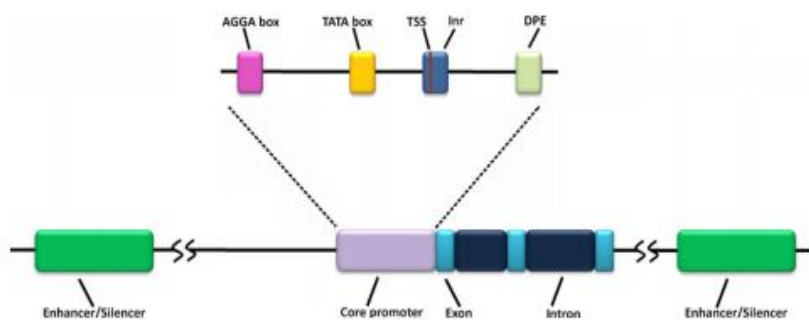


Fig. 10: elementi del promotore minimo coinvolti nella trascrizione mediata dall'RNA pol II. Inr (Initiator), DPE (downstream core promoter element), DCE (downstream core element)

Gli elementi enhancer sono genericamente definiti come sequenze regolatrici in *-cis* che, indipendentemente dal loro orientamento e dalla loro distanza dal sito di inizio della trascrizione, possono aumentare la trascrizione di un determinato gene o di un gruppo di geni (Pennacchio et al., 2013). La distanza e la posizione relativa al gene regolato è estremamente variabile, difatti gli elementi enhancer si possono trovare sia a monte che a valle rispetto al gene di interesse così come all'interno di sequenze introniche (Pennacchio et al., 2013). Attualmente le sequenze degli enhancer sono scarsamente conosciute rendendo impossibile la loro identificazione *"in silico"* (Pennacchio et al., 2013). Il meccanismo d'azione mediante il quale gli enhancer lavorano è basato sul reclutamento e il rilascio di TF necessari per l'inizializzazione della trascrizione. L'attivazione di un dato gene avviene anche attraverso interazioni proteina-proteina tra i TF legati agli enhancer e quelli leganti il promotore di interesse. Oggigiorno è generalmente accettato che se gli elementi enhancer e gli elementi regolatori sono distanti non più di 1 Kpb gli uni dagli altri possono utilizzare un metodo di interazione definito *"short-distance mode"* mediante il quale le proteine ancorate al promotore e quelle legate agli enhancer comunicano direttamente fra loro (Fig. 11a)

(Singer et al., 2010). Nel caso in cui l'elemento enhancer si trovasse in una posizione genomica molto più distante rispetto al promotore (anche fino a 1Mb), ulteriori meccanismi di interazione possono prendere atto. Diversi modelli sono stati proposti: i principali meccanismi di interazione enhancer-promotore sono schematizzati in figura 11.

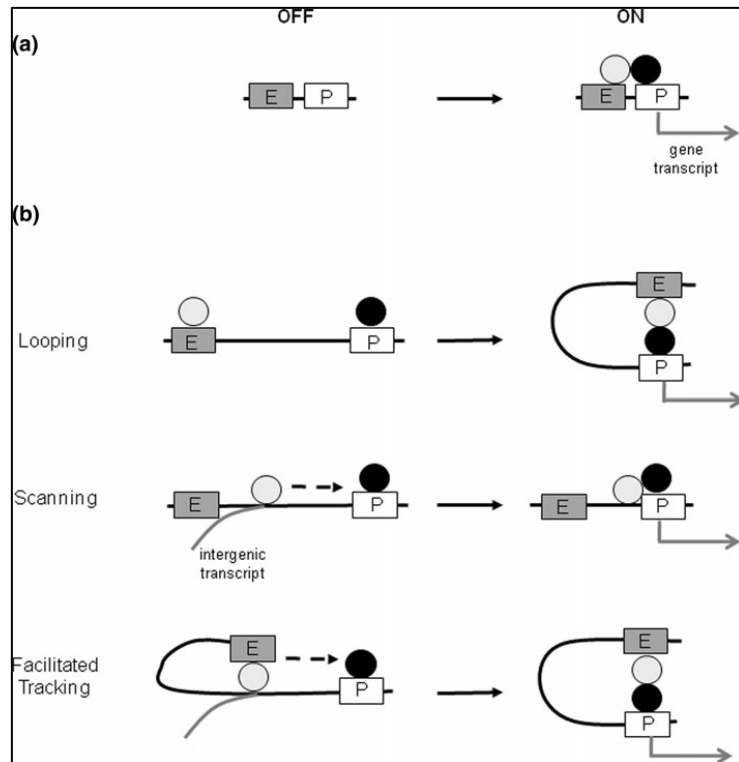


Fig. 11: rappresentazione schematica dei possibili meccanismi di azione enhancer-promoter. Meccanismi di interazione su corta distanza (short-distance mode) (a) e su lunga distanza (long-distance mode) (b).

Il modello “Looping” prevede che l’inizio della trascrizione sia raggiunto grazie all’interazione fra proteine legate ad un enhancer con quelle legate ad un promotore per mezzo di un ripiegamento del filamento di DNA antistante tali componenti. Siccome la cromatina è un polimero estremamente flessibile, al momento si pensa che alla base di questo modello vi sia un meccanismo passivo che sfrutta i movimenti per diffusione della stessa (Pennacchio et al., 2013). Il modello “scanning” invece propone che gli elementi enhancer e le proteine a loro ancorate, essendo molto affini alla RNA pol II, siano capaci di reclutarla formando così un complesso di attivazione trascrizionale. A sua volta il nascente complesso migrerà lungo il filamento di DNA finché non verrà incontrato un promotore competente. D’altro canto lo scorrimento della RNA pol II

lungo il DNA generalmente può portare anche alla formazione di trascritti non specifici derivanti dalla trascrizione di quelle sequenze nucleotidiche interposte fra l'elemento enhancer e il gene interesse (Singer et al., 2010). L'ultimo modello proposto in figura 11b denominato "Facilitated Tracking" è un modello ibrido dei primi due. Tale modello presenta caratteristiche comuni al modello "Looping" dato che l'interazione tra un enhancer e i fattori di trascrizione causa un ripiegamento della cromatina quindi, analogamente al modello "Scanning", questo complesso scorrerà lungo il filamento di DNA finché non verrà incontrato un promotore associato ad un fattore di trascrizione con il quale interagire (Fig. 11b) (Singer et al., 2010). Nel regno animale, le sequenze regolatrici che determinano la corretta espressione spazio-temporale di un gene possono estendersi oltre le 10 Kb (Bonifer, 2000). Diversamente, le sequenze regolatrici presenti nei geni vegetali sono site generalmente in intervalli più brevi, molto spesso attorno a 1-2 Kpb. Questo si riflette per esempio in una maggiore compattezza del genoma come osservato in *Arabidopsis* dove la densità genica è molto alta e dove in media si trova un gene ogni 4,5 Kpb mentre la lunghezza del gene (introni compresi) è di 2,5 Kpb. Il medesimo discorso vale anche se si considerano piante con genomi più grandi (es. mais) dove l'organizzazione delle sequenze dei promotori è comunque simile e i geni attivi sono generalmente distribuiti in regioni ad elevata densità genica (Fu et al., 2001).

1.2.4. Principali classi di fattori di trascrizione in *Arabidopsis* e riso

I fattori di trascrizione sono proteine modulari composte da distinti domini i quali, oltre ad attribuire determinate caratteristiche strutturali specifiche alla famiglia di appartenenza, conferiscono loro la peculiare capacità di legare il DNA in maniera sequenza-specifica. I TF possono presentare anche ulteriori motivi o domini utili per svolgere interazioni proteina-proteina con TF della stessa famiglia e non, agendo in tal modo da attivatori o repressori della trascrizione (Luscombe et al., 2000). L'analisi del genoma di *Arabidopsis* ha indicato la presenza di almeno 1589 TF che rappresentano il 6-10% dei ~26,000 geni di *Arabidopsis* mentre si stima che il genoma di riso codifichi per ~1800 TF rappresentanti il 4,4 – 4,8% delle 37500 – 40000 sequenze codificanti (Riechmann 2006). D'altro canto, questi dati rappresentano probabilmente una sottostima del numero totale di TF presenti. In *Arabidopsis* circa il 40 - 45% delle proteine non possiede un'adeguata catalogazione ontologica mentre per riso la funzione biologica è stata assegnata solamente a circa il 50% dei geni costituenti il genoma (Yu et al., 2005). Vista la grande eterogeneità strutturale delle famiglie di TF risulta estremamente complesso assegnare una funzione biologica sulla base della

negli organismi ancestrali comuni (Yamasaki et al., 2005). Molte delle famiglie di fattori di trascrizione sono costituite da un gran numero di geni (più di 100), e quelle più numerose sia in *Arabidopsis* che in riso sono AP2/ERF (Apetala2/Ethylene Responsive Element), bHLH (basic-region helix-loop-helix) e MYB-(R1)R2R3, ognuna delle quali rappresenta circa il 9% del totale dei TF (Riechmann et al., 2000) e lo 0,5% del totale del numero di geni nel genoma. Nell'insieme, i geni codificanti per TF in *Arabidopsis* e in riso sono simili sia in termini di numero totale che relativamente all'estensione delle singole famiglie. Come si vede dalla figura 13 la grandezza relativa delle diverse famiglie di TF nei due diversi organismi si sono pressoché mantenute durante l'evoluzione, come atteso se si considera la relativa recente divergenza (150-200 milioni di anni fa) tra le piante monocotiledoni e dicotiledoni (Riechmann 200e). In particolare le famiglie WRKY e NAC risultano essere leggermente più grandi in riso mentre un maggiore numero di TF appartenenti alla famiglia MADS sono stati individuati in *Arabidopsis* (Fig. 13).

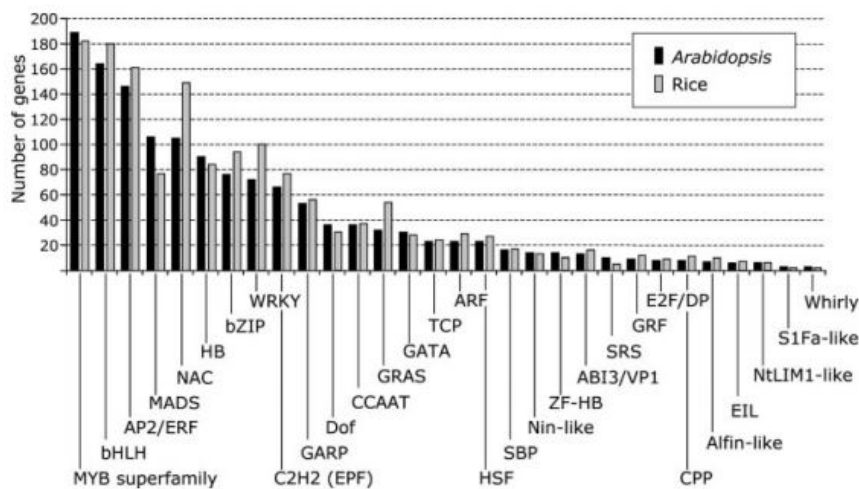


Fig. 13: distribuzione e ampiezza delle famiglie di TF in *Arabidopsis* e in riso. Complessivamente le dimensioni relative delle famiglie di TF in *Arabidopsis* e in riso si sono mantenute pressoché costanti fatta eccezione per le famiglie NAC e WRKY che risultano maggiori in riso mentre MADS sono più numerosi in *Arabidopsis*.

D'altro canto entrambi i genomi sono caratterizzati dall'aver subito una complicata storia di duplicazione genica su larga scala e sembra che tali eventi abbiano contribuito fortemente a generare gli attuali set genici. Analisi filogenetiche di singole famiglie geniche di *Arabidopsis* e riso mostrano la presenza di molti sottogruppi comuni, indicando così come la duplicazione genica fosse già avvenuta nel progenitore ancestrale comune tra monocotiledoni e dicotiledoni (Riechmann 2006).

1.2.5. Network di regolazione trascrizionale per il signaling degli stress abiotici

I pathways di trasduzione dei segnali in risposta agli stress abiotici sono molto complessi e negli ultimi decenni i meccanismi molecolari alla base dell'espressione genica dei geni coinvolti nella risposta a tali stress sono stati studiati principalmente analizzando gli elementi regolatori in *-cis* e in *-trans* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Diversi set genici sono coinvolti in tali risposte i quali non effettuano solamente un ruolo protettivo ma agiscono anche nella trasduzione del segnale. Per questi motivi tali geni vengono generalmente suddivisi in due categorie. Il primo gruppo include quei geni codificanti per proteine che svolgono un ruolo diretto nella tolleranza allo stress, come i chaperoni molecolari, le proteine LEA (*late embryogenesis abundant*), l'osmotina, la ferritina, le proteine antigelo, gli enzimi chiave per la sintesi degli osmoliti compatibili e i loro trasportatori, gli enzimi per il metabolismo degli acidi grassi, le proteine lipid-transfer, gli inibitori delle proteasi e gli enzimi antiossidanti. Il secondo gruppo include quelle proteine che funzionano nella regolazione della trasduzione del segnale come le proteine chinasi attivate dal mitogeno (MAPK) o dipendenti dal calcio (CDPK), le chinasi receptor-like (RLK) e le proteine fosfatasi (fosfoesterasi e fosfolipasi C ecc.); i principali soggetti costituenti questo gruppo sono i fattori di trascrizione che, agendo in comunione o singolarmente, possono stabilire specifici network trascrizionali in risposta ad un determinato stress (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Mutanti di *Arabidopsis* insensibili (*abi: ABA-insensitive mutant*) o incapaci di sintetizzare l'ABA (*aba: ABA mutant*) sono stati utilizzati per studiare i geni inducibili da tali stress e una loro attivazione è stata osservata in entrambe le piante mutanti indicando come, alla base della risposta trascrizionale di tolleranza, siano coinvolti almeno due pathways, uno ABA-dipendente e uno ABA-indipendente (Fig. 14). Le due vie non svolgono un ruolo a se stante ma sono finemente interconnesse tant'è che svariati geni a valle nella cascata di trasduzione del segnale per lo stress osmotico possono essere regolati singolarmente o da entrambe le vie (Shinozaki et al., 2003). L'analisi dei promotori rispondenti all'ABA ha evidenziato la presenza di una o più copie di sequenze in *-cis* definite ABRE (ABscisic acid-Responsive Element) le quali sono riconosciute principalmente da fattori di trascrizione bZIP (Basic leucine Zipper-Transcription Factors) definiti come AREB/ABF (ABA-Responsive Element-Binding Protein/ABA-Binding Factor) mentre il principale elemento in *-cis* coinvolto nella trascrizione genica indipendente dall'ABA è stato definito DRE/CRT (Dehydration-Responsive Element/C-Repeat) e tale sequenza viene riconosciuta e legata principalmente da TF definiti DREB (Dehydration Responsive Element-Binding) (Maruyama et al., 2011).

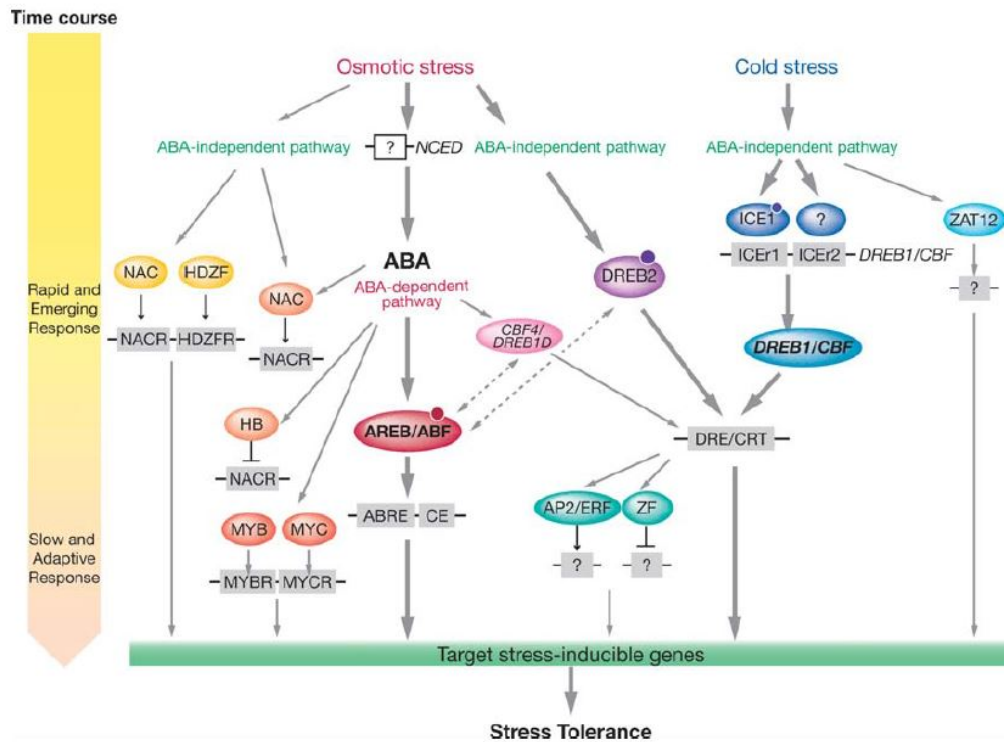


Fig. 14: network di regolazione trascrizionale degli elementi *-cis* e *-trans* coinvolti nello stress osmotico e da freddo. I fattori di trascrizione sono rappresentati da cerchi mentre gli elementi regolatori in *-cis* sono rappresentati da rettangoli. Le frecce grigie piú spesse indicano le vie di segnalazione principali mentre le frecce tratteggiate indicano le interazioni proteine-proteine (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

La connessione tra le due vie avviene grazie alla presenza nel promotore di entrambe le sequenze regolatrici ABRE e DRE/CRT integrando così differenti tipi di segnali. Inoltre uno dei principali candidati responsabili della mediazione del crosstalk fra le due vie di trasduzione del segnale è considerato essere lo ione Ca^{2+} (Roychoudhury et al., 2013). Nelle cellule vegetali lo ione Ca^{2+} svolge un ruolo chiave come secondo messaggero per il signaling di diversi stress biotici e abiotici: è stata infatti riscontrata una stretta correlazione tra le concentrazioni cellulari di calcio e le risposte fisiologiche dipendenti dall'ABA. Ad esempio, nelle cellule di guardia un aumento dei livelli di Ca^{2+} è sufficiente per indurre parte delle risposte ABA-dipendenti mentre i meccanismi dipendenti dal calcio sono responsabili fino al 70% delle chiusure stomatiche (Siegel et al. 2009). Per di più anche l'attivazione di diversi geni biosintetici per l'ABA come *ZEP* (*zeaxantina epossidasi*), *NCED* (*9-cis-epossicarotenoide diossigenasi*), *AAO* (*ABA aldeide ossidasi*) sembrano essere regolati attraverso un pathway di fosforilazione dipendente dal Ca^{2+} , consolidando ulteriormente l'ipotesi che questo secondo messaggero agisca come mediatore fra le due vie di trasduzione ABA dipendente e ABA-indipendente (Tuteja, 2007).

1.3. Lo stress iperosmotico

L'elevata salinità induce nella pianta sia uno stress osmotico che ionico. Questa combinazione di stress porta ad un ritardo nella crescita, a disturbi metabolici e a stress ossidativo. Le piante a loro volta possono tollerare o adattarsi attraverso vari meccanismi fisiologico-molecolari come la modificazione della morfologia fogliare, l'aggiustamento osmotico, l'esclusione e la compartimentalizzazione cellulare di ioni tossici così come mediante sistemi di scavenging delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). La condizione di elevata salinità affligge la vita della pianta in maniera ambivalente: da un lato il basso potenziale idrico del suolo interferisce negativamente con la capacità delle radici di reperire acqua, d'altro canto le grandi quantità di sali assorbiti dalla pianta possono avere effetti fitotossici sulla stessa inibendo numerosi processi fisiologici e biochimici come l'assorbimento e l'assimilazione di nutrienti (Munns and Tester, 2008). Un modello descrivente l'effetto combinato dello stress osmotico e ionico è stato proposto da Munns (2005). In tale modello il duplice effetto negativo indotto dall'elevata salinità è stato descritto considerando la durata di esposizione allo stress in relazione al tasso di crescita in piante suscettibili e tolleranti.

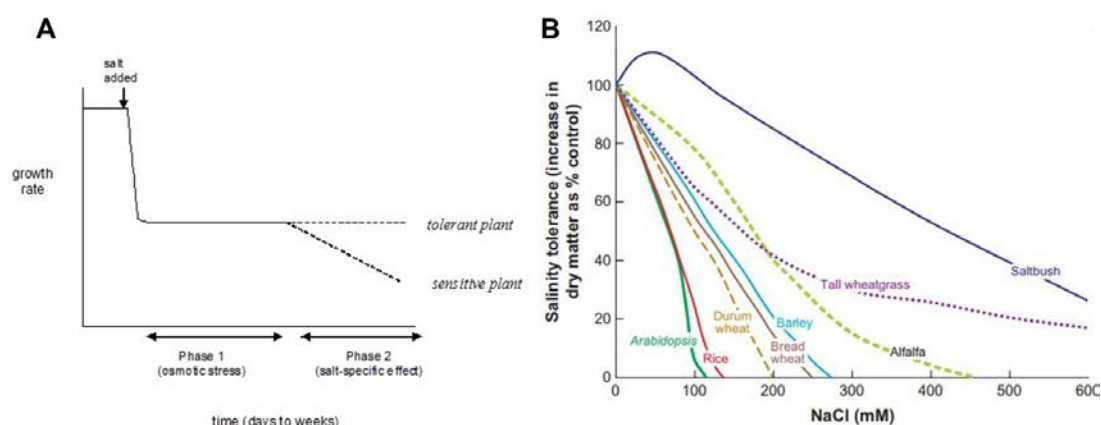


Fig. 15: modello a due fasi dello stress salino proposto da Munns (2005) (A) e confronto della suscettibilità allo stress salino di diverse specie vegetali (B).

Come si vede dalla figura 15A, durante la fase 1, lo stress osmotico originato dall'ambiente salino circondante le radici inibisce la crescita in maniera genotipo-dipendente (tollerante o suscettibile). In questa fase le risposte di tolleranza non sono specifiche alla presenza di sali nel terreno bensì la pianta mette in atto risposte associate alla carenza di acqua. Come rapida risposta difatti la pianta procede con la chiusura degli stomi. Tale processo è determinato da un accumulo ABA ed è volto a limitare la perdita di acqua per traspirazione. Tuttavia la chiusura stomatica limita la

fotosintesi e, vista la necessità della pianta di fissare l'anidride carbonica, questa strategia non può rappresentare una risposta di tolleranza a lungo termine (Hasegawa et al., 2000). La fase 2 del modello proposto da Munns (2005) prende in considerazione le risposte di crescita risultanti dall'effetto tossico dei sali accumulati all'interno della pianta (stress ionico). In particolare i sali assorbiti dalla pianta vengono concentrati principalmente nelle foglie più vecchie dove le quantità di Na^+ e Cl^- raggiungeranno elevati livelli cellulari portando alla morte della foglia. La velocità di morte delle foglie vecchie è un parametro estremamente importante in quanto se la velocità di deperimento è maggiore rispetto alla crescita delle foglie giovani la porzione di tessuti fotosinteticamente attivi non sarà sufficiente per garantire lo sviluppo e la vita della pianta (Fig. 15A) (Munns and Tester 2008). Uno dei meccanismi di tolleranza allo stress salino più diffusi nel regno vegetale prevede l'esclusione degli ioni Na^+ e Cl^- da parte dell'apparato radicale, evitando così che elevate concentrazioni di sali vengano trasportate nella parte aerea della pianta. In tal modo le piante a livello fogliare traspirano cinquanta volte più acqua rispetto a quanto riuscirebbero a fare se i sali fossero trasportati verso le foglie (Munns, 2005). La maggior parte delle piante è capace di escludere a livello cellulare circa il 98% dei sali presenti in soluzione nel terreno permettendo che solamente il 2% venga trasportato attraverso lo xilema nella parte aerea. Nella figura 15B è riportata la sensibilità allo stress salino di diverse specie. Come si può notare, se comparata con altre specie, *Arabidopsis* risulta essere una specie molto sensibile allo stress salino mentre fra i cereali il riso è quello più sensibile, l'orzo è il cereale più tollerante, mentre il grano ha una sensibilità intermedia.

1.3.1. Trasduzione del segnale in risposta allo stress osmo-salino

Diversamente dagli animali le piante non possono evadere da ambienti ostili per cui quando soggette a condizioni ambientali sfavorevoli esse sono capaci di riprogrammare i loro processi cellulari innescando una rete di eventi di segnalazione su lunga distanza. La trasduzione del segnale di condizioni di stress inizia con la percezione di un dato segnale, generalmente mediante recettori di membrana, la quale generando una cascata di reazioni come l'innalzamento cellulare di secondi messaggeri, un "*burst ossidativo*" o fosforilazioni seriali, trasmette il segnale di stress fino al nucleo dove la risposta adattativa sarà raggiunta attraverso un'adeguata modulazione dell'espressione genica (Fig. 16).

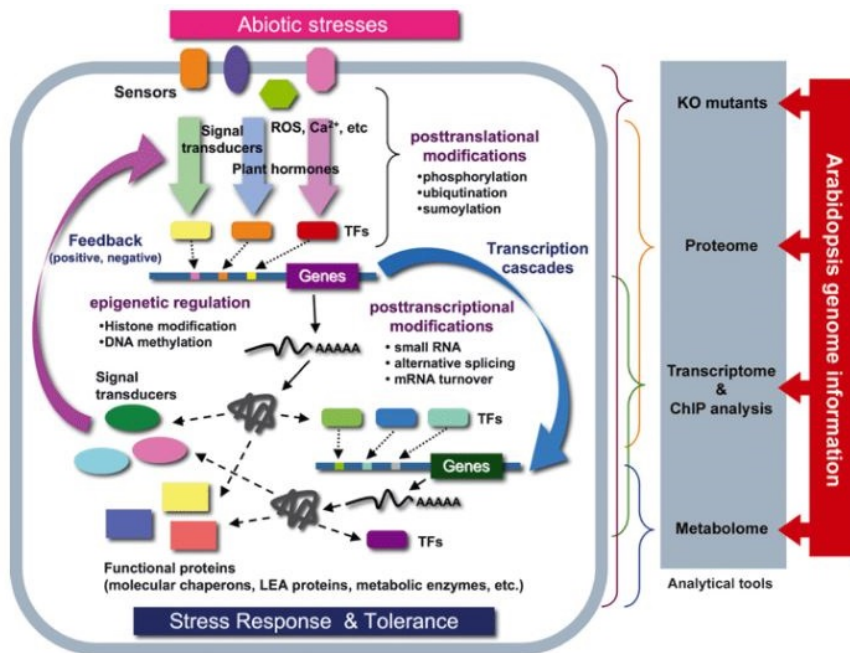


Fig. 16: modello generale della trasduzione del segnale a seguito di stress abiotici. Le cellule vegetali percepiscono il segnale di stress attraverso sensori di membrana e lo trasducono attraverso varie vie di segnale mediate da secondi messaggeri, ormoni, protein chinasi e fattori di trascrizione. A livello nucleare i geni inducibili da stress sono regolati da segnali multipli alcuni dei quali prevedono l'azione di TF che a loro volta sono indotti da diversi stress. Alcuni geni inducibili codificano proteine direttamente coinvolte nella risposta di tolleranza mentre altri codificano per proteine regolatrici che possono agire attraverso meccanismi di regolazione positiva o negativa a feedback (Hirayama and Shinozaki, 2010).

I geni che in condizioni fisiologiche sono silenti mentre sono attivati in presenza di una condizione di stress vengono definiti come geni inducibili. Per conseguenza, differenze nella tolleranza tra differenti genotipi e/o tra differenti stadi di sviluppo in organismi dello stesso genotipo, possono derivare dalla diversa capacità di attivazione di quei meccanismi di trasduzione del segnale e di espressione genica utili per il raggiungimento della tolleranza o della resistenza. L'avvento dell'era post-genomica, accompagnato dalla completa determinazione dei genomi di varie specie (Arabidopsis, riso ecc.), ha portato all'ottenimento di un sempre maggior numero di dati genetici e genomici grazie ai quali è stato possibile delineare un quadro più preciso dei componenti genetici coinvolti nella tolleranza (Hirayama and Shinozaki, 2010). Di seguito i principali elementi coinvolti nella percezione e nella trasduzione dello stress osmo-salino verranno discussi più nel dettaglio.

1.3.2. Come la pianta percepisce lo stress: gli osmosensori

Per definizione con il termine "osmosensing" ci si riferisce alla percezione diretta o indiretta dell'osmolarità dell'ambiente esterno o interno ad una cellula. Nonostante sia

presumibile che le cellule vegetali possiedano sensori cellulari capaci di percepire i vari segnali di stress ambientali, lo studio e l'identificazione degli osmosensori risulta essere di estrema difficoltà tant'è che ad oggi solamente qualche putativo sensore è stato identificato (Zhu 2016). In alcuni casi tale difficoltà risiede nella ridondante presenza di geni codificanti per tali proteine, precludendo una facile identificazione fenotipica mediante silenziamento genico, oppure, in altri casi, il ruolo vitale di tali proteine rende impossibile la creazione di mutanti “*loss of function*” essendo letali per la pianta (Zhu 2016). Recentemente, Yuan e collaboratori (2014) attraverso un lungo e laborioso screening atto all'individuazione di mutanti di *Arabidopsis* incapaci di accumulare Ca^{2+} citosolico a seguito di stress iperosmotico (600 mM sorbitolo) sono riusciti ad individuare 23 putative linee mutanti deficienti nell'accumulo di Ca^{2+} . Lo stress osmotico, la salinità, le temperature estreme e lo stress ossidativo così come i metalli pesanti e l'ABA sono tutti fattori che causano un aumento citosolico di calcio. Il mutante così isolato è stato nominato *OSCA1 (reduced hyperosmolality-induced calcium increase 1)* ed il gene responsabile di tale deficienza (*OSCA1*) è stato visto codificare per un proteina di membrana (un canale ionico) responsabile del passaggio non-selettivo di Ca^{2+} (Yuan et al., 2014).

Altre proteine di membrana che sembrano essere coinvolte nel sensing osmotico in pianta sono proteine con attività istidin-chinasica. In *Arabidopsis* è stato visto che la sovra-espressione del gene *histidin kinase 1 (HK1)* risultava in un aumento della resistenza alla siccità mentre piante knockout per lo stesso gene risultavano essere estremamente più suscettibili allo stress osmotico indicando come *HK1* agisca da regolatore positivo nel signaling dello stress osmotico (Tran et al., 2007). Ulteriori proteine con funzione chinasica coinvolte nel sensing dello stress osmotico fanno parte della famiglia di proteine receptor-like kinases (RLK). In *Arabidopsis* tale famiglia è composta da oltre 600 proteine, alcune delle quali, quelle localizzate a livello della membrana plasmatica, sono state viste essere coinvolte nel sensing osmotico (Osakabe et al., 2013). In riso invece la famiglia genica codificante per RLK è costituita da oltre 1000 geni. Fra i 267 geni inducibili dallo stress idrico, il gene *OsSIK1 (Oryza sativa stress-induced protein kinase gene 1)* è stato selezionato e caratterizzato più nel dettaglio (Ouyang et al., 2010). Piantine di riso over-esprimenti *OsSIK1* esibivano una maggiore tolleranza allo stress salino e idrico mentre mutanti “*loss of function*” mostravano una maggiore sensibilità allo stress. Inoltre una maggiore attività dei geni responsabili dello scavenging dei ROS è stata notata nelle foglie delle piante over-esprimenti *OsSIK1* indicando come tale gene giochi un importante ruolo nella tolleranza allo stress osmotico in riso (Ouyang et al., 2010).

1.3.3. Trasduzione del segnale mediata dal Ca²⁺

Lo ione calcio svolge svariati ruoli fondamentali durante la crescita e lo sviluppo della pianta ed un rapido aumento della sua concentrazione cellulare è stato osservato a seguito di numerosi stress biotici e abiotici. Nel corso degli anni il Ca²⁺ è stato visto fungere da secondo messaggero e la sua concentrazione citoplasmatica viene finemente mantenuta a livelli sub micromolari attraverso l'azione di antiporti H⁺/Ca²⁺ localizzati nel tonoplasto, nei cloroplasti e nel reticolo endoplasmatico evitando così che elevate concentrazioni di Ca²⁺ reagiscano con il fosfato o con altre macromolecole creando precipitati tossici per la cellula (Virdi et al., 2015). Stimoli esogeni differenti non causano lo stesso aumento nella concentrazioni di Ca²⁺. Diversi studi hanno dimostrato che ogni singolo stimolo induce un aumento di calcio citoplasmatico secondo precisi profili sia in termini di magnitudo che spazio-temporali tant'è che Webb et al. (1996) hanno nominato questo fenomeno come Ca²⁺ “*signatures*”. All'interno della cellula l'innalzamento delle concentrazioni di Ca²⁺ viene percepito e trascodificato da specifiche proteine modulate dal calcio (calcium-modulated proteins) che nel regno vegetale possono presentarsi sotto forma di tre tipologie: le calmoduline (CaM), le Calcium dependent protein kinase (CDPK) e le proteine calcineurin B-like (CBL). A livello concettuale tali proteine sono state suddivise in due grandi categorie: le proteine “*sensor relays*” e le proteine “*sensor responder*” (Sanders et al., 2002). Le proteine “*sensor responder*”, come le CDPKs, possiedono sia la capacità di legare il calcio che la capacità di trasdurre il segnale direttamente mediante attività chinasi. Le CDPKs sono una famiglia multigenica di proteine che sono state individuate sia nel mondo vegetale (34 geni identificati in Arabidopsis e 31 in riso) così come nei protisti e nelle alghe verdi ma non nel regno animale e nei funghi.



FIG 17: domini strutturali delle proteine CDPK. N-VD, domino terminale variabile; PK-D, dominio catalitico chinasi; AJ, dominio di giunzione autocatalitica; CBD, dominio legante il calcio contenente quattro domini EF-hands (rettangoli neri); e CT, dominio variabile C-terminale.

Le CDPKs sono costituite da quattro distinti domini, un dominio N-terminale variabile (N-VD), un dominio chinasi (PK) una giunzione autoinibitoria (AJ) e un dominio per il legame per il calcio (CBD) (Fig. 17) (Valmonte et al. 2014). Le CDPKs svolgono svariati ruoli sia nell'innescio del sistema immunitario che nel signaling degli stress abiotici (Boudsocq and Sheen, 2013). Un'espressione differenziale dei geni codificanti per le CDPKs è stata osservata in risposta a diversi stimoli ormonali e ambientali

mentre la localizzazione di queste proteine è stata vista essere pressoché ubiquitaria nella cellula (citosol, nucleo, membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico, tonoplasto, mitocondrio, cloroplasto, e perossisomi) indicando che tali proteine possono avere accesso a svariati substrati cellulari (Boudsocq and Sheen, 2013). In condizioni di stress idrico diversi membri della famiglia delle CDPKs sono stati visti esser coinvolti nella trasmissione del segnale ABA-dipendente. In particolare in *Arabidopsis* le proteine CPK4, CPK11 e CPK32 sono capaci di fosforilare *in vitro* due fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia ABF (ABA-responsive factors), ABF1 e ABF4, suggerendo che tali proteine svolgono un'importante ruolo nella risposta allo stress idrico regolando l'espressione dei geni ABA dipendenti (Zhu et al., 2007) (Fig. 18). Un collegamento diretto tra il sensing del Ca^{2+} con le risposte adattative a valle del signaling osmo-salino è stato visto esser mediato dalla proteina CPK6. Piantine di *Arabidopsis* over-esprimenti il gene *AtCPK6* sono state viste essere più tolleranti sia alla siccità che alla salinità in quanto erano capaci sia di accumulare maggiori quantità dell'osmoprotettore prolina che di neutralizzare più efficacemente le specie radicaliche dell'ossigeno (Xu et al., 2010) (Fig. 18).

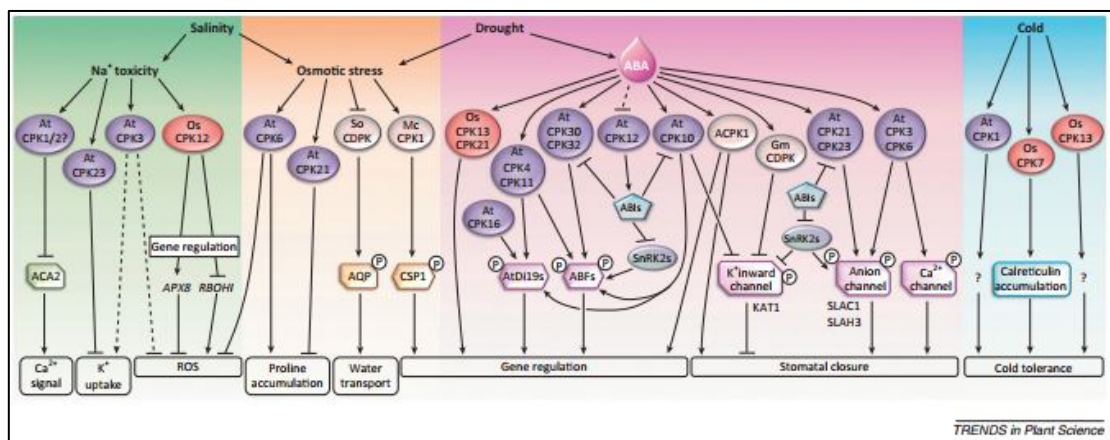


Fig. 18: network di trasduzione del segnale coinvolto negli stress abiotici mediato dalle proteine CDPK. Quando la pianta ha percepito un determinato stress (stress salino, osmotico, ABA ecc.) attiva specifiche proteine CDPK che a loro volta regolano l'uptake del K^+ , la produzione di ROS, l'accumulo di osmoliti compatibili (prolina), il trasporto dell'acqua (acquaporine), la chiusura stomatica e l'espressione genica. In particolare l'espressione genica viene regolata o attraverso fosforilazione diretta di fattori di trascrizione (ABFs) o attraverso regolazione negativa mediata dall'attivazione delle fosfatasi ABIs che a loro volta inibiscono le proteine chinasi SnRK2 (Boudsocq and Sheen, 2013).

Sebbene le risposte mediate dalle CDPK siano molto più ampie e complesse, gli esempi riportati provano come tali proteine siano essenziali nel conferire un'aumentata resistenza agli stress biotici e abiotici. L'altra categoria di proteine coinvolte nel sensing del Ca^{2+} , le proteine "sensor relay", comprendenti le calmoduline (CaM) e le

Calmodulin-like proteins (CaML), sono anch'esse capaci di legare il calcio, evento che porta ad una loro modificazione conformazionale, ma, senza possedere attività chinastica, trasmettono il segnale interagendo direttamente con i loro bersagli target (Sanders et al., 2002). In *Arabidopsis* sono stati individuati sette geni codificanti per quattro isoforme di CaM (CaM1/4; CaM2/3/5; CaM6; CaM7) mentre in riso sono presenti 5 proteine CaM e 32 proteine CaML. Sia le CaM che le CaML presentano a livello strutturale solo l'EF-hand come dominio funzionale mentre la loro localizzazione cellulare risulta essere principalmente citoplasmatica anche se qualche proteina CaML è stata individuata a livello della membrana plasmatica e nel vacuolo (Batistic and Kudla, 2012). Queste due classi proteiche differiscono tra loro per i profili di espressione dei corrispondenti geni, i geni CaM sono altamente espressi in tutta la pianta, mentre i CaML mostrano un pattern di espressione tessuto-specifico (Bender and Snedden, 2013). Le proteine CaM e CaML non avendo attività catalitica trasmettono il segnale del Ca^{2+} interagendo fisicamente con proteine bersaglio (CaM Binding Protein, CaMBP) (Fig. 19). Diversi studi di microarray utili per l'individuazione delle interazioni proteina-proteina hanno portato all'identificazione di oltre 100 CaMBP svelando come tali proteine possono agire sia direttamente sulle risposte fisiologiche di tolleranza che sull'espressione genica (Popescu et al., 2007). Difatti queste proteine sono state classificate in due grandi gruppi, il primo comprende quelle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale come le proteine ad attività chinastica e i fattori di trascrizione, mentre il secondo gruppo comprende quelle proteine con un ruolo da effettori, come le protein fosfatasi, i trasportatori di membrana e diverse classi di enzimi (Boudsocq and Sheen, 2010). Una classe di proteine appartenente alle CaMBP che sono state recentemente individuate sono le proteine definite CAMTA (Calmodulin Binding Transcription Activators). Queste proteine sono fattori di trascrizione che interagendo con CaM possono modulare direttamente l'espressione di geni target. Questa famiglia di TF è altamente conservata e possiede domini multipli sia per il legame al DNA che per il legame alle proteine CaM (Reddy et al., 2011). In *Arabidopsis* sono stati individuati sei geni codificanti per CAMTA (CAMTA1-6) e studi di espressione genica han mostrato come l'accumulo dei loro trascritti avvenga sia a seguito di diverse tipologie di stress che di diversi trattamenti ormonali. Per quanto riguarda l'espressione indotta dagli stress, è stato osservato l'accumulo degli mRNA di CAMTA1-4 e CAMTA6 a seguito di stress termico (elevato calore e congelamento) mentre CAMTA1-4 e CAMTA6 sono indotti da stress salino (Yang and Poovaiah, 2002).

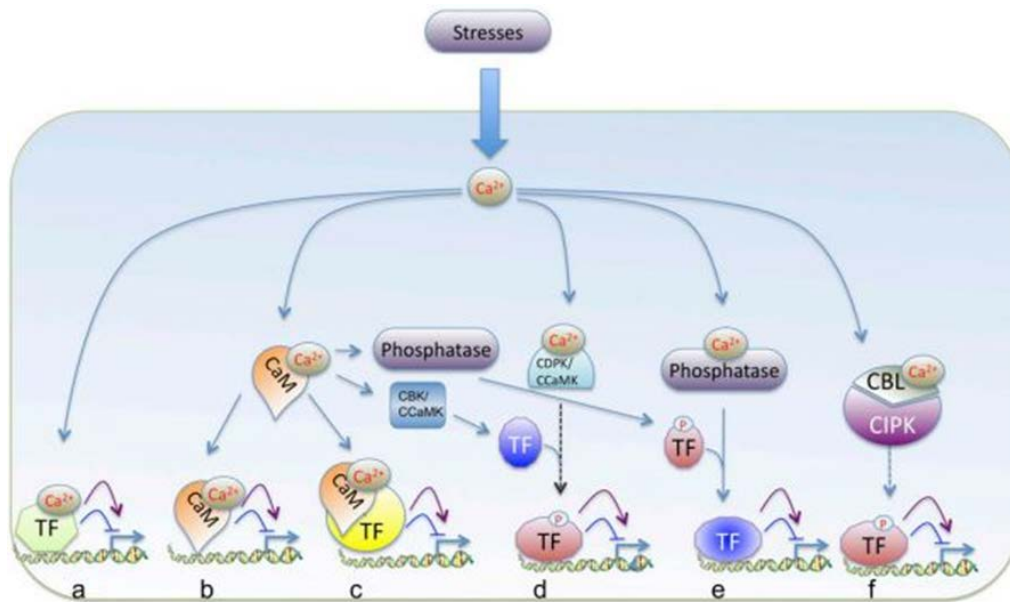


Fig. 19: modulazioni dell'espressione genica indotte da un aumento di Ca^{2+} citoplasmatico. L'aumento del $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmatico viene percepito dai sensori del Ca^{2+} , i quali possono legare direttamente specifiche sequenze di DNA e modularne l'espressione (a) e (b). Diversamente i sensori del calcio una volta attivati ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ o $\text{Ca}^{2+}/\text{CML}$) possono interagire con proteine leganti il DNA (c). Negli esempi d-f le protein chinasi Ca^{2+} dipendenti possono interagire con i TF fosforilandoli o defosforilandoli causando così una loro attivazione o inibizione (Reddy et al., 2011).

Per quanto riguarda l'espressione dipendente dagli ormoni è stato osservato che l'ABA induce i geni *CAMTA2* e *CAMTA4-6*; *CAMTA1*, 3, e 4, sono sensibili sia ai trattamenti con metil-jasmonato che con l'etilene, l'acido salicilico induce *CAMTA2* e *CAMTA4-6* mentre il gene *CAMTA1* è risultato essere indotto dalle auxine (Galon et al., 2010). Tali profili di induzione suggeriscono che questo gruppo di proteine possono essere coinvolte in molteplici pathway di trasduzione del segnale.

