

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo: Sistematica Molecolare

(XX ciclo)

**IL METABOLISMO DELL'AZOTO IN *LOTUS JAPONICUS* E FATTORI
COINVOLTI**

Coordinatore:

Ch.ma Prof. ssa Silvana filosa

Candidata:

ENRICA D'APUZZO

Relatore:

CH.MA Prof.ssa SERENA ACETO

Correlatore:

Dott. MAURIZIO CHIURAZZI

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

<u>Capitolo 1</u>		
<u>Introduzione</u>		
		1
<u>1.1</u>	<u>Fonti azotate e loro assimilazione in pianta</u>	4
<u>1.2</u>	<u>I trasportatori dell'ammonio</u>	8
<u>1.3</u>	<u>Struttura dei trasportatori dell'ammonio</u>	11
<u>1.4</u>	<u>Meccanismo di trasporto</u>	14
<u>1.5</u>	<u>Caratteristiche biochimiche</u>	
<u>1.6</u>	<u>Ruolo dei trasportatori dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno della pianta</u>	16
<u>1.7</u>	<u>Altri ruoli dei trasportatori dell'ammonio in radice</u>	20
<u>1.8</u>	<u>Espressione dei trasportatori in foglia e loro possibile ruolo</u>	22
<u>1.9</u>	<u>Regolazione trascrizionale</u>	24
<u>1.10</u>	<u>Regolazione post-trascrizionale</u>	26
<u>1.11</u>	<u>I Trasportatori dell'ammonio in leguminosa</u>	30
<u>1.12</u>	<u>Simbiosi pianta-batterio e formazione del nodulo</u>	31
<u>1.13</u>	<u>Nodulo e sua struttura</u>	36
<u>1.14</u>	<u>Cambiamenti fisiologici a carico dei batteri durante la simbiosi</u>	38
	<u>Possibile ruolo dei trasportatori durante il processo di simbiosi</u>	
<u>1.15</u>	<u>Correlazione tra il metabolismo del carbonio e dell'azoto</u>	39
	<u>PII, proteina chiave nell'interpretazione del rapporto C/N</u>	
<u>1.16</u>	<u>Struttura di GlnB e di GlnK</u>	43
<u>1.17</u>	<u>Ruolo di PII nei batteri fotosintetici</u>	44
<u>1.18</u>	<u>PII in pianta</u>	47
<u>1.19</u>	<u>PII e i suoi interattori, ruolo nella biosintesi dell'arginina</u>	49
<u>1.20</u>		51
<u>1.21</u>		57
Capitolo 2		
<u>Scopo del lavoro</u>		60
Capitolo 3		
<u>Sistema sperimentale</u>		64
Capitolo 4		
<u>Materiali e metodi</u>		

	<u>Sterilizzazione dei semi di <i>Lotus japonicus</i></u>	66
4.1	<u>Preparazione terreni di coltura e condizioni di crescita</u>	66
4.2.1	<u>Composizione dei mezzi di crescita</u>	67
4.2.2	<u>Procedura di trasformazione-rigenerazione di <i>Lotus japonicus</i></u>	70
4.3	<u>mediata da <i>Agrobacterium tumefaciens</i></u>	
	<u>Procedura di trasformazione</u>	72
4.3.1	<u>Mezzi di crescita per la procedura di trasformazione-</u>	73
4.3.2	<u>rigenerazione</u>	
	<u>Procedura di trasformazione con <i>Agrobacterium rhizogenes</i></u>	73
4.4	<u>Procedura di nodulazione <i>in vitro</i></u>	74
4.5	<u>Preparazione dei batteri</u>	74
4.5.1	<u>Infezione</u>	75
4.5.2	<u>Trattamento delle cellule batteriche</u>	75
4.6	<u>Preparazione delle cellule competenti di <i>Escherichia coli</i></u>	75
4.6.1	<u>Trasformazione per shock termico di <i>Escherichia coli</i></u>	76
4.6.2	<u>Elettroporazione</u>	76
4.6.3	<u>Preparazione delle cellule competenti di <i>Agrobacterium</i></u>	76
4.6.4	<u><i>tumefaciens</i></u>	
	<u>DDescrizione dei plasmidi</u>	77
4.7	<u>Vettore pCR2.1</u>	77
4.7.1	<u>Vettore pCAMBIA</u>	78
4.7.2	<u>Vettore pBI101</u>	79
4.7.3	<u>Vettore pH7GWIWG2(I),0</u>	80
4.7.4	<u>Vettore p-DONR 207</u>	81
4.7.5	<u>Vettore Beta-GFP</u>	82
4.7.6	<u>Vettore pCaMBIA1300:35S:AtrecA::DsRed</u>	84
4.7.7	<u>Gateway Technology</u>	84
4.8	<u>Real Time RT-PCR</u>	87
4.9	<u>Saggio quantitativo con la PCR Real-time</u>	87
4.9.1	<u>Quantificazione</u>	88
	<u>Estrazione dell'RNA da tessuto vegetale</u>	
4.9.2	<u>Elettroforesi e trasferimento di RNA a basso peso molecolare</u>	89
4.10	<u>su filtri di nylon Northern blot (LMW)</u>	90
4.11.1	<u>Elettroforesi e trasferimento di RNA ad alto peso molecolare su</u>	
	<u>filtri di nylon Northern blot (HMW)</u>	90
4.11.2	<u>PrPreparazione della sonda</u>	
	<u>Saggio istochimico della β-glucuronidasi</u>	91
4.11.3	<u>Estrazione delle clorofille</u>	91
4.12		92
4.13		