1.3.4. MAPKs (Mitogen Activated Proteins Kinases)

Le proteine Mitogen Activated Proteins Kinases (MAPK), attraverso un sistema di trasduzione del segnale a cascata sono in grado di attivare una determinata risposta cellulare a seguito di uno stimolo esterno. La trasmissione del segnale mediata dalle MAPKs avviene attraverso fosforilazioni successive le quali, causando l'attivazione di fattori di trascrizione, di fosfolipasi e di proteine associate sia al citoscheletro che ai microtubuli, portano all'espressione di specifici set genici in base alla natura dello stimolo percepito (Fig. 20A) (de Zelicourt et al., 2016). Le piante sono caratterizzate dal possedere grandi famiglie di MAP chinasi (MAPK) costituite da numerosi componenti, i quali possono combinarsi per formare moduli differenti. Ad esempio, *Arabidopsis* contiene oltre 80 MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK), 10 MAP chinasi chinasi

(MAPKK) e 20 MAPK. Ad oggi solamente 3 MAPK, MAPK3, MAPK4, e MAPK6 sono state studiate più nel dettaglio. In particolare queste MAPKs sono coinvolte nella risposta immunitaria, nell'organizzazione del citoscheletro e dei microtubuli, nello sviluppo degli ovuli e anche nel signaling dipendente dall'ABA (Danquah et al., 2014). Studi inerenti al ruolo delle MAPK3/4/6 nel signaling dell'ABA hanno mostrato un diretto e rapido aumento della loro attività a seguito di trattamenti con ABA (entro 30 min). L'attivazione delle MAPKs dipendente dall'ABA è stato visto essere maggiore in piante di *Arabidopsis* doppio mutanti per le fosfolipasi *pp2c5/ap2c1*. Questo dato suggerisce che le MAPKs possono subire un'attivazione ABA-dipendente, d'altro canto la loro attività può essere inibita dall'azione delle fosfatasi PP2C5 e AP2C1 indicando che le condizioni fisiologiche influenzanti l'attività e/o l'espressione delle due fosfatasi possano alterare l'attività delle MAPK dipendenti dall'ABA (Brock et al., 2010). Recentemente, diversi studi hanno inoltre evidenziato una co-regolazione tra la segnalazione cellulare mediata dai ROS e la cascata delle MAP chinasi, come ad esempio nella regolazione della chiusura degli stomi (Danquah et al., 2014), presupponendo che questi due pathways svolgano un ruolo congiunto nel signaling cellulare indotto dagli stress ambientali. In riso il nodo che collega la cascata di fosforilazioni mediata delle MAPK con l'accumulo dei ROS sviluppati a seguito di stress salino è stato visto essere il fattore di trascrizione SERF1 (salt-responsive *ERF1*; Schmidt et al., 2013). In particolare, la trascrizione del gene *SERF1* è indotta dall' H_2O_2 ma non dall'ABA, quindi essendo un fattore di trascrizione è capace di legare i promotori dei suoi geni target quali *MAPKKK6*, *MAPK5*, *DREB2A* e *ZFP179* attivandone direttamente l'espressione. A sua volta l'attività trascrizionale di *SERF1* è stata vista essere regolata dalla MAPK5 attraverso la fosforilazione della serina conservata in posizione 105. Un modello di tale meccanismo di azione è stato proposto da Schmidt e collaboratori (2013) come si vede in figura 20B. Complessivamente, ad oggi, una delle principali sfide nel campo della ricerca sulla traduzione del segnale mediata dalle proteine MAP chinasi risiede nella precisa identificazione delle proteine sensori responsabili della loro attivazione, nell'identificazione delle MAPKKK e MAPKK responsabili dell'attivazione delle MAPK e nella dettagliata caratterizzazione degli effetti fisiologici indotti da tali proteine (Zhu 2016). Non è ancora chiaro se il pathway mediato dalle MAPK a seguito di stress iperosmotico identificato in lievito (Hohmann, 2002) possa mediare l'osmoregolazione anche in pianta. Probabilmente le MAPKs attivate da condizioni di salinità e di siccità vengono principalmente indotte da segnali secondari piuttosto che da un segnale di iperosmolarità diretto (Zhu 2016).

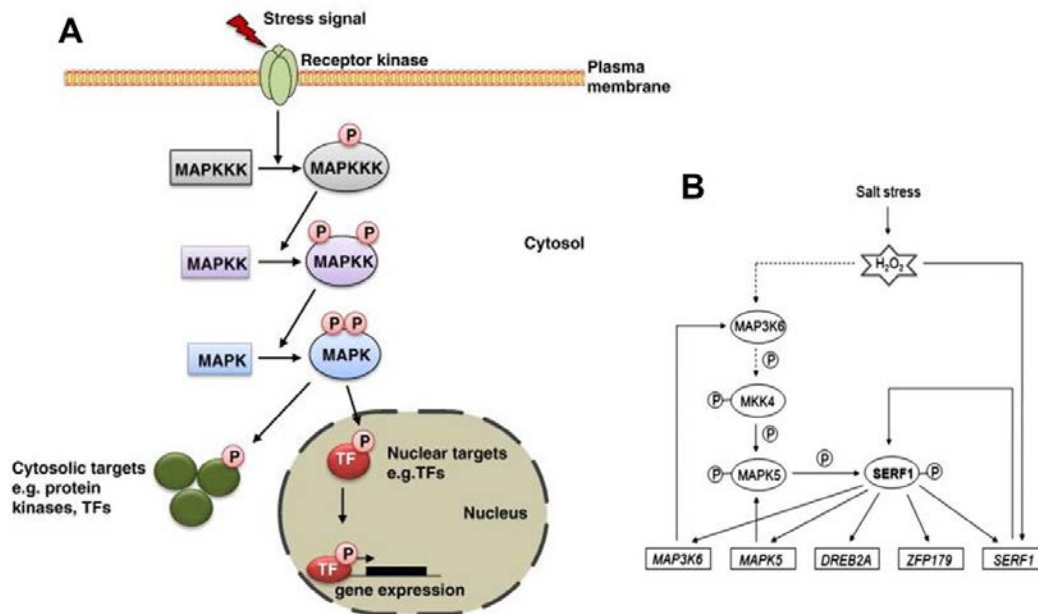


Fig. 20: trasduzione del segnale dipendente dalle proteine MAPK. (A) La cascata di fosforilazione mediata dalle Mitogen Activated Proteins Kinases è organizzata in pathway modulari dove le MAPKKK hanno come bersaglio della fosforilazione le MAPKK che a loro volta attivano le singole chinasi MAPK trasmettendo il segnale sia a livello del nucleo che verso proteine bersaglio. B: modello di regolazione mediata del gene *SERF1* in risposta a stress salino in riso.

1.3.5. SnRK (Sucrose nonfermenting Related Kinases)

Le Sucrose nonfermenting Related Kinases (SnRK2) sono una classe di proteine con funzione chinasi specifiche del mondo vegetale, funzionalmente e strutturalmente analoghe alle proteine sucrose nonfermenting-1 (SNF1) di lievito e ad AMP-activated protein kinase (AMPK) dei mammiferi. Le proteine SnRKs svolgono innanzitutto un ruolo primario nella regolazione dell'omeostasi energetica cellulare, agendo come regolatori globali del metabolismo del carbonio in maniera sia Ca^{2+} -indipendente che Ca^{2+} -dipendente (Halford and Paul 2003), quindi sono state viste agire nella trasduzione del segnale di diverse processi fisiologici e di sviluppo così come nello stress osmotico (Fujii e Zhu, 2012). In *Arabidopsis* la superfamiglia di SnRK è costituita da tre distinte sottofamiglie quali le SnRK1, SnRK2, e SnRK3. Le chinasi appartenenti alla sottofamiglia SnRK1 sono principalmente coinvolte nella regolazione globale dello stato energetico della pianta ad esempio gestendo l'alterato rapporto glucosio/saccarosio in condizioni di periodi di buio, di ipossia e salinità e a seguito di attacco sia di patogeni che di erbivori (Halford and Hey, 2009). Alcuni esempi di enzimi direttamente fosforilati e attivati da SnRK1 sono la saccarosio-fosfato sintasi (SPS: sintesi di saccarosio), la nitrato reductasi (NR: assimilazione dell'azoto), la trealosio-6-fosfato sintasi (TPS: disidratazione e signaling) ecc. (Coello et al., 2011). Sebbene le SnRK1 svolgano ruoli di primaria importanza nel metabolismo cellulare, dei 37 membri

costituenti la famiglia delle SnRKs in Arabidopsis, solamente due appartengono alla sottofamiglia SnRK1, mentre 10 e 25 chinasi sono state viste appartenere rispettivamente alle sottofamiglie SnRK2 e SnRK3. Le chinasi appartenenti alle sottofamiglie SnRK2 e SnRK3 sono note principalmente per il loro coinvolgimento nella trasduzione dei segnali che regolano le risposte atte a contrastare la carenza di nutrienti, la siccità, il freddo e la salinità così come il signaling dell'ABA (Fig. 21). Attualmente si pensa che la sottofamiglia SnRK3 comprenda diversi membri appartenenti sia alle proteine chinasi dipendenti dal Ca^{2+} , come le calcineurin B-like (CBL), sia alle proteine sensori del Ca^{2+} , come le proteine SOS2-like e SOS3-like (Kulik et al., 2011). Con la scoperta del recettore intracellulare specifico per l'ABA, il PYR/PYL/RCAR, avvenuta nell'anno 2009 (Park et al., 2009) un ruolo regolatorio centrale nel signaling dello stress idrico ABA-dipendente è stato inequivocabilmente assegnato alla sottofamiglia SnRK2. Sempre in quell'anno attraverso un approccio di genetica inversa, Fujita e collaboratori (2009) hanno dimostrato come tre protein chinasi appartenenti alle SnRK2, le SnRK2D, SnRK2E e SnRK2I, siano necessarie per poter regolare il segnale ABA-dipendente sia durante la germinazione sia in risposta allo stress idrico durante lo stadio vegetativo. In base alla loro reattività all'ABA le SnRK2 sono state classificate in tre gruppi: il gruppo I sono insensibili a trattamenti con ABA, il gruppo II è poco reattivo all'ABA mentre il gruppo III comprende chinasi fortemente attivate dall'ABA (Kulik et al., 2011). In riso sono stati identificati dieci geni codificanti per SnRK2, designati come *SAPK1-SAPK10*, acronimo che deriva da Stress/ABA activated Protein Kinase. Di tutte le chinasi appartenenti alle SnRK2 in riso solamente tre (*SAPK8*, *SAPK9* e *SAPK10*) sono state viste esser attivate dall'ABA mentre tutte le dieci chinasi rispondevano allo stress iperosmotico (Kobayashi et al., 2004). D'altro canto una risposta differenziale è stata notata a seguito dello stress iperosmotico e questa era fortemente dipendente dalle concentrazioni di sale. In particolare l'attivazione della chinasi *SAPK1* è stata osservata avvenire a concentrazioni di NaCl maggiori di 300 mM mentre *SAPK2* si attivava a concentrazioni inferiori (Kobayashi et al., 2004). Questa attivazione differenziale è stata notata anche in altre specie. Due protein chinasi di soia, *SPK1* e *SPK2*, espresse ectopicamente in lievito sono risultate attivate da NaCl a concentrazioni decisamente elevate, maggiori dello 0,5 M. Anche in frumento tre protein chinasi appartenenti alla sottofamiglia delle SnRK2, *PKABA1*, *W55a*, sono risultate indotte da elevate concentrazioni saline. Per di più l'espressione di due di queste chinasi, *W55a* e *TaSnRK2.4*, in Arabidopsis, è stata vista conferire un'aumentata tolleranza al sale (Coello et al., 2011).

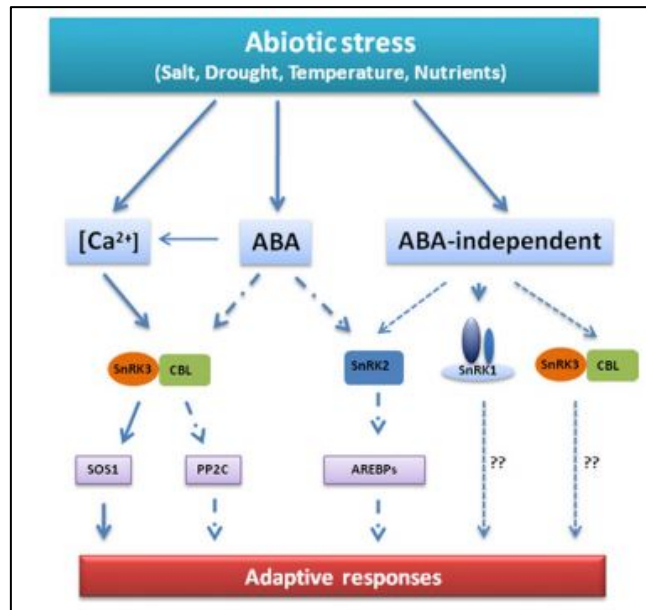


Fig. 21: modello raffigurante la trasduzione del segnale dipendente dal Ca²⁺ e dall'ABA ed indipendente dall'ABA mediato dalle SnRK1, SnRK2 e SnRK3. Gli stress abiotici inducono un accumulo di Ca²⁺ citosolico il quale è trasdotto dalle chinasi SnRK3/calcineurin B-like (CBL). L'ABA regola l'attività delle SnRK2 che a loro volta attivano il TF AREB. L'ABA potrebbe regolare anche l'attività delle SnRK3 attraverso il legame con PP2C. Ulteriori ricerche per delucidare ulteriori componenti coinvolti in altre vie di trasduzione del segnale sono necessarie (Coello et al., 2011).

1.3.6. SOS (Salt Overly Sensitive) pathway

Una delle strategie chiave messe in atto dalle piante per poter tollerare lo stress salino consiste nell'esclusione citoplasmatica dello ione Na⁺. Quando una pianta viene esposta a stress salino a livello cellulare avviene sia una diminuzione dell'assorbimento dello ione potassio (K⁺) sia un aumento dell'influsso dello ione Na⁺. Lo ione K⁺ è il principale catione coinvolto nella osmo-regolazione delle aperture stomatiche e nella forza ionica per cui le cellule vegetali mantengono la loro omeostasi attraverso trasportatori di cationi monovalenti presenti sia a livello della membrana plasmatica che nel tonoplasto (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001). Lo ione Na⁺ invece deve essere rimosso dal citoplasma e compartimentalizzato nel vacuolo attraverso specifici trasportatori. Questo meccanismo garantisce da un lato l'omeostasi ionica cellulare, evitando che lo ione Na⁺ si accumuli in quantità tossiche per la cellula, e dall'altro garantisce un equilibrio dinamico per gli ioni, come il K⁺ e il Ca²⁺, essenziali al buon funzionamento della cellula (Ji et al., 2013). Durante gli ultimi decenni molti lavori hanno suggerito che elevate concentrazioni di Ca²⁺ possano "proteggere" la pianta da quantità tossiche di Na⁺ (Knight et al., 1997; Zhu, 2002). Difatti una volta che la pianta percepisce lo stress salino a livello delle cellule delle radici viene generato un accumulo repentino di Ca²⁺ che a sua volta attiva la cascata di reazioni del cosiddetto SOS (Salt Overly Sensitive) pathway (Fig. 22).

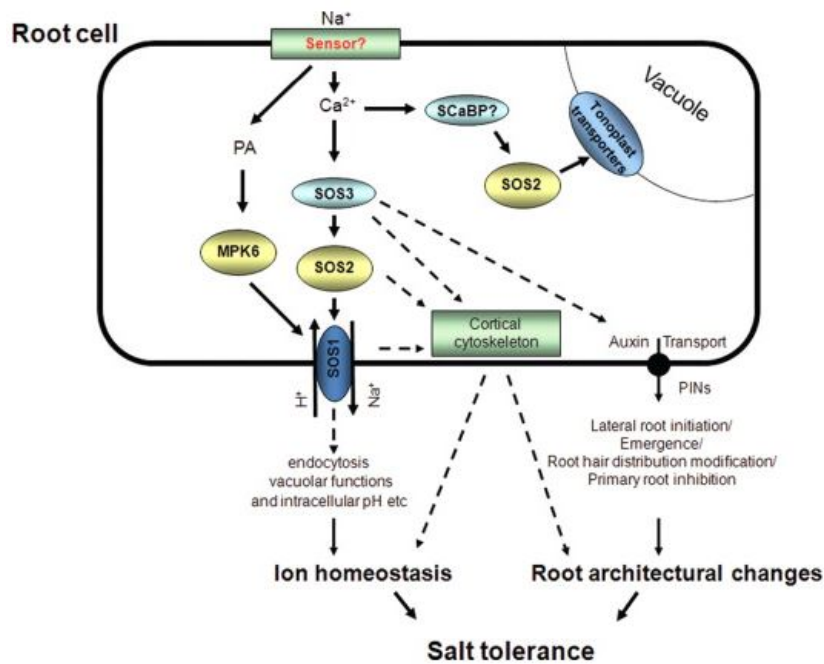


Fig. 22: modello di trasduzione del segnale mediato dalle proteine SOS regolanti l'omeostasi ionica e l'architettura radicale nelle cellule della corteccia radicale e dell'epidermide. Le linee intere indicano una regolazione diretta mentre quelle tratteggiate suggeriscono una legame tra i vari componenti in gioco (Ji et al., 2013).

Il Na^+ può essere secreto al di fuori della cellula attraverso proteine antiporto di cui la meglio caratterizzata è quella codificata dal gene *SOS1* (Shi et al., 2000). La proteina *SOS1* è particolarmente concentrata nelle cellule circondanti lo xilema e nei peli radicali mentre a livello cellulare è localizzata sulla membrana plasmatica, dove funziona da antiporto Na^+ / H^+ (Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001). La trasduzione del segnale del sistema SOS è costituito da tre elementi essenziali, *SOS1*, *SOS2* e *SOS3* (Fig. 22). Questi tre componenti presentano profili di espressione differenti, in particolare i primi due sono espressi sia nei tessuti radicali che nelle parte aeree della pianta, mentre *SOS3* è principalmente espresso nelle radici. D'altro canto un analogo della proteina *SOS3*, l'*SOS3-like ScaBP8 (CBL10)*, è stato identificato nelle parti aeree della pianta (Ji et al., 2013). La proteina *SOS3* è una proteina legante il calcio capace di percepire l'accumulo transiente di Ca_2^+ elicitato dallo stress salino mentre *SOS2* è una proteina serina/treonina chinasi caratterizzata dalla presenza di un dominio catalitico che è evolutivamente correlato a quello della proteina di lievito *SNF1* (Liu et al., 2000). L'attività del trasportatore *SOS1* è regolata attraverso la fosforilazione mediata dal complesso di chinasi *SOS2/SOS3* nelle radici mentre negli apici vegetativi l'attività dell'antiporto *SOS1* è regolata dal complesso *SOS2/CBL10* (Quan et al., 2007). In condizioni non stressanti la proteina *SOS1* giace in forma inattiva grazie ad un dominio C-terminale autoinibitorio. Quando si è in presenza di stress salino la

fosforilazione Ca^{2+} -dipendente mediata dal complesso delle chinasi SOS2/SOS3 attiva la parte terminale della proteina SOS1 (il peptide comprendente gli aminoacidi 1072–1146), presumibilmente attraverso la rimozione del dominio di autoinibizione C-terminale (Quintero et al., 2011), con conseguente estrusione dello ione Na^+ dal citoplasma (Fig. 22).

1.4. Risposte fisiologiche-molecolari indotte dall'acido Abscissico (ABA) nello stress osmotico

L'Acido Abscissico (ABA) è un importante fitormone appartenente alla famiglia dei terpeni e più precisamente ai sesquiterpeni ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$), costituiti da tre unità isopreniche. Sebbene l'ABA sia costituito da 15 atomi di carbonio, la sua biosintesi nelle piante non deriva direttamente dal farnesil difosfato, il precursore dei sesquiterpeni (C15), ma avviene attraverso l'idrolisi ossidativa dei carotenoidi (C40) (Fig. 23) (Nambara and Marion-Poll, 2005). L'ABA viene sintetizzato "*de novo*" durante la disidratazione mentre viene degradato durante la reidratazione nella fase di recupero dallo stress. Oltre ad avere un ruolo chiave nello stress idrico, riducendo la traspirazione fogliare attraverso l'induzione della chiusura stomatica (Kim et al., 2010), l'ABA svolge anche altri importanti ruoli chiave in svariati processi fisiologici. L'accumulo di ABA nei semi porta alla sintesi delle proteine di deposito e dei lipidi, promuove la dormienza dei semi e ne inibisce la germinazione. L'ABA è anche coinvolto nello sviluppo delle radici laterali, nella morfogenesi dell'embrione (Sah et al., 2016) e nella difesa contro diverse tipologie di patogeni (Ton et al., 2009). I livelli di ABA endogeno sono fortemente dipendenti sia dal tasso di attività del suo anabolismo che dal suo catabolismo e tali livelli vengono modulati in risposta a diversi segnali di stress. Diversi geni per la biosintesi dell'ABA sono stati clonati e studiati più nel dettaglio tra i quali si annoverano la zeaxantina epossidasi (*ZEP*, in *Arabidopsis* noto come *ABA1*), la 9-cis-epoxycarotenoid diossigenasi (*NCED*), l'ABA aldeide ossidasi (*AAO3*) e MoCo sulfurasi (*ABA3*) (Tuteja 2007).

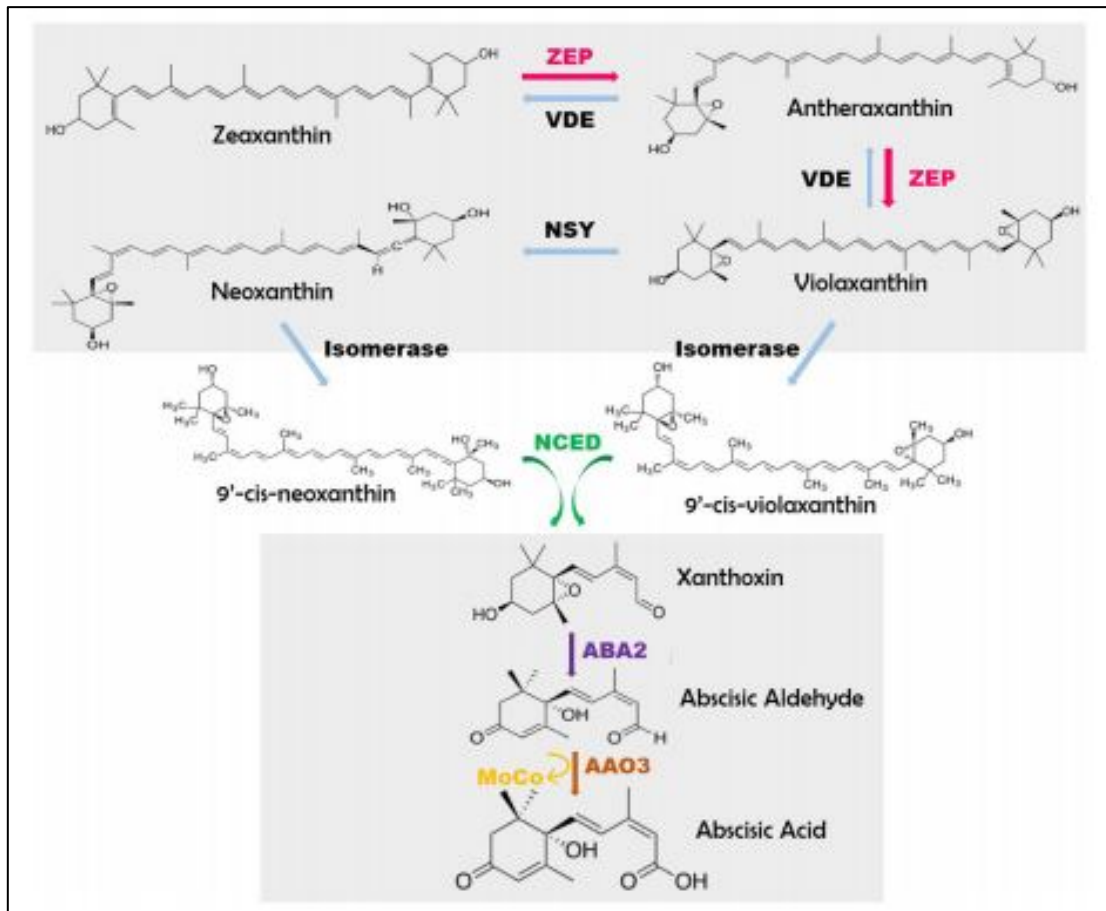


Fig. 23: via biosintetica dell'acido abscissico. La sintesi della violaxantina è catalizzata dall'enzima zeaxantina epossidasi (ZEP) mentre nei cloroplasti una reazione inversa può avvenire grazie all'azione dell'enzima violaxantina de-epossidasi (VDE). La formazione della neoxantina è catalizzata dalla neoxantina sintasi (NSY) mentre la sintesi dei cis isomeri della neoxantina e della violaxantina richiedono un'isomerasi. Il taglio delle xantofille in *cis* è catalizzato dalla 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi per produrre xantossina. Quest'ultima verrà convertita in aldeide abscissica e successivamente in acido abscissico mediante l'azione degli enzimi SDR (una deidrogenasi a corta catena codificato dal gene ABA2) e da AAO3 (aldeide abscissica ossidasi).

In *Arabidopsis* l'accumulo nei tessuti vascolari dell'mRNA *NCED3* a seguito di stress idrico rappresenta uno step fondamentale nell'innescare del signaling dipendente dall'ABA (Endo et al., 2008). Un recente studio rivolto alla comprensione delle relazioni tra l'aumento del *deficit di pressione di vapore* (VPD) con la regolazione delle risposte stomatiche ha evidenziato come l'accumulo di trascritto del gene *NCED3* rappresenti un punto chiave nella regolazione degli scambi gassosi in *Arabidopsis* (Fig. 24) (Sussmilch et al., 2017). D'altro canto, l'utilizzo di mutanti deficienti per l'osmosensore AHK1 ha evidenziato come tale proteina di membrana non sia coinvolta nell'induzione della sintesi di ABA a seguito di un aumento del VPD indicando che la percezione e il signaling alla base di tale stress è regolato in maniera alternativa (Sussmilch et al., 2017).

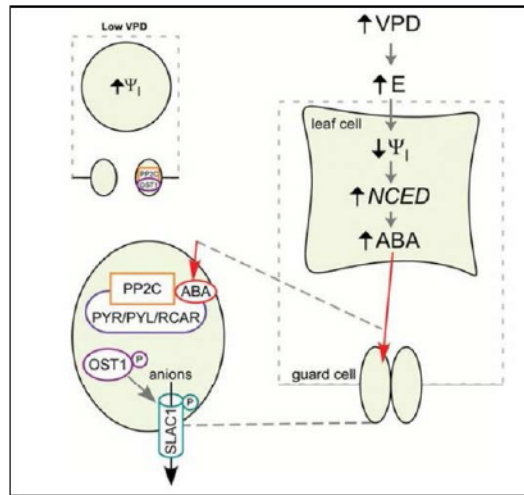


Fig. 24: modello di chiusura degli stomi ABA-dipendente indotta da un aumento del deficit di pressione di vapore (VPD). Bassi livelli di VPD causano un aumento del potenziale idrico (Ψ_w) per cui la proteina fosfatasi 2C (PP2C) inibisce la proteina OPEN STOMATA1 (OST1) rendendola incapace di attivare il canale anionico SLOW ANION CHANNEL 1 (SLAC1) nelle cellule di guardia (sinistra). L'aumento del VPD e dell'evapotraspirazione causano una diminuzione del Ψ_w e della pressione di turgore i quali attivano una rapida trascrizione del gene *NCED* aumentando le concentrazioni di ABA nelle cellule di guardia. Il legame tra ABA ed il suo recettore intracellulare PYR/PYL/RCAR inibisce la fosfatasi PP2C, per cui la proteina OST1, diventando attiva, fosforila e attiva a sua volta il canale anionico SLCA1 causando la chiusura stomatica (Susmilch et al., 2017).

La chiusura degli stomi rappresenta una ben nota e rapida risposta di tolleranza allo stress idrico mediata dall'acido abscissico (Fig. 25). In risposta allo stress idrico l'ABA viene trasportato ed accumulato nelle cellule di guardia, fenomeno che porta ad un aumento dello ione calcio a livello cellulare causando così la depolarizzazione transiente della membrana delle cellule di guardia. Per conseguenza la cellula di guardia espelle gli ioni potassio causandone la riduzione sia della pressione di turgore che del volume cellulare per cui lo stoma si chiude. Come conseguenza si determina un abbassamento del livello di CO_2 nella foglia. Inoltre è stato visto che durante le prime fasi di chiusura degli stomi in *Arabidopsis* l'accumulo di ABA induce un "burst ossidativo" mediato dalle proteine NADPH ossidasi, *AtrbohD* and *AtrbohF*. Studi funzionali hanno evidenziato che doppi mutanti di *Arabidopsis AtrbohD/F* producevano un "burst ossidativo" di minore entità a seguito di trattamenti con ABA inoltre erano incapaci sia di attivare i canali per il Ca^{2+} dipendenti dall'ABA sia di procedere con la chiusura stomatica (Kwak et al., 2003). Le tipiche risposte fisiologiche potevano essere recuperate se i mutanti venivano trattati con H_2O_2 indicando che i ROS agiscono come secondi messaggeri nel signaling ABA-dipendente delle aperture stomatiche. Il "burst ossidativo" indotto dall'ABA causa anche un aumento nella concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatico il quale a sua volta porta all'attivazione di due tipologie di canali anionici: i canali lenti (slow-activating sustained type (S-type)) e i canali rapidi (rapid-transient type (R-type)). L'attività di questi canali anionici determina la depolarizzazione della

membrana plasmatica ed inibisce i canali per il K^+ (KAT1/KAT2), catione responsabile per il mantenimento del turgore cellulare durante le aperture stomatiche.

L'applicazione esogena di ABA induce un elevato numero di geni che sono modulati anche dalla disidratazione e dallo stress da congelamento. D'altra parte il preciso ruolo dell'ABA nell'espressione dei geni indotti dal

freddo non è ancora del tutto chiaro. Nel corso degli anni attraverso l'utilizzo della tecnologia dei microarray a cDNA, svariati

lavori hanno evidenziato come diversi geni indotti dalla disidratazione e dallo stress da freddo non venissero indotti da applicazioni esogene con ABA (Shinozaki et al., 2003), indicando così l'esistenza di due cascate di trasduzione del segnale, una ABA dipendente e una ABA indipendente, operanti fra il segnale di stress e l'espressione di specifici geni.

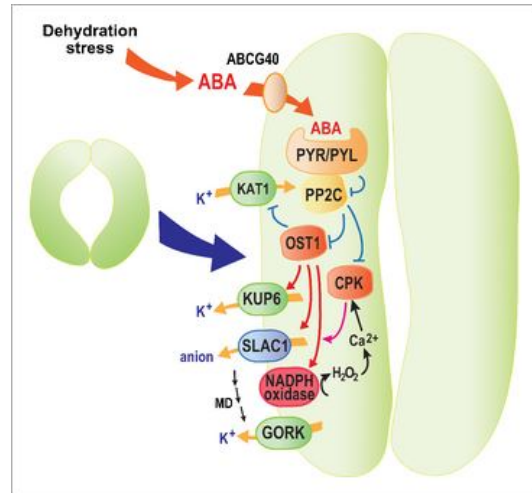


Fig. 25: trasduzione del segnale e sistemi di trasporto ionico coinvolti nella chiusura stomatica (Osakabe et al., 2014).

1.4.1. Signaling ABA-dipendente

Nel corso dell'ultimo decennio sono stati individuati diversi recettori capaci di legare l'acido abscissico in maniera specifica. Tali recettori presentano localizzazioni cellulari differenti tant'è che oggi è noto che questo importante ormone può essere percepito sia a livello intracellulare che a livello extracellulare (Cutler et al., 2010). La percezione extracellulare dell'ABA viene coordinata da un recettore accoppiato ad una proteina G (G protein-coupled receptor, GPCR) localizzato a livello della membrana plasmatica (Liu et al., 2007). Sebbene ancora controversa (Johnston et al., 2007), la percezione dell'ABA extracellulare sembra essere mediata dal recettore GCR2 il quale governa principalmente le risposte fisiologiche ABA-dipendente come la dormienza, la germinazione del seme e la regolazione delle aperture stomatiche (Liu et al., 2007).

Recenti ricerche nel campo della trasduzione del segnale ABA dipendente hanno inequivocabilmente dimostrato l'esistenza di un unico meccanismo di percezione intracellulare di questo ormone (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Park e collaboratori attraverso uno screening chimico/genetico utilizzando una molecola sintetica (la pirobactina) con effetti inibitori per la germinazione analoghi all'ABA, sono riusciti ad identificare il gene *PYR1* (*PYRABACTIN RESISTANCE 1*) il quale è stato visto

codificare per una proteina appartenente alla superfamiglia di proteine con domini di legame START. Nel genoma di *Arabidopsis* sono presenti ben 13 geni simili a *PYR1*, per cui, attraverso l'utilizzo di doppi, tripli e quadrupli mutanti, Park e collaboratori sono riusciti a dimostrare l'esistenza di una famiglia di recettori simili a *PYR1* denominati *PYL* (*PYR-Like*) (Park et al., 2009). Tale famiglia di recettori presentava inoltre un'ulteriore componente con attività regolatoria necessario per la percezione dell'ABA, definito *Regulatory Components of ABA Receptors* (*RCAR*), per cui il recettore è stato successivamente rinominato *PYR/PYL/RCAR*. Il legame tra ABA ed il suo recettore *PYR/PYL/RCAR* porta all'inattivazione delle proteine fosfatasi 2C (*PP2Cs*) come l'ABA *INSENSITIVE 1* (*ABI1*) e il suo omologo ABA *INSENSITIVE 2* (*ABI2*) (Park et al., 2009). Studi di cristallografia a raggi X dei recettori *PYR1*, *PYL1*, *PYL2* hanno permesso la caratterizzazione strutturale del legame tra l'ABA e il suo recettore (Fig. 26). Da tali studi è risultato che in assenza di ABA il recettore è in una conformazione aperta mentre va a legarsi direttamente nella cavità idrofobica centrale del recettore, comportando un cambiamento conformazionale del recettore mediante il quale i due domini β -foglietto circondanti il sito di legame per ABA, nominati come *Gate* e *Latch*, si avvicinano creando una forma chiusa. Tale cambiamento conformazionale crea una superficie di interazione idonea al reclutamento della *PP2C* (Fig. 26). L'interazione tra il recettore *PYR/PYL* e la *PP2C* avviene direttamente nella tasca di legame dell'ABA dove la Prolina₈₈ posizionata nel dominio *gate* interagisce direttamente con la *PP2C* causando un effetto inibitorio su quest'ultima (Cutler et al., 2010).

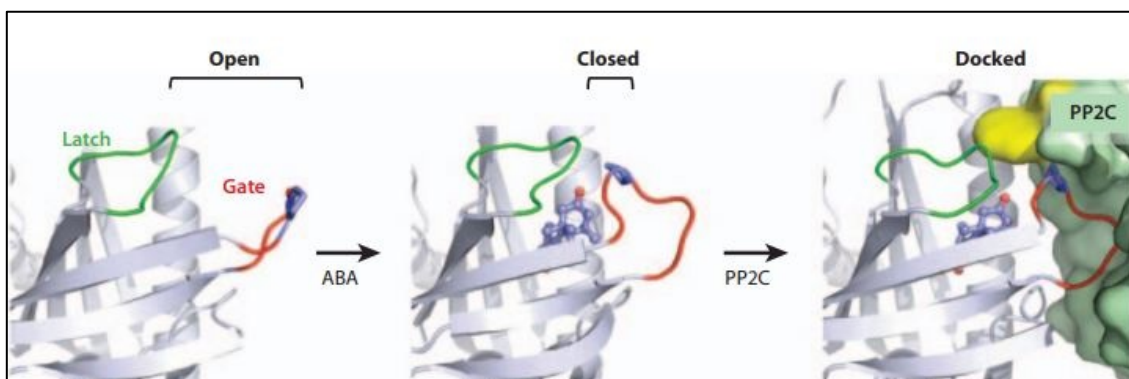


Fig. 26: cambio di conformazione del recettore PYR/PYL indotto dall'ABA. In assenza di ABA il recettore Pyrabactin Resistance 1/Pyrabactin Resistance 1-like (*PYR/PYL*) mantiene una conformazione aperta. Il legame dell'ABA induce la chiusura dei β -foglietti *Latch* e *Gate*. La conformazione chiusa crea una superficie di interazione adeguata per reclutare la fosfatasi 2C (*PP2C*) inibendola direttamente nel sito di legame per l'ABA (Cutler et al., 2010).

L'inattivazione della *PP2C* impedisce la defosforilazione delle proteine *SnRK2s* (*Sucrose-nonfermenting Related Kinases*) le quali essendo fosforilate si attivano. L'attivazione delle *SnRK2s* porta alla fosforilazione sia di canali ionici assieme a

specifici fattori di trascrizione. I principali fattori di trascrizione target delle SnRKs appartengono alla famiglia bZIP la quale è caratterizzata dalla capacità di legare specificamente le sequenze ABRE (ABA Responsive Elements; PyACGTGG/TC) (Fig. 27). Tali sequenze sono considerate le principali sequenze regolatrici presenti nel promotore dei geni indotti dall'ABA. In *Arabidopsis* sono state identificate ottanta differenti varianti di PP2C, mentre analisi "in silico" svolte per identificare i geni codificanti per proteine fosfatasi in riso ha rivelato complessivamente la presenza di 132 geni, 92 facenti parte della classe PP2C (Singh et al., 2010).

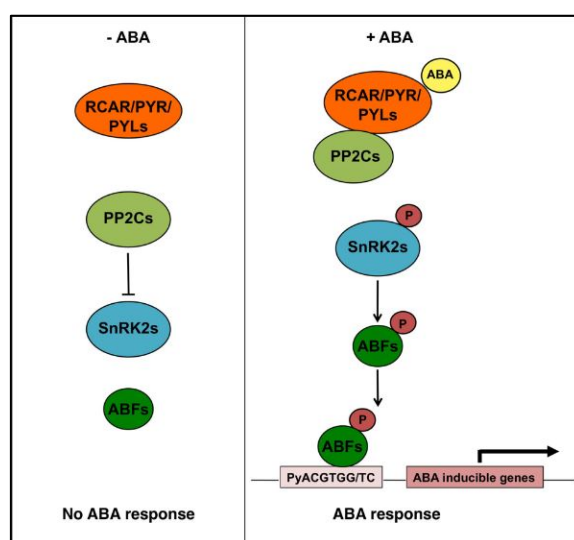


Fig. 27: signaling ABA dipendente. In condizioni di assenza di ABA, la fosfatasi PP2C inibisce la protein chinasi SnRK2. In presenza di ABA, il legame tra ABA con il recettore PYR/PYL/RCAR inibisce la PP2C permettendo alle proteine SnRK2 di fosforilare i TF ABF. I TF ABF, una volta fosforilati, modulano l'espressione dei geni ABA-dipendenti legando le sequenze ABRE presenti nei loro promotori.

1.4.2. Signaling ABA-indipendente

Il termine "crosstalk" viene utilizzato in modo vago per riferirsi a situazioni in cui diverse vie di segnale condividono uno o più intermedi/componenti o presentano target comuni. Sulla base della presenza di meccanismi di tolleranza generali o specifiche interconnessi, è logico aspettarsi che le piante dispongano di diverse modalità di percezione e di trasduzione del segnale di stress (Roychoudhury et al., 2013). A dimostrazione di ciò il gene di *Arabidopsis* *RD29A/COR78/LTI78* viene indotto dalla siccità, dalle basse temperature e anche da trattamenti con ABA. D'altro canto la trascrizione di tale gene è stata osservata anche nei mutanti di *Arabidopsis* *aba* o *abi* sia a seguito di stress idrico che di stress da basse temperature indicando che la sua trascrizione è governata da ambedue i pathways ABA-dipendente e ABA-indipendente (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). L'analisi della regione promotrice di tale gene ha portato all'identificazione di una sequenza conservata di 9-pb, TACCGACAT,

successivamente nominata come DRE (dehydration-responsive element), che rappresenta la sequenza regolatoria in *-cis* essenziale per l'induzione ABA-indipendente. Elementi regolatori in *-cis* simili a DRE sono i CRT (C-repeat) e i LTRE (Low Temperature-Responsive Element), entrambi caratterizzati dalla presenza del "core motif" A/GCCGAC.

Le proteine capaci di legare la sequenza DRE, CBF/DREB1 (*C-repeat Binding Factor/DRE Binding protein 1*), e DREB2 sono state inizialmente individuate in lievito. In *Arabidopsis* tre geni codificanti per DREB1/CBF sono posizionati in tandem sul cromosoma 4 nel seguente ordine: *DREB1B/CBF1*, *DREB1A/CBF3*, e *DREB1C/CBF2* mentre due proteine DREB2, DREB2A e DREB2B, sono state individuate in altri loci. L'espressione delle proteine DREB1/CBF è indotta dalle basse temperature ma non dallo stress osmo-salino mentre l'espressione dei geni DREB2 è indotta dalla salinità e dalla siccità ma non dal freddo (Liu et al., 1998).

1.5. Gli osmoliti compatibili

Gli osmoliti compatibili sono piccole molecole chimicamente differenti tra di loro, solubili, neutre ed innocue per la cellula anche se accumulate in grandi quantità. Fatta eccezione per gli alobatteri, microrganismi appartenenti al genere degli archeobatteri, le cellule di tutti gli organismi potenzialmente esposti a stress osmotico sono capaci di accumulare grandi quantità di osmoliti compatibili (Burg and Ferraris, 2008). Nel regno vegetale, ed in particolare nelle alofite, specie capaci di tollerare la presenza di grandi quantità di sali nel terreno, un'ampia varietà di molecole sono state viste agire come osmoliti compatibili tra le quali si annoverano mono-, di- e oligo- polisaccaridi (fruttosio, saccarosio, trealosio ecc.), polialcoli (sorbitolo, mannitolo, glicerolo ecc.), aminoacidi liberi e loro derivati (prolina, prolina betaina, metilprolina, acido pipecolico ecc.) e composti quaternari dell'ammonio (glicina betaina) (Fig. 28). I meccanismi mediante i quali gli osmoliti compatibili proteggono i componenti cellulari in condizioni di stress non sono ancora del tutto chiariti ma è noto che tali composti svolgono un ruolo chiave nella osmoregolazione, nello scavenging delle specie radicaliche dell'ossigeno e nella stabilizzazione delle membrane plasmatiche e delle proteine.

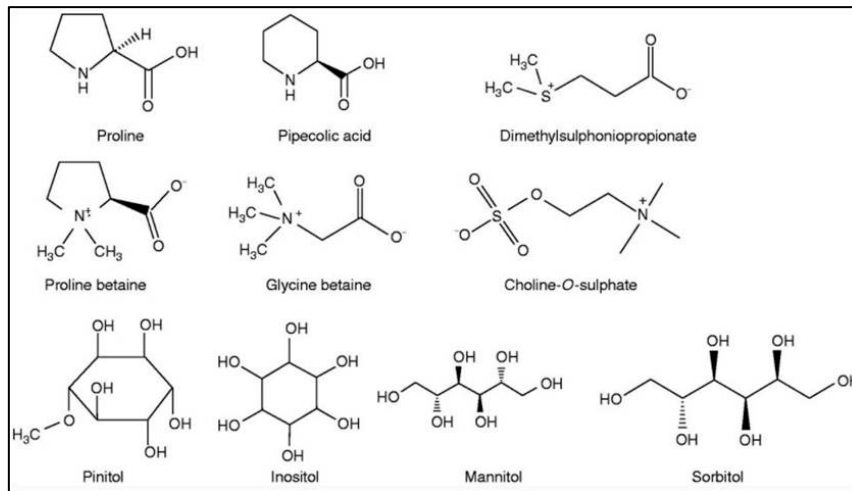


Fig.28: struttura chimica dei principali osmoliti compatibili identificati nelle alofite.

Le elevate concentrazioni cellulari di osmoliti compatibili accumulate a seguito di stress osmo-salino possono difatti aumentare la pressione osmotica cellulare. Il movimento dell'acqua è determinato dal gradiente di potenziale idrico (Ψ_w), dove l'acqua si muove sempre da un Ψ_w maggiore verso un Ψ_w minore, per cui bassi Ψ_w nel terreno possono comportare la fuoriuscita di acqua dalla cellula causandone la plasmolisi. Per capire meglio il meccanismo che sta alla base del bilanciamento osmotico è necessario introdurre più nel dettaglio il concetto di potenziale idrico. Non considerando il potenziale di gravità e di matrice (che nel caso delle cellule possono essere trascurati), il potenziale idrico è dato dalla differenza del potenziale pressorio (Ψ_p) e di quello osmotico (Ψ_o). In condizioni fisiologiche il Ψ_w intracellulare è minore rispetto a quello extracellulare (suolo) consentendo il naturale ingresso dell'acqua nelle cellule delle radici. Quando la concentrazione di sali disciolti nel suolo aumenta, il Ψ_o extracellulare diminuisce, e con esso anche il Ψ_w si abbassa causando la fuoriuscita di acqua dalla cellula. L'accumulo cellulare di soluti compatibili agisce proprio a questo livello; le grandi quantità di osmoliti compatibili accumulati a livello intracellulare possono abbassare il Ψ_w intracellulare maggiormente rispetto a quello extracellulare limitando così la fuoriuscita di acqua dal citoplasma.

Gli osmoliti compatibili accumulati in condizioni di stress differiscono tra le diverse specie sia in termini quantitativi che qualitativi. A livello generale è stato visto che le alofite quando sottoposte a stress tendono ad accumulare un osmolita dominante tra prolina e glicina betaina in modo preferenziale, ovvero le specie accumulatrici di prolina producono minori quantità di glicina betaina e *vice versa* (Grigore et al., 2011). Un andamento preferenziale è stato osservato anche in diverse specie batteriche (vedi tabella 2 in Csonka, 1989). Le concentrazioni fogliari di prolina o glicina betaina

raggiunte in queste specie possono arrivare fino a $400 \mu\text{mol g}^{-1}$, (circa 10-20% del peso secco) esercitando così una pressione osmotica nell'ordine di 0,1 MPa. Nelle glicofite, invece, tali molecole raggiungono concentrazioni notevolmente più basse, nell'ordine di $10 \mu\text{mol g}^{-1}$, comunque possono ugualmente contribuire al raggiungimento di apprezzabili pressioni osmotiche (Flowers et al., 1977).

Oltre alla loro peculiare funzione come osmoregolatori, diversi osmoliti compatibili sono stati visti svolgere un ruolo protettivo come chaperonine molecolari incrementando la stabilità delle macromolecole biologiche (proteine e membrane), prevenendo l'aggregazione delle proteine, ed accelerando il re-folding proteico sia in vivo che in vitro (Fonin et al., 2015). Studi inerenti l'azione protettiva svolta dalla glicina betaina han dimostrato come, ad esempio, il suo accumulo sia capace di proteggere l'attività della RuBisCO (ribuloso 1,5 bifosfato carbossilasi), l'enzima chiave del Ciclo di Calvin, in condizioni di stress salino. Difatti la RuBisCO risulta essere estremamente sensibile al sale e la presenza di glicina betaina in cianobatteri ingegnerizzati per la produzione di questo osmolita preserva la sua attività stabilizzandone la conformazione nativa (Namura et al., 1998). Analogamente, anche l'attività della Nitrato Reduttasi, fortemente inibita da elevate concentrazioni di H_2O_2 , NaCl, PEG e metalli pesanti come Al, As, Pb e Cd, veniva stabilizzata dalla presenza di prolina, glicina betaina e saccarosio (Sharma and Dubey, 2005). Più recentemente Sarkar e Pielak (2014) hanno proposto che la glicina betaina possa prevenire la denaturazione delle proteine globulari, indotta dall'affollamento di piccole proteine (fenomeno definito come macromolecular crowding) nell'ambiente citoplasmatico, aumentando l'energia libera di Gibbs e mitigando le interazioni proteina-proteina con altre proteine presenti nel citoplasma.

1.6. Il metabolismo della prolina

La prolina è un aminoacido ciclico contenente un gruppo aminico secondario, peculiarità che la rende unica tra gli aminoacidi proteinogenici. La sua caratteristica struttura ciclica influisce fortemente sulla flessibilità conformazionale dei polipeptidi che la contengono, tant'è che l'ingombro sterico tra il CH_2 - legato all'azoto immidico della prolina con i gruppi NH_2 - e CH_2 - del residuo precedente nella catena polipeptidica potrebbe comportare una possibile stabilizzazione o destabilizzazione delle strutture proteiche secondarie (MacArthur and Thornton, 1991). Oltre al fondamentale ruolo strutturale svolto nella sintesi proteica, la prolina libera è uno dei soluti compatibili più diffusi nelle piante e nei batteri e grazie alla modulazione del suo anabolismo e del suo

catabolismo viene accumulata a seguito di differenti condizioni ambientali avverse (Slama et al., 2015). Nel corso degli anni il metabolismo della prolina è stato ampiamente studiato ed oggi è noto che tale metabolismo avviene in diversi compartimenti cellulari, quali il citosol, il cloroplasto e il mitocondrio. In base al precursore di partenza si possono definire due vie biosintetiche, precisamente la via del glutammato e la via dell'ornitina (Fig. 29).

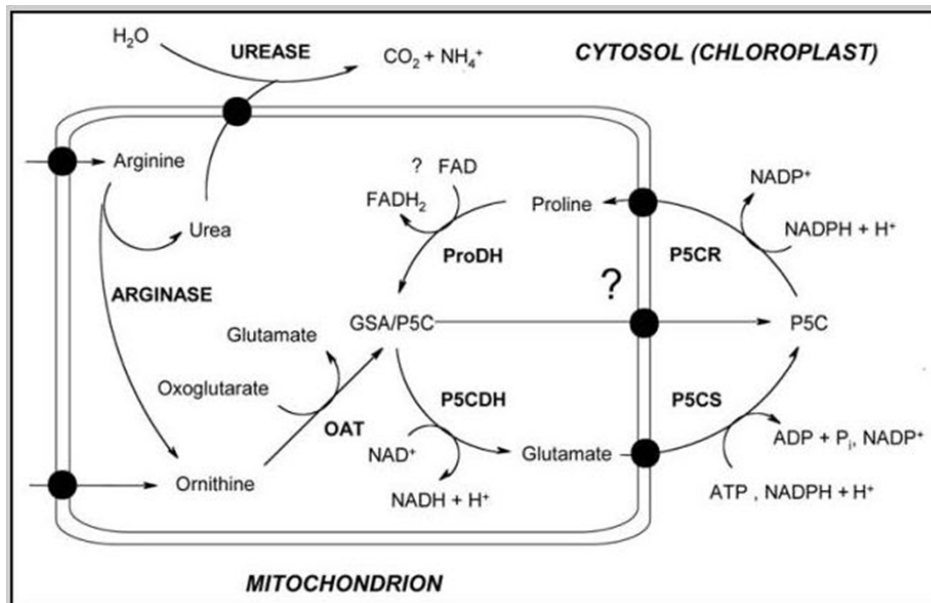


Fig. 29: metabolismo della prolina e connessione con il catabolismo dell'arginina.

1.6.1. La via biosintetica del glutammato

La principale via di sintesi della prolina avviene nel citosol e utilizza come precursore l'amminoacido glutammato il quale, attraverso l'azione di due enzimi, la P5C Sintetasi (P5CS) e la P5C Reduttasi (P5CR), viene successivamente ridotto ad acido Δ^1 -pirolin-5-carbossilico (P5C) e a prolina (Fig. 29). In particolare la riduzione del glutammato a P5C passa attraverso la formazione di un intermedio instabile, la glutammato semi-aldeide (GSA). L'enzima P5CS è un enzima bifunzionale dotato sia di attività γ -glutamyl-chinasica (γ -GK) che di attività glutamil- γ -semialdeide reduttasica quindi è capace sia di fosforilare che di ridurre il glutammato in GSA, il quale ciclizza spontaneamente formando P5C.

In diverse specie vegetali sono state individuate almeno due isoforme di P5CS mentre nel genoma di qualche pianta vascolare come ad esempio il sorgo (*Sorghum bicolor*), il mais (*Zea mays*) e la soia (*Glycine max*) sono state individuate rispettivamente tre, quattro e sette copie geniche, intere o parziali, annotate come geni P5CS (Fichman et

al., 2015). Analisi funzionali utilizzando mutanti knockdown per i geni *p5cs1* e *p5cs2* in *Arabidopsis* han mostrato che questi geni non svolgono funzioni ridondanti (Székely et al., 2008). In particolare la P5CS1 in *Arabidopsis* svolge un ruolo chiave nell'accumulo di prolina dipendente dallo stress osmotico tant'è che il mutante *p5cs1*, in tale condizione, accumula 3-5 volte meno prolina rispetto al wild type (Yoshiba et al., 1995; Székely et al., 2008). La sintesi di prolina indotta dallo stress può avvenire anche nel cloroplasto (Fig. 30). Studi di immuno-localizzazione utilizzando costrutti P5CS1-GFP e P5CS2-GFP han dimostrato come, in piantine di *Arabidopsis* trattate con NaCl per 24 ore, oltre l'80% della P5CS1 veniva traslocata all'interno dei cloroplasti mentre l'intensità della fluorescenza citoplasmatica specifica per la P5CS2-GFP era inferiore del 20% (Székely et al., 2008) (Fig 30).

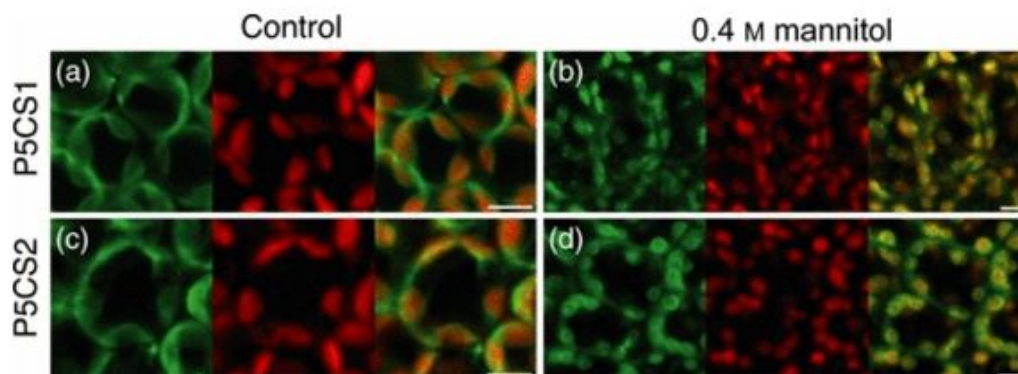


Fig. 30: localizzazione Intracellulare di P5CS1-GFP e P5CS2-GFP nelle cellule del mesofillo. La fluorescenza della GFP (verde), l'autofluorescenza della clorofilla (rosso) e la sovrapposizione "merge" mostrano come in presenza di stress osmotico (0,4 M mannitolo) la P5CS1 viene maggiormente rilocalizzata nei cloroplasti rispetto alla P5CS2 (b, d). Le immagini a, c riportano i controlli (Funck et al., 2012).

La P5CS2 di *Arabidopsis* invece è costitutivamente espressa nel corso della vita della pianta e garantisce la quantità di prolina essenziale per la crescita e per la maturazione degli embrioni (Székely et al., 2008; Funck et al., 2012). Questa seconda isoforma è anche espressa durante le interazioni incompatibili pianta-patogeno (Fabro et al., 2004). Uno scenario opposto è stato osservato in riso dove l'isoforma P5CS1 risulta essere espressa costitutivamente mentre la P5CS2 è responsabile della sintesi di prolina in risposta a stress iperosmotico (Hur et al., 2004). Alla base della diversità funzionale osservata tra le P5C sintetasi di *Arabidopsis* e riso potrebbe esservi una spiegazione evolutiva. Analisi filogenetiche dei geni *P5CS1* e *P5CS2* svolte in diverse specie vegetali hanno indicato come durante l'evoluzione, i geni paraloghi della P5CS, una volta che la divergenza genica tra le monocotiledoni e le dicotiledoni era già avvenuta, hanno subito diversi eventi di duplicazione genica indipendenti i quali

potrebbero aver determinato la differenziazione tra la specificità funzionale osservata nelle varie specie (Turchetto-Zolet et al. 2009). La reazione catalizzata dalle P5C sintetasi rappresenta il passaggio limitante dell'anabolismo della prolina tant'è che un meccanismo di inibizione allosterica a feedback negativo a carico dell'attività delle P5CS è stato visto essere indotto dalla prolina stessa (già a concentrazioni pari a 6 mM). Questo meccanismo, quando la pianta è in condizioni di stress, viene inibito permettendo quindi un accumulo di prolina (Zhang et al., 1995; Hong et al., 2000). Diversamente dalla P5CS, una singola isoforma di P5C reduttasi è presente sia in *Arabidopsis* che in riso. Recentemente è stato dimostrato che l'attività della P5C reduttasi in *Arabidopsis* risulta modulata dalla tipologia di equivalenti riducenti presenti nel citosol (Giberti et al., 2014). Anche in riso è stato provato come la preferenza nell'utilizzo dei cofattori NADPH/NADH da parte della P5CR svolga un ruolo di primaria importanza sia nella regolazione dello stato redox della cellula sia nella risposta allo stress salino. Difatti è stato dimostrato come, in base al cofattore utilizzato dalla P5C reduttasi ed in presenza di diverse tipologie di ioni, l'attività enzimatica possa essere o fortemente inibita o stimolata (Forlani et al., 2015a).

Analisi di microscopia confocale svolta sia in protoplasti che in cellule del mesofillo di *Arabidopsis* trasformate con il costrutto *P5CR-GFP* sotto il controllo o del promotore nativo della *P5CR* o del promotore *CaMV-35S* han mostrato risultati simili e, diversamente dalla *P5CS*, la localizzazione della *P5CR* risultava essere prettamente citoplasmatica sia durante lo sviluppo vegetativo sia in condizioni iperosmotiche (Fig. 31). Questo dato ha rimesso in discussione il reale ruolo plastidiale di questo enzima in condizioni di iperosmolarità (Funck et al., 2012).

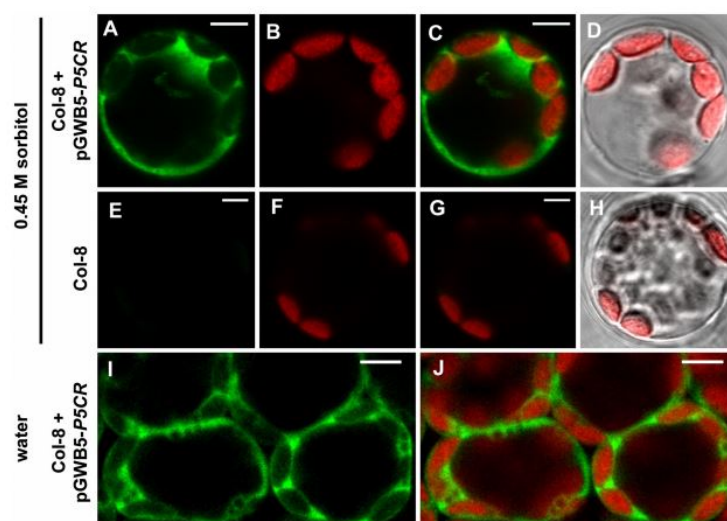


Fig. 31: Localizzazione cellulare della P5CR. Immagini di microscopia confocale di protoplasti isolati da foglie wt o da mutanti pGWB5-P5CR in condizioni normali (H₂O) o iperosmotiche (0,45 M sorbitolo) mostrano come la localizzazione cellulare della P5CR sia sempre citosolica (Funck et al., 2012).

D'altro canto la funzionalità della P5CR risulta essere di primaria importanza nello sviluppo embrionale tant'è che mutanti eterozigoti recessivi per il gene *P5CR* presentavano un arresto dello sviluppo embrionale, fenotipo che in *Arabidopsis* può essere complementato dalla trasformazione con il costrutto *P5CR-GFP*. D'altro canto l'assenza di un'isoforma funzionale di P5CR ha mostrato ricadute sulla fertilità di entrambi i gameti maschili e femminili (Funck et al., 2012).

1.6.2. La via biosintetica dell'ornitina

Una seconda via di biosintesi può portare alla formazione di prolina utilizzando come precursore l'amminoacido ornitina. Nelle piante l'ornitina viene convertita direttamente nell'intermedio instabile GSA/P5C attraverso l'attività dell'enzima mitocondriale ornitina- δ -aminotransferasi (δ -OAT). Il P5C poi verrà o convertito direttamente nel mitocondrio in glutammato mediante l'azione dell'enzima P5C deidrogenasi o trasportato nel citosol e quindi ridotto a prolina (Fig. 29). In *Arabidopsis* la trascrizione dell' δ -OAT è risultata indotta da stress salino mentre la sovra-espressione ectopica dell' δ -OAT di *Arabidopsis* in piante di *Nicotiana benthamiana* conduceva ad un maggior accumulo di prolina la quale conferiva una maggiore tolleranza allo stress osmotico (Roosens et al., 1998). D'altro canto, il ruolo di questa amminotransferasi nella risposta a stress osmo-salino è stata messa in discussione con la recente osservazione che piantine di *Arabidopsis* knockout per δ -OAT non erano alterate nell'accumulo di prolina a seguito di stress osmotico (Funck et al., 2008). Anche in riso la via dell'ornitina contribuisce in maniera inferiore all'accumulo di prolina in risposta allo stress idrico rispetto alla via del glutammato. L'utilizzo di un inibitore specifico per l' δ -OAT, la gabaculina, ha mostrato come a fronte di un'inibizione della sua attività pari al 75% la diminuzione dell'accumulo di prolina a seguito di stress idrico era risultata essere inferiore al 20% (Yang and Kao, 1999).

In *Arabidopsis* l'ornitina mitocondriale deriva dal catabolismo dell'arginina (Fig.29). Quest'ultima oltre a rappresentare una delle principali molecole di riserva di azoto, nel regno vegetale sembra essere il precursore dell'ossido nitrico (NO) e delle poliammine (Winter et al., 2015). Per tale motivo attualmente si ritiene che questa via biosintetica non sia implicata nella risposta a condizioni di stress osmo-salino bensì sembra svolgere principalmente un ruolo nel ricircolo e nel trasporto di molecole azotate (Funck et al., 2008). Inoltre data la natura tossica del P5C si ipotizza che l'attività della δ -OAT, insieme a quella della prolina deidrogenasi (ProDH), primo enzima del catabolismo della prolina, svolga un ruolo chiave nelle interazioni pianta-patogeno ed

in particolare nell'induzione della risposta di ipersensibilità e della morte cellulare programmata (Senthil-Kumar and Mysore, 2012).

1.6.3. Il catabolismo della prolina

Il catabolismo della prolina avviene nel mitocondrio per cui affinché la sua degradazione abbia inizio la prolina deve essere trasportata dal citosol all'interno di questo organello. Ad oggi solamente due carriers mitocondriali sono stati identificati in grano duro (*Triticum durum*): un antiporto che facilita il trasporto della prolina verso la matrice mitocondriale e un antiporto prolina/glutammato che sembra svolgere un'importante ruolo come shuttle tra il mitocondrio e il citosol (Kaur and Asthir, 2015). Una volta all'interno del mitocondrio la prolina viene ossidata a glutammato attraverso l'azione successiva di due enzimi, la prolina deidrogenasi (ProDH), che catalizza la conversione della prolina nell'intermedio P5C, e la pirolin-5-carbossilato deidrogenasi (P5CDH) che ossida il P5C a glutammato (Fig. 29). Come visto precedentemente anche il catabolismo dell'arginina ad ornitina, mediato dall'enzima arginasi, e la transaminazione dell'ornitina, mediato dall'azione dell' δ -OAT, contribuiscono alla produzione mitocondriale del P5C. Il P5C rimane in equilibrio con la glutammato semialdeide (GSA) in maniera pH-dipendente, e a pH fisiologico ($\text{pH} \approx 7$) il P5C risulta essere la forma prevalente (Lewis et al., 1993). La reazione limitante della via ossidativa è quella catalizzata dalla flavoproteina ProDH che è presente nel genoma di diverse specie vegetali in due forme geniche, la *ProDH1* e la *ProDH2* (Funck et al., 2010). Studi spatio-temporali dell'espressione genica della *ProDH2*, svolti utilizzando 1500 pb del suo promotore fuso con il gene reporter GUS, han mostrato come questa isoforma sia indotta prevalentemente nei tessuti vascolari, con una più marcata espressione nei tessuti più anziani (senescenti), nei fiori e nelle radici. L'espressione della *ProDH1*, analogamente alla *ProDH2*, è stata osservata nelle foglie in senescenza, negli organi fiorali e nelle radici (Fig. 32) (Funck et al., 2010). La trascrizione dell'isoforma *ProDH1*, piuttosto che la *ProDH2*, viene inibita da trattamenti con NaCl indicando come la sua attività giochi un ruolo di primaria importanza nell'accumulo di prolina in condizioni di stress osmotico. È stata invece osservata una leggera induzione della *ProDH2* a seguito di stress salino o idrico nei tessuti vascolari (Funck et al., 2010). Nonostante la caratterizzazione funzionale della ProDH sia attualmente incompleta, dato che tale enzima risiede nella membrana interna del mitocondrio è stato ipotizzato che, attraverso la riduzione del gruppo prostetico FAD^+ , sia capace di trasferire elettroni direttamente all'ubiquinone nella catena respiratoria (Schertl et al., 2014). Inoltre l'elevata attività di questi enzimi, che può verificarsi o

durante la fase di recupero dallo stress o a seguito di trattamenti esogeni con prolina o quando il ciclo prolina/P5C è fortemente attivo, è risultata fortemente correlata con la produzione di ROS (Rejeb et al., 2014).

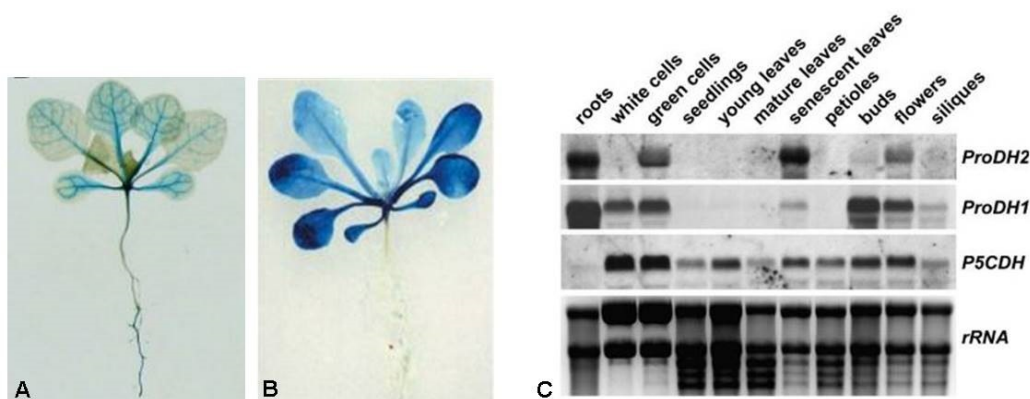


Fig. 32: distribuzione spaziale dell'espressione dei geni del catabolismo della prolina. Saggi istochimici GUS in piantine di *Arabidopsis* transgeniche per il promotore della *ProDH2* (A) e della *P5CDH* (B) fusi al gene reporter GUS mostrano come la *ProDH2* sia espressa prevalentemente nei tessuti vascolari mentre la *P5CDH* è espressa uniformemente nelle foglie adulte in *Arabidopsis*. (C). Northern blot dei geni del catabolismo della prolina svolti in vari tessuti e in due differenti linee cellulari di *Arabidopsis* (Deuschle et al., 2004; Funck et al., 2010).

La seconda reazione del ciclo catabolico della prolina, l'ossidazione del P5C a glutammato, è catalizzata dall'enzima P5C deidrogenasi (P5CDH) il quale, diversamente dalla ProDH, utilizza come accettore degli elettroni il cofattore NAD⁺ (Fig. 29). Un singolo gene codificante per l'enzima P5CDH è stato identificato sia nel genoma di riso che di *Arabidopsis*. In quest'ultima, un'analisi bioinformatica della regione N-terminale ha rivelato la presenza nell'open reading frame (ORF) di una sequenza di 36 basi codificante per un peptide di transito responsabile della sua traslocazione nella matrice mitocondriale (Deuschle et al., 2001). Inoltre studi di espressione han mostrato come, nonostante l'mRNA fosse presente a livelli basali in tutti gli organi della pianta, la sua massima espressione avveniva nei fiori, nei germogli così come nel polline (Deuschle et al., 2001; 2004) ma non nelle radici (Fig. 32c) (Funck et al., 2010). Un aumento dell'espressione costitutiva della P5CDH è stato anche osservata in relazione all'anzianità della foglia (Deuschle et al., 2004; Funck et al., 2010). La connessione tra il catabolismo della prolina e la senescenza fogliare rimane tuttavia un tema largamente irrisolto dato che tale catabolismo non sembra esser utilizzato per fini energetici in questa condizione fisiologica (Zhang and Becker, 2015). I dati attualmente disponibili sulla funzione svolta dall'enzima P5CDH derivano principalmente da lavori eseguiti utilizzando mutanti knockout *p5cdh*. La crescita di questi mutanti in presenza di prolina, ornitina o arginina determina danni ossidativi

anche se la trascrizione della *P5CDH* è indotta da trattamenti con prolina (Deuschle et al., 2001) ed è stato osservato un mantenimento di elevate quantità di prolina cellulare durante il recupero dallo stress salino (Deuschle et al., 2004). Tale generazione di ROS deriva presumibilmente da un aumento del ciclo P5C-prolina (Miller et al., 2009): quando l'attività della P5CDH è bassa, il ciclo P5C-prolina trasferisce una eccessiva quantità di elettroni direttamente alla catena di trasporto degli elettroni comportando la generazione di radicali dell'ossigeno e inducendo morte cellulare programmata. L'attività della P5CDH risulta quindi essere molto importante soprattutto per metabolizzare il P5C a glutammato fornendo così energia ai tessuti vegetativi giovani, per la crescita dei tubi pollinici e per la germinazione oltre ovviamente ad evitare l'induzione della morte cellulare programmata ed un eccessivo stress ossidativo durante il recupero dallo stress idrico (Kavi Kishor and Sreenivasulu, 2014).

1.6.4. Differenze fra procarioti ed eucarioti

La via anabolica della prolina è stata descritta per la prima volta nei batteri, dove procede attraverso tre passaggi: la fosforilazione del glutammato a γ -glutamil-fosfato mediato dalla γ -glutamil chinasi (γ -GK), la riduzione del risultante γ -glutamil-fosfato a glutammico- γ -semideideide (GSA) mediato dalla glutammico- γ -semideideide reduttasi (GPR), quindi la ciclizzazione reversibile di GSA a P5C, che avviene spontaneamente, è seguita dalla riduzione del P5C a prolina catalizzata dall'enzima Δ^1 -pirroline-5-carbossilico reduttasi (P5CR nel regno vegetale; ProC nei batteri) (Csonka 1989). In *E.coli* e in altri membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* l'attività γ -glutamil chinasi, quella γ -glutamil fosfato reduttasi e la glutammico- γ -semideideide reduttasi sono compiute da enzimi distinti che a loro volta sono codificati rispettivamente dai geni *ProB*, *ProA* e *ProC* (Fig. 33). Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, lo scenario risulta essere ancora incerto, difatti, sebbene due proteine con possibile attività γ GK sono codificate dai geni *Pro1* e *Pro2*, in letteratura sono presenti pareri discordanti inerenti a quale delle due isoforme svolga il ruolo prioritario nella sintesi di prolina (Fichman et al., 2015). Queste due funzioni enzimatiche negli eucarioti superiori (anche se qualche rara eccezione esiste) sono condensate in un unico polipeptide, l'enzima bifunzionale P5C sintetasi, nel quale il dominio per l'attività γ -GK e quello per attività GPR risiedono rispettivamente nella parte N-terminale e C-terminale della proteina. A livello evolutivo si ipotizza che il gene ancestrale eucariotico sarebbe sorto da una fusione dei geni γ GK e GPR avvenuta in un operone procariotico (Fichman et al., 2015).

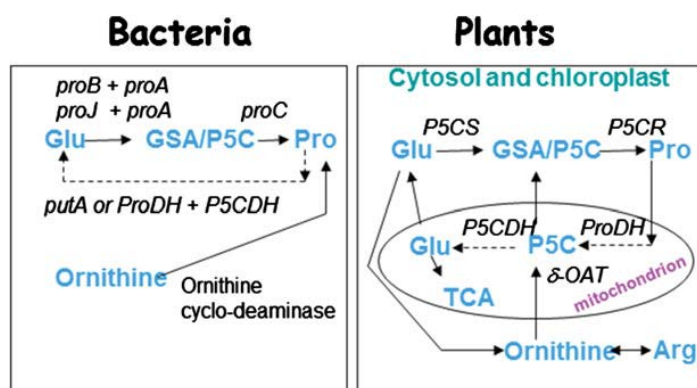


Fig. 33: differenze metaboliche tra eucarioti e procarioti.

In molti procarioti gli enzimi γ GK sono costituiti da due distinti domini, uno responsabile dell'attività chinasi posizionato nella parte N-terminale e uno di circa 100 aminoacidi definito PUA (*pseudouridine synthase and archaeosine transglycosylase*) posizionato nella parte C-terminale. Questo secondo dominio non è presente negli enzimi bifunzionali eucariotici così come in molti eubatteri e nei procarioti sembrerebbe agire principalmente come stabilizzatore della γ GK piuttosto che essere coinvolto nell'attività catalitica (Fichman et al., 2015). D'altro canto le sequenze amminoacidiche delle regioni γ GK responsabili dell'attività catalitica e della regolazione allosterica nei batteri, nei lieviti, così come quelle delle piante e dei mammiferi sono altamente conservate. A questo livello infatti risiede l'unico meccanismo di regolazione della biosintesi della prolina comune a tutti gli organismi viventi, l'inibizione a feedback dell'attività γ GK da parte della prolina (Fichman et al., 2015). L'inibizione a feedback è stata vista essere più marcata nei procarioti e studi comparativi delle sequenze dei domini γ GK hanno evidenziato come la presenza di un residuo carico positivamente in posizione 163 nei procarioti fosse il responsabile della diminuita inibizione (Fichman et al., 2015).

La reazione di riduzione del P5C a prolina negli eucarioti viene catalizzata dall'enzima P5C reduttasi e nella maggior parte delle piante, così come negli archeobatteri, questo enzima è presente in una singola isoforma (Fichman et al., 2015). A sostegno di ciò uno studio bioinformatico atto all'individuazione per omologia di sequenza di P5C reduttasi nel database NCBI ha portato all'individuazione di oltre 37.000 putative P5CR indicando come la maggior parte delle specie ne possieda solamente una (Forlani et al., 2015b). Inoltre studi di allineamenti multipli di sequenze di P5CR han evidenziato un elevato grado di omologia tra *Arabidopsis* con quelle di altre specie (Fichman et al., 2015a). Una situazione particolare invece è stata notata nel batterio *B. subtilis* dove non meno di quattro geni, *ProG*, *ProH*, *ProI* e *comER*, codificano per putative P5CR, anche se sembra solo le prime tre isoforme siano coinvolte nella biosintesi della prolina

(Fichman et al., 2015). Recentemente è stato invece dimostrato che sebbene tutte riescano a catalizzare la reazione di riduzione del P5C *in vitro*, in base alle caratteristiche strutturali e ai tassi catalitici ottenuti sperimentalmente solamente *ProG* e *ProH* possono essere coinvolte nella sintesi di prolina utile per soddisfare la sintesi proteica e l'osmoregolazione *in vivo*. Le isoforme *ProI* e *comER* sembra abbiano subito un evento di subfunzionalizzazione (*comER*) o semplicemente abbiano perso la loro capacità catalitica (*ProI*) (Forlani et al., 2017).

Anche la via alternativa di biosintesi di prolina che utilizza come precursore l'ornitina mostra svariate differenze tra eucarioti e procarioti. Sebbene nei procarioti diversi geni sembrano codificare per δ -OAT, l'elevata omologia di sequenza con altri geni codificanti per enzimi del catabolismo dell'arginina ha reso difficile la loro identificazione (Fichman et al., 2015). La maggiore differenza tra procarioti ed eucarioti sta nel fatto che alcuni procarioti sembrano possedere un enzima, la ornitina ciclo deaminasi (OCD), capace di convertire direttamente l'ornitina a prolina (Fig. 33). Questo enzima, individuato in *Agrobacterium tumefaciens*, viene codificato dal gene *roID* e la sua espressione ectopica in piantine di tabacco e di *Arabidopsis* è stata vista stimolare la fioritura (Trovato et al., 2001).

Per quanto riguarda le differenze del catabolismo della prolina tra procarioti ed eucarioti è interessante notare che gli enzimi ProDH e P5CDH vegetali differiscono dalle loro controparti batteriche in quanto le funzioni svolte da queste due proteine nei batteri sono incorporate in un unico polipeptide definito PutA (proline utilization A) (Fig. 33). PutA appartiene ad una famiglia di polipeptidi caratterizzati da una struttura minima di circa 1000 aminoacidi comprendente un modulo con attività ProDH al N-terminale ed un modulo con attività GSA deidrogenasica (GSADH) al C-terminale. I polipeptidi costituiti da questa struttura di base appartengono alla famiglia PutA di tipo A, quindi in base alla presenza di aggiuntivi domini si distinguono ulteriori classi. La classe di tipo B contiene un dominio strutturale per l'aldeide deidrogenasi al C-terminale mentre la classe tipo C contiene un ulteriore dominio di legame al DNA del tipo ribbon-helix-helix (RHH) al N-terminale (Fig. 34) (Liu et al., 2017).

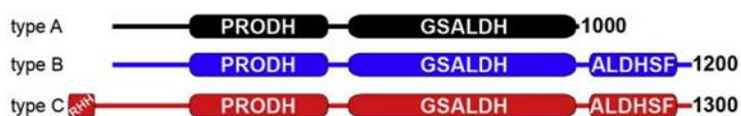


Fig. 34: struttura dei polipeptidi PutA. Differenze strutturali e di architettura tra i diversi tipi di polipeptidi appartenenti alla famiglia PutA.

1.7. Regolazione del metabolismo della prolina

Sebbene il metabolismo della prolina sia stato studiato da oltre 40 anni, la regolazione e la trasduzione del segnale che sta alla base della sua modulazione a seguito di differenti stress non è ancora stata del tutto delucidata. Sicuramente è stato verificato che durante una condizione di stress osmo-salino l'accumulo di questo aminoacido avviene grazie all'attivazione del suo anabolismo a discapito del catabolismo mentre nella fase di recupero dallo stress idrico prende atto una regolazione opposta dove sarà attivato il catabolismo a discapito dell'anabolismo (Fig. 35) (Szabados and Savourè, 2010; Verslues and Sarma, 2010).

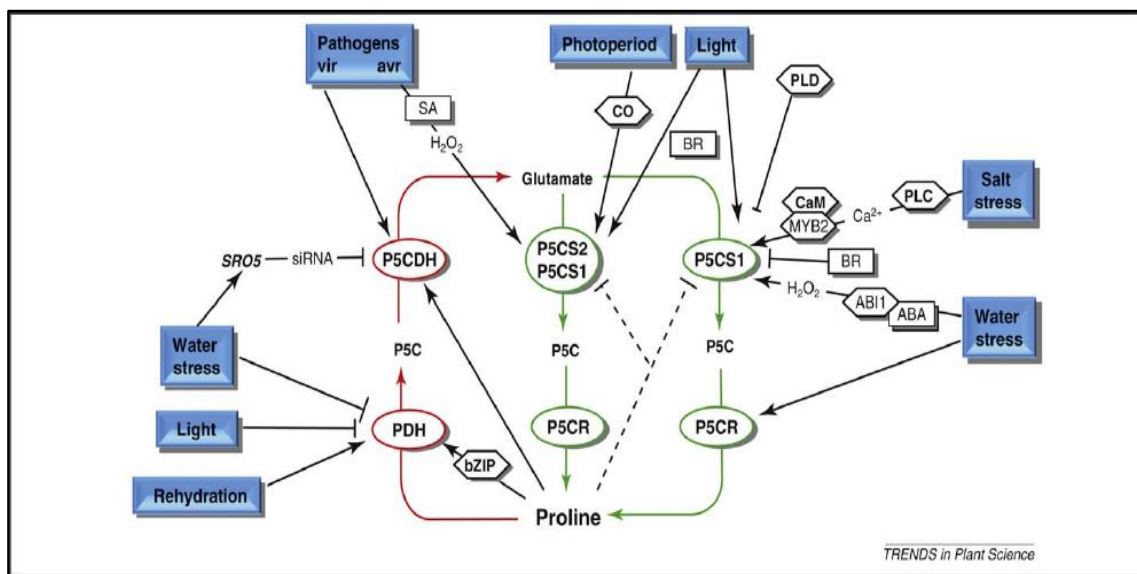


Fig. 35: regolazione del metabolismo della prolina nelle piante.

Una regolazione analoga è stata osservata anche per quanto riguarda il ciclo luce/buio dove l'accumulo di prolina ed in particolare il gene *P5CS1* di *Arabidopsis* per essere espresso necessita di condizioni di luce mentre contrariamente un'espressione della ProDH è stata osservata in piante adattate al buio (Abraham et al., 2003) (Fig. 35). Il ruolo della prolina nelle interazioni pianta-patogeno invece è un tema che si sta sviluppando di recente. Nelle interazioni incompatibili la risposta di ipersensibilità (HR) è accompagnata da un sovra-espressione dei geni della biosintesi (Fabro et al., 2004) mentre nelle interazioni compatibili la regolazione di tale metabolismo avviene principalmente a carico della P5CDH (Fig. 35). Nei successivi capitoli i principali meccanismi regolatori che stanno alla base della modulazione del metabolismo della prolina saranno descritti più nel dettaglio con particolare attenzione rivolta allo stress osmo-salino e alle interazioni pianta-patogeno.

1.7.1. Regolazione della biosintesi della prolina in condizioni di stress osmo-salino

Dei due geni codificanti per la P5CS, generalmente uno è espresso costitutivamente (*AtP5CS2* in Arabidopsis e *OsP5CS1* in riso) mentre l'altro risulta essere l'isoforma inducibile dallo stress o da segnali ambientali esterni (*AtP5CS1* in Arabidopsis e *OsP5CS2* in riso). Risulta chiaro quindi che alla base della loro espressione vi siano distinti meccanismi di regolazione trascrizionale. In Arabidopsis durante lo stress osmotico-salino intervengono diverse vie di segnale che sono responsabili dell'attivazione della *P5CS1*. Ad esempio, in condizioni non stressanti l'attività della fosfolipasi D (PLD) è stata vista agire come regolatore negativo nell'accumulo di prolina (Thiery et al., 2004) mentre in condizioni di stress salino le fosfolipasi C (PLC) causano un'induzione della trascrizione della *P5CS* con conseguente accumulo di prolina (Parre et al., 2007). Un trend regolativo opposto è stato descritto nell'alofita *Thellungiella halophila*, dove PLD agisce come regolatore positivo mentre PLC esercita un effetto negativo sull'accumulo di prolina (Ghars et al., 2012). In Arabidopsis l'attivazione del gene *P5CS1* indotta da PLC viene accompagnata anche da un accumulo citosolico di calcio (Parre et al., 2007). L'attivazione calcio-dipendente della *P5CS1* era già stata notata da Knight e collaboratori (1997) i quali attraverso l'utilizzo di diversi inibitori dei canali del calcio notarono una ridotta espressione sia in condizioni di stress salino che osmotico (Fig. 36a).

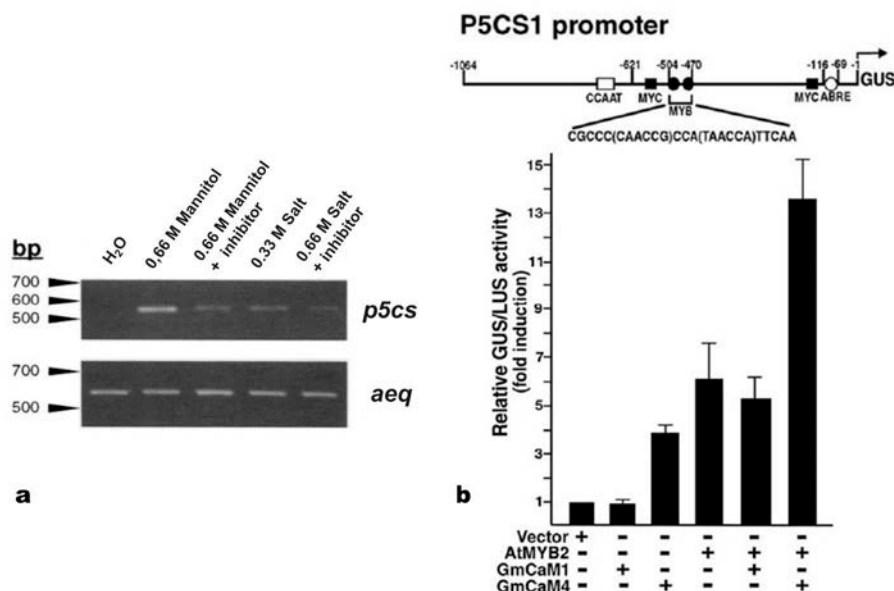


Fig. 36: induzione calcio-dipendente della *P5CS1* in condizioni osmo-saline. (a) RT-PCR svolte in piantine di Arabidopsis pretrattate o no con un inibitore dei canali del Ca²⁺ (10 mM lantano) e trattate per 4 ore con H₂O, mannitolo o sali, mostrano come l'accumulo di calcio citosolico sia coinvolto nell'espressione della *P5CS1* (Knight et al., 1997). (b) Il promotore della *P5CS1* di Arabidopsis contiene un sito di legame per il TF MYB e prove di transattivazione del promotore P5CS1-GUS han mostrato come la proteina CaM4 e il TF MYB2 possano interagire per indurne l'espressione (Yoo et al., 2005).

D'altro canto è stato notato che questo segnale da solo non risultava sufficiente per indurre l'espressione della *P5CS1* (Knight et al., 1997). Come discusso nei capitoli precedenti (vedi cap. 1.3.3) la trasduzione del segnale del Ca^{2+} può essere trasmessa mediante l'azione di specifiche proteine, come le calmoduline, le quali una volta legato il Ca^{2+} sono capaci di interagire ed attivare determinati fattori di trascrizione. In particolare in *Arabidopsis* è stato dimostrato che la proteina calmodulina CaM4, interagendo con il fattore di trascrizione MYB2 porta alla sua attivazione; questo a sua volta, legando il promotore del gene *P5CS1*, ne causa l'attivazione (Fig. 36b) (Yoo et al., 2005). Analisi dell'espressione genica delle due isoforme di P5CS in riso invece hanno indicato come *OsP5CS2* sia principalmente implicata nella risposta allo stress mentre *OsP5CS1* è espressa costitutivamente nella pianta. D'altro canto entrambi i geni sono indotti dallo stress salino, dal freddo e da trattamenti esogeni con ABA. In particolare, l'espressione di *OsP5CS1* a seguito dello stress idrico è stata vista incrementare fino al raggiungimento di un picco a 12 ore, per poi ritornare ai livelli iniziali, mentre contrariamente il trascritto della *OsP5CS2* aumenta costantemente fino a 24 ore dal trattamento. Lo stress salino, il freddo e trattamenti con ABA invece causano un aumento costante del trascritto per la *OsP5CS2* fino 24 ore dopo lo stress mentre l'espressione dell'isoforma *OsP5CS1* aumenta solo leggermente (Fig. 37).

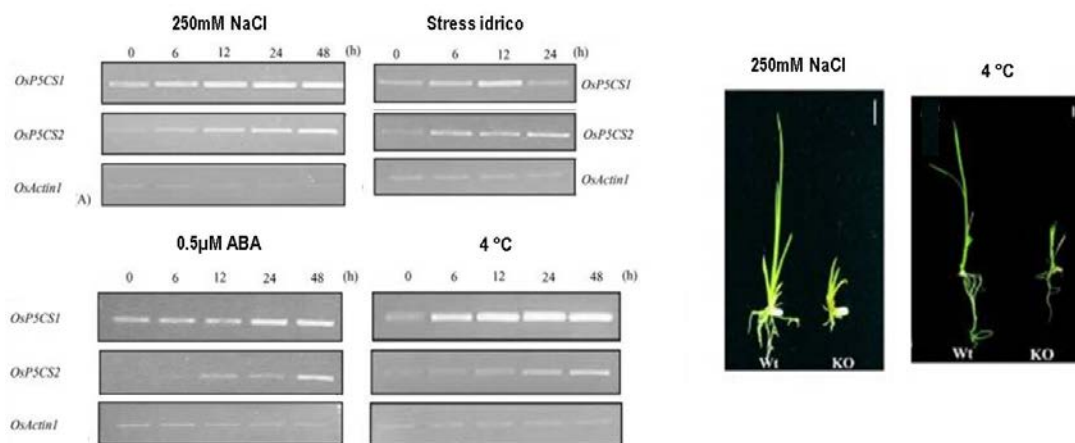


Fig. 37: profili di espressione dei geni *OsP5CS1* e *OsP5CS2* a seguito di diversi stress e di trattamento con ABA (sinistra) e fenotipi dei mutanti knockout per la *OsP5CS2* in riso in condizioni di stress salino e da freddo (destra). L'espressione di *OsP5CS1*, nonostante sia costitutiva in riso, viene leggermente incrementata da varie condizioni di stress mentre il gene *OsP5CS2* è inducibile dagli stress (sinistra) e risulta essere indispensabile nella risposta allo stress salino e da basse temperature come si vede dai mutanti knockout (destra).

Per di più, analisi di genetica inversa han inequivocabilmente dimostrato che l'isoforma *OsP5CS2* è indispensabile per fronteggiare le condizioni di stress (Fig. 37). Difatti, sebbene a causa di mancanza di vitalità della pianta non sia stato possibile creare

mutanti knockout per il gene *OsP5CS1*, studi fisiologici condotti su mutanti knock-out per *OsP5CS2* han mostrato che in condizioni normali la pianta cresce in maniera simile al wild type, mentre in condizioni di stress vi sia una drastica diminuzione della crescita (Fig. 37). Questi dati indicano chiaramente come *OsP5CS2* svolga un ruolo chiave nella risposta allo stress e non nel metabolismo basale o costitutivo (Hur et al., 2004).