Capitolo 5

Risultati

	Localizzazione sub-cellulare delle proteine AMT1	93
<u>5.1</u>	RNA-interference: meccanismi generali	98
<u>5.2</u>	Strategia per il silenziamento dell'intera famiglia <i>LjAMT1</i>	100
<u>5.2.1</u>	Analisi del fenotipo simbiotico in hairy roots	103
<u>5.2.2</u>	Caratterizzazione molecolare delle linee interferite	103
<u>5.2.3</u>	Analisi per Northern blot (LMW)	107
<u>5.2.4</u>	Analisi per Northern blot (HMW)	109
<u>5.2.5</u>	Analisi del fenotipo di crescita e di quello simbiotico nei segreganti T1	110
<u>5.2.6</u>	Ottenimento di piante che over-esprimono il trasportatore <i>LjAMT1;3</i>	112
<u>5.2.7</u>	Test di sensibilità al metilammonio	116
<u>5.2.8</u>	Analisi del fenotipo simbiotico	117
<u>5.2.9</u>	Analisi del fenotipo di crescita	118
<u>5.2.10</u>	PII, un regolatore del rapporto C/N	123
<u>5.3</u>	Analisi del profilo di espressione di <i>LjGLB1</i> nei vari organi	124
<u>5.3.1</u>	Analisi dell'espressione di <i>LjGLB1</i> durante il ciclo giorno/notte	126
<u>5.3.2</u>	La regolazione luce/buio dell'espressione di <i>LjGLB1</i> è influenzata dalla presenza di saccarosio	128
<u>5.3.3</u>	Analisi dell'espressione di <i>LjGLB1</i> in condizioni limitanti di azoto	129
<u>5.3.4</u>	Localizzazione spaziale dell'attività promotrice di <i>LjGLB1</i>	131
<u>5.3.5</u>	Analisi dell'espressione della fusione <i>GLB1::gusA</i> in mezzi contenenti diverse fonti azotate	136
<u>5.3.6</u>	Localizzazione di GLB1 a livello sub-cellulare	137
<u>5.3.7</u>	Capitolo 6	141
	Discussione	141
	<u>Bibliografia</u>	164

1.1 FONTI AZOTATE E LORO ASSIMILAZIONE IN PIANTA

L'azoto è un macronutriente essenziale per la crescita delle piante e per la loro sopravvivenza; diverse sono le fonti azotate presenti nel suolo, fonti inorganiche quali nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e ammonio ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), le cui concentrazioni possono variare enormemente, e fonti organiche quali amminoacidi e piccoli peptidi in genere presenti a bassissime concentrazioni.

Le fonti azotate sono spesso presenti in concentrazioni limitanti per la crescita e produttività delle piante e queste ultime hanno quindi sviluppato vari meccanismi per potere fare fronte a tale condizione e alla carenza di nutrienti in generale. Quando ad esempio, determinati nutrienti diventano limitanti, tanto da alterare lo status nutrizionale della pianta, si assiste a cambiamenti nell'architettura dell'apparato radicale e/o a modifiche nella capacità di trasporto; tutto ciò comporta un incremento nell'acquisizione dei nutrienti dovuto ad un maggiore trasporto di questi dal mezzo esterno all'interno delle cellule vegetali e/o ad una loro migliore mobilitazione fra i vari tessuti e organi della pianta (Marschner, 1995).