Per quanto riguarda la seconda reazione nella sintesi di prolina, la reazione di riduzione del P5C catalizzata dalla P5C reduttasi, sebbene non rappresenti lo step limitante (Verbruggen et al., 1993) viene regolata in maniera non convenzionale, dato che vi è linearità tra la trascrizione del gene e l'inizio della traduzione in condizioni di stress osmo-salino e dal calore (Fig. 38) (Hua et al., 2001). Studi funzionali del promotore hanno evidenziato come alla base di questa particolare regolazione vi sia un frammento della regione 5'-UTR di 92 pb che sembra agire da un lato come regolatore della stabilità dell'mRNA nascente e dall'altro come inibitore della traduzione in condizioni di stress (Hua et al., 2001).

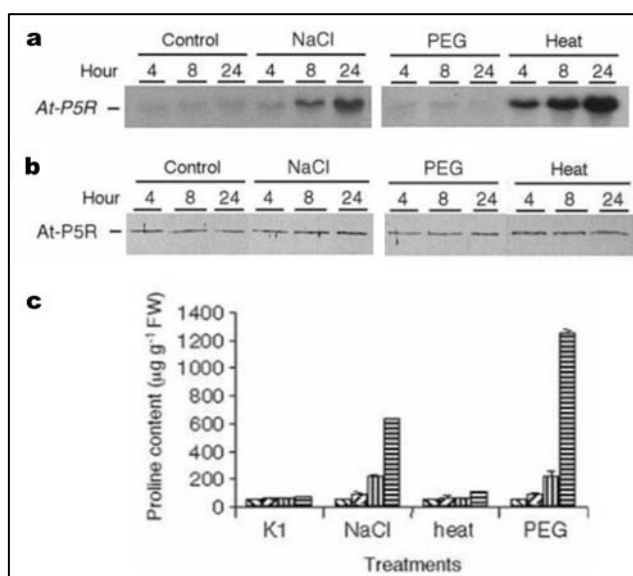


Fig. 38: livelli di espressione e proteici della *AtP5CR* e accumulo di prolina a seguito di differenti stress. I livelli di trascritto osservati in seguito a differenti stress (a) non correlano con i livelli di proteina rilevati tramite analisi western-blot (b). Accumulo di prolina indotta da differenti stress a diversi tempi (0, 4, 8 e 24 h dopo il trattamento) (c).

1.7.2. Regolazione del catabolismo della prolina in condizioni di stress osmo-salino

Il catabolismo della prolina è attivato durante la fase di recupero dallo stress, quando i livelli di prolina sono alti; in questa fase la reazione limitante è l'ossidazione della prolina a P5C catalizzata dalla ProDH (Fig. 29). Studi svolti utilizzando mutanti per il

gene *ProDH* hanno mostrato come in condizioni di recupero dallo stress osmotico (trattamento con PEG6000) la prolina si accumulava in maniera significativamente maggiore nei mutanti rispetto al wild type e i mutanti risultavano essere ipersensibili a trattamenti esogeni con prolina (Mani et al., 2002). Sempre in *Arabidopsis* analisi funzionali del promotore di *ProDH1* han portato all'identificazione di una nuova sequenza regolatoria in *-cis* di 9 pb (ACTCATCCT) che è responsabile della sua espressione in presenza di elevate concentrazioni di prolina così come nella fase di recupero dallo stress iperosmotico (Sato et al., 2002). Questa nuova sequenza regolatoria è stata definita PRE (Pro- or hyposmolarity-responsive element) e il suo "core motif" è ACTCAT. Quest'ultima risulta essere un ottimo target per i fattori di trascrizione bZIP e analisi di immunoprecipitazione della cromatina e di legame al DNA hanno rivelato come la ProDH sia regolata in particolare da fattori di trascrizione bZIP appartenenti al gruppo S (Sato et al., 2004).

La seconda reazione della via catabolica è l'ossidazione del P5C a glutammato catalizzata dall'enzima P5C deidrogenasi. Analogamente alla P5CR, anche nel caso della P5CDH, sebbene non catalizzi la reazione limitante il catabolismo della prolina, sono stati individuati diversi meccanismi di regolazione a suo carico. In *Arabidopsis*, studi di espressione a seguito di trattamenti con concentrazioni crescenti di prolina hanno mostrato come il trascritto della *P5CDH* si accumuli proporzionalmente con l'aumentare dell'intensità del trattamento (Deuschle et al., 2004). Ciò nonostante, studi svolti utilizzando mutanti knockout per il gene *P5CDH* hanno mostrato come l'interruzione della via catabolica a questo livello non causi un aumento significativo di prolina sia in condizioni fisiologiche che di stress salino indicando l'esistenza di una regolazione a feedback negativo mediato dall'intermedio P5C (Deuschle et al., 2004). D'altro canto, sebbene attualmente non sia ancora stato individuato un trasportatore specifico per il P5C, una possibile interpretazione per spiegare l'incongruenza nel contenuto di prolina osservata in mutanti *p5cdh* potrebbe risiedere nella esistenza di un ciclo P5C/prolina mitocondrio/citosol (Miller et al., 2009). Secondo questa teoria l'eccesso di P5C mitocondriale, derivante dall'ossidazione incompleta della prolina, viene trasportato nel citosol e ridotto in prolina dalla P5CR. Per contro, la prolina citosolica così prodotta viene trasportata nel mitocondrio dove, attraverso l'attività della ProDH, viene nuovamente convertita a P5C. In parallelo, un aumento di intensità di tale ciclo porta ad un maggiore trasferimento di elettroni alla catena di trasporto mitocondriale (mediato dal FADH₂) con conseguente generazione di ione superossido (O₂⁻). L'attività della P5CDH risulta quindi essere indispensabile per mantenere bassi i livelli mitocondriali di P5C e di conseguenza anche del ciclo P5C/prolina limitando così

la formazione di O_2^- responsabile della morte cellulare programmata (Miller et al., 2009).

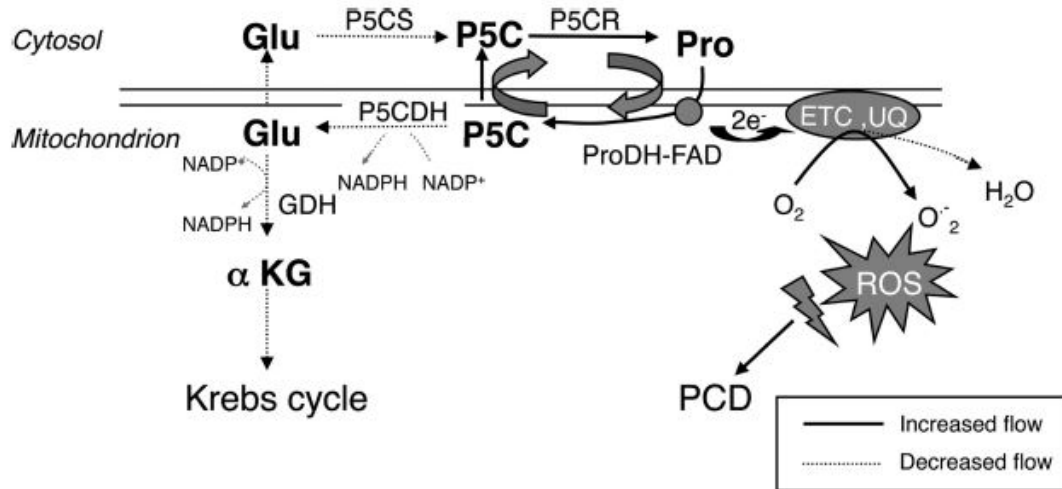


Fig. 39: ciclo P5C/prolina. L'eccesso di P5C mitocondriale, dovuto all'incompleta ossidazione della prolina (come avviene nei mutanti *p5cdh*), viene trasportato e ridotto dalla P5CR nel citosol. A sua volta la prolina viene ossidata dalla ProDH nel mitocondrio. Un eccesso di ossidazione causa un elevato trasferimento di elettroni verso la catena di trasporto di elettroni con conseguente formazione di ROS e morte cellulare programmata (PCD) (Miller et al., 2009).

Un altro interessante meccanismo regolativo a carico della trascrizione della *P5CDH* che avviene a seguito di stress salino viene mediato da due siRNA (short interfering RNA) di diverse lunghezze, denominati nat-siRNA *SRO5-P5CDH* (Fig. 40). In *Arabidopsis* la porzione di genoma occupata dal gene *P5CDH* è parzialmente sovrapposta con il gene *SRO5* (similar to RCD one), attualmente ad attività incognita. La trascrizione del gene *SRO5* (indotta da elevata salinità) causa la formazione di un dsRNA con il trascritto della *P5CDH* il quale viene inizialmente processato dall'enzima DICER-LIKE2 (DCL2) per generare un primo nat-siRNA *SRO5-P5CDH* di 24 pb. Il legame tra questo nat-siRNA con l'mRNA della *P5CDH* veicola una seconda ribonucleasi, la DCL1, che operando un ulteriore taglio dell'mRNA della *P5CDH* genera un secondo siRNA di 21 pb. Il nat-siRNA *SRO5-P5CDH* di 21 pb è capace di legare specificamente i messaggeri per la *P5CDH*, silenziandone l'espressione (Borsani et al., 2005). Questa regolazione post-trascrizionale, causando una diminuzione del catabolismo, porta ad un accumulo di prolina utile per contrastare la condizione di stress salino. D'altra parte, il silenziamento della *P5CDH* induce un aumento di ROS generati dall'intensificazione del ciclo prolina/P5C. Anche se non ancora accertato

sperimentalmente, l'espressione della proteina SRO5, che possiede putative funzioni antiossidanti, limita la formazione di ROS (Borsani et al., 2005).

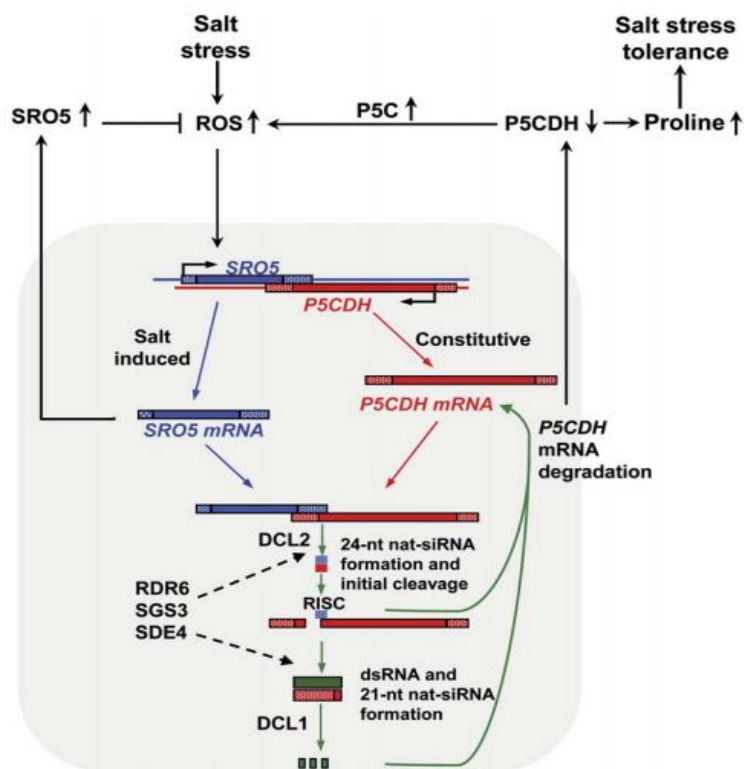


Fig. 40: modello di down-regolazione del gene *P5CDH* mediato dal nat-siRNA *P5CDH-SRO5* e suo coinvolgimento nello stress salino. Lo stress salino induce l'espressione del gene *SRO5* il quale dopo essersi complessato con il trascritto della *P5CDH* viene processato per generare due nat-siRNA della lunghezza di 24 e 21 pb. Il silenziamento della *P5CDH* causa un aumento di P5C con conseguente formazione di ROS. Il gene *SRO5* sembra essere coinvolto nella detossificazione dei ROS (Borsani et al., 2005).

1.7.3. Regolazione del metabolismo della prolina mediata dai ROS

Sempre un maggiore numero di lavori scientifici sta evidenziando come la produzione endogena di ROS sia una risposta comune tra diversi stress sia di natura abiotica che biotica. L'accumulo cellulare di ROS non sempre causa effetti dannosi al metabolismo cellulare bensì, a bassi livelli, tali molecole possono svolgere importanti ruoli nella comunicazione intracellulare e nella trasduzione del segnale utile per il raggiungimento della tolleranza a condizioni ambientali ostili per la pianta (Sewelam et al., 2016). La generazione dei ROS può avvenire in differenti compartimenti cellulari come l'apoplasto, il mitocondrio, il cloroplasto, il perossisoma e il reticolo endoplasmatico mentre i tre più importanti soggetti coinvolti nella generazione di ROS nelle piante sono la catena di trasporto degli elettroni, gli enzimi perossidasi e ossidasi (NADPH ossidasi,

NADH ossidasi, xantina ossidasi, lipossigenasi, ecc) e i pigmenti fotosintetici (Ashraf, 2012). Una prima e diretta correlazione tra la regolazione dell'anabolismo della prolina e l'accumulo di ROS è stata osservata quando foglie di *Arabidopsis* infiltrate con un mix enzimatico di xantina (X) e xantina ossidasi (XO) (utile per la produzione dello ione superossido *in situ*), erano capaci di accumulare progressivamente prolina nel corso delle nove ore successive ai trattamenti (Fig. 41A) (Fabro et al., 2004). Per di più l'accumulo di prolina osservato è stato visto essere direttamente proporzionale alla concentrazione di xantina ossidasi inoculata (Fig. 41B), indicando chiaramente l'esistenza di una relazione diretta tra l'accumulo di prolina e la generazione di ROS. Analisi dell'espressione genica indotta dal ceppo avirulento *P. syringae avrRpm1* (agente scatenante la risposta di ipersensibilità in *Arabidopsis*) avevano evidenziato come l'accumulo di prolina nel sito di infezione era dipendente dall'attività della P5CS2 per cui attraverso l'utilizzo di piante transgeniche *AtP5CS2-GUS* e *AtP5CS2-LUC* è stato notato come la colorazione GUS o la luminescenza specifica per il gene reporter luciferasi avveniva significativamente nei siti di infiltrazione di X e XO (Fabro et al., 2004).

Un ulteriore collegamento diretto tra la biosintesi della prolina con un'altra molecola appartenente alla famiglia dei radicali dell'ossigeno, il perossido di idrogeno (H_2O_2), è stata osservata in piante di mais (Yang et al., 2009). Analisi enzimatiche della P5C sintetasi svolte nei tessuti del coleoptile e delle radici di piantine di mais trattate con H_2O_2 han mostrato un significativo e progressivo aumento della sua attività, mentre la valutazione dell'attività della prolina deidrogenasi a seguito dello stesso trattamento ha mostrato come questa veniva significativamente ridotta in entrambi i tessuti. Parallelamente, nei coleptili di mais sono stati svolti anche esperimenti di espressione genica per la valutazione dell'andamento dell'accumulo dell'mRNA per la P5CS per cui un aumento progressivo e significativo è stato osservato a seguito di trattamenti con H_2O_2 (Yang et al., 2009). Il perossido di idrogeno nelle piante è prodotto da una NADPH ossidasi, conosciuta anche come Rboh (respiratory burst oxidase homologues), localizzata nella membrana plasmatica. Rboh riduce l'ossigeno molecolare (O_2) in ione superossido (O_2^-) ossidando il NADPH attraverso una molecola di FAD e due gruppi prostetici "eme". Lo ione superossido viene quindi convertito in perossido di ossigeno attraverso l'attività della superossido dismutasi (Sagi and Fluhr, 2006). Nel genoma di *Arabidopsis* sono presenti 10 geni codificanti per diverse isoforme di Rboh (*Rboh/A* – *Rboh/F*) le quali sono responsabili della produzione di ROS a seguito di determinati stimoli biotici e abiotici (Torres and Dangl, 2005). L'acclimatazione allo stress salino in *Arabidopsis* richiede la produzione di ROS bifasica, dove una rapida e transiente produzione di ROS (1h) è seguita da una seconda fase

specifica per il signaling dello stress nella quale si verifica un consistente “burst ossidativo” (6h). In particolare, la funzionalità di *Rboh/D* risulta indispensabile per l’attuazione della seconda fase utile per il raggiungimento dell’acclimatazione allo stress salino (Xie et al., 2011). Per valutare il ruolo svolto dalle NADPH ossidasi nell’accumulo di prolina a seguito di stress osmo-salino, Rejeb e collaboratori (2015), attraverso l’utilizzo di un inibitore specifico per le NADPH ossidasi (DPI: diphenylene iodonium), hanno dimostrato come crescenti quantità di inibitore, inibendo la produzione di H₂O₂ NADPH-dipendente, comportavano una diminuzione dell’accumulo di prolina sia in condizioni di stress salino che osmotico (Fig. 41C).

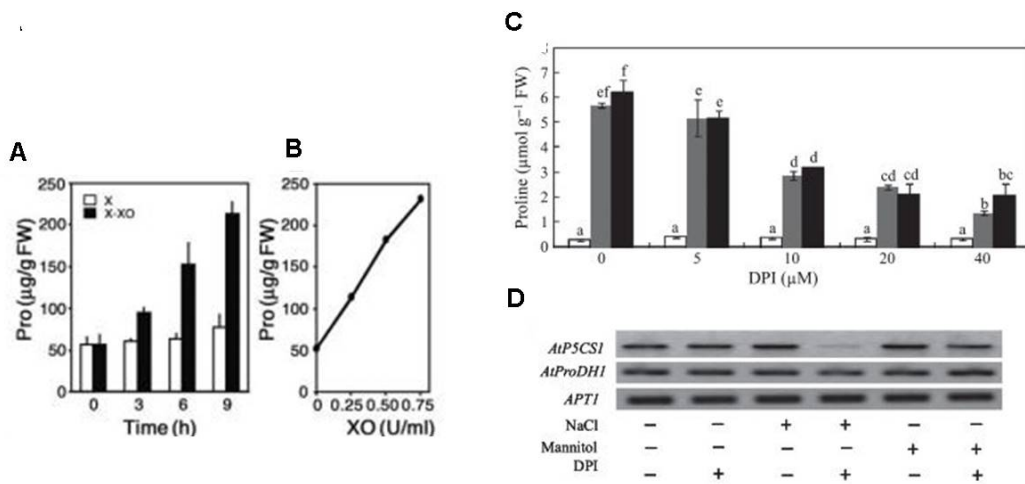


Fig. 41: regolazione dell’accumulo e del metabolismo della prolina mediato dai ROS. La xantina ossidasi, enzima responsabile della produzione di O₂⁻, causa un graduale accumulo di prolina proporzionale alla sua concentrazione (A, B) (Fabro et al., 2004), mentre l’inibitore DPI (specifico per la NADPH ossidasi), inibendo la trascrizione della *P5CS1* in Arabidopsis (D), impedisce l’accumulo di prolina a seguito di stress salino (colonne grigie, NaCl 200 mM) e osmotico (colonne nere, mannitolo 400 mM) (C) (Rejeb et al., 2015).

Ancora, l’accumulo di prolina è stato valutato in mutanti knockout per *Rboh/D* e *Rboh/F* e come atteso in ambedue i mutanti è stata osservata una diminuzione nell’accumulo di prolina dipendente dallo stress osmo-salino. A livello molecolare invece la valutazione dei trascritti responsabili della codifica per gli enzimi catalizzanti le reazioni limitanti dell’anabolismo (*P5CS*) e del catabolismo (*ProDH*) della prolina han mostrato come la presenza dell’inibitore DPI causava da un lato l’inibizione della trascrizione della *P5CS1* e dall’altro un’induzione della *ProDH1* (Fig. 41D) (Rejeb et al., 2015). Complessivamente questi dati, sebbene siano stati ottenuti principalmente utilizzando il sistema modello Arabidopsis, illustrano come la generazione ed il signaling mediato dai ROS è fortemente relazionato con la modulazione del metabolismo della prolina.

1.8. Ruolo della prolina durante la morte cellulare programmata (Programmed Cell Death)

La prolina di per sé non sembra avere una funzione difensiva diretta contro l'invasione da agenti patogeni, ma si ritiene che un ruolo nella difesa della pianta da determinati stress biotici può essere svolto dalla produzione di ROS derivanti dall'attivazione del suo catabolismo così come dall'intensificazione del ciclo P5C/prolina. La produzione di ROS che avviene nel sito di infezione durante le interazioni pianta-patogeno è un fenomeno denominato come "burst ossidativo". Questa precoce risposta di riconoscimento e di difesa attuata durante le interazioni incompatibili è uno dei principali meccanismi di resistenza nei confronti di patogeni avirulenti (Torres et al., 2006). Oltre ad essere coinvolti nella risposta di ipersensibilità e nell'induzione di morte cellulare programmata, i ROS possono portare anche al rinforzamento della parete cellulare e possono fungere da segnale (Torres et al., 2006). Il "burst ossidativo" utile per contrastare i patogeni avirulenti segue generalmente un andamento bifasico dove una prima fase di lieve accumulo transiente di ROS è seguita da una seconda fase, specifica per la resistenza, caratterizzata da un prolungato e massiccio accumulo di ROS nel sito di infezione (Lamb and Dixon, 1997). Il contenuto di prolina è stato visto aumentare a seguito dell'attacco da patogeni in *Arabidopsis* (Fabro et al., 2004) e diversi studi hanno dimostrato come, durante le fasi iniziali di difesa contro agenti patogeni avirulenti, nel sito di infezione viene attivato il suo catabolismo (Cecchini et al., 2011).

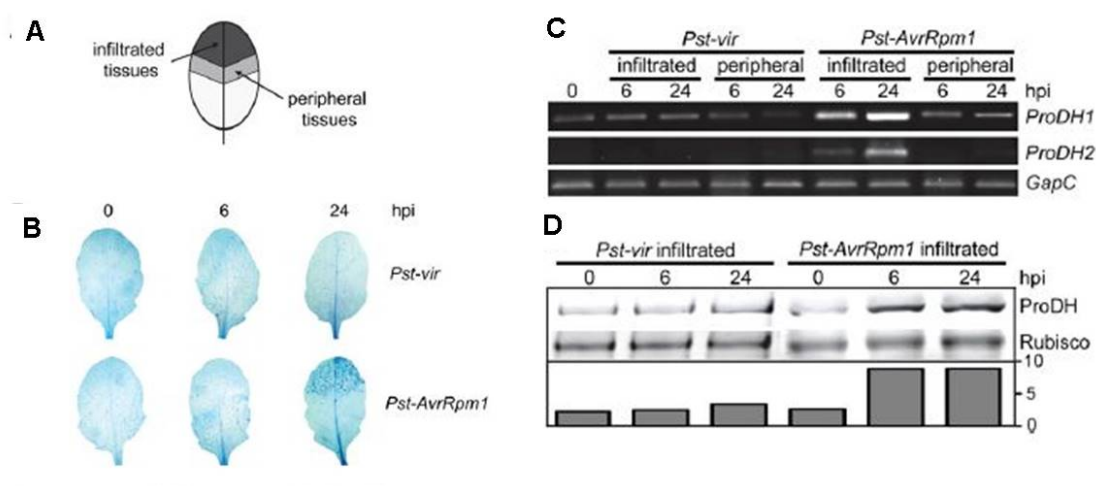


Fig. 42: analisi dell'espressione genica e dei livelli proteici delle due forme di *ProDH* in piante di *Arabidopsis* inoculate con ceppi di *P. syringae* virulento (*Pst-vir*) e avirulento (*Pst-AvrRpm1*). Porzioni di foglie infiltrate con i ceppi *Pst-vir* e *Pst-AvrRpm1* (A), scatenanti o no la produzione di ROS (B) sono state utilizzate per valutare sia l'espressione genica (C) che i livelli proteici, mediante analisi western-blot, (D) di *ProDH1* e *ProDH2*.

In particolare, l'analisi dell'espressione genica a seguito di infezioni con ceppi virulenti e avirulenti di *Pseudomonas syringae*, svolta sia in tessuti direttamente esposti all'infezione, sia in tessuti periferici (Fig. 42 A e B), ha mostrato un accumulo significativo di entrambi i trascritti per *ProDH1* e *ProDH2* solamente nel sito di infezione (Fig. 42C). L'induzione di entrambe le isoforme di *ProDH* è stata osservata sia a 6 h che a 24 h solamente dopo l'inoculazione con il ceppo di *P. syringae* avirulento (*Pst-AvrRpm1*) ed un'intensificazione dell'espressione di questo gene è stata osservata 24 h dopo l'infezione (Fig. 42C). Un profilo di attivazione analogo all'accumulo dei trascritti è stato osservato a seguito dell'infezione con il ceppo avirulento (Fig. 42D) indicando come la trascrizione delle *ProDH1* e *ProDH2* sia strettamente correlata con l'innesco della risposta di ipersensibilità nel sito di infezione (Cecchini et al., 2011).

D'altro canto Cecchini e collaboratori (2011) hanno anche notato come il catabolismo della prolina venisse attivato solamente in parte, non essendoci differenze nell'espressione del gene *P5CDH*, mentre il gene *P5CR* veniva espresso a seguito di infezioni con *PstAvrRpm1*. Questa osservazione indica come la mancanza di coordinazione tra l'attività degli enzimi catalitici ProDH e P5CDH potrebbe portare alla morte cellulare causata da un eccessivo accumulo di P5C/GSA (Deuschle et al., 2001). Un ruolo di primaria importanza nella resistenza della pianta a stress biotici potrebbe quindi essere svolto anche dal P5C (Fig. 43) (Qamar et al., 2015). A sostegno di ciò la trascrizione del gene *P5CDH* è stata vista essere inibita dall'inoculo con ceppi avirulenti di *P. syringae* (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrRpm1*) in *Arabidopsis* mentre la sua espressione, valutata in piante di tabacco (*N. benthamiana*) infettate con il ceppo virulento di *P. syringae* (*P. syringae* pv. *tabaci*), risultava up-regolata (Senthil-Kumar and Mysore, 2012). Inoltre la quantificazione dei livelli di P5C in mutanti per *p5cdh* di *Arabidopsis* han mostrato un leggero aumento dei livelli di P5C nel sito di ipersensibilità a seguito dell'inoculo con *P. syringae* *AvrRpm1* (Monteoliva et al., 2014) indicando come il P5C sia importante per il raggiungimento della resistenza nelle interazioni pianta-patogeno incompatibili. Inoltre trattamenti esogeni con prolina inducono l'espressione del gene *PR1* (*pathogenesis related 1*), classico gene marker per le risposte difensive dipendenti dall'acido salicilico (Chen et al., 2011). L'acido salicilico è un ormone vegetale che svolge un ruolo chiave nella trasduzione del segnale utile al raggiungimento della resistenza a patogeni biotrofici. (es. *P. syringae*). Esperimenti di interazione pianta-patogeno in piante mutanti di *Arabidopsis* incapaci di accumulare l'SA (*NahG*, *EDS5*) hanno mostrato come l'accumulo di prolina 72 h dopo l'infezione con ceppi virulenti e non di *P. syringae* era solo del 28% (*NahG*) o del 44% (*EDS5*) rispetto alle piante wild type (Fabro et al., 2004). Questi dati indicano che alla base del ruolo della prolina nella protezione della pianta da interazioni incompatibili

potrebbe esservi anche un cross-link con il pathway di trasduzione del segnale SA-dipendente.

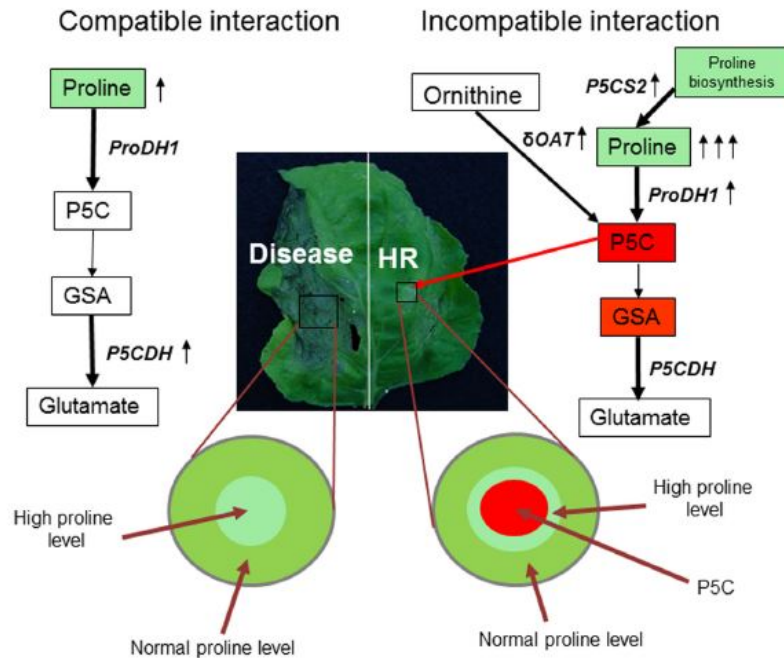


Fig. 43: modello della regolazione del metabolismo della prolina nelle interazioni pianta-patogeno. I patogeni virulenti, instaurando interazioni compatibili con il proprio ospite, riescono a causare malattia inibendo la formazione della risposta di ipersensibilità (sinistra). Durante le interazioni incompatibili i patogeni avirulenti non causano malattia in quanto l'ospite è capace di scatenare una risposta di ipersensibilità (HR) nel sito di infezione (destra). Grazie ad un' aumentata espressione della *ProDH* nel sito di infezione si verifica un accumulo di P5C che insieme alla formazione di ROS coopera per il raggiungimento della risposta di ipersensibilità (Qamar et al., 2015).

1.9. Ruolo della prolina nella regolazione dello stato redox della cellula

Il metabolismo della prolina sembra esser coinvolto anche nella regolazione dello stato redox della cellula secondo varie modalità di azione. Un'elevata attività biosintetica della prolina, via glutammato, ossidando il NADPH a NADP^+ , mantiene alto il rapporto $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (facilita l'ossidazione) che risulta utile per limitare gli effetti della fotoinibizione e la formazione dei ROS a seguito di una elevata irradianza (Hare et al., 1997). Inoltre, il metabolismo della prolina è strettamente collegato con la via metabolica dei pentosi fosfati tant'è che gli alti rapporti di $\text{NADP}^+/\text{NADH}$ ottenuti grazie ad un'elevata biosintesi di prolina provocano un incremento del flusso del carbonio attraverso la via ossidativa dei pentosi fosfati. In particolare, le due molecole di "potere riducente" (NADPH) ossidate durante la biosintesi di prolina, vengono rigenerate nella loro forma ridotta dalle prime due reazioni irreversibili della via dei pentosi fosfati, catalizzate dalla G6PDH (glucosio-6-fosfato deidrogenasi) e dalla 6-fosfogluconato

deidrogenasi. Inoltre, dall'ossidazione del glucosio-6-fosfato a ribosio-6-fosfato si libera anche anidride carbonica. Quando la pianta è sottoposta a condizioni di stress osmotico come immediata risposta procede con la chiusura degli stomi che causa una diminuzione della disponibilità di CO₂ cellulare. Tale risposta adattativa incide sul bilancio energetico della pianta riducendo l'attività del ciclo di Calvin con conseguente diminuzione del consumo di NADPH. In condizioni di stress osmo-salino la CO₂ liberata dalla via dei pentosi fosfati può essere immessa nel ciclo di Calvin, mentre nel cloroplasto, l'attività della P5CS porta alla formazione di NADP⁺ prevenendo inoltre la formazione di ROS (Rejeb et al., 2014).

Nei mitocondri il catabolismo della prolina può regolare lo stato redox della cellula a due livelli. L'ossidazione della prolina può fornire molecole donatori di potere riducente direttamente tramite l'attività della ProDH che, ossidando la prolina, riduce il FAD⁺ a FADH₂. La riduzione del FAD⁺ porta al trasferimento diretto di elettroni all'ubiquinone della catena del trasporto degli elettroni i quali verranno convertiti in energia utile per riprendere la crescita una volta terminate le condizioni di stress (Fig. 44). Il secondo livello di regolazione dello stato redox è governato dall'attività della P5CDH che, ossidando il P5C a glutammato, genera NADH o NADPH (Hare et al., 1997). Risulta logico pensare che la crescita di piante in presenza di elevate concentrazioni di prolina può causare una variazione dell'attività delle ossido-reduttasi coinvolte nel catena respiratoria (Schertl, 2014).

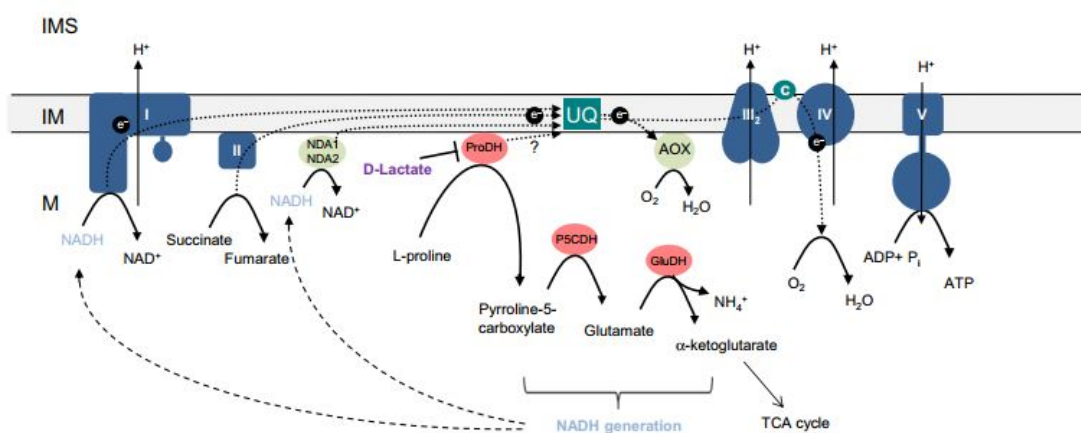


Fig. 44: integrazione del metabolismo mitocondriale con il catabolismo della prolina. Il catabolismo della prolina ed in particolare l'enzima ProDH sembra trasferire elettroni direttamente nella catena di trasferimento degli elettroni. In blu sono riportati gli enzimi della catena respiratoria, in rosso gli enzimi del catabolismo della prolina; in verde i carrier di elettroni e in verde chiaro gli enzimi alternativi (NDA1 e NDA2: alternative NADH dehydrogenases; AOX: alternative oxidase) (Schertl, 2014).

1.10. Applicazioni biotecnologiche dell'ingegnerizzazione del metabolismo della prolina

Come visto in precedenza, l'accumulo di prolina può svolgere svariate funzionalità protettive in risposta a un notevole numero di stress biotici e abiotici, a tal punto che questo aminoacido ha guadagnato il nome di "aminoacido multifunzionale". Grazie al suo enorme potenziale come molecola protettiva, l'ingegnerizzazione e l'ottimizzazione del metabolismo della prolina possono essere strategie interessanti per conferire una maggiore resistenza alle colture. D'altro canto, l'effettivo ruolo svolto dalla prolina nella tolleranza a determinati stress risulta essere ancora fonte di dibattito nella comunità scientifica. In particolare, attualmente non è del tutto chiaro se l'aumentata resistenza conferita dalla prolina sia dovuta dall'accumulo di per sé, o se piuttosto è funzionale all'attività degli enzimi che controllano la sua omeostasi (Kavi Kishor and Sreenivasulu, 2014). Nel corso degli ultimi decenni sono stati svolti diversi tentativi col fine di incrementare la produzione di prolina utile per potenziare la tolleranza allo stress salino. I primi risultati positivi vennero ottenuti negli anni '90 ingegnerizzando piantine di tabacco con il gene *P5CS* di *Vigna aconitifolia*, un legume resistente alla siccità, posto sotto il controllo del promotore CaMV35S. L'espressione costitutiva della *P5CS* così ottenuta nelle piante transgeniche di tabacco ha portato all'accumulo di circa 10 volte più prolina rispetto alle piante wild type in condizioni non stressanti. Al contrario, nonostante le piante transgeniche fossero più tolleranti allo stress salino, queste in condizioni stressanti accumulavano solamente il doppio di prolina rispetto alle piante wild type (Kavi Kishor et al., 1995) a causa della regolazione a feedback da parte della prolina stessa. Attraverso un approccio di mutagenesi sito-specifica Hong e collaboratori (2000), sostituendo la fenilalanina sita in posizione 129 dell'enzima *P5CS* di *Vigna aconitifolia* con un'alanina, furono capaci di ottenere una forma di *P5CS* mutata (*P5CSF129A*) insensibile all'inibizione a feedback da prodotto. Di conseguenza, piante transgeniche di tabacco esprimenti *P5CSF129A* in condizioni fisiologiche accumulavano il doppio di prolina rispetto al wild type mentre in condizioni di stress salino la differenza nell'accumulo di prolina veniva intensificata così come la resistenza alla salinità (Hong et al., 2000). La stessa forma mutata di *P5CS* (*P5CSF129A*) è stata introdotta anche in piantine di riso ottenendo così performance di crescita maggiori in condizioni di stress salino. Grazie all'elevato accumulo di prolina ottenuto in piante *P5CSF129A* di riso lo stress ossidativo ed in particolare i livelli di perossidazione lipidica erano diminuiti (Kumar et al., 2010). Approcci di ingegnerizzazione della biosintesi di prolina sono stati svolti anche a carico del secondo gene della biosintesi, la *P5CR*. Questo enzima non catalizza la reazione limitante della biosintesi di prolina ma opera nel punto di convergenza tra due vie di

sintesi, quella del glutammato e quella dell'ornitina. La sovra-espressione della *P5CR* in patate dolci è stata vista conferire una maggiore resistenza allo stress salino. Tali piante, oltre ad accumulare una maggiore quantità di prolina, presentavano un minore tasso di stress ossidativo risultato dall'attivazione di diversi geni antiossidanti. Inoltre è stato anche osservato un maggiore tasso fotosintetico, di conduttanza stomatica e di clorofilla rispetto al wild type (Liu et al., 2014).

Un approccio alternativo alla manipolazione della via biosintetica dovrebbe consistere nel silenziamento dei geni codificanti per la via catabolica; d'altro canto in letteratura sono stati pubblicati dati discordanti. Sebbene il silenziamento della *ProDH* in piante di tabacco è stata visto indurre una maggiore produzione di prolina, che correlava con un incremento nella resistenza allo stress salino (Ibragimova et al., 2012), la modulazione dei livelli di *ProDH* mediante approcci in senso (S) o antisenso (AS) ha portato a risultati contrastanti. Le linee di *Arabidopsis* trasformate con un costrutto per la *ProDH* in orientamento senso accumulavano circa il 50% in meno prolina rispetto ai wild type sia in condizioni di stress osmotico che durante la fase di recupero dallo stress e non presentavano osmotolleranza. D'altro canto la somministrazione esogena di prolina a queste linee in condizioni di stress salino ha determinato un aumento della resistenza. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che la prolina può essere una buona fonte di energia utilizzata in condizioni stressanti come mostrato dall'elevato tasso di degradazione del glutammato osservato in esperimenti di cromatografia su strato sottile (Mani et al., 2002). Diverso è il discorso per le linee *ProDH-AS*. Nanjo e collaboratori (1999) hanno notato che in condizioni fisiologiche le linee *ProDH-AS* accumulano prolina a livelli maggiori rispetto alle piante wild type e questa tendenza correlava bene con la resistenza allo stress osmotico. Mani e collaboratori (2002) hanno notato invece che sebbene le piante *ProDH-AS* accumulassero elevate quantità di prolina in condizioni di stress osmotico queste non mostravano un aumento dell'osmotolleranza.

Complessivamente, da un punto di vista applicativo, l'ingegnerizzazione del metabolismo della prolina risulta essere una strategia di estremo interesse per il raggiungimento di una maggiore resistenza agli stress abiotici e biotici. D'altro canto sebbene le conoscenze che stanno alla base della regolazione di tale metabolismo stanno progressivamente aumentando soprattutto in piante modello come *Arabidopsis*, lo studio e l'efficacia della manipolazione del metabolismo della prolina dovrà essere valutata anche in piante di interesse agronomico.

1.11. Scopo del lavoro

Il metabolismo della prolina, dunque, sembra rappresentare un'*unicum* nei meccanismi adattativi della pianta, svolgendo un ruolo nella risposta della cellula vegetale a condizioni di stress sia biotico che abiotico. Lo scopo di questa tesi è quello di comprendere la regolazione del metabolismo della prolina nel sistema modello del riso. In particolare gli obiettivi prefissati erano sia di natura biochimica che molecolare. Quelli di natura biochimica si prefiggevano la purificazione e la caratterizzazione dei principali enzimi coinvolti nella via biosintetica della prolina, quali le due isoforme della P5C sintetasi (P5CS1 e P5CS2). Gli obiettivi di carattere più strettamente molecolare invece erano rivolti allo studio dei meccanismi di regolazione trascrizionale che stanno alla base della modulazione del metabolismo della prolina in presenza di diverse condizioni stressanti e non. Un particolare interesse è stato stato inoltre rivolto ai geni biosintetici della prolina (*OsP5CS1*, *OsP5CS2* e *OsP5CR*) individuando la presenza di putative sequenze regolatorie in *-cis* nei loro promotori. Tali sequenze svolgono un ruolo chiave nella regolazione trascrizionale in quanto possono essere legate da proteine regolatrici come i fattori di trascrizione le quali a loro volta possono agire sia da attivatori che da inibitori della trascrizione.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Crescita di colture cellulari in sospensione liquida e di plantule di riso

Le linee cellulari di riso sono state mantenute in beute Erlenmeyer da 500 ml contenenti 100 ml di terreno liquido composto dai sali Murashige e Skoog (MS) (Fig. 45) addizionati con 30 g/l saccarosio e 2 mg/l di acido 2-4 diclorofenossiacetico. Le linee cellulari sono state quindi cresciute in agitazione a circa 100 rotazioni al minuto (rpm) ad una temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e in condizione di penombra. Le colture cellulari sono state rigenerate settimanalmente inoculando 25 ml di sospensione cellulare in 100 ml di terreno fresco in beute da 500 ml. Nonostante le colture cellulari siano capaci di crescere esponenzialmente per 10-15 giorni è stato deciso di procedere come descritto in modo tale da evitare problemi indotti da carenza di nutrienti nel mezzo o dalla formazione di cataboliti potenzialmente tossici. Per lo svolgimento degli esperimenti, le cellule sono state prontamente rinnovate il giorno stesso del trattamento in beute da 250 ml sempre mantenendo inalterato il rapporto tra il volume totale e il volume del terreno di coltura così da non modificare né le condizioni di ossigenazione né le dimensioni dell'inoculo.

MEZZO MURASHIGE & SKOOG		
	Concentrazione nel substrato (mg/l)	Concentrazione stock
MACROELEMENTI		
		X10 (g/l)
NH ₄ NO ₃	1650	16.5
KNO ₃	1900	19.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O (6H ₂ O)	440 (655)	4.4 (6.6)
MgSO ₄ ·7H ₂ O (6H ₂ O)	370 (343)	3.7 (3.43)
KH ₂ PO ₄	170	1.7
MICROELEMENTI		
		X100 (g/200ml)
KI	0.83	0.0166
H ₃ BO ₃	6.2	0.124
MnSO ₄ ·4H ₂ O (1H ₂ O)	22.3 (16.9)	0.446 (0.338)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	0.172
Na ₂ Mo ₀ ·2H ₂ O	0.25	0.005
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0005
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0005
VITAMINE		
		X100 (g/200ml)
INOSITOLO	100	2.0
TIAMINA	0.1	0.002
GLICINA	2.0	0.04
AC. NICOTINICO	0.5	0.01
AC. ASCORBICO	5.0	0.1
PIRIDOSSINA	0.5	0.01
FERRO		
		X100 (g/200ml)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	0.556
Na ₂ EDTA	37.3	0.746

Fig. 45: composizione dei sali MS (Murashige & Skoog).

I semi di riso sono stati cortesemente forniti dall'Unità di ricerca per la risicoltura CRA-RIS di Vercelli. Delle 17 varietà disponibili nel laboratorio di Fisiologia e Biochimica Vegetale dell'Università degli Studi di Ferrara sono state selezionate 4 varietà (Baldo, Vialone Nano, Carnaroli, Volano) per la valutazione del tasso di germinazione. Esse derivano dai raccolti degli anni 2013-2015 e sono state conservate in camera fredda (4-7 °C) al buio.

Prima della semina, i semi sono stati sterilizzati superficialmente mediante trattamento in etanolo assoluto per 3 min seguito da quello in una soluzione sterilizzante contenente 3% (v/v) di NaClO e 0,04% (v/v) di Triton X-100 per 5 min. Una volta sterilizzato, il materiale vegetale è stato abbondantemente lavato in condizioni asettiche con acqua distillata sterile, lasciato imbibire per almeno 5 h e infine seminato con due modalità alternative:

- test di germinazione: 15 semi sono stati posti in piastre Petri dove era presente uno strato di 20 ml di acqua agarizzata (6‰);

- semina: 16 semi sono stati posti in capsule Magenta verticali (6 x 6 x 20 cm) precedentemente riempite con 75 ml di acqua agarizzata (6‰). Una volta posti a dimora, i semi sono stati immediatamente ricoperti con lo stesso volume di sali MS 0,5X implementato con 2 mg/l di Plant Preservative Mixture (Plant Cell Technology) per evitare contaminazioni fungine.

I test di germinazione sono stati effettuati a $24 \pm 0,5$ °C in condizioni di penombra ($\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) con un fotoperiodo di 16:8 h (luce:ombra) quindi il tasso di germinazione è stata valutato ogni 24 h durante il corso di una settimana. La crescita delle plantule di riso nelle Magenta invece è stata ottenuta con un fotoperiodo di 14:10 h (luce:buio) a 26 ± 1 °C di giorno sotto alta irradianza ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) e a 22 ± 1 °C di notte, in un incubatore con lampade a luce fredda con emissione luminosa pari a 1700 lumen (GE Lighting). Le plantule sono state fatte crescere per 14-15 giorni prima di esser utilizzate per i trattamenti.

2.2. Induzione di stress iperosmotico e trattamenti con prolina esogena, ABA e aminoacidi in colture cellulari in sospensione liquida

Tutti i trattamenti svolti utilizzando linee cellulari sono stati applicati a cellule in coltura di riso (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) delle varietà Vialone nano e Loto. L'induzione dello stress iperosmotico è stato raggiunta o trasferendo le cellule in terreno di coltura addizionato con concentrazioni crescenti (15 ÷ 25% p/v) di polietilenglicole (PEG

6000), un composto osmotico non permeante e non tossico per la cellula, o aggiungendo al terreno un adeguato volume di una soluzione di NaCl 5 M. I trattamenti con aminoacidi sono stati svolti utilizzando un adeguato volume di una soluzione 1 M sterilizzata mediante microfiltrazione con siringa ($\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$). Per quanto riguardano i trattamenti con acido abscissico questi sono stati effettuati utilizzando adeguati volumi di una soluzione stock 50 mM sciolta in etanolo.

2.3. Test di vitalità cellulare di Evans

Il test di Evans permette di discriminare la quantità di cellule vitali rispetto a quelle non vitali presenti in una coltura cellulare. Tale test di vitalità si basa sull'assorbimento selettivo del colorante Blu di Evans da parte delle cellule morte presenti (Delledonne et al., 1998). Opportune aliquote di colture cellulari sono filtrate su filtro di carta, lavate con acqua distillata e pesate. Una quantità di cellule corrispondenti a 50 ± 2 mg di peso fresco sono trasferite in provette Eppendorf da 1,5 ml e risospese in 1 ml di tampone potassio fosfato 0,2 M, pH 6,5. A ogni campione sono stati aggiunti 20 μl di una soluzione acquosa al 2,5% (p/v) di Evans Blue. Dopo incubazione per 15 min a T ambiente, rimescolando di tanto in tanto, le cellule sono state sedimentate per centrifugazione 3 min a 14000 g. il supernatante è stato eliminato, mentre le cellule sono state lavate in 1 ml di acqua distillata per 4-5 volte in modo tale da eliminare l'eccesso di colorante non complessato con il materiale cellulare. Le cellule sono state quindi risospese in 1,2 ml di soluzione decolorante (50% [v/v] metanolo e 1% [p/v] sodio dodecil solfato [SDS]) per 15 min a 50 °C in modo tale da rimuovere il colorante. Dopo un'ulteriore centrifugazione, il supernatante ottenuto è stato diluito 1:5 con acqua distillata e letto allo spettrofotometro ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Come controllo negativo sono state usate colture cellulari raccolte nella fase di crescita esponenziale mentre come controllo positivo sono state utilizzate colture trattate per 90 sec in forno a microonde alla massima potenza. I dati, media \pm SD di tre repliche, sono stati espressi come unità ottiche (UO) di colorante g^{-1} di cellule (peso secco).

2.4. Misurazione della prolina e degli aminoacidi liberi con il metodo della ninidrina

La determinazione della prolina libera e degli aminoacidi totali è avvenuta modificando il metodo descritto da Bates (1973) in accordo con Williams e Frank (1975). La quantificazione è di tipo colorimetrico e monitora la comparsa di un addotto di colore giallo proporzionale al contenuto di prolina, con un massimo di assorbimento

a 352 nm. Diluizioni opportune di ogni campione in un volume finale di 15 µl sono state poste in provette Eppendorf a cui sono state aggiunte in sequenza un volume di una soluzione di sodio acetato 3 M e 0,2 ml di reattivo formato da 0,15% ninidrina (p/v) sciolto in acido acetico glaciale. La reazione è stata fatta procedere a 50 °C per 15 min. Una volta portati a temperatura ambiente i campioni sono stati letti mediante uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 352 nm. Ai valori ottenuti sono stati sottratti quelli determinati al T0 prima di far avvenire la reazione a 50 °C, così da eliminare l'interferenza dovuta alla presenza negli estratti di sostanze capaci di assorbire la luce alle stesse lunghezze d'onda. Per ogni campione sono state analizzate 4-5 diverse diluizioni. Dai valori di assorbanza ottenuti è stato possibile risalire alla concentrazione amminoacidica grazie a un'interpolazione con una retta di taratura ottenuta aggiungendo quantità note di prolina (da 2,5 a 15 mM).

2.5. Espressione ectopica degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina

Sono stati utilizzati due vettori di espressione pET101-D-Topo cloning (Fig. 46) precedentemente ingegnerizzati per l'espressione delle due isoforme di P5C sintetasi di *Oryza sativa*. Il vettore topo cloning è caratterizzato dall'esprimere la (His)_{6x}-tag nella porzione C-terminale per cui le proteine di interesse saranno successivamente purificate tramite cromatografia per affinità.

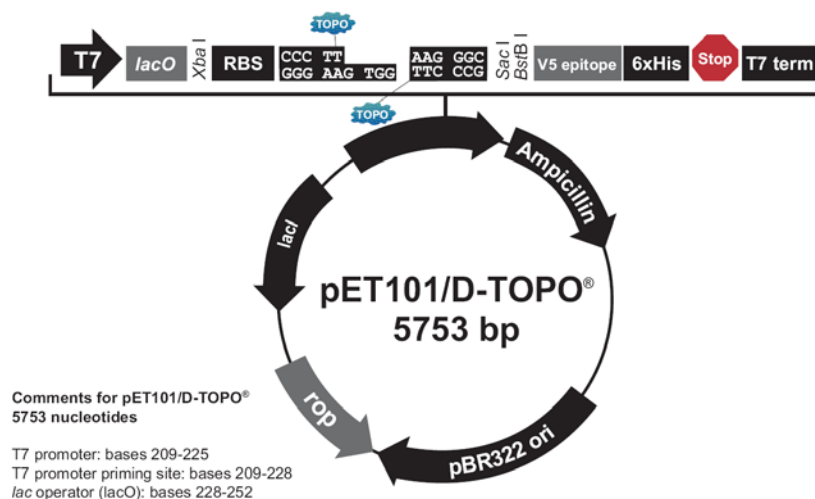


Fig. 46: mappa del vettore di espressione pET101/D-TOPO.

2.5.1. Amplificazione dei plasmidi nel ceppo TOP10 di *E. coli* e successiva purificazione (MidiPrep)

Le singole colonie batteriche contenenti il plasmide di interesse sono state incubate in terreno LB (10 g/l di triptone, 5 g/l di estratto di lievito, 10 g/l di NaCl) in presenza di ampicillina 50 µg/ml a 37 °C overnight in agitazione. I batteri sono stati raccolti per centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente e l'estrazione del DNA plasmidico è stata eseguita con il kit GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (SIGMA).

Al pellet derivante da 5 ml di coltura batterica incubata overnight sono stati aggiunti 200 µl di "Resuspension Solution" quindi, dopo un paio di cicli di vortex, sono stati addizionati 200 µl di "Lysis Buffer". L'aggiunta di questo tampone di lisi alcalina è necessario per solubilizzare le membrane e denaturare proteine e DNA. La provetta Falcon è stata mescolata gentilmente per 6-8 volte e lasciata incubare per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente per permettere la rinaturazione del DNA plasmidico sono stati aggiunti 350 µl di Neutralization/Binding Buffer quindi dopo aver mescolato gentilmente per 6-8 volte la sospensione è stata centrifugata a 10000 rpm per 10 min. Il supernatante è stato quindi caricato in una colonna GenElute HP Miniprep Binding Column, preventivamente posizionata in una nuova provetta, quindi affinché il DNA si legasse alla colonna, si è proceduto mediante centrifugazione a 1500 rpm per 5 minuti. Questo passaggio è stato ripetuto un paio di volte in modo tale da far passare tutto il supernatante attraverso la colonna di legame quindi per rimuovere eventuali contaminanti come RNA, proteine o nucleasi sono stati svolti due lavaggi, il primo con 500 µl di Wash Solution I e il secondo con 750 µl di Wash Solution II. Entrambi i lavaggi sono stati seguiti da una centrifugazione a 10000 rpm per 1 minuto. A questo punto dopo aver posizionato la colonna in una nuova provetta è stato aggiunto 1 ml di acqua. Dopo aver lasciato incubare per un minuto, il DNA plasmidico è stato eluito mediante centrifugazione per 1 min a 10000 rpm. Successivamente all'eluizione, il DNA plasmidico è stato sia quantificato con lo strumento BioSpect-nano (Shimadzu) sia valutato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

2.5.2. Trasformazione del ceppo BL21(DE3) pLysS di *E. coli*

- Preparazione delle cellule competenti

Per poter procedere con la trasformazione delle colonie batteriche un prerequisito indispensabile è che queste siano competenti ovvero pronte per ricevere ed integrare DNA esogeno. Le cellule di *E. coli* usate per l'espressione di OsP5CS1, OsP5CS2

sono state le BL21(DE3) pLysS. Queste cellule sono particolarmente adatte per l'espressione di proteine esogene indotte da Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) in quanto presentano un'alta efficienza di espressione per qualsiasi gene sotto il controllo del promotore del fago T7. Per rendere competenti queste cellule è necessario allestire una pre-coltura di 5-10 ml di LB e cloramfenicolo $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (prelevando una singola colonia dalla piastra madre conservata a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$) e lasciarla crescere overnight a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Il giorno successivo, la coltura in fase stazionaria è stata inoculata in terreno LB fresco in un rapporto 1:100 per ottenere una OD_{600} di partenza compresa fra 0,08 - 0,1. L'inoculo è stato fatto crescere fino ad una OD_{600} pari a 0,2 raggiunto il quale è stato addizionato l'1% (v/v) di MgCl_2 2 M e si è lasciato ulteriormente crescere fino a un valore di OD_{600} compreso fra 0,45 e 0,55. A questo punto la sospensione batterica è stata trasferita in ghiaccio per 60 min per bloccare la crescita quindi le cellule sono state raccolte centrifugando per 5 min a 5000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Una volta rimosso il surnatante le cellule sono state risospese in metà volume iniziale di soluzione $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ (Na-Acetano 40 mM, MnCl_2 70 mM, CaCl_2 100 mM) 0,1 M fredda, precedentemente sterilizzata per filtrazione. Prima di recuperare le cellule mediante centrifugazione per 5 min a 10000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ la sospensione batterica è stata incubata in ghiaccio per 2 h. Il risultante pellet è stato risospeso in 1/50 del volume iniziale di soluzione $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$. Dopo un ulteriore trattamento in ghiaccio della durata minima di un'ora le cellule, a questo punto competenti, sono state utilizzate per la trasformazione.

- Trasformazione delle cellule competenti mediante il metodo dello shock termico

Le cellule competenti sono in grado di integrare il DNA plasmidico esogeno se questo è capace di oltrepassare la membrana cellulare batterica. Per permettere la penetrazione del DNA all'interno delle cellule batteriche un appropriato quantitativo di DNA plasmidico (da 10 pg a 10 ng) è stato aggiunto ad un'aliquota di 50 μl di cellule competenti e si è lasciato incubare in ghiaccio per 30 min in una provetta sterile. Dopo questo passaggio alla sospensione cellulare è stato applicato uno shock termico immergendo la provetta in un bagnetto termostato impostato a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ per 45 sec, quindi sono stati aggiunti immediatamente 450 μl di terreno SOC (Tryptone 20 g/l, Estratto di lievito 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10 mM, Glucosio 20 mM), precedentemente raffreddato in ghiaccio. La risultante sospensione è stata posta in agitazione per 45 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Differenti volumi (100, 30 e 10 μl) della sospensione sono stati piastrati in piastre Petri selettive contenenti $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ di cloramfenicolo e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ di ampicillina. Le cellule sono state incubate overnight a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5.3. Espressione eterologa nel ceppo BL21(DE3) pLysS di *E. coli*

Per ogni proteina di interesse partendo dalle colture batteriche BL21 precedentemente trasformate è stato avviato un pre-inoculo in 40 ml di terreno LB contenente gli appositi antibiotici (cloramfenicolo e ampicillina rispettivamente a concentrazioni pari a 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) messo ad incubare in agitazione overnight a 37 °C. Il giorno seguente opportune diluizioni dei pre-inoculi sono state allestite in modo tale da avviare colture parallele di 200 ml di LB (più opportune concentrazioni di antibiotici) ad un'OD₆₀₀ pari a 0,2 le quali sono state fatte crescere in agitazione a 24 °C. Una volta raggiunto una OD₆₀₀ di circa 0,7 alle colture è stato aggiunto un adeguato volume di IPTG 50 mM per ottenere una concentrazione finale pari a 1 mM quindi sono state poste in agitazione a 24 °C. Trascorso un minimo di incubazione di 5 h le cellule sono state raccolte in tubi Falcon mediante centrifugazione a 2500 rpm per 10 min quindi una volta scartato il supernatante il pellet è stato pesato e immediatamente posto a -20 °C fino all'utilizzo.

2.5.4. Purificazione delle proteine espresse in *E. coli* mediante cromatografia per affinità su colonna HIS-Select

L'utilizzazione del vettore di espressione pET101-D-Topo cloning conferisce il vantaggio di aggiungere alla proteina di interesse un tag costituito da 6 residui di istidina il quale permette una facile purificazione mediante cromatografia di affinità su una colonna contenente una resina di nichel agarosio (His-Select® High Flow Cartridge, Sigma Aldrich).

- Lisi cellulare

Il materiale congelato viene aggiunto con 2 g allumina (g peso fresco)⁻¹ e omogenato in un mortaio precedentemente raffreddato in ghiaccio. L'omogenato è risospeso in 25 ml g⁻¹ di tampone di estrazione costituito da sodio fosfato 50 mM (pH 7,5) contenente 200 mM NaCl e 0,5 mM DTT quindi centrifugato a 10000 rpm per 10 min in una centrifuga refrigerata a 4 °C. Il supernatante che costituisce l'estratto grezzo è stato prelevato e posto in una Falcon sterile in ghiaccio fino al successivo utilizzo.

- Purificazione

Il supernatante, risultato della centrifugazione avvenuta dopo la lisi, prima di essere caricato in colonna è stato aggiunto con un adeguato volume di imidazolo 500 mM per ottenere una concentrazione pari a 20 mM. Per la purificazione sono state utilizzate

delle colonne monouso His SpinTrap (GE Healthcare) le quali prima di essere utilizzate necessitavano di essere riequilibrare attraverso il passaggio in serie di 3 ml di acqua distillata e 5 ml di tampone di estrazione contenente 20 mM imidazolo a un flusso di 10 ml h⁻¹ mantenuto mediante una pompa peristaltica in uscita. Una volta che la colonna di affinità era pronta si è caricato l'estratto ad un flusso costante pari a 5 ml h. Dopo un ulteriore lavaggio con 3 ml di tampone di estrazione, la colonna è stata eluita step-wise seguendo specifici profili in base alla proteina che si desiderava purificare (Tabella 1). Tutta la procedura è stata eseguita in camera fredda a 7 °C.

	P5CS1	P5CS2
Flow-Through	(estratto 20 mM imidazolo)	(estratto 20 mM imidazolo)
Step 1	5 ml 20 mM imidazolo	5 ml 20 mM imidazolo
Step 2	8ml 50 mM imidazolo	8ml 50 mM imidazolo
Step 3	8ml 100 mM imidazolo	8ml 100 mM imidazolo
Step 4		

Tabella 1: profili di eluizione utilizzati nella purificazione delle proteine espresse in *E. Coli*.

2.6. Determinazione del contenuto proteico (metodo di Bradford)

Per la determinazione del contenuto proteico ci si è avvalsi del saggio Bradford (1976), che sfrutta la formazione di un complesso tra il colorante blu di Coomassie e i gruppi amminici liberi delle proteine in soluzione. Il blu di Coomassie libero presenta un picco di assorbimento a 465 nm mentre quando è complessato con un gruppo amminico il suo picco di assorbimento passa a 595 nm (Bradford, 1976). L'assorbanza del complesso a 595 nm risulta proporzionale alla quantità di proteine presenti in soluzione per cui grazie a questa peculiare capacità di assorbire lunghezze d'onda distinte, e a partire da una curva di taratura creata con concentrazioni note di una soluzione di Siero Albumina Bovina (BSA), si è in grado di determinare il contenuto proteico di una soluzione incognita. La miscela colorimetrica è stata preparata sciogliendo 100 mg di Coomassie Brilliant Blue G 250 in 50 ml di etanolo 95%, ponendola in agitazione. Una volta che il colorante si è sciolto sono stati gradualmente aggiunti 100 ml di acido fosforico 85% (p/v) quindi si è portato a volume (1 l) con acqua distillata. Per eliminare l'eventuale reattivo non solubilizzato la soluzione è stata filtrata su filtro di carta. I campioni e gli standard di BSA sono stati addizionati con un volume opportuno di reattivo di Bradford quindi, per permettere la formazione del complesso colorimetrico, si è lasciato incubare per almeno 5 min a temperatura ambiente. Alla misura di assorbanza dei campioni è stata sottratta l'assorbanza di un bianco costituito dal solo reattivo. La lettura è stata effettuata entro 30 min (periodo di stabilità del complesso).

Con i valori di assorbanza è stato possibile disegnare una retta di taratura in funzione delle concentrazioni note di proteina. Le concentrazioni delle soluzioni incognite sono state determinate per interpolazione lineare dopo che aliquote crescenti sono state analizzate secondo la stessa procedura.

2.7. Separazione delle proteine mediante elettroforesi (SDS-PAGE)

La tecnica di elettroforesi SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) permette di separare le proteine in funzione della loro massa molecolare in condizioni denaturanti. Come tutte le tecniche di elettroforesi anche l' SDS-PAGE sfrutta la diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche attraverso una soluzione tampone, utile a mantenere il pH costante, e sotto l'influenza di un campo elettrico applicato. La separazione elettroforetica delle proteine è stata effettuata su un supporto costituito da un sottile gel verticale di poliacrilamide (11 X 11 cm) usando spaziatori da 1 mm. Il gel di corsa era costituito da due fasi distinte definite *separating gel* (parte bassa) e *stacking gel* (parte alta). Le due fasi sono realizzate dalle medesime soluzioni (Tabella 2) ma a concentrazioni differenti; l'acrilammide nello *stacking gel* risulta essere decisamente più bassa (6%), permettendo così la concentrazione delle proteine nei pozzetti di corsa prima che queste vengano risolte durante la migrazione nel *separating gel*. La separazione vera e propria delle proteine avviene difatti nella parte bassa del gel dove è presente il *separating gel* quindi in base alla massa molecolare delle proteine da separare sono state preparate fasi di *separating gel* a concentrazione di poliacrilammide pari al 10%. I campioni proteici da analizzare in SDS-PAGE prima di esser caricati sul gel sono stati bolliti per cinque minuti in un tampone (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerolo 20%, SDS 4%, blu di bromofenolo 1mg ml⁻¹ e 2-β-mercaptoetanolo 10%). Il β-mercaptoetanolo è utilizzato per ridurre gli eventuali ponti disolfuro e per destabilizzarne la struttura terziaria delle proteine, mentre l' SDS, oltre a conferire una carica negativa alle proteine, legandosi fortemente ne provoca la denaturazione. Una volta che i campioni sono stati denaturati, 40 µl sono stati caricati nel gel di poliacrilammide quindi la corsa elettroforetica è stata eseguita in un tampone SDS *tank buffer* (25 mM Tris 192 mM glicina, pH 8,3 contenente lo 0,1% SDS) ad un amperaggio costante di 8 mA per circa cinque ore. La corsa elettroforetica era considerata terminata quando il tracciante di corsa, il blu di bromofenolo, raggiungeva il fondo del gel. La rivelazione delle proteine è stata ottenuta mediante colorazione al blu di Coomassie lasciando incubare il gel nel colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1%, metanolo 50%, acido acetico glaciale 10%) per 10-30 min in agitazione. Trascorso il tempo di colorazione l'eccesso di

colorante è stato eliminato tramite diversi lavaggi nella soluzione di decolorazione (metanolo 20%, acido acetico 10%) sempre in agitazione.

	Gel 10% Acril-Bis	Gel 5% Acril-Bis
	Separating gel	Stacking gel
Acqua distillata	15,6 ml	3,66 ml
Separating gel buffer 4x (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	8 ml	1,5 ml
SDS 10%	320 µl	60 µl
Acrilamide-bis al 40% (SIGMA)	8 ml	750 µl
Ammonio persolfato 10%	250 µl	60 µl
TEMED	36 µl	15 µl

Tabella 2: composizione del gel discontinuo utilizzato per l'analisi SDS-page.

2.8. Saggi dell'attività in vitro della P5C sintetasi di riso

L'attività della P5CS è stata misurata spettrofotometricamente a 30 °C per 20 min (ad intervalli di 30 sec) seguendo la diminuzione dell'assorbanza alla lunghezza d'onda pari a 340 nm relativa all'ossidazione glutammato-dipendente del NADPH. La miscela di reazione era costituita da tampone Tris-HCL 50 mM pH 7,5, L-glutammato 50 mM, ATP 2 mM e NADPH 0,4 mM.

2.9. Analisi dell'espressione genica

2.9.1. Estrazione dell'RNA totale

Il materiale vegetale viene raccolto e immediatamente congelato con azoto liquido o con ghiaccio secco, quindi conservate a -80 °C. Successivamente esso viene tritato a freddo in un mortaio sterile fino ad ottenere una polvere molto fine, che è stata raccolta in un tubo di tipo Falcon da 50 ml. Una porzione di 55 ± 5 mg è stata trasferita in una provetta ed utilizzata per l'estrazione dell'RNA totale mediante il kit "*Plant RNA Isolation Mini Kit*" (Agilent). Ai campioni è stato aggiunta una soluzione di lisi (500 µl + 5 µl di 2-β-mercaptoetanol 14,3 M) che permette il rilascio dell'RNA ed allo stesso tempo inattiva le ribonucleasi ed i metaboliti secondari interferenti, come i composti polifenolici. Dopo aver miscelato energicamente, l'omogenato ottenuto è stato incubato

a temperatura ambiente per 5 minuti. A questo punto si centrifuga a 13000 rpm per 3 minuti per separare il materiale insolubile (membrane extracellulari, polisaccaridi e DNA ad alto peso molecolare). Il surnatante è stato filtrato attraverso apposite “colonne di filtrazione” e centrifugando a 13000 rpm per 1 minuto. Dopo la rimozione dei detriti cellulari, al lisato viene aggiunta una “soluzione di legame” (500 µl) per poi raccoglierlo all’interno di una “colonna di legame”. Impurità residue e residui di DNA genomico sono rimossi attraverso due lavaggi con “soluzioni di lavaggio” seguiti da due centrifugazioni a 13000 rpm per 1 minuto (Wash Solution 1). L’RNA purificato è eluito mediante l’aggiunta di un volume compreso tra i 30 e i 50 µl di H₂O sterile e centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto. L’RNA a questo punto è disponibile per l’utilizzo.

2.9.2. Trattamento con DNAsi e retrotrascrizione dell’RNA in cDNA

Per evitare eventuali contaminazioni con molecole di DNA, prima di procedere con la reazione di retrotrascrizione, i campioni di RNA sono stati trattati con DNAsi utilizzando il kit “*DNase I Amplification Grade*” (Sigma). In tubi eppendorf da 0,2 ml, aliquote di 16 µl di RNA sono state addizionate con 2 µl di buffer di reazione 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.3, MgCl₂ 20 mM) e 2 µl di DNase I (1 U ml⁻¹). La miscela di reazione così composta è stata mescolata gentilmente quindi la reazione è stata fatta procedere per 15 min a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo la reazione è stata interrotta aggiungendo 2 µl di Stop Solution (EDTA 50mM) e scaldando a 70 °C in un termoblocco per 10 min. I campioni sono stati riequilibrati in ghiaccio.

Dalle aliquote di RNA precedentemente trattate con DNAsi è stato sintetizzato il cDNA utilizzando il kit “*iScript™ cDNA Synthesis Kit*” (Bio-Rad). La reazione è stata allestita aggiungendo ad un quantitativo adeguato di RNA (1 µg) 4 µl di tampone di reazione 5x (contenente una miscela di oligo(dT) e primer esamerici random), 1 µl di trascrittasi inversa RNase H + MMLV ed un complemento di acqua, per un volume finale di 20 µl. La soluzione è stata incubata 5 min a 25 °C, 30 min a 42 °C e 5 min a 80 °C. La qualità del cDNA ottenuto è stata verificata tramite PCR, utilizzando oligonucleotidi specifici per l’Actina (primer F, 5’-CTGCGGGTATCCATGAGACT-3’; primer R, 5’-GCAATGCCAGGGAACATAG -3’) e 1 µl di cDNA neo prodotto.

2.9.3. Valutazione della bontà dei cDNA mediante PCR end point

La PCR end point permette di amplificare un segmento di DNA posto tra due inneschi definiti primer. Le fasi per ottenere l’amplificazione consistono in:

- denaturazione del DNA a 95 °C così da permettere l'apertura del doppio filamento;
- appaiamento dei primer a temperature variabili a seconda della loro composizione in basi;
- estensione dei primer a 72 °C condotta dalla Taq polimerasi in presenza di desossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) (Tab. 3; Tab. 4).

Componente	Volume	Quantità
cDNA	1 µl	50-100 ng
Red Mix PCR 5X	1 X	
Primer Forward	0,5 µl	20 pmol
Primer Reverse	0,5 µl	20 pmol
H2O	3 µl	
V _{finale}	10 µl	

Tabella 3: miscela di reazione utilizzate per svolgere la PCR tradizionale di controllo dei cDNA.

Cicli di amplificazione		
1 ciclo	94 °C	3 min
39 cicli	94 °C	40 sec
	61 °C	40 sec
	72 °C	1 min
1 ciclo	72 °C	10 min

Tabella 4: cicli di amplificazione utilizzati per svolgere la PCR tradizionale.

I prodotti della reazione di amplificazione possono essere distinti in base al loro peso molecolare se fatti migrare su gel di agarosio. Il gel è stato preparato usando agarosio alla concentrazione dell'1% (p/v) in presenza di un tampone di corsa TAE 1 X (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) e di G staining alla concentrazione di 0,5 µg ml⁻¹. Quest'ultimo è in grado di intercalarsi tra le basi di DNA rendendolo visibile se esposto a luce fluorescente. Il gel, nei cui pozzetti sono stati caricati 15 µl di prodotto di PCR e il colorante blu di bromofenolo (0,04% p/v) per evidenziare l'avanzare della corsa

elettroforetica, è stato fatto migrare in vaschetta elettroforetica applicando un campo elettrico pari a 30 - 40 Volt per circa 25-30 minuti.

2.9.4. PCR quantitativa in tempo reale (qPCR)

Nelle PCR convenzionali, il prodotto dell'amplificazione (amplicone) viene rilevato a reazione ultimata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio. La real-time PCR, o qPCR, invece, consente di misurare l'accumulo dei prodotti di amplificazione durante il corso della reazione. Ciò è reso possibile includendo nella reazione di amplificazione una molecola fluorescente che segnali l'incremento della quantità di DNA attraverso l'emissione di un segnale proporzionale ad esso. I composti fluorescenti che vengono impiegati in tal senso possono essere coloranti che legano il DNA in maniera aspecifica o sonde marcate sequenza-specifiche a seconda dell'approccio sperimentale scelto. Questa tecnica di analisi presenta diversi vantaggi rispetto alla PCR convenzionale: permette di determinare con una certa accuratezza e grande sensibilità il numero iniziale di copie di template; i risultati di qPCR possono essere qualitativi (presenza o assenza di una sequenza) o quantitativi (numero di copie di DNA) e i dati ottenuti possono essere valutati senza dover far ricorso ad elettroforesi.

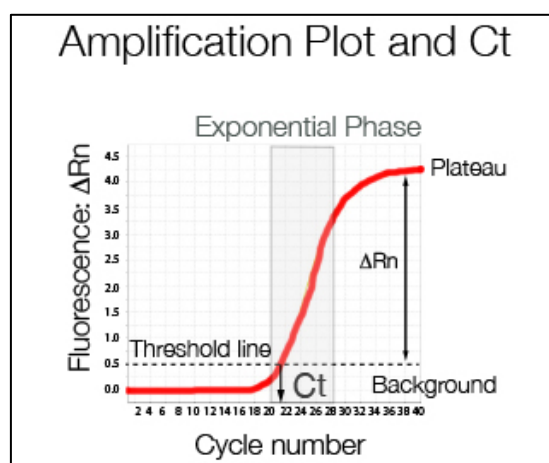


Figura 47: grafico generico di amplificazione mediante qPCR.

Per capire meglio come funziona la qPCR si può osservare un grafico di amplificazione. Sull'asse delle ascisse viene riportato il numero di cicli della reazione mentre su quello delle ordinate la fluorescenza, che è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato. Nella reazione di amplificazione si possono distinguere due fasi: una fase esponenziale

seguita da un plateau (Fig. 47). Durante la fase esponenziale la quantità di prodotto di PCR si duplica ad ogni ciclo mentre nella fase di plateau l'incremento del numero dei cicli non è proporzionale alla fluorescenza emessa. All'inizio della reazione la fluorescenza rimane a livelli basali (al di sotto della linea di threshold). Ad un certo punto, però, l'amplificato si è accumulato in quantità tali da fornire un segnale fluorescente rilevabile. Il numero di cicli in corrispondenza del quale ciò si verifica viene chiamato ciclo soglia (threshold cycle, C_t). Un ruolo chiave in una qPCR viene svolto dai composti utilizzati per monitorare l'amplificazione di una sequenza target. I diversi composti fluorescenti disponibili possono essere raggruppati in due categorie principali:

- 1) coloranti che legano il DNA in maniera aspecifica (SYBR Green I);
- 2) coloranti-etichette, primer e sonde sequenze specifiche (TaqMan).

Il colorante utilizzato nel presente studio è il SYBR Green I, composto organico aromatico (formula molecolare $C_{32}H_{37}N_4S$) facente parte del gruppo delle cianine asimmetriche, molecole dotate di attività fluorofora. Questa molecola è in grado di legarsi in modo aspecifico al solco minore della doppia elica di DNA. Quando si trova libero in soluzione il SYBR Green I mostra un livello di fluorescenza basso mentre quando lega il dsDNA la fluorescenza emessa aumenta fino a 1000 volte (Fig. 48).

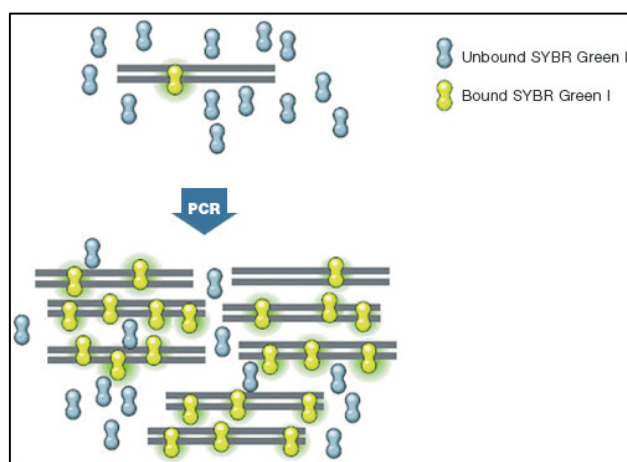


Fig. 48: rappresentazione semplificata del legame delle molecole di SYBR green alle molecole di DNA amplificate.

I vantaggi che derivano dall'utilizzo di questo tipo di coloranti comprendono la semplicità del disegno sperimentale, la possibilità di testare più geni contemporaneamente sulla stessa piastra, il basso costo iniziale e la possibilità di

effettuare l'analisi delle curve di dissociazione (o di melting) per verificare la specificità della reazione di amplificazione. Completata la reazione di amplificazione, infatti, viene generata una curva di dissociazione incrementando la temperatura e monitorando il segnale di fluorescenza. Per quanto riguarda l'amplicone analizzato mediante qPCR questo deve avere dimensioni comprese tra 70 e 200 pb, deve avere un contenuto in GC tra 50-60%, non vi devono essere lunghe ripetizioni di singolo nucleotide e non deve mostrare strutture secondarie che possano limitare-impedire il legame dei primer (Real-Time PCR Applications Guide, Bio-Rad). Di seguito la tabella riportante i primers utilizzati in questo lavoro e relative dimensioni dell'amplicone atteso (Tabella 5).

Gene	Primers	Sequenza	cDNA	DNA genomico
<i>P5CS1</i>	P5CS F1 P5CS R1	CGCAGGATCAATTCGTGAAATCGCA GCAATCTGTACCAAGGCATCAGGA	162	291
<i>P5CS2</i>	P5CS2 F1 P5CS2 R1	GATTGGGTGCTGAGGTTGGCATAA CGACATCCTTGTCCACCATTACCA	132	---
<i>P5CR</i>	P5CR F1 P5CR F2	ATCGTAAGGCAGGTAAGTGGTTGAG AGCTGAACGGGTGTTTGGCATT	150	377
<i>OAT</i>	OAT F1 OAT F2	GAGGGGTTTGCTTAATGCAGTGGA CAGCGGAGGCGCTAATCTGATTAT	142	142
<i>ProDH</i>	ProDH F1 ProDH R1	ACGGTCCAGTGGAGCAGATCAT AGCATTGCAGCCTTGAACCT	133	261
<i>P5CDH</i>	P5CDH F1 P5CDH R1	ATGCTTGCAGTGGTCAGAAGTG TGGGCCAATGGTCAAGTCTTCA	134	487
<i>ACT</i>	ACT F1 ACT R1	CTGCGGGTATCCATGAGACT GCAATGCCAGGGAACATAGT	118	118

Tabella 5: lista di primers utilizzati per l'analisi PCR end-point e qPCR.

2.9.5. Elaborazione dati

L'elaborazione dei dati di qPCR è un fattore estremamente importante per l'ottenimento di dati veritieri, affidabili e soprattutto riproducibili. Il metodo di elaborazione dati utilizzato in questo lavoro è stato quello proposto da Pfaffl e collaboratori (2001), che a sua volta si basa sul metodo Livak (Livak and Schmittgen, 2001), detto anche del $2^{-\Delta\Delta CT}$. Mentre il metodo Livak assume che sia i geni di interesse che quelli di riferimento abbiano un'efficienza di amplificazione pari al 100% (uguale a 2), il metodo Pfaffl tiene in considerazione l'effettiva efficienza dei primers utilizzati. Prima di utilizzare tale metodo è quindi necessario verificare l'efficienza di amplificazione dei primer tramite la costruzione di una retta di efficienza utilizzando un template a concentrazione nota ed effettuando diluizioni seriali come si vede nella figura 49 (nel nostro caso è stato utilizzato un pool di cDNA precedentemente quantificato attraverso lo strumento BioSpect-nano).

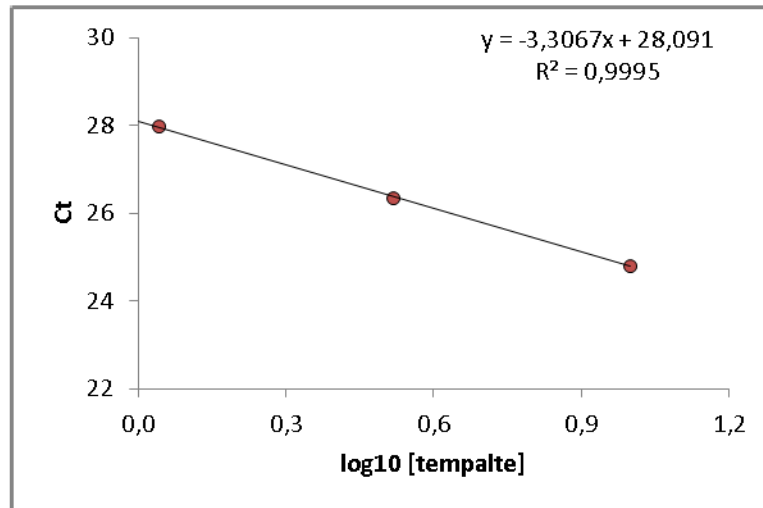


Fig. 49: esempio di retta di efficienze dei primers.

L'efficienza di amplificazione, E, viene calcolata dalla pendenza della retta usando la formula seguente:

$$E = 10^{-1/\text{pendenza}}$$

In linea teorica il quantitativo di prodotto di PCR raddoppia perfettamente ad ogni ciclo (quando l'amplificazione è nella fase esponenziale) per cui l'incremento teorico nel numero delle copie ad ogni ciclo è di 2. Questo viene tradotto in una efficienza di reazione pari al 100%. L'efficienza di amplificazione è frequentemente espressa anche come percentuale:

$$\% E = (E-1) * 100$$

Una volta che l'effettiva efficienza di ogni singola coppia di primers è stata calcolata, per determinare le differenze nel livello di espressione nei diversi campioni si procede normalizzando il C_t del gene di interesse (target) rispetto a quello del gene di riferimento (rif), sia per i campioni trattati (TR) che per i controlli (CTR):

$$\Delta C_t(\text{TR}) = C_{t(\text{target})} - C_{t(\text{rif})} \quad \Delta C_t(\text{CTR}) = C_{t(\text{target})} - C_{t(\text{rif})}$$

A questo punto il metodo Livak procederebbe normalizzando il ΔC_t del campione trattato rispetto al ΔC_t del controllo:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{TR}) - \Delta C_t(\text{CTR})$$

quindi la quantità del gene di interesse sarebbe calcolata direttamente applicando la formula:

$$\text{quantità gene target} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Il dato di espressione in questa tesi è stato calcolato utilizzando il metodo proposto da Pfaffl il quale tiene in considerazione l'effettiva efficienza dei primers secondo la seguente formula:

$$FC = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t, \text{target}} (\text{CTR-TR})}}{(E_{\text{rif}})^{\Delta C_{t, \text{rif}} (\text{CTR-TR})}}$$

2.10. Analisi “*in silico*” delle regioni promotrici dei geni biosintetici della prolina

L'individuazione della posizione genomica dei promotori dei geni *OsP5CS1* (Os05g38150), *OsP5CS2* (Os01g0848200) e *OsP5CR* (Os01g0948400) è stata raggiunta utilizzando il database Rice Functional Genomics Database (<http://signal.salk.edu/>) mentre la sequenza corrispondente a 1000 pb dal sito di inizio della traduzione (ATG) è stata recuperata direttamente dal database NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database). Una volta selezionate le sequenze dei promotori di interesse, queste sono state caricate manualmente nel software PlantPAN2.0 (Chang et al. 2008; Chow et al., 2015) e la ricerca degli elementi regolatori in *-cis* è stata effettuata mediante l'utilizzo della funzione “promoter analysis”. Solamente gli elementi regolatori in *-cis* che presentavano una similarità maggiore o uguale al 95% sono stati considerati. La presenza di putativi fattori di trascrizione capaci di legare le sequenze regolatorie individuate nei singoli promotori sono stati individuati utilizzando la funzione “gene search” del software PlantPan2.0.

2.11. Analisi dell'ontologia genica (GO)

L'analisi dell'ontologia genica (GO) è stata effettuata utilizzando la lista completa dei putativi fattori di trascrizione che il software PlantPan2.0 ha evidenziato avere uno o più siti di legame nei promotori analizzati. L'analisi dell'ontologia genica è stata svolta mediante il software AgriGO il quale supporta solamente il formato MSU per cui, prima di procedere con l'analisi GO è stato necessario convertire il formato dei TF da RAP a MSU. Per una migliore visualizzazione grafica, i risultati ottenuti con il software AgriGO sono stati rielaborati con il software ReviGO (Supek et al., 2011).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Purificazione parziale delle due isoforme della P5C sintetasi (P5CS) di riso

Per poter caratterizzare funzionalmente una proteina di interesse un prerequisito fondamentale sta nel disporre di un semplice ed efficiente protocollo di purificazione che permetta l'ottenimento di buone quantità di proteina. La procedura di purificazione di una determinata proteina si distingue in quattro passaggi fondamentali: (i) la lisi cellulare, (ii) il legame della proteina di interesse ad una determinata matrice, (iii) la fase di lavaggio e (iv) l'eluizione. La lisi cellulare può essere raggiunta sia seguendo diverse metodologie non enzimatiche (sonicazione, french press, ecc) che attraverso l'uso di enzimi idrolitici come il lisozima o detergenti ionici e non ionici. Siccome la purificazione delle proteine native può risultare complessa, spesso si procede attraverso protocolli di purificazione tramite cromatografia per affinità utilizzando proteine di fusione ottenute fondendo il gene di interesse con una sequenza codificante per un polipeptide, generalmente una coda di poli-istidine. Questo facilita notevolmente l'arricchimento e la purificazione della proteina studiata. Ciascun sistema di espressione eterologa presenta infatti dei vantaggi e dei limiti (Yin et al., 2007). I microrganismi procariotici (es. *E. coli*) ad esempio presentano numerosi vantaggi, come il rapido tasso di crescita, la facilità di manipolazione e di conservazione così come i bassi costi. D'altro canto attraverso questi sistemi di espressione non è possibile studiare quelle proteine che per essere biologicamente attive necessitano di modificazioni post-traduzionali come la glicosilazione, la fosforilazione e la formazione di ponti disolfuro.

Prove preliminari di purificazione delle due isoforme P5CS di riso espresse ectopicamente in cellule di *E. coli* BL21(DE3)pLysS hanno evidenziato come l'ottenimento di discrete quantità di proteina fosse difficoltoso in quanto ambedue le isoforme, durante l'espressione eterologa in *E. coli*, venivano sequestrate nei corpi di inclusione. In questa tesi vengono presentati solamente i dati ottenuti dalle procedure di induzione e purificazione della P5CS2, ma analoghi risultati sono stati ottenuti anche utilizzando il plasmide pET151-OsP5CS1.

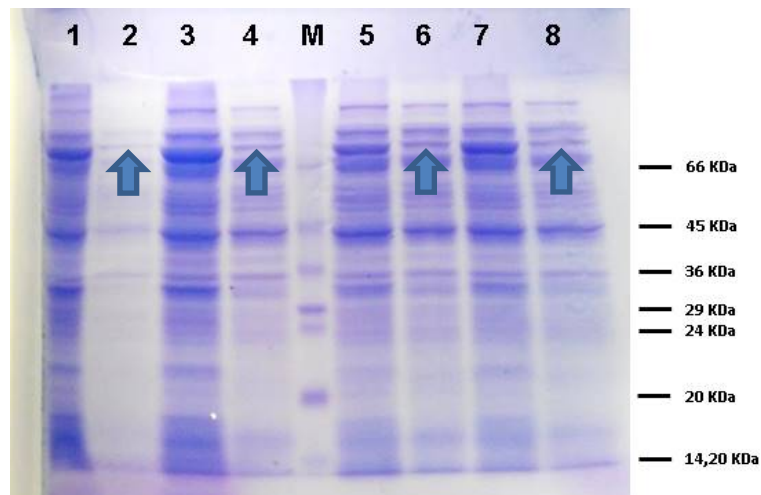


Fig. 50: SDS-page di estratti grezzi derivanti dall'espressione eterologa in *E. coli* BL21-pLysS della proteina P5CS2 di riso. Ceppi di *E. coli* BL21-pLysS sono stati trasformati con il plasmide pET151-OsP5CS2. Dopo l'estrazione le frazioni delle proteine totali e solubili sono state analizzate mediante SDS-page. Le lanes 1, 3, 5 e 7 rappresentano le proteine totali mentre le lanes 2, 4, 6 e 8 le proteine solubili. M = marcatore molecolare low range. Le frecce indicano la posizione attesa per la proteina di interesse, sulla base del peso molecolare atteso (79,5 KDa).