In altre parole, possiamo dire che organismi sessili come le piante devono essere capaci di percepire continuamente l'ambiente circostante in maniera da rispondere prontamente ed efficientemente a diversi e correlati segnali biotici e abiotici. Il controllo della pianta su questa pletora di fattori che agiscono al livello della rizosfera, avviene attraverso una complicata rete di trasduzione di segnali.

Un esempio di come un segnale abiotico come la carenza di nutrienti azotati, possa essere trasdotto all'interno della radice inducendo un cambiamento della sua architettura è stato riportato in *Arabidopsis thaliana* con l'isolamento del mutante *anr1* che in condizioni di carenza di nitrato è alterato nello sviluppo delle radici laterali (Zhang and Forde, 1998). *ANR1* in particolare sembra essere implicato nell'induzione della crescita delle radici secondarie in quelle condizioni e non nella loro formazione (Zhang and Forde, 1998). Inoltre, la mutazione *ANR1* non influenza

l'attività di fattori del metabolismo di *Arabidopsis* coinvolti nell'assimilazione del nitrato come ad esempio la nitrato riduttasi (NAR1) e quindi sembra esercitare un ruolo di sensore della condizione esterna in grado di associare tale segnale ad un preciso programma di sviluppo.

Inoltre, diversi studi molecolari e fisiologici hanno dimostrato che una risposta della pianta a condizioni di carenza di azoto nel terreno passa attraverso un diretto incremento dell'espressione e della funzione dei trasportatori di NH_4^+ e di NO_3^- .

Oltre alle fonti azotate principali che sono presenti nel terreno, ne esiste un'altra proveniente dall'atmosfera ed in questo caso l'azoto è assorbito dalla porzione aerea delle piante attraverso le aperture stomatiche.

Nelle piante leguminose si è evoluto un altro meccanismo che le mette in grado di essere rifornite di azoto atmosferico che sarebbe altrimenti irreperibile, la simbiosi mutualistica con batteri del suolo, appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*, in grado di fissare l' N_2 atmosferico all'interno di specifici organi, i noduli radicali. Da qui l'azoto fissato, ridotto ad ammonio, viene traslocato al resto della pianta (Okon and Vanderleyden, 1997; Reinhold-Hurek and Hurek, 1998). In queste piante quindi, esiste un meccanismo addizionale, oltre a quelli descritti precedentemente, per sopperire alla condizione azoto-limitante,

Altre piante, pur non essendo in grado di formare noduli, sono comunque in grado di beneficiare di simbiosi di tipo associativa con batteri diazotrofici free-living come, ad esempio, *Azospirillum* o *Azoarcus* (Bashan and Holguin, 1997). Generalmente questi batteri vivono in stretta associazione con la pianta ospite, sulla superficie delle radici, anche se batteri diazotrofici sono stati anche riscontrati all'interno dei tessuti vegetali (Triplett, 1996). Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti positivi dei batteri N_2 -fissatori free-living sulla crescita della pianta (Hoeflich *et al.* 1994; Bashan and Holguin, 1997).

Ulteriore fonte di azoto nelle piante può essere infine rappresentata da sorgenti interne come ad esempio l'ammonio prodotto come catabolita durante la

fotorespirazione nelle cellule del mesofillo fogliare. In particolare, questo viene prodotto all'interno dei mitocondri da cui viene successivamente traslocato nei cloroplasti.

Indipendentemente dal tipo di nutriente inorganico, l'azoto introdotto all'interno delle cellule vegetali è ridotto, per l'assimilazione, a ione ammonio. Quindi, questa forma inorganica è energeticamente favorita rispetto alle altre e questo è il motivo per cui ad esempio piante di *Arabidopsis thaliana* cresciute in identiche, basse concentrazioni di nitrato e ammonio, crescono meglio in presenza di quest'ultimo (Gazzarini *et al.* 1990).