La figura 50 riporta la corsa elettroforetica delle frazioni proteiche totali e solubili derivanti da estratti batterici di *E. coli* trasformati con il plasmide pET151-OsP5CS2. Come si può notare la proteina P5CS2 in condizioni di espressione standard (5 – 6 h di induzione con 1 mM IPTG) viene inglobata nei corpi di inclusione batterici. Difatti nella frazione delle proteine totali si nota la presenza di una banda putativamente corrispondente alla proteina di interesse dal peso molecolare atteso di 79,5 KDa, d'altro canto una banda corrispondente alla proteina P5CS2 è rilevabile anche nella frazione delle proteine solubili ad una intensità molto più debole. Questo indica come buona parte della proteina ricombinante sia stata inglobata nei corpi di inclusione. Per valutare la possibilità di isolare la proteina di interesse si è proceduto ugualmente con la purificazione attraverso cromatografia per affinità in colonna. La figura 51 riporta la corsa elettroforetica di diverse frazioni derivanti dalla cromatografia per affinità delle proteine solubili evidenziando una purificazione parziale della proteina. Nelle frazioni eluite con 100 mM imidazolo (lanes 7, 8 e 9) si nota la presenza di una banda corrispondente alla proteina P5CS2 di riso, d'altro canto nella stessa frazione erano presenti altre bande di peso molecolare maggiori e minori corrispondenti a proteine aspecifiche (Fig. 51).

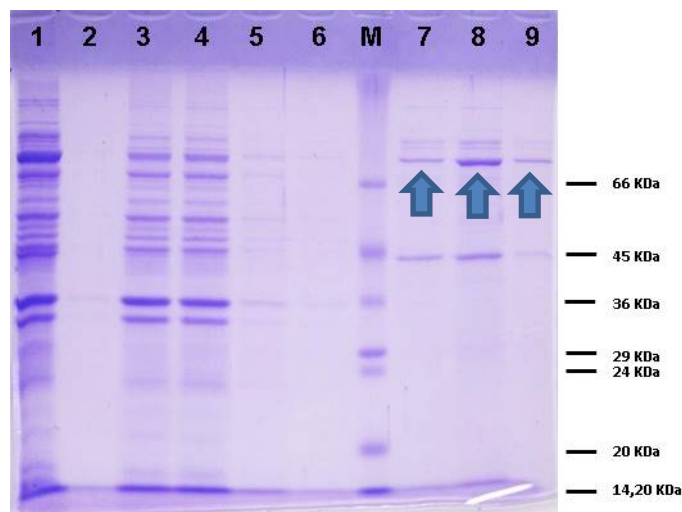


Fig. 51: espressione eterologa nel sistema *E. coli* BL21-pLysS e purificazione per affinità della OsP5CS2. Colture cellulari di *E. coli* BL21-pLysS trasformate con il plasmide pET151-OsP5CS2 sono state indotte con 1 mM imidazolo e la frazione delle proteine solubili è stata purificata mediante cromatografia per affinità. 1) flow through della colonna; 2) eluizione con 20 mM Imidazolo; 3, 4, 5 e 6) eluizioni con 50 mM imidazolo; M = marcatore peso molecolare low range; 7, 8 e 9) eluizioni con 100 mM imidazolo. Le frecce indicano la posizione attesa per la proteina di interesse, sulla base del peso molecolare atteso (79,5 kDa).

3.2. Prove di estrazione proteica dai corpi di inclusione

Uno dei principali problemi indotti dall'espressione di proteine eterologhe in sistemi procariotici è il possibile sequestro della proteina di interesse nei corpi di inclusione. Per provare ad ovviare tale problema si è proceduto provando a variare diversi parametri di induzione. Innanzitutto si è deciso di cambiare sistema di espressione batterico per cui invece di utilizzare il ceppo di *E. coli* BL21(DE3) pLysS sono state utilizzate cellule competenti di *E. coli* SHuffle® T7. Questo nuovo ceppo batterico è stato prodotto e ottimizzato per l'espressione di proteine contenenti modificazioni post-traduzionali come la presenza di ponti-disolfuro (Lobstein et al., 2011). Una volta che le cellule competenti *E. coli* SHuffle® T7 sono state trasformate con la proteina di interesse si è provato ad ottimizzare il protocollo di espressione della proteina modificando vari parametri chimico-fisici come la temperatura di crescita, il tempo di induzione e le concentrazioni di induttore utilizzato. In particolare, invece di utilizzare una concentrazione di IPTG pari a 1 mM, le colture batteriche sono state indotte con 0,2 e 0,4 mM IPTG mentre l'induzione è stata svolta modificando sia i parametri di tempo che di temperatura (16 e 25 °C per 16 h o 30 h e 37 °C per 7 - 8 h). Gli esperimenti svolti per valutare l'effetto delle due concentrazioni di IPTG incubati sia a 25 °C 16 h che a 30 e 37 °C per 7 - 8 h hanno mostrato risultati paragonabili a quelli ottenuti con il sistema di espressione *E. coli* BL21(DE3) pLysS (dato non mostrato). Diversamente l'induzione condotta a 16 °C per 16 h ha rivelato come il sistema *E. coli*

SHuffle® T7 riuscisse ad esprimere una maggiore quantità di proteina nel citosol piuttosto che nei corpi di inclusione. La figura 52 rappresenta la corsa elettroforetica delle frazioni proteiche totali e solubili derivanti dall'espressione eterologa nel sistema *E. coli* SHuffle® T7 indotte con 0,2 mM e 0,4 mM IPTG a 16 °C per 16 h. Come si può notare anche le cellule competenti *E.coli* SHuffle® T7 inglobano buona parte della P5CS2 di riso nei corpi di inclusione. D'altra parte, sebbene lieve, appare che l'induzione in presenza di una minore quantità di IPTG (0,2 mM) favorisca il rilascio nel citosol di una maggiore quantità di proteina solubile (Fig.52, lane 4).

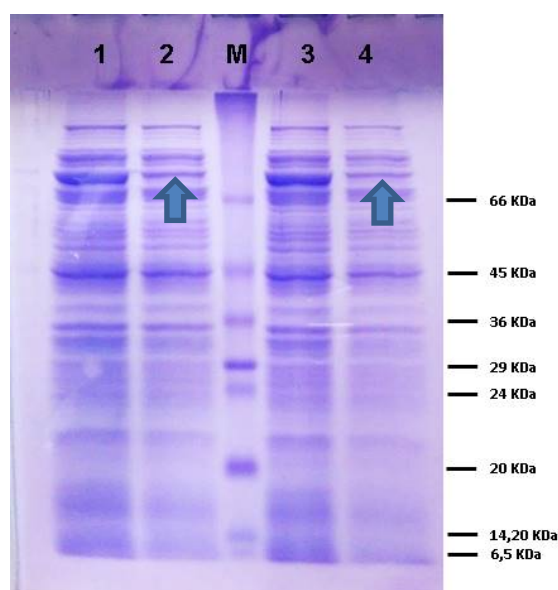


Fig. 52: Analisi SDS-page per la valutazione dell'espressione della *OsP5CS2* nel sistema eterologo *E. coli* SHuffle® T7. Ceppi di *E. coli* SHuffle® T7 sono stati trasformati con il costrutto pET151-*OsP5CS2* quindi l'elettroforesi è stata svolta su aliquote indotte con differenti concentrazioni di IPTG. 1) proteine totali 0,4 mM IPTG, 2) proteine solubili 0,4 mM IPTG, 3) proteine totali 0,2 mM IPTG, 4) Proteine solubili 0,2 mM IPTG, M = marcatore molecolare low range. Le frecce indicano la posizione attesa per la proteina di interesse, sulla base del peso molecolare atteso (79,5 KDa).

La cromatografia di affinità della frazione di proteine solubili derivante dalla coltura cellulare indotta con 0,2 mM IPTG incubata 16 h a 16 °C ha portato a purificare una minore quantità di proteina (Fig. 53 lanes 5 e 6) rispetto alla purificazione precedentemente mostrata in Fig. 51. D'altro canto in questo caso le frazioni corrispondenti all'eluizione con 100 mM imidazolo sono risultate essere meno contaminate rispetto a quanto osservato a seguito delle procedure di purificazione utilizzando il sistema *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

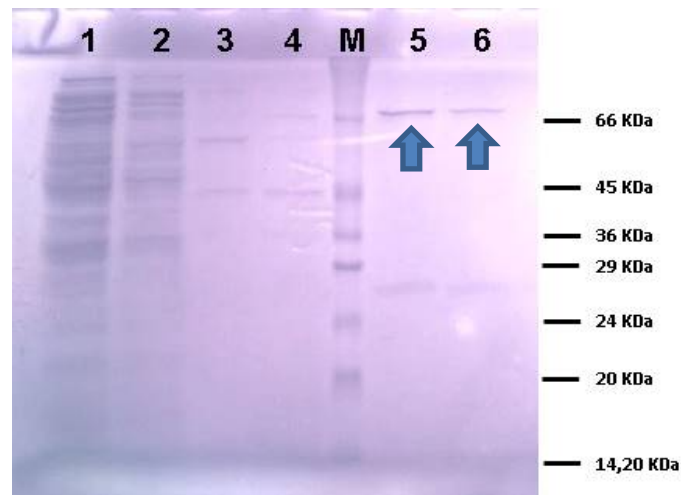


Fig. 53: espressione eterologa nel sistema *E. coli* SHuffle® T7 e purificazione per affinità della OsP5CS2. Colture cellulari di *E. coli* SHuffle® T7 trasformate con il costrutto pET151-OsP5CS2 sono state indotte con 0,2 mM IPTG e l'elettroforesi è stata svolta a seguito di cromatografia per affinità in colonna. 1) flow through della colonna; 2) eluizione con 20 mM Imidazolo; 3 e 4) eluizioni con 50 mM imidazolo; M = marcatore peso molecolare low range; 5 e 6) eluizioni con 100mM Imidazolo. Le frecce indicano la posizione attesa per la proteina di interesse, sulla base del peso molecolare atteso (79,5 kDa).

3.3. Prove di attività della P5CS

Le proteine così purificate sono state saggiate per valutarne l'effettiva attività enzimatica *in vitro* in presenza del substrato glutammato e del cofattore NADPH. Come si nota in fig. 54, la proporzionale diminuzione di assorbanza ($\lambda = 340 \text{ nm}$) relativa all'ossidazione del NADPH osservata in presenza di crescenti quantità di proteina indica come la proteina parzialmente purificata da cellule BL21 trasformate con plasmide pET151-OsP5CS2 sia risultata essere blandamente attiva sul substrato glutammato (Fig. 54). Sebbene la purificazione mediante cromatografia per affinità sia avvenuta in maniera parziale, l'ossidazione del NADPH osservata sembra essere specifica per la proteina di interesse in quanto nel controllo negativo, dove la reazione è stata fatta procedere in assenza di glutammato, il livello di NADPH rimaneva pressochè stabile nel tempo (Fig. 54). Risultati simili in termini di attività (dati non mostrati) sono stati ottenuti anche con la proteina purificata da cellule SHuffle® T7 trasformate con il costrutto pET151-OsP5CS1 (vedi Fig. 53).

D'altro canto il calcolo dell'attività enzimatica specifica ha mostrato come la proteina parzialmente purificata presentasse un tasso catalitico estremamente basso, il quale si aggirava intorno alle $2,5 - 3 \text{ nkat mg}^{-1}$ mentre il tasso di turnover si aggirava intorno a 0,2 eventi catalitici al secondo. Come termini comparativi l'enzima catalizzante la seconda reazione della biosintesi della prolina, la P5C reduttasi, ha mostrato avere un'attività specifica rispettivamente di 694 e 350 nkat mg^{-1} in *Arabidopsis* (Giberti et al.,

2014) e in riso (Forlani et al., 2015b). La quantità esigua di proteina purificata insieme alla scarsa attività enzimatica verificata sperimentalmente non hanno d'altronde permesso di svolgere un'adeguata caratterizzazione biochimica.

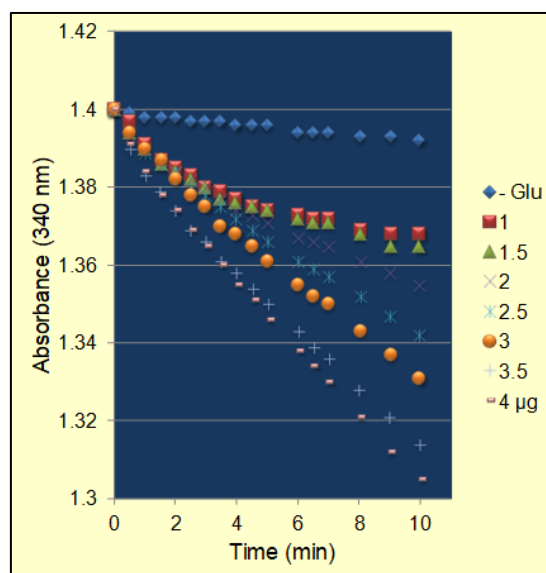


Fig. 54: attività della P5CS di riso. Quantità crescenti di proteina purificata da cellule BL21 trasformate con plasmide pET151-OsP5CS2 (comprese tra 1-4 µg) sono state saggiate in presenza di costanti quantità di glutammato, NADPH e ATP. La lieve differenza nella pendenza delle varie rette, corrispondente alla diminuzione dell' A_{340} relativa all'ossidazione del NADPH, indica una bassa attività specifica.

3.4. Individuazione della posizione genomica dei promotori dei geni della biosintesi di prolina

L'avvento delle tecnologie NGS (Next Generation Sequencing) ha notevolmente accelerato la crescita di vari settori di ricerca nel campo della genomica. Il libero accesso e la grande disponibilità di sequenze geniche ha semplificato l'individuazione e l'utilizzazione di specifiche sequenze di interesse. D'altro canto il preciso riconoscimento della regione promotrice di un gene risulta essere ancora difficoltosa. I promotori sono spesso situati a monte del primo esone e la tripletta segnale di inizio della traduzione (ATG) è estremamente ripetuta nei genomi vegetali. Inoltre questo scenario in riso viene ulteriormente complicato in quanto sia la nomenclatura degli "accession number" che le posizioni genomiche di un determinato gene risultano essere discordanti tra i differenti database disponibili in rete, creando così ambiguità nel recupero delle sequenze da analizzare. Per l'identificazione della posizione nel genoma di riso dei geni di interesse ci si è avvalsi del Rice Functional Genomic Express Database (<http://signal.salk.edu/>). Questo database, che viene gestito dal

Genomic Analysis Laboratory appartenente al Salk Institute (California, USA), è noto anche per disporre di una delle più grandi collezioni mondiali di mutanti inserzionali T-DNA di *Arabidopsis*. In particolare, la localizzazione dei singoli geni di interesse è stata individuata utilizzando la funzione “Rice functional genomic database: RiceGE”. Attraverso questo strumento è possibile scorrere virtualmente su tutto il genoma di riso quindi inserendo in “query” il locus del gene che si desidera individuare è possibile recuperare la posizione genomica (Fig. 56).

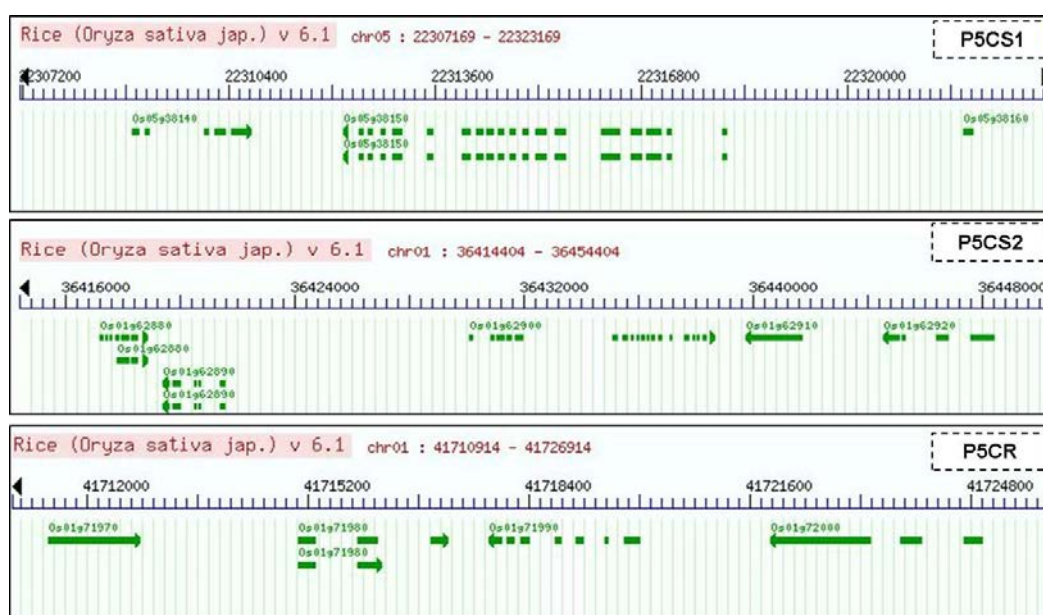


Fig. 56: posizione genomica dei geni *P5CS1*, *P5CS2* e *P5CR* di riso. Screenshot dell'individuazione dei loci *Os05g38150* (*OsP5CS1*), *Os01g62900* (*OsP5CS2*) e *Os01g71990* (*OsP5CR*) attraverso la funzione *RiceGE* del Rice Functional Genomic Express Database.

Una volta che la posizione genomica dei singoli geni è stata identificata, per individuare il sito di inizio della traduzione ci si è avvalsi del database NCBI. NCBI, acronimo di National Center for Biotechnology Information, è un centro di ricerca americano che ospita e gestisce varie banche dati di geni, proteine e altre informazioni relative alle biotecnologie, nonché sviluppa strumenti e software per analizzare dati genomici. In particolare, attraverso l'utilizzo del portale *GenBank*, sono state reperite le sequenze cromosomiche contenenti i loci dei geni di interesse, così pure le relative sequenze CDS (coding DNA sequence) contenenti il codone di inizio della traduzione (ATG). Confrontando quindi la sequenza genomica e le sequenze CDS è stato possibile individuare la putativa regione contenente il sito di inizio della traduzione. A differenza degli altri due geni, l'analisi del sito di inizio della traduzione per il gene *OsP5CR* ha evidenziato la presenza di un introne e di un esone non tradotto nella zona *5'-UTR* (*5'*-

untranslated region) mentre l'ATG è risultato essere posizionato nel secondo esone (primo esone codificante, Fig 57). Indipendentemente da questo si è deciso di analizzare la porzione di 1 Kpb a monte dell'ATG mediante l'analisi "*in silico*" rivolta all'individuazione dei putativi siti regolatori in *-cis* (cis-regulatory elements, CRE) e dei fattori di trascrizione a loro correlati. Le sequenze analizzate sono riportate nell'appendice 5.1.

3.5. L'analisi "*in silico*" dei promotori dei geni della biosintesi di prolina ha evidenziato un elevato numero di sequenze regolatrici in *-cis* e di putative famiglie di TF

Durante l'ultimo decennio è stata generata un'enorme quantità di dati trascrittomici i quali hanno portato ad una visione molto più esauriente delle dinamiche della regolazione trascrizionale nelle piante. All'inizio del 2016, difatti più di 5600 serie di dati ottenuti sperimentalmente sono stati annotati nel database *Gene Expression Omnibus* (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Questi dati sono stati generati da più di 65 differenti specie vegetali anche se il 46% e il 13% sono dati relativi alle specie *Arabidopsis* e riso (Franco-Zorrilla and Solano, 2017). Negli anni '80 quando la ricerca alla base delle interazioni tra TF e CRE era agli inizi, l'identificazione dei TF e dei loro elementi regolatori target poteva essere raggiunta solamente attraverso diverse tecniche di laboratorio come: (i) tecniche di footprinting (DNase I, DNase II, photofootprinting in vivo), (ii) tecniche di digestione con esonucleasi, (iii) tecniche di modificazione chimica del DNA (metilazione, acetilazione, ecc) e (iv) saggi di mobilità su gel EMSA (electrophoretic mobility shift assays). Con il completamento dei progetti di sequenziamento genomico svolti per numerose specie, un elevato numero di sequenze sono state depositate in archivi pubblici e questo ha permesso ai ricercatori di delineare su scala genomica dei veri e propri atlanti di TF. A tal fine nel corso degli ultimi anni sono stati creati numerosi strumenti bioinformatici utili sia per l'individuazione delle sequenze regolatorie in *-cis* sia per l'identificazione e lo studio dei network stabiliti tra specifici TF (Wang et al., 2015). Utilizzando un software specifico per l'analisi dei promotori di *Arabidopsis* ([ww.athamap.de](http://www.athamap.de)) Fichman e collaboratori (2015) hanno creato una mappa di putativi fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione del metabolismo della prolina mentre l'analisi "*in silico*" presentata in questa tesi risulta essere la prima mappa di putativi TF coinvolti nella regolazione della biosintesi della prolina in riso (pianta modello per le monocotiledoni) pubblicata in letteratura (Zarattini and Forlani, 2017). Il software PlantPan2.0 permette di lavorare specificamente con sequenze di *Arabidopsis*, di riso e di mais e utilizza anche tutte le

sequenze regolatorie in *-cis* e dei TF a loro associati depositate in diversi database e software (*Plant CARE, PLACE, JAPAR, TRANSFAC* ecc.). Normalmente, la regione promotrice maggiormente densa in CRE risiede nella zona prossimale al sito di inizio della traduzione (da 1 a 2 Kpb a monte dell'ATG) e studi genome-wide orientati alla valutazione della distribuzione di diverse CRE svolti sia in *Arabidopsis* e riso hanno mostrato come la zona compresa tra il sito di inizio della trascrizione (fine regione 5'-UTR) e 200-300 pb a monte dello stesso risulta essere la porzione di promotore più significativamente arricchita (Yamamoto et al., 2007). Inoltre per svolgere un'analisi paragonabile a quella svolta in *Arabidopsis* da Fichman e collaboratori (2015), le sequenze di 1000 pb dei putativi promotori di geni della biosintesi di prolina sono state analizzate con il software PlantPan2.0 il quale identifica la presenza di tutte quelle sequenze regolatorie in *-cis* con similarità $\geq 75\%$. Con il fine di svolgere un'analisi più conservativa, di tutte le sequenze CRE individuate "*in silico*", solo quelle con similarità $\geq 95\%$ sono state considerate e i risultati dell'analisi sono riportati nella figura 57.

L'analisi "*in silico*" dei promotori della biosintesi di prolina in riso ha evidenziato complessivamente la presenza di numerosi CRE target di 24 differenti classi di TF. In particolare, in tutti i tre promotori analizzati sono stati individuati CRE contenenti siti di legame per le famiglie AP2/ERF, GATA, MYB, e NAC (Fig. 57). L'individuazione di siti di legame per queste famiglie non risulta sorprendente in quanto anche la mappa di TF di *Arabidopsis* evidenziava la presenza di siti di legame per le famiglie MYB e AP2/ERF indicando come questi siti siano ben conservati tra queste due specie (Fichman et al., 2015). Inoltre, fatta eccezione per GATA, le famiglie AP2/ERF, MYB e NAC rappresentano tre delle più grandi famiglie di fattori di trascrizione presenti in riso (Fig. 13; Riechmann 2006). Nel genoma di riso sono presenti 167 loci che codificano per proteine appartenenti alla famiglia AP2/ERF (APETALA 2/Ethylene-Responsive Element) e, in base alla presenza di singoli o coppie di domini AP2/ERF, questa famiglia è suddivisa in quattro distinti sottogruppi: AP2, RAV, ERF e DREB. Collettivamente questa famiglia di TF regola diversi processi fisiologici e dello sviluppo. In particolare la sottoclasse AP2 partecipa principalmente alla regolazione dell'embriogenesi e allo sviluppo del seme, mentre i TF appartenenti alla sottoclasse ERF sembrano svolgere un ruolo chiave nell'integrazione tra i pathway dell'acido jasmonico (JA) e dell'etilene (ET) (Lorenzo et al., 2003).

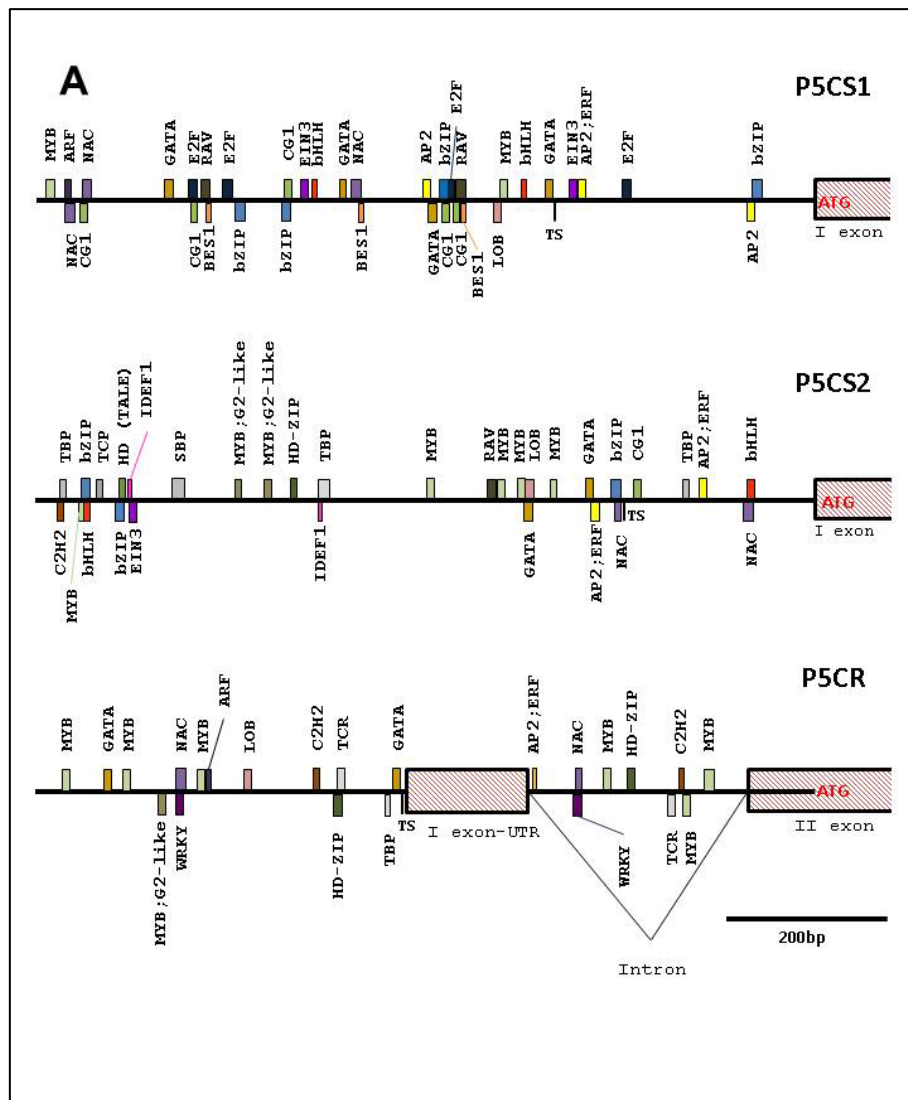


Fig. 57: analisi “*in silico*” dei promotori dei geni *OsP5CS1*, *OsP5CS2* e *OsP5CR* svolta per l’individuazione di putativi CRE. La sequenza di 1000 pb a monte del sito di inizio della traduzione (ATG) è stata selezionata e analizzata con il software PlantPan2.0. Solamente i CRE con similarità $\geq 95\%$ sono stati considerati. I rettangoli colorati rappresentano le putative famiglie di TF che possono potenzialmente legare quella determinata sequenza regolatoria. TS: sito di inizio della trascrizione.

D’altro canto diversi membri appartenenti alla sottofamiglia DREB sono stati visti svolgere ruoli chiave nella risposta a diversi stress abiotici (Mizozia et al., 2012). In particolare la famiglia di proteine DREB1 è coinvolta nella regolazione della trasduzione del segnale dello stress da freddo mentre la famiglia DREB2 è coinvolta nella regolazione del pathway dello stress osmotico (Fig. 14). Diversi studi hanno dimostrato come la sovra-espressione in pianta di entrambi i geni appartenenti alle famiglie DREB1 e DREB2 determini un aumento della tolleranza alla siccità, alla salinità e al freddo ed evidenze sperimentali supportano il loro ruolo come attivatori trascrizionali per la P5CS (Zhang et al., 2013). Ad esempio, piante di soia over-esprimenti il gene di riso *OsDREB2A* presentavano un aumento nell’espressione della

P5CS il quale correlava positivamente con un incremento nelle quantità cellulari di prolina. D'altro canto analisi del promotore della *P5CS* di soia non ha evidenziato la presenza di CRE specifici per le proteine DREB e gli autori ipotizzavano che la regolazione di questo gene sia mediata da miRNA piuttosto che da un'interazione tra TF e il promotore (Zhang et al., 2013). D'altro canto oltre alla canonica sequenza regolatoria DRE/CRT, recentemente è stato notato che diverse proteine DREB sono capaci di legare con un'elevata affinità anche gli elementi GCC-like (GCCGCC) (Franco-Zorrilla et al., 2014), osservazione questa che potrebbe giustificare l'aumento dell'espressione della *P5CS* di soia osservata da Zhang e collaboratori (2013). Dall'analisi "*in silico*" è risultato che una sequenza parzialmente identica a DRE (tCCGAC) è presente 421 pb a monte del sito di inizio della traduzione (TSS) nel promotore di *OsP5CR* (Fig. 57) mentre una sequenza DRE è stata individuata 72 pb a monte del TSS di *OsP5CS2*. Inoltre la ricerca nei promotori di un'eventuale sequenza GCC-like ha evidenziato come questa fosse presente in duplice copia nel promotore della *OsP5CS1* rispettivamente a 300 e 505 pb a monte del codone di inizio della traduzione (ATG) (Fig. 57) (Zarattini and Forlani, 2017).

La seconda famiglia di fattori di trascrizione per la quale sono stati identificati putativi siti di legame in tutti i promotori analizzati è la famiglia MYB. Analogamente alla famiglia AP2/ERF, la famiglia MYB, in base alla presenza da una a tre ripetizioni (anche imperfette) del dominio MYB, si distingue in tre sottocategorie: R1R2R3-MYB, R2R3-MYB e R-MYB. Attraverso approcci di genetica inversa numerose proteine R2R3-MYB sono state caratterizzate le quali sono coinvolte principalmente nell'attuazione di risposte difensive e di tolleranza contro fattori biotici e abiotici così come nel controllo e nella regolazione di vari processi fisiologici quali il metabolismo primario e secondario; la differenziazione e la morfogenesi cellulare (Dubos et al., 2010). Fra tutte le proteine MYB la classe R2R3 è la più ampia e nel caso del riso sono state identificate 109 proteine. Diversi membri di questa sottoclasse sono stati visti essere coinvolti nella risposta della pianta a vari stress abiotici, tra i quali l'elevata salinità, la siccità, il freddo e l'eccessiva irradiazione (Li et al., 2015). Recentemente diversi lavori hanno evidenziato come l'espressione ectopica di proteine appartenenti alla famiglia MYB conferisca una maggiore tolleranza allo stress salino grazie anche ad un aumento dell'espressione dei geni della biosintesi della prolina. In particolare la sovra-espressione in tabacco del gene *FvMYB1*, isolato dalla specie resistente alla salinità *Fraxinus velutina* (Li et al., 2016), e del gene *SbMYB15*, isolato da *Salicornia brachiata*, determina l'attivazione trascrizionale della *P5CS* (Shukla et al., 2016). In *Arabidopsis* invece il TF MYB2 è stato visto cooperare con la calmodulina 4 (Cam4) nella regolazione del promotore della *P5CS1* (vedi cap. 1.71.; Yoo et al., 2005) mentre

la sovra-espressione del gene *TaMYB2A* di mais in *Arabidopsis* aumentava la capacità di accumulo di prolina quando la pianta trasgenica viene sottoposta a stress salino (Mao et al., 2011). In riso invece Xiong e collaboratori (2014) hanno notato come la sovra-espressione del gene *OsMYB48-1* in riso aumenta la tolleranza allo stress idrico e salino grazie alla modulazione di molti geni dipendenti dall'ABA, tra i quali vi erano anche la *OsP5CS1* e la *OsP5CS2*. L'analisi "*in silico*" ha evidenziato la presenza in tutti i promotori analizzati di diverse sequenze bersaglio per i TF MYB (Fig. 57) indicando che teoricamente tutto il pathway biosintetico della prolina può essere regolato da questa famiglia di TF.

La terza famiglia di fattori di trascrizione per la quale diversi siti di legame sono stati individuati in tutti i promotori analizzati è la famiglia NAC (NAM, ATAF, and CUC) (Fig. 57). Le proteine NAC fanno parte di un'ampia famiglia di TF costituita da 151 membri in riso la quale è stata vista svolgere svariati ruoli fisiologici nella differenziazione florale e del meristema apicale del germoglio, nella divisione cellulare, nella senescenza, nella formazione della parete cellulare e nelle risposte a stress biotici e abiotici (Shao et al., 2015). D'altro canto solamente una minoranza dei geni appartenenti alla famiglia NAC è stata ben caratterizzata quindi per delucidare più nel dettaglio il ruolo biologico di questa famiglia sarà necessario ulteriore lavoro sperimentale. Anche per il caso delle proteine NAC è stato notato che la sovra-espressione in varie specie vegetali di singoli geni NAC causa un aumento della tolleranza allo stress idrico e salino che è correlata con un aumento dei livelli di prolina (Hong et al., 2016). Le sequenze CRE target per le proteine NAC sono estremamente eterogenee anche se il *core motif* CACG sembra comunque essere necessario per il legame e per l'attivazione genica da parte delle proteine NAC. L'analisi "*in silico*" dei promotori della biosintesi di prolina in riso ha evidenziato la presenza di questo *core motif* nei promotori dei geni *OsP5CS2* e *OsP5CR*. Altri CRE non canonici bersaglio delle proteine NAC sono stati individuati in tutti i tre promotori analizzati suggerendo che anche questa classe di TF potrebbe regolare l'accumulo di prolina sia in condizioni fisiologiche che stressanti.

La quarta famiglia di TF con siti di legame ricorrenti in tutti i promotori della biosintesi di prolina è risultata essere GATA (Fig. 57). I TF GATA appartengono ad una famiglia di regolatori trascrizionali presenti in molti eucarioti come funghi, metazoi e piante e sono capaci di riconoscere la sequenza consenso "WGATAR" (W = T o A; R = G o A). Questa famiglia di TF nel regno vegetale è più ristretta rispetto a quelle descritte in precedenza, tant'è che nei genomi di *Arabidopsis* e di riso sono presenti rispettivamente 29 e 28 loci che codificano per proteine GATA. Nelle piante i CRE bersaglio per le proteine GATA sono implicati nel controllo trascrizionale dipendente

dalla luce e nella regolazione trascrizionale utile al ricircolo di fonti azotate. La sequenza GATAA, così come altre sequenze correlate a questo motivo, è stata individuata in molti geni regolati dalla luce come ad esempio *RBCS* (Ribulose Bisphosphate Carboxylase Small Chain), *CAB* (chlorophyll A/B binding protein), e *GAP* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Il coinvolgimento di questa famiglia di TF nella regolazione trascrizionale mediata dalla luce è stata anche dimostrata sperimentalmente attraverso saggi EMSA e di footprinting con DNaseI (Reyes et al., 2004). Dall'analisi bioinformatica presentata in questa tesi di dottorato quattro siti di legame per GATA sono stati individuati nel promotore del gene *OsP5CS1* rispettivamente a 348, 497, 613 e 840 pb a monte del sito di inizio della traduzione, nel promotore del gene *OsP5CS2* sono stati individuati due siti 292 e 374 pb a monte dell'ATG mentre due CRE specifici per i TF GATA sono stati individuati a 534 e 911 pb del promotore del gene *OsP5CR* (Fig. 57, Tabella 6) (Zarattini and Forlani, 2017).

	P5CS1	P5CS2	P5CR
AP2	2	1	2
AP2; ERF	1	2	1
ARF	1	//	1
BES1	3	//	//
bHLH	2	2	//
bZIP	4	3	//
C2H2	//	1	2
CG1	5	1	//
E2F	4	//	//
EIN3	//	1	//
GATA	4	2	2
HD (TALE)	//	1	//
HD-ZIP	//	1	2
IDEF1	//	2	//
LOB	1	//	1
Myb	2	4	6
Myb; G2-like	//	2	1
NAC	3	2	2
RAV	//	1	//
SBP	//	1	//
TBP	//	3	1
TCP	//	1	//
TCR	//	//	2
WRKY	//	//	2

Tabella 6: confronto del numero di siti di legame per le famiglie di fattori di trascrizione individuati "in silico" nei promotori della *P5CS1*, *P5CS2* e *P5CR* di riso.

Ulteriori siti di legame per le famiglie E2F e BES1 sono stati individuati solamente nel promotore della *OsP5CS1*, un sito di legame per IDEF1 è stato visto essere presente unicamente nel promotore di *OsP5CS2* mentre diversi siti di legame per le famiglie

TCR e WRKY sono stati individuati solamente nella *OsP5CR*. Complessivamente una visione di insieme di tutti i siti di legame individuati nei diversi promotori è riportata in figura 51 e nella tabella 6.

3.6. Modello teorico di regolazione trascrizionale della biosintesi di prolina ABA-dipendente e ABA-indipendente

L'analisi "*in silico*" ha permesso di individuare potenziali siti di legame bersaglio di numerose classi di famiglie di TF. E' necessario comunque considerare che le diverse famiglie di TF presentano la capacità di legare sequenze regolatorie multiple ed eterogenee (la somma di tutti i CRE legati da una determinata famiglia di TF è definito in inglese "*cistrome*") e i siti di legame di un dato TF possono comprendere anche siti bersaglio di altre proteine. Questa caratteristica rende molto difficoltoso predire con precisione a livello bioinformatico quale TF realmente andrà a legare una determinata sequenza consenso, a tal fine è necessario svolgere prove sperimentali di interazione proteina-DNA. D'altro canto, la disponibilità di una mappa di siti di legame per un TF può fornire quelle informazioni chiave necessarie per costruire modelli teorici di network della regolazione trascrizionale per un determinato gene o un intero metabolismo (Qui 2003). Dall'analisi "*in silico*" dei promotori della biosintesi di prolina in riso è stata evidenziata la presenza di cinque sequenze regolatorie in *-cis* che corrispondevano alla G-BOX (e ABRE), alla GCC-box, alla W-box, ai DRE e ai NACRS. Queste CRE sono ben conosciute per essere coinvolte nella trasduzione del segnale degli stress abiotici sia in maniera ABA-dipendente che ABA-indipendente (Fig. 58 e 59) (Zarattini and Forlani, 2017).

Le sequenze ABRE (Abscisic acid-responsive element) sono considerate essere le principali sequenze CRE coinvolte nella regolazione dei geni dipendenti dall'ABA tant'è che la loro identificazione è stata raggiunta analizzando i promotori di svariati geni noti per essere regolati dall'ABA. Queste sequenze appartengono alla più ampia famiglia di CRE definita G-BOX (CACGTG) e sono caratterizzate dalla presenza di un *core motif* ACGT. Una sottoclasse della famiglia di TF bZIP, le proteine AREB/ABF (ABRE-binding protein/ABRE binding factor), è capace di legare specificamente le sequenze ABRE modulando l'espressione di geni di interesse. D'altro canto una singola copia di ABRE non è sufficiente per indurre l'espressione genica ABA-dipendente bensì è necessaria la presenza, nel promotore del gene target, di due copie di ABRE o di un ABRE abbinato ad un ulteriore elemento definito CE (coupling element) (Hobo et al., 1999). Dall'analisi "*in silico*" è risultato che nel promotore del gene *P5CS1* di riso sono

presenti due sequenze contenenti il core motif ACGT e una sequenza contenente il *core motif* per CE (Fig. 58) (Zarattini and Forlani, 2017).

Le sequenze G-BOX sono state individuate in numerosi geni vegetali e sono costituite da un motivo esamerico CACGTG. Questa sequenza CRE fu scoperta inizialmente studiando la regione non codificante in 5' del gene *RBCS* e si riteneva che tale CRE svolgesse un ruolo solamente nei geni regolati dalla luce (Merkens et al., 1995). Attualmente è invece noto che le G-BOX sono coinvolte nella regolazione trascrizionale dello stress da carenza di ossigeno così come a seguito di trattamenti con ABA, JA, acido cumarico e nella risposta immunitaria (Kaur et al., 2017). Agli albori della loro scoperta si pensava che le G-BOX fossero bersaglio solamente di un sottogruppo di proteine appartenenti alla famiglia di TF bZIP definite come GBF (G-BOX Binding Factor). Attualmente è invece noto che le G-BOX possono essere legate da diverse classi di TF come da proteine appartenenti alle famiglie bZIP e bHLH. Per di più queste due classi di TF possono legare l'elemento G-BOX sottoforma di omo- o etero-dimeri e sono state viste competere per il legame alla G-BOX aumentando ulteriormente la complessità del network regolatorio alla base di questo elemento (Ezer et al., 2017). Dall'analisi "*in silico*" sono state individuate due sequenze G-BOX nel promotore della *P5CS1* e una nel promotore della *P5CS2* in riso indicando un potenziale ruolo anche nella regolazione della biosintesi della prolina.

Le altre tre sequenze CRE individuate nei promotori dei geni analizzati e che sono correlate principalmente con il pathway di trasduzione del segnale ABA-dipendente sono le W-BOX, le MYBRS (MYB Responsive Element) e le GCG-BOX (Fig. 58). La W-BOX è la sequenza consenso minima (TTGACC/T) necessaria per il legame dei TF WRKY. Sebbene queste sequenze siano coinvolte principalmente nel signaling degli stress biotici, recenti evidenze stanno sottolineando un loro ruolo anche nella resistenza a stress abiotici. Per esempio una diretta correlazione tra un membro della famiglia WRKY ed un maggior accumulo di prolina è stata osservata in piante di tabacco che sovraesprimevano il gene di mais *TaWRKY10* (Wang et al., 2013). Una sequenza W-BOX è stata individuata nel promotore della *P5CR* di riso. Le sequenze MYBRS rappresentano le sequenze bersaglio dei TF MYB e sono costituite dalla sequenza generica CANNTG (N = A; T; C; G). La loro presenza è stata notata in tutti i tre promotori analizzati "*in silico*" (Fig. 57) suggerendo un loro potenziale ruolo anche nella regolazione del metabolismo della prolina in riso. L'ultima sequenza regolatoria individuata nel promotore del gene *OsP5CS1* che sembra essere collegata con il pathway dipendente dall'ABA è la GCG-BOX (Fig. 58). Questa nuova sequenza (GG[GT]CC[GT][GA][TA]C) è stata recentemente identificata da Liu e collaboratori i

quali notarono che il TF bHLH112, legando la sequenza GCG-BOX nei promotori dei suoi geni target (entrambi i geni per la *P5CS* in *Arabidopsis*), era capace di indurne l'espressione (Liu et al., 2015). La ricerca di questo CRE nei promotori dei geni della biosintesi della prolina in riso è stata svolta manualmente e una copia è stata identificata nel promotore della *P5CS1* di riso (Fig. 58).

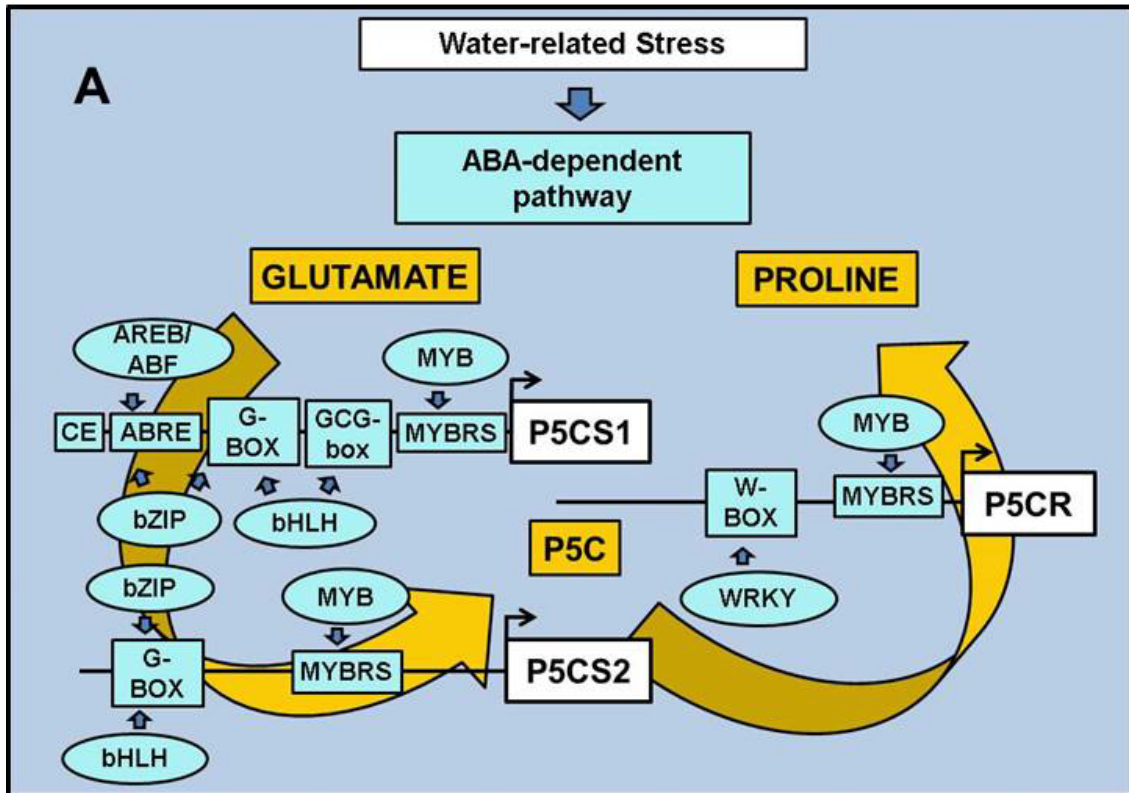


Fig. 58: network di regolazione della biosintesi di prolina ABA-dipendente. Diversi CRE coinvolti nella trasduzione del segnale dipendente dall'ABA sono stati individuati *in silico* nei promotori dei geni della biosintesi della prolina. ABRE, ABA responsive element; CE, coupling element; MYBRS, MYB recognition sequences (Zarattini and Forlani, 2017).

I principali fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione del pathway indipendente dall'ABA che agiscono in risposta a stress abiotici sono i TF DREB e i NAC i quali legano specificamente le sequenze DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-Repeats) e NACRS (NAC recognition sequence).

La sequenza DRE/CRT è un elemento regolatorio in *-cis* coinvolto nella trasduzione del segnale indipendente dall'ABA indotto dallo stress idrico, dall'elevata salinità e dalle basse temperature (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000). La sequenza consenso di DRE/CRT (RCCGAC; R: A o G) è stata individuata da Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki (1994) i quali ne notarono la presenza analizzando per

delezione il promotore del gene *RD29A* (responsive to dehydration 29) in Arabidopsis. Dall'analisi *in silico* svolta in riso è risultata la presenza di due DRE/CRT una nel promotore della P5CS1 e una nel promotore della P5CR (Fig. 59).

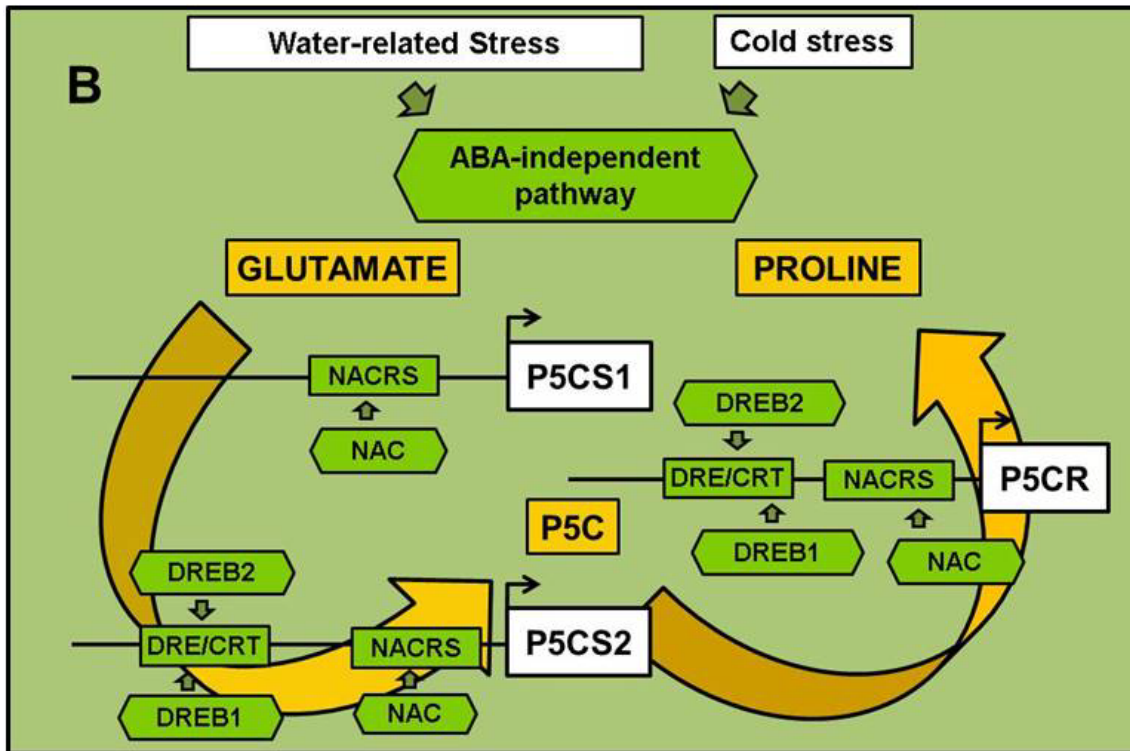


Fig. 59: network di regolazione della biosintesi di prolina indipendente dell'ABA. Diversi CRE coinvolti nella trasduzione del segnale indipendente dall'ABA sono stati individuati *in silico* nei promotori dei geni della biosintesi della prolina. DRE/CRT, dehydration-responsive elements/C-repeat; NACRS, NAC recognition sequences (Zarattini and Forlani, 2017).

Le sequenze regolatorie NACS sono estremamente eterogenee, comunque il *core motif* CACG sembra essere necessario per il legame e per l'espressione genica da parte dei TF NAC. Diversi siti di legame per i TF NAC sono stati individuati in tutti i promotori dei geni della biosintesi di prolina in riso (Fig. 59).

3.7. Individuazione di putativi TF e analisi dell'ontologia genica

Il software PlantPan2.0, una volta identificati tutti i CRE presenti in un determinato promotore, attraverso l'utilizzo della funzione "gene search", permette di ottenere una lista di putativi TF capaci di legare le sequenze regolatorie precedentemente individuate. Complessivamente è risultato che un totale di 434 putativi TF potrebbero

essere coinvolti nella regolazione del metabolismo della prolina (Tabella 7) (la lista completa è riportata come suppl. data in Zarattini and Forlani, 2017).

Famiglia di TF	n° TF individuati	Famiglia di TF	n° TF individuati	Famiglia di TF	n° TF individuati
AP2	84	E2F	1	Myb	36
ERF	15	EIN3	4	Myb; G2-like	1
ARF	24	GATA	8	NAC	31
B3	1	HD	1	RAV	2
BES1	1	HD(TALE)	8	SBP	17
bHLH	29	HD-WOX	1	TBP	2
bZIP	38	HD-ZIP	22	TCP	9
C2H2	4	IDEF1	1	TCR	1
CG1	3	LOB	5	WRKY	85

Tabella 7: famiglie e n° totale di fattori di trascrizione individuati dal software PlantPan2.0 che potenzialmente possono regolare la trascrizione dei geni coinvolti nella biosintesi della prolina.

In particolare è risultato che 37, 75 e 130 distinti TF potrebbero legare rispettivamente i promotori della *OsP5CS1*, *OsP5CS2* e *OsP5CR*, 97 TF trovano un sito di legame in entrambi i promotori delle P5CS, 33 putativi TF potrebbero regolare entrambi i promotori dei geni *OsP5CS1* e *OsP5CR*, 38 TF trovano un sito di legame nei promotori dell'*OsP5CS2* e dell'*OsP5CR* mentre solamente 24 TF potrebbero regolare tutti i tre promotori analizzati come riportato in figura 60.

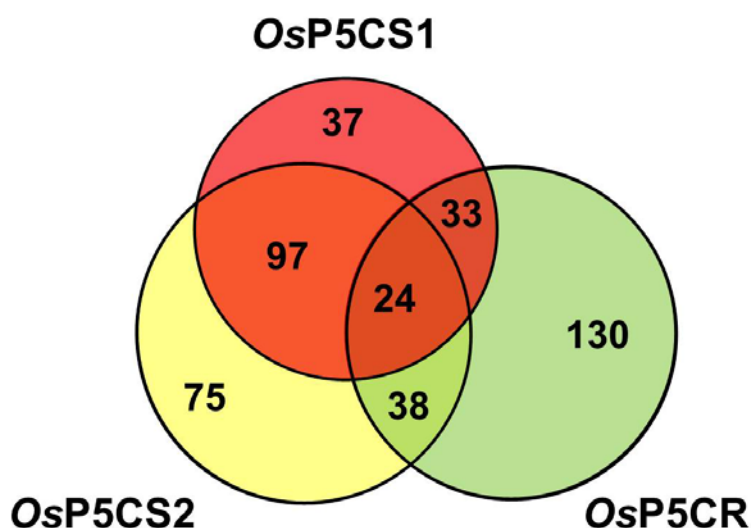


Fig. 60: diagramma di Venn dei TF individuati "in silico". Il digramma è stato costruito utilizzando la lista dei TF putativi che trovano un sito di legame nei promotori dei geni della biosintesi di prolina in riso.

Per ottenere maggiori informazioni riguardo ai processi biologici nei quali i TF individuati “*in silico*” potessero essere coinvolti, la lista completa di tutti i putativi TF è stata sottoposta ad un’analisi dell’ontologia genica (GO). Il progetto GO fornisce un’ontologia di termini ben definiti per la descrizione di prodotti genici (se annotati) in termini di funzione molecolare, di ruolo biologico e di ubicazione cellulare. A tal proposito, per lo svolgimento dell’analisi GO ci si è avvalsi di uno strumento specifico per le piante, il software AgriGO (Du et al., 2010). Attraverso questo software è possibile svolgere un’analisi definita SEA (*Singular Enrichment Analysis*) mediante la quale l’arricchimento di una determinata categoria di GO (per il ruolo biologico, per la funzione molecolare e anche per l’ubicazione cellulare) è calcolato confrontando la presenza in percentuale di un determinato termine ontologico rispetto ad una lista di geni di referenza proposta di default dal programma. Complessivamente dall’analisi dell’ontologia genica sono risultate essere coinvolte 55 classi di GO (Fig. 61). Per quanto riguarda il ruolo biologico una rilevante porzione di categorie GO sono relative alla regolazione di processi metabolici e cellulari riferiti principalmente ai composti azotati e alle macromolecole. Queste indicazioni risultano di estremo interesse. Come atteso avendo analizzato una lista di putativi TF le principali categorie GO relative alla funzione molecolare sono risultate essere pertinenti alla regolazione trascrizionale e alla capacità di legare al DNA mentre le principali classi di GO relative alla localizzazione cellulare riguardavano gli organelli cellulari e il nucleo (Fig. 61).

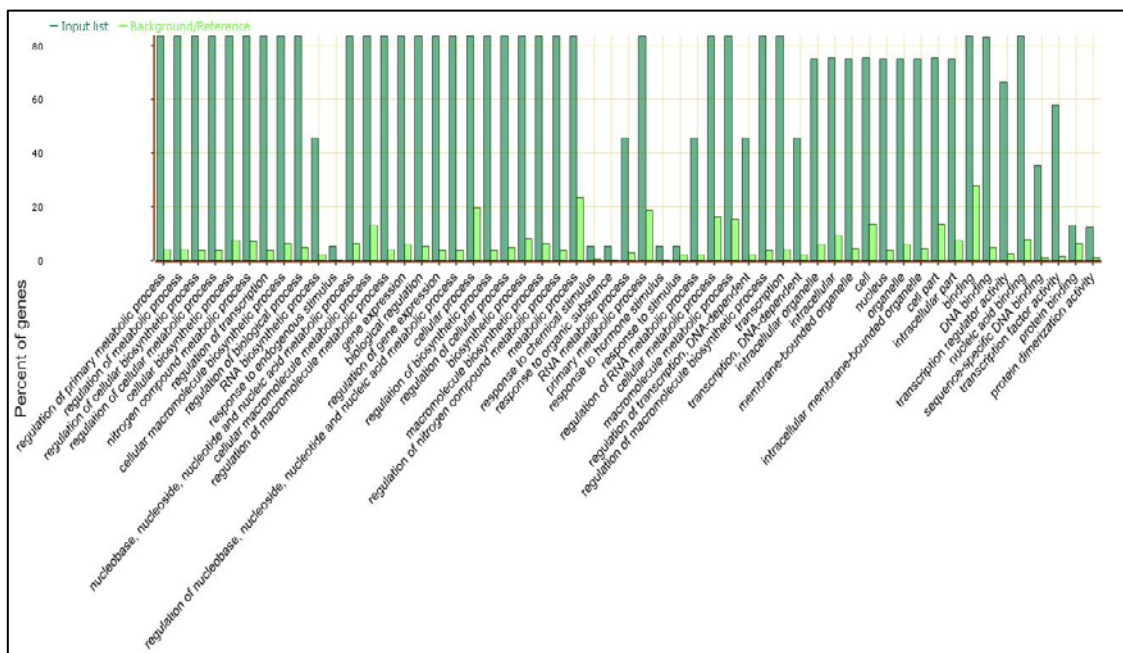


Fig. 61: analisi dell’ontologia genica della lista di TF individuati “*in silico*”. I TF individuati “*in silico*” sono stati analizzati con il software AgriGO. Sono riportate tutte le 55 categorie GO relative al ruolo biologico, alla funzione molecolare e alla localizzazione cellulare.

D'altro canto quando si lavora con grandi quantità di dati o di liste di geni uno dei principali problemi con il quale ci si confronta è relativo alla buona interpretazione dei risultati che generalmente risultano essere ridondanti. Per ottenere una migliore visualizzazione dei risultati dell'analisi GO relativi al ruolo biologico dei TF analizzati, i dati ottenuti mediante il software AgriGO sono stati ulteriormente elaborati con il software REVIGO (Supek et al., 2011). REVIGO è un "open source web tool" che in base alla somiglianza semantica fra le varie categorie raggruppa e riorganizza i lunghi elenchi di termini GO derivanti dal software AgriGO proponendo nuove e significative sottocategorie. Il risultato grafico dell'analisi è riportato in figura 56. Nel grafico la disposizione spaziale X-Y di ogni categoria GO è stata assegnata in modo tale che i termini semanticamente simili risultavano il più possibile vicini fra di loro mentre la dimensione delle circonferenze specifiche per una data categoria GO era proporzionale alla frequenza di TF che rientrano in quella categoria (Fig. 62).

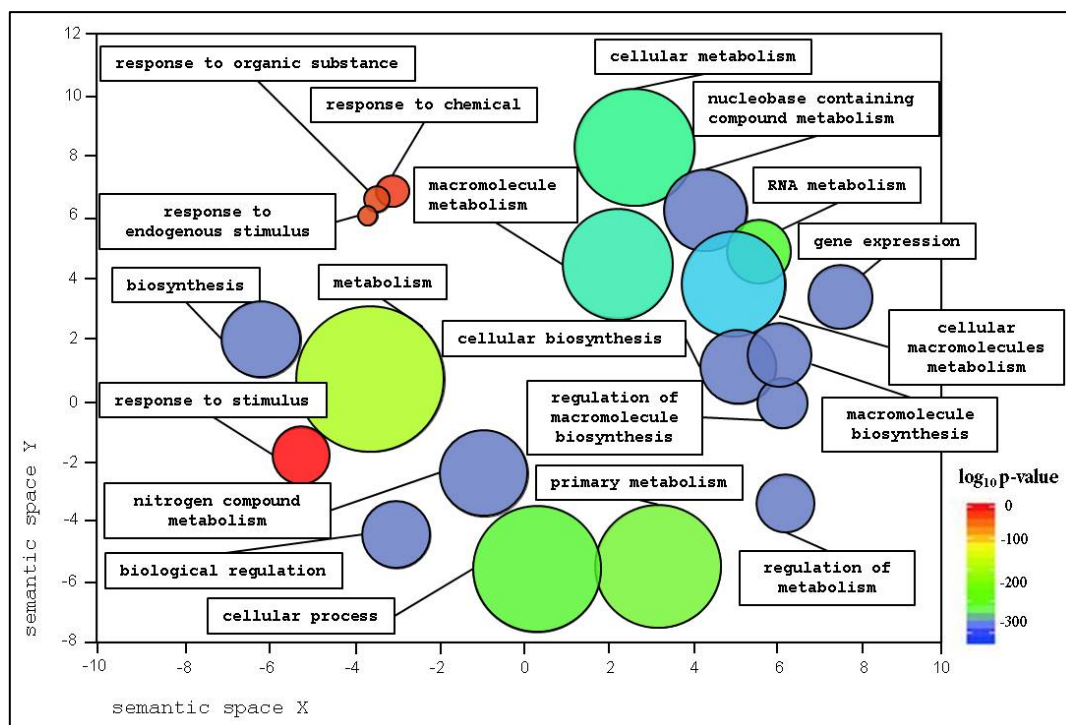


Fig. 62: Analisi GO della lista di TF individuati "in silico". Per ottenere una migliore e più comprensibile rappresentazione grafica i dati ottenuti mediante il software AgriGO sono stati rielaborati con il software REVIGO il quale ricapitola le categorie GO in base alla similarità semantica. La grandezza dei cerchi è proporzionale alla frequenza di TF per ogni termine GO mentre il colore indica la significatività in termini di log₁₀ p-value di ogni categoria.

Dall'analisi con REVIGO sono risultate 20 nuove sottocategorie GO (Tabella 8) dove le più rappresentate sono quelle nominate come *metabolic process*, *cellular process*,

primary metabolic process, cellular metabolic process, e macromolecule metabolic process.

nuove categorie GO	frequency	nuove categorie GO	frequency
metabolic process	84,51%	biological regulation	17,69%
cellular process	63,53%	macromolecule biosynthesis	16,08%
primary metabolism	59,22%	gene expression	15,71%
cellular metabolism	53,99%	RNA metabolic process	15,33%
macromolecule metabolism	46,53%	response to stimulus	12,49%
cellular macromolecule metabolism	40,64%	regulation of metabolism	12,26%
nitrogen compound metabolism	29,58%	regulation of macromolecule biosynthesis	9,45%
nucleobase-containing compound metabolism	26,38%	response to chemical	3,93%
biosynthesis	23,22%	response to organic substance	2,59%

Tabella 8: nuove categorie GO e relative frequenze ottenute con il software REVIGO.

3.8. Valutazione della regolazione dell'anabolismo della prolina a seguito di trattamenti con auxina in riso

L'analisi bioinformatica dei promotori dei geni coinvolti nella biosintesi della prolina ha mostrato la presenza di svariate sequenze regolatorie in *-cis* le quali possono essere legate da numerosi TF. D'altro canto l'analisi dell'ontologia genica svolta con il software Revigo ha evidenziato una sottocategoria nominata "*response to endogenous stimulus*" la quale è stata vista essere arricchita principalmente di fattori di trascrizione regolati dall'ormone auxina ARF (Auxine Responsive Factor).

Gli ormoni vegetali appartenenti alla famiglia delle auxine sono coinvolti in numerose risposte fisiologiche e adattative dell'intera pianta come il tropismo, la dominanza apicale e l'iniziazione delle radici mentre a livello cellulare governano l'estensione e il differenziamento della cellula. Oltre ad avere un ruolo di primaria importanza nella fisiologia della pianta, nel corso degli ultimi decenni è stato chiaramente dimostrato come l'auxina sia anche capace di esercitare un rapido e specifico effetto sull'espressione di determinati geni, tra i quali, i più finemente studiati appartengono alle famiglie Aux/IAA, GH3 e SAUR (Hagen and Guilfoyle, 2002). L'analisi dei promotori dei geni indotti da auxina ha svelato la presenza di una sequenza regolativa

chiave definita AuxRE (auxin response elements; TGTCTC) sito di legame specifico unicamente per i fattori di trascrizione ARF. D'altro canto nella regolazione del signaling mediato dall'auxina sono coinvolti ulteriori componenti, tant'è che l'attività di questi fattori di trascrizione è repressa quando i TF ARF eterodimerizzano con le proteine AUX/IAA (Hagen 2015; Hagen and Guilfoyle, 2002). Il legame tra AUX/IAA e i TF ARF è fortemente dipendente dalle concentrazioni di auxine presenti a livello cellulare. Al di sotto di una certa concentrazione soglia le proteine AUX/IAA reprimono i TF ARF formando degli eterodimeri, diversamente quando le concentrazioni di auxina cellulare aumentano, i repressori Aux/IAA vengono degradati rapidamente dal proteosoma attraverso l'azione della ligasi E3 SKP1-Cullin-F-box (SCF) (Fig. 63). L'attività del proteosoma conduce alla degradazione e alla dissociazione delle proteine Aux/IAA dai TF ARF permettendogli quindi di svolgere la loro funzione di attivatori sull'espressione dei geni auxina-dipendenti (Fig. 63) (Gray et al., 2001).

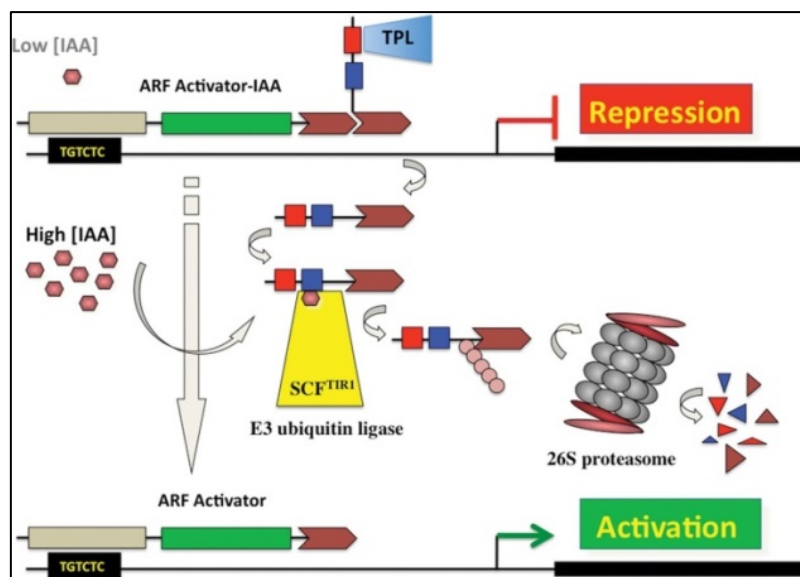


Fig 63: modello di trasduzione del segnale nel nucleo mediato dalle auxine. Quando le concentrazioni di auxina sono basse, i TF ARF ancorati agli AuxRE sono repressi attraverso l'interazione con le proteine Aux/IAA e con il co-repressore TOPLESS (TPL). Quando le concentrazioni di auxine aumentano i repressori Aux/IAA vengono marcati dal complesso SCF^{TIR1}. I repressori Aux/IAA sono quindi ubiquitinilati e degradati dal proteosoma 26S. La degradazione dei repressori dei TF ARF porta all'attivazione della trascrizione dei geni auxina-dipendenti (Hagen 2015).

Dall'analisi *in silico* dei promotori della biosintesi della prolina in riso sono stati individuati due siti di legame (TGTCTC) per i fattori di trascrizione ARF, uno nel promotore del gene *OsP5CS1* e uno nel promotore del gene *OsP5CR* (Fig. 57). Per valutare se i CRE AuxRE potessero esser coinvolti nella biosintesi della prolina si è proceduto valutando l'espressione genica dei geni della biosintesi di prolina in piante di

riso della varietà baldo (due settimane) 6 e 24 h dopo trattamenti con 5 e 50 μM 2-4D (acido-2,4-diclorofenossiacetico) (Fig. 64).

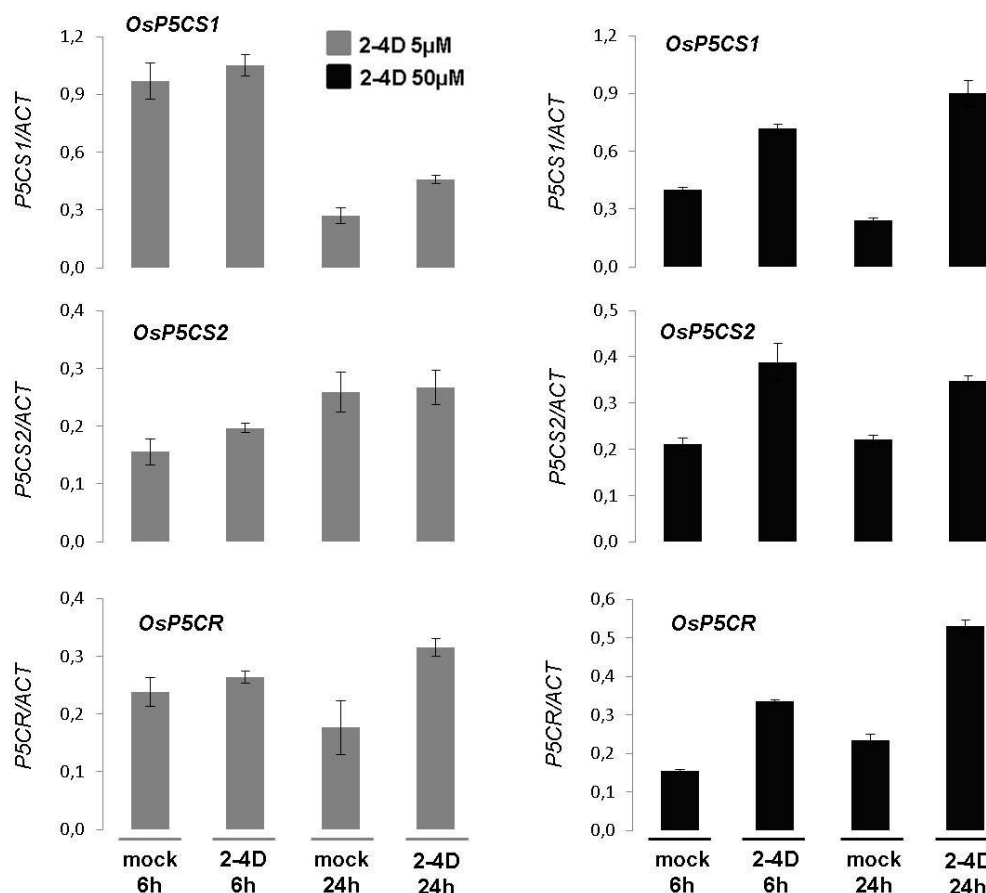


Fig. 64: analisi dell'espressione dei geni della biosintesi della prolina in risposta a trattamenti con auxina (2-4D) in riso. Piantine di riso di due settimane sono state trattate con 2-4D 5 o 50 μM e l'analisi qPCR è stata svolta 24 e 48 h dopo i trattamenti con diverse concentrazioni di 2-4D o con acqua (mock).

E' noto che il 2-4D ad elevate concentrazioni ha effetti tossici sulla fisiologia della pianta (viene infatti utilizzato come erbicida) e che concentrazioni superiori gli 800 ppm ($\approx 3 \text{ mM}$) causano un ritardo della crescita e della germinazione dei semi (Hsueh and Lou, 1947). In termini di regolazione della trascrizione è stato però precedentemente dimostrato tramite saggi *GST-pull down* in piantine di *Arabidopsis*, che a basse concentrazioni i repressori AUX/IAA sono legati al DNA bloccando la trascrizione. Viceversa a concentrazione maggiore (50 μM) si osserva inequivocabilmente la degradazione dei repressori AUX/IAA grazie all'interazione tra il proteosoma SCF^{TIR1} e AUX/IAA portando quindi all'attivazione della trascrizione (Gray et al., 2001). Per testare l'effetto dell'auxina sulla regolazione della trascrizione dei geni biosintetici della prolina è stato quindi deciso di utilizzare due diverse concentrazioni di 2-4D (5 e 50

μM) in modo da verificare se anche in riso si osserva il fenomeno descritto in *Arabidopsis*. Cellule di riso sono state quindi trattate con entrambe le concentrazioni di ormone e i livelli di trascrizione dei geni chiave della biosintesi della prolina sono stati analizzati mediante PCR quantitativa.

Dall'analisi qPCR è emerso che 6 h dopo il trattamento con la più bassa concentrazione di 2,4-D testata nessuno dei geni della biosintesi di prolina veniva significativamente indotto rispetto ai campioni di controllo non trattati mentre una maggiore induzione dell'espressione del gene *OsP5CR* è stata osservata 24 h dopo i trattamenti con 2,4-D 5 μM . Diversamente una più marcata induzione dell'espressione di tutti i geni della biosintesi di prolina è stata osservata 24 h dopo i trattamenti con la più alta concentrazione di auxina testata (Fig. 64). Per valutare se i dati di espressione genica osservati a seguito di trattamenti con la più alta concentrazione testata correlassero con un effettivo accumulo di prolina cellulare si è proceduto quantificando la prolina 24 e 48 h a seguito di trattamenti con 2,4-D 50 μM . Un incremento di prolina (Fig. 65) è stato osservato sia 24 che 48 h dopo i trattamenti con auxina. Questi dati seppur indiretti potrebbero suggerire un potenziale ruolo positivo dei TF ARF nella regolazione della biosintesi di prolina in riso.

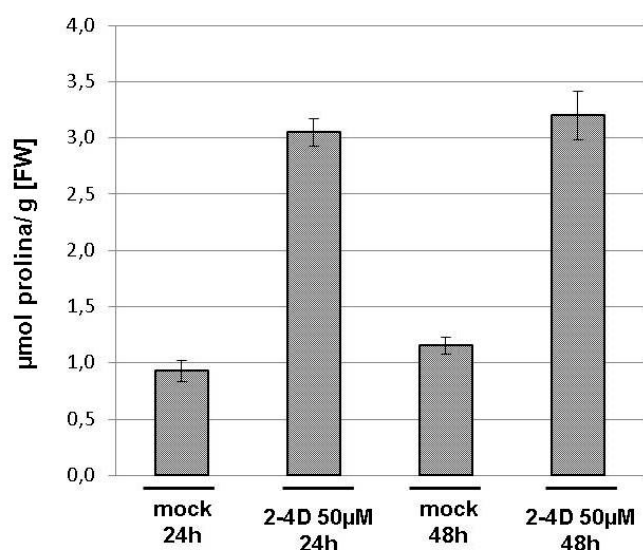


Fig. 65: quantificazione della prolina 24 e 48 h dopo trattamenti con 2,4-D 50 μM in piante di riso. Piantine di riso (due settimane) della varietà baldo sono state trattate con auxina 2,4-D 50 μM o con acqua (mock) e la prolina cellulare è stata quantificata 24 e 48 h dopo i trattamenti.

3.9. Analisi dei livelli di espressioni in colture di riso trattate con polietilenglicole (PEG)

Per comprendere come il metabolismo della prolina fosse modulato dallo stress osmotico si è proceduto quantificandone i livelli a seguito di trattamenti con concentrazioni crescenti di PEG (17,5 – 22,5%) in un sistema semplificato come le colture cellulari di riso della varietà Vialone nano. Sebbene l'accumulo di prolina non fosse risultato ingente (Fig. 66A) la concentrazione più alta di PEG testata induceva uno specifico e più duraturo accumulo di prolina, come indicato dalla percentuale di prolina espressa rispetto agli aminoacidi totali (Fig. 66B).

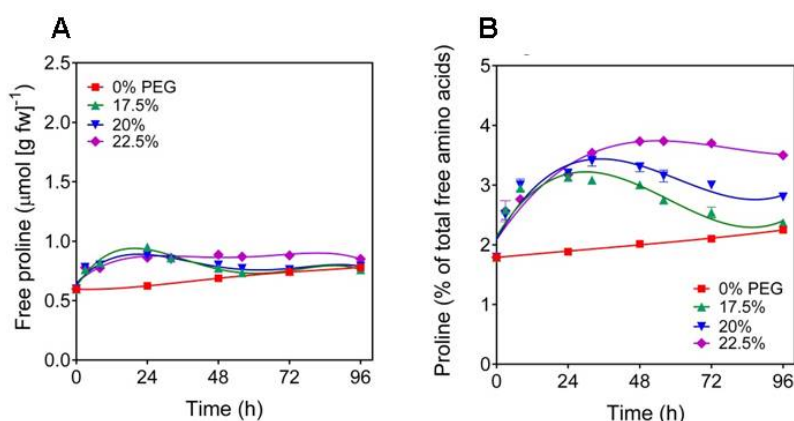


Fig. 66: accumulo di prolina in colture cellulari di riso stressate con crescenti concentrazioni di PEG. Cellule di riso della varietà Vialone nano sono state trattate con concentrazioni crescenti di PEG (0, 17,5, 20 e 22,5%) quindi a tempi crescenti (0, 24, 48, 72, 96 h dopo i trattamenti) la prolina è stata quantificata (A) ed espressa come percentuale rispetto agli aminoacidi totali (B).

Per valutare come la trascrizione dei geni del metabolismo della prolina fosse modulata dallo stress osmotico si è deciso di valutare, mediante un approccio di qPCR, la cinetica di espressione dei geni del metabolismo della prolina a seguito di trattamenti con PEG 22,5%. Colture cellulari sono state quindi sottoposte a stress osmotico e a tempi prestabiliti (0, 6, 24, 48 h) è stata analizzata l'espressione genica (Fig. 67). Dall'analisi è emerso che le cellule non stressate presentavano un notevole livello basale di trascritto per entrambi i geni *OsP5CS2* e *OsP5CR*. Per di più l'espressione del gene *OsP5CR* ha evidenziato come i livelli di trascritto subissero una forte fluttuazione nel corso dei tempi analizzati ed un accumulo significativo è stato osservato a 24 h (Fig. 67A). D'altro canto l'espressione dei geni *OsP5CS1*, *OsProDH* e *OsP5CDH* osservata nelle cellule non trattate è risultata essere trascurabile (Fig. 62A). L'analisi dell'espressione genica in cellule stressate con PEG 22,5% non rivela variazioni significative nei livelli di mRNA del gene *OsP5CR* malgrado il rapido e rilevante accumulo di prolina (Fig. 67B). Questo dato è in linea con i dati pubblicati in

letteratura i quali indicano che tale gene non codifica per l'enzima limitante per la biosintesi di prolina in *Arabidopsis* (Sharma and Verlues, 2010). Contrariamente in riso una leggera variazione per le due P5CS è stata riscontrata 48 h dopo i trattamenti e un incremento significativo dell'espressione del gene *OsP5CS2* (di due volte) è stata osservata 48 h dopo il trattamento (Fig. 67B).

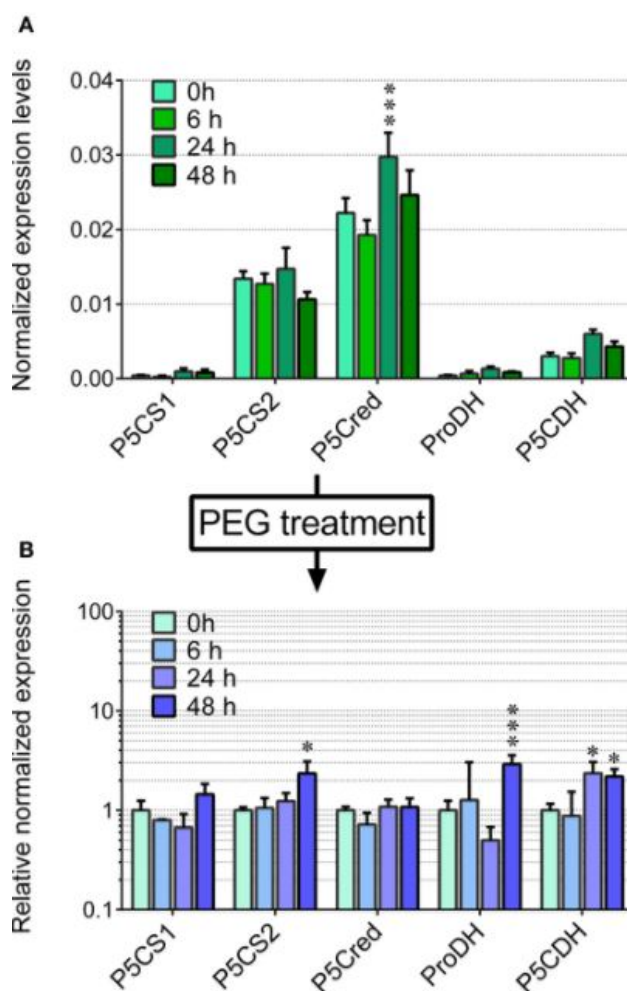


Fig. 67: profilo cinetico dell'espressione dei geni del metabolismo della prolina in colture cellulari di riso (cv vialone nano) trattate con 22,5% PEG. I livelli di espressione dei geni del metabolismo della prolina sono stati quantificati a tempi prestabiliti in colture cellulari di riso in condizioni fisiologiche (A) e in presenza di 22,5% PEG. L'espressione genica è stata normalizzata utilizzando come gene di riferimento l'actina. Tutti i trattamenti sono stati svolti in triplicato e gli istogrammi corrispondono alla media \pm l'errore standard. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza. Differenze significative al 10 % sono state indicate con un asterisco (*) mentre tre asterischi (***) indicano differenze significative all'1 %. Le differenze sono relative ai differenti tempi analizzati (A) o al controllo (B).

In *Arabidopsis* l'espressione del gene *P5CS1* (gene inducibile dallo stress) è stata vista essere indotta di 20 volte dopo i primi 10 minuti dall'applicazione di stress osmotico (Sharma and Verlues, 2010). L'espressione specifica dei geni *OsP5CS1* e *OsP5CS2*

osservata in riso invece risulta essere decisamente inferiore se paragonata a quella osservata in *Arabidopsis*, d'altro canto *Arabidopsis* è capace di accumulare quantità di prolina decisamente maggiori (fino a $50 \mu\text{mol g}^{-1}$) e questo potrebbe in parte spiegare il divario nell'espressione del gene *P5CS* fra le due specie. Dall'analisi qPCR in riso è stato anche osservato un'inaspettata attivazione del catabolismo della prolina. In particolare un aumento dell'espressione del gene *P5CDH* è stato osservato sia 24 che 48 h dopo i trattamenti mentre un accumulo significativo di trascritto della *ProDH* è stato osservato 48 h dopo i trattamenti (Fig. 67B). Sebbene l'osservazione di un accumulo dei trascritti dei geni del catabolismo della prolina appare in contrasto con la finalità della cellula di accumulare prolina per scopi osmoprotettivi, anche in *Arabidopsis* un'attivazione del gene *P5CDH* è stata osservata a seguito di stress iperosmotico (Sharma and Verslues, 2010). I dati osservati in riso, insieme a quelli riportati in *Arabidopsis*, rimettono in discussione il ruolo dell'inibizione del catabolismo della prolina in condizioni di bassi potenziali idrici.

3.10. Analisi dei livelli di espressioni in colture di riso trattate con prolina

Con l'intento di studiare i profili di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo del P5C quando le concentrazioni di prolina cellulare sono elevate, come avviene nella fase di recupero dallo stress osmo-salino, cellule in coltura di riso sono state trattate con prolina 2 mM (addizionata al mezzo di coltura) e l'RNA totale è stato estratto 0, 24 e 48 h dopo il trattamento. La presenza nel mezzo di coltura di diverse concentrazioni di prolina ha permesso di farne accumulare elevate quantità a livello cellulare (Fig. 68B).

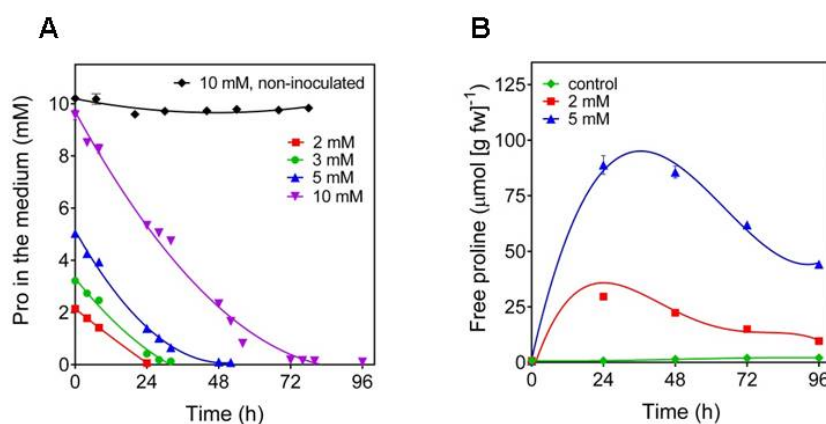


Fig. 68: assimilazione e accumulo di prolina in colture cellulari di riso. Cellule di riso della varietà loto sono state trattate con 2 mM prolina (addizionata nel mezzo di coltura) e la prolina è stata quantificata sia nel mezzo di coltura (A) che nelle cellule vegetali (B) a tempi crescenti (0, 24, 48, 72h dopo i trattamenti).

Concentrazioni maggiori di 5 mM permettevano alle cellule in coltura di accumulare elevate quantità di prolina, mentre nell'arco temporale di 24 h successive ai trattamenti esogeni con prolina 2 mM le cellule erano capaci di assimilare tutta la prolina presente nel mezzo (Fig. 68A) accumulandone al loro interno un massimo di circa 30 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Fig. 68B). Successivamente i livelli di prolina all'interno della cellula diminuivano progressivamente fino a raggiungere livelli basali nel corso delle successive 96 h (Fig. 68B). D'altro canto alcuni autori hanno notato che la somministrazione esogena di prolina può essere tossica per piante di *Arabidopsis* (Hellmann et al., 2000). Per valutare se trattamenti esogeni con prolina 2 mM fossero tossici per le cellule di riso, la morte cellulare è stata valutata attraverso il saggio di Evans (dati non mostrati) il quale ha evidenziato come tali trattamenti non incidessero significativamente sulla vitalità cellulare fino a 4 giorni dopo i trattamenti (Forlani et al., 2015c). L'analisi dei livelli di trascritto dei geni coinvolti nel metabolismo del P5C è stata svolta mediante esperimenti di qPCR sia in cellule di riso trattate con prolina 2 mM sia nelle stesse linee cellulari non trattate. L'analisi qPCR svolta nelle cellule non trattate non ha evidenziato variazioni nell'espressione dei geni testati nel corso delle 48 h mentre, la quantità di trascritto del gene *P5CR* era maggiore rispetto agli mRNA della *ProDH*, *P5CDH* e *OAT* che rimanevano a livelli basali (Fig. 69A). L'analisi qPCR svolta a seguito di trattamenti con prolina esogena ha evidenziato come il gene codificante per l'enzima regolatorio del catabolismo della prolina, la prolina deidrogenasi, venisse sovraespresso. In particolare 24 h dopo i trattamenti, i livelli di trascritto della *PRODHD* sono aumentati di circa 60 volte se paragonati ai livelli di mRNA osservati nelle cellule non trattate, mentre 48 h dal trattamento l'mRNA della *ProDH* è diminuito gradualmente fino a raggiungere livelli 5 volte maggiori rispetto al controllo non trattato (Fig. 69B). Diversamente dalla *ProDH*, i trattamenti con prolina 2 mM non hanno causato un accumulo di mRNA di nessuno degli altri geni analizzati (*OsP5CDH*, *OsOAT* e *OsP5CR*) (Fig. 69B). Sebbene un accumulo di trascritto della *P5CR* e dell'*OAT* non fosse atteso, dato che questi geni codificano per enzimi non direttamente coinvolti nella degradazione della prolina, un accumulo di mRNA della *P5CDH*, che catalizza il secondo enzima del catabolismo della prolina, era presumibilmente atteso. In *Arabidopsis*, la trascrizione della *P5CDH* è regolata sia da fattori ambientali che da fattori coinvolti nello sviluppo della pianta. Attualmente è noto che la *P5CDH* è espressa a livelli basali in tutti i tessuti della pianta fatta eccezione per i fiori dove è fortemente espressa (Deuschle et al., 2001). La sua regolazione in condizioni di stress ambientali risulta essere decisamente più variabile. In *Arabidopsis* l'espressione della *P5CDH* in condizioni di stress salino è repressa da un meccanismo inibitorio mediato dalla formazione di un piccolo siRNA derivante dalla sovrapposizione tra il trascritto del

gene *SRO5* e quello della *P5CDH* (Fig. 40; Borsani et al., 2005). L'espressione della *P5CDH* è invece up-regolata da condizioni di basso potenziale idrico e in risposta a trattamenti con prolina esogena (Deuschle et al., 2004). Deuschle e collaboratori hanno inoltre mostrato come l'accumulo dell'mRNA della *P5CDH* in piantine di *Arabidopsis* sia rilevabile solamente 48 h dopo trattamenti con concentrazioni di prolina maggiori o uguali a 5 mM. Questo dato suggerisce che anche in colture cellulari di riso l'espressione della *P5CDH* per poter essere indotta necessita di concentrazioni di prolina superiori di 2 mM.

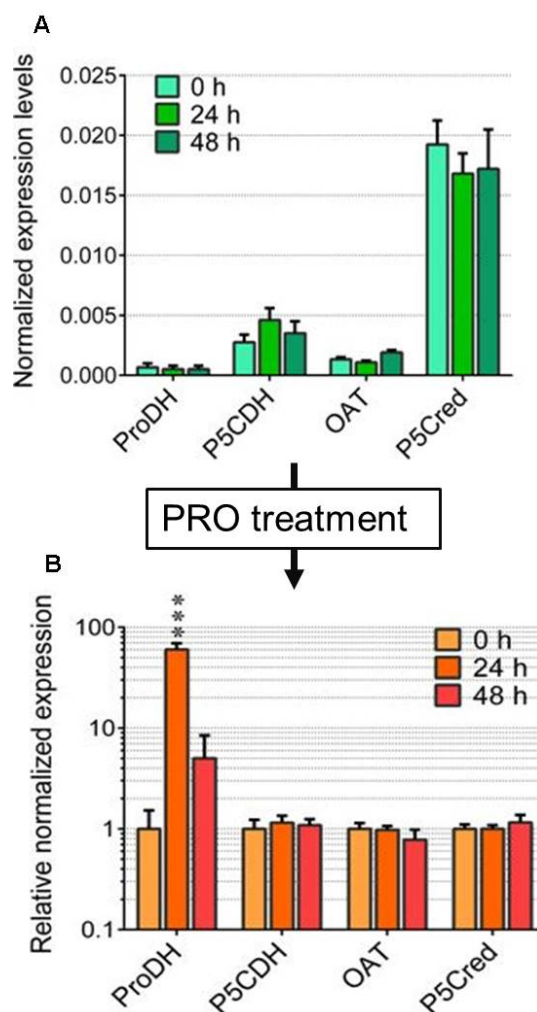


Fig. 69: profilo cinetico dell'espressione dei geni del metabolismo del P5C in colture cellulari di riso (cv loto) trattate con 2 mM prolina. L'espressione dei geni del metabolismo del P5C è stata quantificata a tempi prestabiliti in colture cellulari di riso sia in condizioni fisiologiche (A) che in presenza di prolina 2 mM. L'espressione genica è stata normalizzata utilizzando come gene di riferimento l'actina. Tutti i trattamenti sono stati svolti in triplicato e gli istogrammi corrispondono alla media \pm l'errore standard. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza. Differenze significative all'1 % sono indicate da tre asterischi (***) . Le differenze sono relative ai differenti tempi analizzati (A) o al controllo (B).

In varie specie vegetali, in condizioni di stress osmo-salino la *ProDH* viene down-regolata come risposta osmo-protettiva e per permettere l'accumulo cellulare di adeguate quantità di prolina. Diversamente la sua espressione è stata vista essere up-regolata durante la fase di recupero dello stress idrico (Verslues and Sharma, 2010). Analogamente, trattamenti con prolina esogena in *Arabidopsis* causano un accumulo di trascritto della *ProDH* (Verslues and Sharma, 2010). Per delucidare meglio la regolazione trascrizionale alla base dell'espressione della *ProDH* indotta da elevate concentrazioni di prolina uno studio della regione 5' del promotore della *ProDH* in *Arabidopsis* ha evidenziato la presenza di un elemento regolatorio in *-cis* definito come PRE (*Pro- or hypoosmolarity-responsive element*) (Sato et al., 2002). Questo elemento, che è stato visto essere necessario per l'espressione della *ProDH* dipendente da trattamenti con prolina, è costituito da un *core motif* di 6 pb (ACTCAT). Per comprendere se questo elemento regolativo individuato in *Arabidopsis* fosse in qualche modo coinvolto anche nella regolazione del metabolismo della prolina in riso la sua presenza è stata ricercata manualmente nei promotori dei geni responsabili sia della sintesi che del catabolismo della prolina (dato non mostrato). Come atteso, dall'analisi "*in silico*" dei promotori dei geni *OsP5CS1*, *OsP5CS2* e *OsP5CR* non è risultata la presenza di questa sequenza regolatoria mentre in entrambi i promotori dei geni *OsProDH* e *OsP5CDH* è stata individuata una sequenza parzialmente identica (ACTC) al *core motif* dell'elemento PRE. Sebbene le analisi di qPCR effettuate in cellule in coltura di riso trattate con prolina non abbiano evidenziato un aumento di trascritto per la *P5CDH*, la presenza del "*core motif*" dell'elemento PRE nel promotore della *ProDH* di riso potrebbe in parte spiegare il significativo accumulo di mRNA osservato 24 e 48 h dopo i trattamenti con prolina esogena (Fig. 58).

4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La comprensione dei meccanismi molecolari e biochimici che stanno alla base della risposta a condizioni di stress nelle piante è un tema tanto importante quanto complicato per la cui comprensione la comunità scientifica sta impiegando innumerevoli sforzi. Negli ultimi anni svariate analisi fisiologiche e molecolari insieme al sequenziamento dei genomi (*Arabidopsis in primis*) hanno permesso di definire un soddisfacente quadro generale delle risposte cellulari messe in atto dalle piante a seguito di diversi stress (Hirayama and Shinozaki, 2010). D'altro canto manca ancora la piena comprensione dei numerosi meccanismi molecolari che stanno alla base di tali risposte. L'accumulo di prolina è una comune risposta fisiologica che molte specie vegetali effettuano in risposta ad un ampio ventaglio di stress come salinità, siccità, basse temperature, metalli pesanti, attacchi patogeni, carenza di elementi nutritivi così come radiazioni UV (Hare et al., 1997). Risulta ovvio quindi che per soddisfare queste necessità le piante utilizzano sofisticati network regolatori. Attualmente è noto che il metabolismo della prolina, ed in particolare la trascrizione del gene *P5CS1* in *Arabidopsis*, può essere regolato da diversi pathways, sia dipendenti che indipendenti dall'ABA, come mostrato dall'espressione differenziale del gene *P5CS1* in piante mutanti incapaci di sintetizzare (*aba1*) o insensibili all'ABA (*abi*) (Savourè et al., 1997; Strizhov et al., 1997). La regolazione della trascrizione genica è un meccanismo molto fine nel quale sono coinvolti diversi fattori. In questo scenario il promotore svolge un ruolo fondamentale in quanto caratterizzato dalla presenza delle cosiddette sequenze regolatorie in *-cis* (CRE), siti di legami per i fattori di trascrizione (TF). Questi ultimi, legandosi a specifiche CRE, regolano la trascrizione in maniera combinatoria reclutando e cooperando con la RNA polimerasi II nell'inizio della trascrizione. La disponibilità di una mappa dettagliata delle CRE presenti in un determinato promotore risulta quindi di estrema utilità per poter comprendere quali interazioni, tra CRE e TF, possono essere coinvolte nella regolazione della trascrizione di un determinato gene.

Relativamente al metabolismo della prolina, in letteratura era presente solamente una mappa di CRE riguardante la pianta modello *Arabidopsis* (Fichman et al., 2015). Grazie ai risultati ottenuti nell'ambito di questa tesi è stato possibile disegnare una mappa dettagliata delle CRE presenti nei promotori dei geni della biosintesi di prolina in riso che complessivamente ha evidenziato la presenza di numerose sequenze regolatorie in *-cis* (Fig. 57). Sia sequenze ABRE che sequenze DRE sono state individuate nei promotori dei geni analizzati, d'altro canto l'analisi "*in silico*" ha evidenziato la presenza di ulteriori sequenze regolatorie in *-cis* coinvolte nelle due vie

di trasduzione del segnale, dipendente e indipendente dall'ABA, le quali complessivamente hanno permesso di creare due modelli teorici di regolazione trascrizionale (Fig. 59 e 60). Pertanto sia la mappa delle CRE sia i modelli teorici di regolazione trascrizionale proposti e descritti in questa tesi di dottorato risultano essere i primi dati inerenti alla regolazione trascrizionale della biosintesi di prolina in riso pubblicati in letteratura (Zarattini and Forlani, 2017).

In termini funzionali, una conferma delle indicazioni bioinformatiche sulla regolazione genica è stata ottenuta mediante l'analisi dell'espressione dei geni del metabolismo della prolina a seguito di stress osmotico e dei geni coinvolti nel metabolismo del P5C a seguito di trattamenti esogeni con prolina (Fig. 69). In questo caso è stato utilizzato un sistema sperimentale semplificato come le colture cellulari di riso. Sebbene in condizioni di stress osmotico le cellule in coltura di riso accumulano quantità di prolina cellulare (Fig. 66) decisamente inferiori rispetto ad *Arabidopsis* (Sharma and Verlues, 2010), un aumento dell'espressione del gene inducibile dallo stress, *OsP5CS2*, è stata osservata mediante qPCR. Per quanto riguarda i trattamenti con prolina esogena, come atteso è stato osservato un aumento dell'espressione del gene *OsProDH*, codificante per l'enzima limitante del catabolismo della prolina. Questi dati risultano conformi con quanto osservato nella pianta modello *Arabidopsis*. D'altro canto, sia in riso che in *Arabidopsis*, il ruolo del catabolismo della prolina in condizioni di stress osmotico rimane controverso. L'aumento dell'espressione dei geni *ProDH* e *P5CDH* osservata in cellule in coltura di riso (Fig. 67), così come in *Arabidopsis* (Sharma and Verlues, 2010), sembrano discordanti con la necessità della pianta di accumulare prolina in condizioni di stress osmotico. Per tale motivo ulteriori analisi sperimentali saranno necessarie per chiarire questo fenomeno.

L'analisi "*in silico*" delle regioni promotrici dei geni di riso ha inoltre reso possibile identificare nei promotori analizzati altre possibili CRE, correlate a diverse famiglie di TF che potrebbero anch'esse regolare la biosintesi di prolina (dati supplementari in Zarattini and Forlani, 2017; Tabella 6 e 7 in questa tesi). Il dato forse più interessante è dovuto alla presenza delle sequenze CRE AuxRE (Auxine Responsive Element) nei promotori dei geni *OsP5CS1* e *OsP5CR*. Le CRE AuxRE sono coinvolte in particolare nella trasduzione del segnale dipendente dalle auxine e risultano essere siti di legame specifici per i TF ARF (Auxine Responsive Factor). L'attivazione genica mediata dai TF ARF è fortemente dipendente dai livelli cellulari di auxine: a basse concentrazioni i TF ARF sono repressi dalle proteine AUX/IAA mentre al di sopra di una certa soglia le proteine AUX/IAA vengono degradate dal proteosoma 26S permettendo ai TF ARF di svolgere la loro azione di attivatori trascrizionali (Fig. 63). Per verificare *in vivo* il

possibile ruolo delle auxine nella regolazione della biosintesi di prolina, l'accumulo degli mRNA dei geni della biosintesi di prolina è stato valutato sperimentalmente in piantine di riso a seguito di trattamenti con diverse concentrazioni di auxina (Fig. 64); i dati di qPCR hanno confermato un possibile ruolo di questo ormone, soprattutto alla più alta concentrazione testata, suggerendo quindi che la biosintesi di prolina possa realmente essere regolata dalle interazioni tra le sequenze AuxRE e i TF ARF.

Il reale coinvolgimento delle CRE e dei TF a loro associati necessita comunque di essere supportato da dati sperimentali, come indirettamente mostrato in questa tesi per le CRE AuxRE. I network di regolazione trascrizionale mediati dai TF possono essere studiati attraverso diversi approcci sia *in vitro* che *in vivo*, tra i quali i più promettenti risultano essere i saggi basati sull'immunoprecipitazione della cromatina seguita dal sequenziamento o da analisi di microarray (Franco-Zorrilla and Solano, 2017). La ricerca in questo senso contribuirà a definire più precisamente le dinamiche di regolazione trascrizionale utili per comprendere le basi molecolari dei tratti complessi utilizzabili in programmi di breeding e di miglioramento genetico.

Per quanto riguarda la caratterizzazione biochimica degli enzimi chiave del metabolismo della prolina, le basse quantità delle proteine P5CS1 e P5CS2 ottenute a seguito di espressione eterologa in *E. coli* non hanno permesso di svolgere un'adeguata caratterizzazione biochimica. Le scarse rese ottenute in questo lavoro sono dovute al fatto che la maggior parte delle proteine di interesse venivano sequestrate dai corpi di inclusione batterici. Le prove di espressione svolte sia utilizzando diversi ceppi batterici, ottimizzati per l'espressione di proteine complesse, sia variando parametri chimico-fisici come temperatura, tempo di induzione e concentrazioni di induttore hanno mostrato come era possibile ottenere una maggiore solubilizzazione della proteina di interesse rallentando il tasso di espressione proteica del sistema eterologo, abbassando la temperatura di crescita e utilizzando minori concentrazioni di induttore (Fig. 52 e 53). D'altra parte i risultati ottenuti non sono stati comunque soddisfacenti per poter svolgere un'adeguata caratterizzazione biochimica. Come prospettiva futura vi sarà da un lato quella di valutare sistemi di espressione e di purificazione alternativi, come ad esempio la possibilità di ingegnerizzare la proteina di interesse in modo tale da renderla più solubile (utilizzando differenti tag per la cromatografia di affinità, come la fusione con la GST invece della coda di istidine). In alternativa si potrebbero utilizzare protocolli specifici di estrazione proteica dai corpi di inclusione sempre tenendo in considerazione le limitazioni dovute dalla rinaturazione della proteina di interesse. Questo permetterà di svolgere una caratterizzazione biochimica soddisfacente come è stato svolto per l'enzima P5CDH di riso (Forlani et

al., 2015c). Attraverso questi studi sarà possibile, ad esempio, comprendere se l'attività degli enzimi catalizzanti la reazione limitante la biosintesi di prolina venga modulata dalla presenza di elevate concentrazioni di sali così come dallo stato redox della cellula.

5. APPENDICE

5.1. Sequenze analizzate “*in silico*” per l’individuazione delle sequenze CRE (-cis regulatory elements)

OsP5CS1

cagattccctcccgtctctacccaaaactcttgtcgcgtgacagcgaagcagcgcgtagcgtagt -934
actagtaggactgtaggagtactaggtggtagcgccgtgtccagacgtccagtcagagtcacc -869
acgagcgcggccccctcccctcccgcggatcgatcgctgcacgaaactcacccaagcaaa -804
aacgcgccatacacctgcacgcaccgtgcccgtgcatagaggcgcgcacccgcaccggctcacc -739
gtcaccgcatatatcccGctgctcatccgcgcggaatcctctcccaaagccgtgacgcggc -674
ggccccctgctcgatgcatgctgcctcacgttctctcgtgccaaaacaacgattctagcaggatc -611
gatcggctctgggtggcgtgccgcccgtccccgtgacgagcccattcgccccccgctccgatcc -546
gggcttgtcagttgtcacggtacaaaacgctccgccccgtcggcggcgcgatcgggacagtgc -481
acgtcacgcgcgccatacacctgcacccgcacgcgcgaggcggccccccgcaccgggatatggata -416
tctattccccggcttatccgcgctcgcgcggctgagcggctcacgttttctcgtgccaaaacgac -351
ggatggatcggctctgggccaacgacccccattccccctgtatctcgggtgcgcccacctaacag -286
ctttaacagcttaacaagtcacagtaaacacgcataccgtgtggcgggcgggcgagaggatcc -221
cgggggtcgttgggcattttgcgccctgggtttccgccttccggtcacgggagccagagccact -156
tctgccttcataaaccttccctcttttctcctcctctatctatccccctctactcgcggctgc -91
ggcggcaaggcggcgcgagacgtgggagaggatttacaggtagaggagagggtggaggaggagag -26
gctgaggctaggaagcgggttccgcca**atg** +3

OsP5CS2

Atggagtgatgaatggagggtagacaagtgtgtatttatgtggaacacacgatttgcataatc -934
Cacgtagctagcaaaagcaccacgaaataaacaccttaaaatctgtcatcgtcgtatcatgcat -869
Gtcgaatgtttgggtgcaaccgattgaagtaaatgaatttaggaatttgtacgtgaaaacggta -804
ggaataatcttgtaagtAtctccatgaaacattctttatgtccactatctcgaaaataagta -739
tatttttcattcgtgctatacatatacaataaaaaatattatcatcattttatcaattttcaata -674
taattatttcataattttatctactcccaatgctttgccccatgcttttataaaactctaatacaac -611
gattgtttaaaaataaaacttattttagaataaacaggagcgaataaaaaataatcttattttcgaaa -546
cagtgatgtactagtttttaggaatttggtcagatatttcagttcacagtttatccacaattaa -481

taagtggttactgtggctgggcctgcgtgagctgggctgactagagagagggagagaccgcaaca -416
cagaagatggcgatatttttgggagcaaaccgctgattccacagatccgggagcccatgtggaaa -351
gcgcccgttggcggttcggcgatggttacgggccatcacgggtccgctcgccgcagacgatcgc -286
ggcggcgggaggatctcgccacacacgtaatccgacgcccgcgcgacgggacgggacgcggcta -221
cgggctaccaccacccatccccaccaccaccaccacctcccttctctcccccttttaagccgt -156
cgcaccctggcgggtgtgtaagcctccgcccctccccgtatctctcggtttctggtctaagttcc -91
acgccacttggtgcccattccttctccctccctgcaaataccaatccaatccaatcccaccccaa -26
gctcgcggaggaggaggaggagagatg +3

OsP5CR

attctttcttgcaaagaaccatttctgtactaagagtaggttgataaccactgcagagggcat -934
tctccctaataaggcagatacctccgatcctgcttgaacaaaacgaaagatattatcgatgaata -869
gaagcacgtcttgcttattaacatctcggaaatattctgccatagttagggcagtcaaaccaact -804
ctcatacgagctcctggcggttgtctcccaaaatataagaacctattttctaggttcttatact -739
tctggctaccgcaaattccactaaaacaaattccactatgagtagtaagtggcatactgctggct -674
actgcaaattccactaaaacaaattctagtgaaaataactcacttatttgttcttgctgattg -611
aaatttgaaatcaagcagtttttttttaaaaaaataattgaatcgacgaatccattcatatatt -546
tgtaggggcagcggatctggggcttctgggccccggccaagtgcgagcaaaaccacccaaaa -481
aaaaaatacagcggagacgcgcgacggcggcagttccccgctccgccgctccgtgctccgacc -416
tccggcgacccccgggcaccggcgagtggccccgacggccatccagcttgtcagcgtcggttcctc -351
ttccttctactctcaaatttttagtctcttattatcaacaggattgacctgttactgttcaggg -286
agcctgttcttatcgcattatccagatttttcttttcaaaaaacatgaaatcatcactggatttt -221
gctttaataacttattattatcagtttggttgagtttgaaccaacaagtgaacaaatcttcg -156
tatcgttcacccaaaatatctcctggttttctcgtttccgtttcgaattaacagaattttact -91
acagattattaggcctcgaaacctaccttccacatccacgccattcttctccgctcctcctcct -26
cctcctcctcctcggatccctcgcaatg +3

6. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 51, 363–372.
- Altman, A. (1999). Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. *Electronic Journal of Biotechnology* 2, 51-55.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N, Grenier-de March, G., Savouré, A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum* 120, 442–450.
- Ashraf, M., Ahmad, M.S.A., Öztürk, M., Aksoy, A. (2012). Crop Improvement Through Different Means: Challenges and Prospects. In *Crop Production for Agricultural Improvement*. ISBN 978-94-007-4115-7
- Ayliffe, M.A., Mitchell, H.J., Deuschle, K., Pryor, A.J. (2005). Comparative analysis in cereals of a key proline catabolism gene. *Mol. Gen. Genomics* 274, 494–505.
- Barlow, K.M., Christy, B.P., O’Leary, G.J., Riffkin, P.A., Nuttall, J.C. (2015). Simulating the impact of extreme heat and frost events on wheat crop production: A review. *Field Crops Research* 171, 109-119.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Batistic, O., Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 1283-1293.
- Bayer Crop Science 2008, <http://www.seedquest.com/News/releases/2008/october/23973.htm>.
- Bender, KW., Snedden, WA. (2013). *Calmodulin-related proteins step out from the shadow of their namesake*. *Plant J.* 76, 634-647.
- Bradford, M.M. (1975). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7, 248-54.
- Bevan, M. (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 26; 12, 8711–8721.
- Bilas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., Kononowicz, AK. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 127, 269–287.
- Bonifer, C. (2000). Developmental regulation of eukaryotic gene loci: which cis-regulatory information is required?. *Trends Genet* 16, 310-315.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, PE., Sunkar R., Zhu, J. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123, 1279–1291.
- Boudsocq, M., Sheen, J. (2010). Stress signaling II: calcium sensing and signaling. *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation* 75-90
- Boudsocq, M., Sheen, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 18, 30–40.
- Boyer, J.L. (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-8.
- Breseghele, F. (2013). Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 8277–8286.
- Brock, A.K., Willmann, R., Kolb, D., Grefen L, Lajunen, H.M, Bethke G, et al. (2010). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiol.* 153, 1098–111.
- Burg, M.B., Ferraris, J.D: (2008). Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem.* 21; 7309-13.

- Carmo-Silva, A.E., A. Francisco, J.P. Stephen, J.K. Alfred, A. Lia, A.J.P. Martin and C.A. Maria. (2009). Grasses of different C4 subtypes reveal leaf traits related to drought tolerance in their natural habitats: Changes in structure, water potential, and amino acid content. *Amer. J. Bot.* 96, 1222-1235.
- Cecchini, N.M., Monteoliva, M.I., Alvarez, M.E. (2011). Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155, 1947–1959.
- Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y., Pan, R.-L. (2008). PlantPAN: plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9:561.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, C., Lü, W., Jin, J.B., Hua, X. (2011). Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids.* 40, 1473-84.
- Chow, C.-N., Zheng, H.-Q., Wu, N.-Y., Chien, C.-H., Huang, H.-D., Lee, T.-Y., et al. (2015). PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res.* 4, 1154–1160.
- Coello, P., Hey, S.J., Halford, N.G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J Exp Bot.* 62, 883-93.
- Cooper, GM., Hausman, RH. (2006). *The Cell: A Molecular Approach*, Fourth Edition. Book
- Cramer, G.R, Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M, Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11:163.
- Csonka L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev.* 53,121-47.
- Cutler, SR., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., Abrams, S.R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol.* 61, 651-79.
- Danquah, A., Zelicourt. A., Colcombet, J., Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*, 32, 40-52.
- de Zelicourt, A., Colcombet, J., and Hirt, H. (2016). The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. *Trends Plant Sci.* 21, 677–685.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., et al., (2004) The role of Δ 1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation *The Plant Cell* 16, 3413-3425.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., Frommer W.B. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial Δ 1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal* 27, 345-355.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res.* 38, W64–W70.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15, 573-81.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H. et al. (2008). Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol.* 147, 1984–1993.
- Ezer, D., Shepherd, S.J.K., Brestovitsky, A., Dickinson, P., Cortijo, S., Charoensawan, V., et al., (2017). The G-BOX Transcriptional Regulatory Code in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 175, 628-640.
- Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L., and Alvarez, M. E. (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 17, 343–350.

- FAO, 2008: The State of Food Insecurity in the World: High Food Prices and Food Security—Threats and Opportunities. FAO, Rome, Italy, 56 pp.
- FAO, 2010: The state of food insecurity in the world 2010. Addressing food insecurity in protracted crisis.
- Fichman, Y., Gerdes, S.Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., Csonka, L.N. (2015). Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 1065–1099.
- Flowers T.J., Troke P.F., Yeo A.R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review Plant Physiol.* 28, 89–121.
- Fonin, A.V., Uverskya, V.N., Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K. (2016). Protein Folding and Stability in the Presence of Osmolytes. *Biophysics*, 61, 185–192.
- Forlani, F., Nocek, B., Chakravarthy, S., Joachimiak, A. (2017). Functional Characterization of Four Putative δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductases from *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 8:1442.
- Forlani, G., Bertazzini, M., Zarattini, M., Funck, D. (2015c). Functional characterization and expression analysis of rice δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide new insight into the regulation of proline and arginine catabolism. *Front. Plant Sci.* 6:591.
- Forlani, G., Bertazzini, M., Zarattini, M., Funck, D., Ruskowski, M. Nocek, B. (2015a) Functional properties and structural characterization of rice δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front. Plant Sci.* 6:565.
- Forlani, G., Makarova, K., Ruskowski, M., Bertazzini, M., Nocek, B. (2015b). Evolution of plant δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. *Front. Plant Sci.* 6:567.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S. et al. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *PNAS* 80, 4803-4807.
- Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P., Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *PNAS* 11, 2367–2372.
- Franco-Zorrilla, J.M., Solano, R. (2017). Identification of plant transcription factor target sequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1, 21-30.
- Fromm, M., Taylor, L.P., Walbot, V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *PNAS* 82: 5824–5828.
- Fu, H., Park, W., Yan, X., Zheng, Z., Shen, B., and Dooner, H.K. (2001). The highly recombinogenic bz locus lies in an unusually gene-rich region of the maize genome. *PNAS* 98, 8903-8908.
- Fujii, H., Zhu, J.K. (2012). Osmotic stress signaling via protein kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 3165–3173.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa T. et al., (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50, 2123-32.
- Funck, D., Eckard, S., Müller, G. (2010). Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 10:70.
- Funck, D., Stadelhofer, B., Koch, W. (2008). Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 8:40.
- Funck, D., Winter, G., Baumgarten, L., Forlani, G. (2012). Requirement of proline synthesis during *Arabidopsis* reproductive development. *BMC Plant Biol.* 12: 191.
- Galon, Y., Snir, O., Fromm, H. (2010). How calmodulin binding transcription activators (CAMTAs) mediate auxin responses. *Plant Signal Behav.* 5, 1311–1314.
- Ghars, M.A., Richard, L., Lefebvre-De Vos, D., Leprince, A.S., Parre, E., Bordenave, M., Abdely, C., Savauré, A. (2012). Phospholipases C and D modulate proline accumulation in

- Thellungiella halophila/salsuginea differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress. *Plant Cell Physiol.* 53, 183-92.
- Giberti, S., Funck, D., and Forlani, G. (2014). Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol.* 202, 911–919.
- Gray, WM., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature.* 15; 271-6.
- Grigore, M-N, Boscaiu, M. Vicente, O. (2011). Assessment of the relevance of osmolyte biosynthesis for salt tolerance of Halophytes under natural conditions. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 5, 12–19.
- Hagen, G. (2015). Auxin signal transduction. *Essays In Biochemistry* 15, 1-12.
- Hagen, G., Guilfoyle, T. (2002) Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49, 373–385.
- Hahn S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 11, 394-403
- Halford, N.G., and Hey, S.J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J.* 419, 247–259.
- Halford, N.G., Paul, M.J. (2003). Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnol J.* 1, 381–398.
- Hare P.D, Cress W.A (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21:79–102.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 51, 463-499.
- Hatfield, J.L., Prueger, J.H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4-10.
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., Frommer, W. (2000), Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology* 123, 779-790.
- Hernandez-Garcia, C.M., Finer, J.J. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217, 109–119.
- Hirayama, T., Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61, 1041-52.
- Hobo, T., Asada, M., Kowiyama, Y., Hattori, T. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J.* 19, 679-89.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooyas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.
- Hong Z.L., Lakkineni K., Zhang Z.M., Verma D.P.S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology.* 122:1129–1136.
- Hong, Y., Zhang, H., Huang, L., Li, D., Song, F. (2016). Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene ONAC022 improves drought and salt tolerance in rice. *Front. Plant Sci.* 7:4.
- Hsueh, Y.L., Lou C.H.(1947). Effects of 2,4-D on Seed Germination and Respiration. *Science*, 14: 283-5.

- Hua X.J., Van de Cotte B., Van Montagu M.V., Verbruggen, N (2001). The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *The Plant J.*, 26, 157–169.
- Hur, J., Jung, K.-H., Lee, C.-H., and An, G. (2004). Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci.* 167, 417–426.
- Ibragimova, S.S., Kolodyazhnaya, S.Y., Gerasimova, S.V., Kochetov, A.V. (2012). Partial suppression of gene encoding proline dehydrogenase enhances plant tolerance to various abiotic stresses. *Russian Journal of Plant Physiology* 59:88–96.
- IPCC (2007). Climate change 2007: the physical science basis. in Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, eds Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B. et al.
- Ji, H., Pardo, J.M., Batelli, G., Van Oosten, M.J., Bressan, R.A., Li, X. (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular Plant* 6, 275–286.
- Jiang, F., Doudna, J.A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46, 505–529.
- Johnston, C.A., Temple, B.R., Chen, J.G., Gao, Y., Moriyama, E.N., Jones, A.M., et al., (2007). Comment on: "A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". *Science* 318, 914.
- Jouzel, J., Masson-Delmotte, V., Cattani, O., Dreyfus, G., Falourd, S., Hoffmann, G., et al., (2008). Orbital and Millennial Antarctic Climate Variability over the Past 800,000 Years. *Science*, 317, 793–796.
- Kaur, A., Pati, P.K., Pati, A.M., Nagpal, A.K. (2017). In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PLoS One* 14, 12(9):e0184523.
- Kaur, G., Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59, 609–619.
- Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108, 1387–1394.
- Kavi Kishor, P.B., Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant Cell Environ.* 37, 300–311.
- Kim, G-B., Nam, Y-W. (2013). A novel Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene of *Medicago truncatula* plays a predominant role in stress-induced proline accumulation during symbiotic nitrogen fixation. *J Plant Physiol.* 70, 291–302.
- Kim, T.H., Bohmer, M., Hu, H.H., Nishimura, N., Schroeder, J.I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Ann Rev Plant Biol* 61, 561–591
- Kirigwi F.M., Van Ginkel M., Trethowan R., Sears R.G., Rajaram S., Paulsen G.M. (2004). Evaluation of selection strategies for wheat adaptation across water regimes. *Euphytica* 135, 361–371.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12, 1067–78.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., Hattori, T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell*, 16, 1163–1177.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywinska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases: key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS* 15, 859–872.
- Kumar, V, Shriram, V., Kavi Kishor, P.B, Jawali, N., Shitole, M.G. (2010). Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over expressing P5CSF129A gene. *Plant Biotechnology Reports* 4:37–48.

- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., et al., (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 22: 2623–2633.
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 251–275.
- Lewis, M.L., Rowe C.J., Sewald N., Sutherland J.D., Wilson E.J., Wright M.C. (1993). The effect of pH on the solution structure of delta-1-pyrroline-2-carboxylic acid as revealed by NMR and electrospray mass spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 1193–1196.
- Li, C., Ng, C. K.Y., Fan, L.M. (2015). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environ. Exp. Bot.* 114, 80–91.
- Liere, K., Weihe, A., Börner, T. (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J. Plant Physiol.* 168, 1345–1360
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, et al. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1391–406.
- Liu, D., He, S., Zhai, H., Wang, L., Zhao, Y., Wang, B., Li, R., Liu, Q. (2014). Overexpression of *Ibp5CR* enhances salt tolerance in transgenic sweet potato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 117, 1–16.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *PNAS* 28, 3730-4.
- Liu, L.K., Becker, D.F., Tanner, J.J. (2017). Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Arch. Biochem. Biophys.* 632:142-157.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.H., Ma, L. (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315, 1676–1677.
- Liu, Y., Ji, X., Nie, X., Qu, M., Zheng, L., Tan, Z., et al. (2015). *Arabidopsis* *AtbHLH112* regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs. *New Phytol.* 207, 692–709.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-8.
- Lobstein, J., Emrich, C.A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M. (2011). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories* 11:56.
- Lohman, G., Rimbu, N., Dima, M. (2004). Climate signature of solar irradiance variations analysis of long-term instrumental, historical, and proxy data. *Int. J. Climatol.* 24, 1045–1056.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano J.J, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15 165–178.
- Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M., Thornton, J.M. (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biology* 1
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science.* 324, 1064-1068.
- MacArthur M.W, Thornton J.M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol.* 20, 397-412.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158.
- Mani, S., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 128, 73–83.

- Marrapese, M., Matthews, K.A. (2014). The Importance of Agricultural Biotechnology in the Response to the Effects of Climate Change. *Natural Resources & Environment* 29, 1-8.
- Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., et al. (2012). Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. *DNA Res.* 19 37–49.
- Meehl, G.A., Stocker, T.F., Collins, W.D., Friedlingstein, A.T., Gaye, A.T., Gregory, J.M., et al., (2007). *Global Climate Projections*. Cambridge University Press, 747-845.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., Zilberstein, A. (2009). Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylateproline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 26482–26492.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 2, 86–96.
- Monteoliva, M.I., Rizzi, Y.S., Cecchini, N.M., Hajirezaei, M.R., Alvarez, M.E. (2014). Context of action of proline dehydrogenase (ProDH) in the hypersensitive response of Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 14:21.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645–663.
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–81.
- Nakashima K., Ito Y., Yamaguchi-Shinozaki K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses *Plant Physiol*, 149,88-95.
- Nambara, E and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165–85
- Namura M, Hibino T, Takabe T, Sugiura T, Yokota A, Miyake H, et al. (1998). Transgenically produced glycinebetaine protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress. *Plant Cell Physiol.* 39, 425–432
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., et al., (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 18, 185–193.
- NASA (2010). Global Warming. Earth observatory.
- NASA (2017). NOAA data show 2016 warmest year on record globally.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S-Y., Wang, A., Carvalho, P.C., et al., (2009). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant Journal.* 61, 290–299.
- Oreskes, N. (2004). The Scientific Consensus on Climate Change. *Science* 306.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran L.S. (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 64, 445–458.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S.P. (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol.* 202, 35–49.
- Ouyang, S.Q., Liu, Y.F., Liu, P., Lei, G., He, S.J., Ma, B., Zhang, W.K., Zhang, J.S., Chen, S.Y. (2010). Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *The Plant Journal* 62, 316–329.
- Park, S-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, Zhao, H.Y., Lumba, S. et al., (2009). Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science.* 22; 1068–1071.
- Parre, E., Ghars, MA., Leprince, A.S., Thiery, L., Lefebvre, D., Bordenave, et al.,. (2007). Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 144 503–512.

- Pennacchio, L.A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega M.A., Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nat Rev Genet.* 14, 288-95.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1; 29(9): e45.
- Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Seay M., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *PNAS* 104, 4730–4735.
- Porter J.R. (2005). Rising temperatures are likely to reduce crop yields. *Nature*, 14;436(7048):174.
- Porter, J., R., Xie, L., Challinor, A.J., Cochrane, K., Howden, S. M., Iqbal, M. M., et al. (2014). Food security and food production systems. In *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. 7, 485-533.
- Qamar, A., Mysore, K. S., and Senthil-Kumar, M. (2015). Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front. Plant Sci.* 6:503.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, JM., Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *The Plant Cell* 19, 1415-1431.
- Qui, J. (2003). Computational approaches for deciphering the transcriptional regulatory network by promoter analysis. *Drug Discov Today Biosilico* 4:125.
- Quintero F.J., Martinez-Atienza J., Villalta I., Jiang X., Kim W.Y., Ali Z., et al. (2011). Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *PNAS* 108, 2611–2616.
- Reddy, A.S., Ali, G.S., Celesnik, H., Day, IS. (2011). Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell* 23, 2010-2032.
- Rejeb, K., Abdelly, C., Saviouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 278–284.
- Rejeb, K., Lefebvre-De, Vos, D., Le Disquet, I., Leprince, A.S., Bordenave, et al. (2015). Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* 208: 1138–1148
- Reyes, J.C., Muro-Pastor, M.I., Florencio, F.J. (2004). The GATA Family of Transcription Factors in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol.* 4, 1718-32.
- Ricroch, A., Harwood, W., Svobodová, Z., Sági, L., Hundleby, P., Badea, E.M., et al., (2015). Challenges facing European agriculture and possible biotechnological solutions. *Crit Rev Biotechnol.* 36, 875-83.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C-Z., Keddie, et al. (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 15; 2105-10.
- Riechmann J. Grasser K. (2006). Transcription factors of Arabidopsis and rice: a genomic perspective. *OxfordWiley-Blackwell.* 28-53.
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J., Reeves, H.C. (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal Biochem.* 167, 290–294.
- Roosens, N.H., Thu, T.T., Iskandar, H.M., Jacobs, M. (1998). Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 117, 263-71.
- Roychoudhury, A., Paul, S, Basu, S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 32:7,985–1006.
- Sachs, W. and Santarius, T. (2007). Per un future equo. Feltrinelli, ISBN: 9788807104145
- Sagi, M, Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* 141: 336–340.

- Sah, S.K., Reddy, K.R., Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Plant Sci.* 7, 571.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., and Harper, J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14, 401–417.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *UPST.* 5, 27-37.
- Sarkar, M., Pielak, G.J. (2014). An osmolyte mitigates the destabilizing effect of protein crowding. *Protein Sci.* 23, 1161-4.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 45, 309–317.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130: 709–719.
- Savouré, A., Hua, X.J., Bertauche, N., VanMontagu, M., Verbruggen, N. (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* 254, 104–109.
- Schertl, P., Cabassa, C., Saadallah, K., Bordenave, M., Savouré, A., Braun, H.P. (2014). Biochemical characterization of proline dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria. *FEBS J.*, 281, 2794-804.
- Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H.M., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A.R., et al., (2013). SALT-RESPONSIVE ERF1 Regulates Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling during the Initial Response to Salt Stress in Rice. *Plant Cell* 25, 2115–2131.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol.* 14, 194-9.
- Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S. (2012). Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant Cell Environ.* 35, 1329–1343.
- Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 399-404.
- Sewelam, N., Kazan, K., Schenk, P.M. (2016). Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Front. Plant Sci.* 7:187.
- Shahid, S.A. and Rahman K. (2007). Soil Salinity Development, Classification, Assessment, and Management in Irrigated Agriculture. HANDBOOK of Plant and Crop stress.
- Shao, H.B., Chu, L., Jaleel, C.A., Zhao, C.X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* 33, 215-225.
- Shao, H., Wang, H., and Tang, X. (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front. Plant Sci.* 6:902.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005). Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.* 162, 854—864
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *PNAS* 97, 6896-6901.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol.* 3, 217–223.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 410–417.

- Shukla, P.S., Gupta, K., Agarwal, P., Jha, B., Agarwal, P.K. (2015). Overexpression of a novel SbMYB15 from *Salicornia brachiata* confers salinity and dehydration tolerance by reduced oxidative damage and improved photosynthesis in transgenic tobacco. *Planta* 242, 1291–1308.
- Siegel R.S, Xue S, Murata Y, et al. (2009). Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*. 59, 207–220.
- Singer, D.D., Cox, K.D., Liu, Z. (2011). Enhancer–promoter interference and its prevention in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 30, 723–731.
- Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., Tyagi, A. K., Pandey, G. K. (2010). Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics* 11:435.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Saviouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann Bot.* 115,433-47.
- Smale, S.T., Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 72:449-79.
- Stockinger E.J, Gilmour S.J, Thomashow M.F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *PNAS* 94:1035–40.
- Strizhov, N., Abrahám, E., Okrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12: 557–569.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE* 6:e21800.
- Sussmilch, F.C., Brodribb, T.J., McAdam, S.A.M. (2017). Up-regulation of NCED3 and ABA biosynthesis occur within minutes of a decrease in leaf turgor but AHK1 is not required. *J. Exp. Bot.* 68:2913–2918.
- Szabados, L. and Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97.
- Székely, G., Abraham, E., Cselo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., et al. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53, 11–28.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009). *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates
- Thiery, L., Leprince, A.S., Lefebvre, D., Ghars, M.A., Debarbieux, E., Saviouré, A. (2004). Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 279, 14812–14818.
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14, 310-7.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378.
- Tran, L.S., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *PNAS* 104, 20623–20628.
- Trost, P., Morgante, M. (2016). Considerazioni riguardo la tecnica del genome editing per il miglioramento genetico delle colture agrarie. Documento congiunto SIPV-SIGA.
- Trovato, M., Maras, B., Linhares, F., Costantino, P. (2001). The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *PNAS*, 6; 13449–13453.

- Tuberosa, R. (2012). Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front Physiol* 3: 347.
- Turchetto-Zolet, A.C., Margis-Pinheiro, M., Margis, R. (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Mol Genet Genomics*. 281, 87-97.
- Tuteja N (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav.* 2:135–138.
- Valmonte, G.R., Arthur, K. Higgins, C.M., MacDiarmid, R.M. (2014). Calcium-dependent protein kinases in plants: evolution, expression and function. *Plant and Cell Physiology* 55, 551–569.
- Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M. (1993). Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103, 771-781.
- Verslues, P.E. and Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8:e0140.
- Virdi A. S., Singh S., Singh P. (2015). Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. *Front. Plant Sci.* 6:809.
- Wang, C., Deng, P., Chen, L., Wang, X., Ma, H., Hu, W., et al. (2013). A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco. *PLoS ONE* 8:e65120.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.
- Wang, Y., Lu, W., Deng, D. (2015). Bioinformatic landscapes for plant transcription factor system research. *Planta* 243, 297-304.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M. (1996). Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 22, 45–96.
- Wilhite, D.A and Glantz, M.H. (1985). Understanding the Drought Phenomenon: The Role of Definitions. *Water International* 10, 111–120.
- Williams, I., Frank, L (1975). Improved chemical synthesis and enzymatic assay of delta-1-pyrroline-5-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry* 64, 85-97.
- Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., Funck, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci.* 30;6:534.
- Xie, YJ, Xu, S, Han, B, Wu, M.Z, Yuan, X.X, Han, Y, Gu, Q, Xu, D.K, Yang, Q, Shen, WB. (2011). Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *Plant Journal* 66: 280–292.
- Xiong, H. Y., Li, J. J., Liu, P. L., Duan, J. Z., Zhao, Y., Guo, X., et al. (2014). Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-Related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *PLoS ONE* 9:e92913.
- Xu J, Tian, Y.S., Peng, R.H., Xiong, A.S., Zhu, B., Jin, X.F., Gao, F., et al., (2010). AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 231,1251–1260.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.* 6,251-64.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol.* 57,781-803.
- Yamamoto, Y.Y., Ichida, H., Matsui, M., Obokata, J., Sakurai, T., Satou, M., Seki, M., Shinozaki, K., Abe, T. (2007). Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics.* 8;8:67.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M. et al. (2005). Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA binding domain. *Plant Cell* 17, 944–956.

- Yamniuk A.P, Vogel H.J (2005). Structural investigation into the differential target enzyme regulation displayed by plant calmodulin isoforms. *Biochemistry* 1, 3101-11.
- Yang, C-W., Kao, H.C. (1999). Importance of ornithine- δ -aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation* 27, 189–192.
- Yang, S.L., Lan, S.S., Gong, M. (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J Plant Physiol.* 15,1694-9.
- Yang, T. Poovaiah, B.W. (2002). A Calmodulin-binding/CGCG Box DNA-binding Protein Family Involved in Multiple Signaling Pathways in Plants. *J. Biol. Chem.* 277, 45049-45058.
- Yin, J., Li, G., Rena, X., Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* 127, 335–347.
- Yoo, J.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Heo, W.D., Cheong, M. S., Park, H.C., et al. (2005). Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 280, 3697–3706.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., YamaguchiShinozaki, K., et al. (1995). Correlation between the induction of a gene for Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress. *Plant J.* 7, 751–760.
- Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 133–139.
- Yu, J., Wang, J., Lin, W. et al. (2005) The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biology* 3, e38
- Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C., Zhang, J. et al. (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* 16,5:367-71.
- Zarattini, M., Forlani, G. (2017). Toward Unveiling the Mechanisms for Transcriptional Regulation of Proline Biosynthesis in the Plant Cell Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Front. Plant Sci.* 6, 927
- Zhang, C-S., Lu, Q., Verma, D.P.S. (1995). Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem.* 270, 20491–20496.
- Zhang, L., Becker, D.F. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Front Plant Sci.* 6: 552.
- Zhang, S., Wang, X., Hammarlund, E.U., Wang, H., Costa, M.M., Bjerrum, C.J., Connelly, J.N., Zhang, B., Bian, L., Canfield, D.E. (2015). Orbital forcing of climate 1.4 billion years ago. *PNAS*, 112, 1406–1413.
- Zhang, X.-X., Tang, Y.-J., Ma, Q.-B., Yang, C.-Y., Mu, Y.-H., Suo, H.-C., et al. (2013). OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean. *PLoS ONE* 8:e83011
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247–273.
- Zhu, J-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167, 313–324.
- Zhu, S.Y., et al. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 3019–3036.

7. PUBBLICAZIONI

Pubblicazioni inerenti alla tesi di dottorato:

Zarattini, M., Forlani, G. (2017). Toward Unveiling the Mechanisms for Transcriptional Regulation of Proline Biosynthesis in the Plant Cell Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Front Plant Sci.* 2; 8:927.

Forlani, G., Bertazzini, M., **Zarattini, M.**, Funck, D. (2015). Functional characterization and expression analysis of rice $\delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide new insight into the regulation of proline and arginine catabolism. *Front Plant Sci.* 5; 6:591.

Forlani, G., Bertazzini, M., **Zarattini, M.**, Funck, D., Ruszkowski, M., Nocek, B. (2015). Functional properties and structural characterization of rice $\delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front Plant Sci.* 28; 6:565.

Altre pubblicazioni:

Zarattini, M., Launay, A., Farjad, M., Wénès, E., Taconnat, L., Boutet, S., Bernacchia, G., Fagard, M. (2017). The bile acid deoxycholate elicits defences in Arabidopsis and reduces bacterial infection. *Mol Plant Pathol.* 18(4):540-554.

Zarattini, M., De Bastiani, M., Bernacchia, G., Ferro, S., De Battisti A. (2015). The use of ECAS in plant protection: a green and efficient antimicrobial approach that primes selected defense genes. *Ecotoxicology.* 24(9):1996-2008.