In radice l'assimilazione dell'ammonio avviene ad opera del sistema della glutammina sintetasi/glutammato sintasi (GS/NADH-GOGAT) del citoplasma; tali enzimi incorporano l'ammonio negli amminoacidi base glutammina e glutammato, successivamente trasportati nei vari tessuti e organi della pianta attraverso i vasi xilematici. Una parte dell'ammonio viene anche traslocato dalle radici alla porzione aerea della pianta e, in particolari condizioni di crescita, quale la ridotta concentrazione di azoto nel terreno, può anche essere assimilato nelle foglie e da queste, soprattutto sotto forma di amminoacidi, trasferito alle radici attraverso i vasi floematici (Marshner *et al.* 1997). Recentemente è stato osservato che la concentrazione di ammonio all'interno dei vasi xilematici è più alta di quella attesa (Britto *et al.* 2001; Rawat *et al.* 1999), per cui è lecito ipotizzare che la concentrazione dell'ammonio nel citoplasma delle cellule di radice sia, almeno in alcune condizioni, più alta del previsto e che lo stesso ammonio possa essere trasferito dalla radice alla parte aerea della pianta e viceversa. In pianta esiste comunque un riciclo continuo di azoto, sotto forma di amminoacidi, tra radice e parte aerea della pianta (Williams and Miller, 2001) e questo può rappresentare un valido meccanismo grazie al quale qualsiasi cambiamento dello *status* di azoto, ad esempio nella parte aerea della pianta, può essere segnalato alla parte ipogea e viceversa (Cooper and Clarkson, 1989; Imsande and Touraine, 1994).

L'assimilazione dell'ammonio in foglia avviene sempre attraverso il sistema GS/NADH-GOGAT anche se in questo caso è la GS plastidiale ad essere maggiormente attiva; inoltre l'ammonio, prodotto dalla fotorespirazione, è assimilato anche dalla glutammato deidrogenasi (GDH) presente nei mitocondri stessi (Udvardi 2000). Diverse isoforme enzimatiche della GS sono presenti nei diversi organi, cellule e compartimenti cellulari (Lam *et al.* 1996). Nelle piante superiori la GS è un ottamero le cui subunità di 38-45 kDa sono codificate da una famiglia multigenica. Nelle foglie sono state identificate entrambe le isoforme della GS, citosolica e cloroplastica. La subunità cloroplastica risulta essere leggermente più grande, 43-45 KDa, rispetto a quella citosolica, 37-43 KDa. Il rapporto tra i due isoenzimi varia a seconda della specie vegetale, dello stadio di sviluppo e di diversi fattori ambientali, quali la luce o la concentrazione di CO₂ (Orea *et al.* 2002). Nelle radici, normalmente, è presente solo la forma citosolica, ma la presenza dell'isoforma plastidiale è stata comunque rilevata nei legumi temperati.

1.2 I TRASPORTATORI DELL'AMMONIO

L'ammonio, essendo energeticamente favorito, rappresenta un'eccellente fonte azotata e un componente chiave nell'assimilazione dell'azoto in numerosi sistemi biologici quali batteri, lieviti, funghi, alghe e piante superiori dove rappresenta la forma inorganica che è incorporata, generalmente attraverso il sistema GS/NADH-GOGAT, in scheletri carboniosi (vedi paragrafo 1.1).

L'ammonio è una base debole (pK_a 9.25) ed esiste in due forme chimicamente differenti, sotto forma ionica (NH₄⁺) e sotto forma di ammoniaca (NH₃) per le quali le membrane presentano differenti permeabilità.

Ad alte concentrazioni (>1mM) il trasporto avviene passivamente nella forma non protonata NH₃ ed è sufficiente a promuovere la crescita cellulare nel caso dei batteri enterici e dei funghi. A basse concentrazioni, invece, quando la diffusione

diventa limitante, è richiesto un sistema di trasporto attivo ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$). In natura esistono, infatti, specifiche proteine deputate a tale trasporto sia in organismi procarioti che eucarioti (AMT/Rh). Quei pochi organismi che non presentano geni che codificano per trasportatori dell'ammonio, si sono specializzati ad utilizzare forme di azoto specifiche come urea nel caso di *Helicobacter pylori*, oppure a crescere in ambienti ricchi di azoto. Esempi sono forniti da parassiti patogeni per gli eucarioti come *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei* che vivono nel sangue degli ospiti che parassitano (Ludewig *et al.* 2007).

L'ammonio, quando presente in elevate concentrazioni, può risultare citotossico per cui il suo trasporto attraverso le membrane cellulari ha una notevole rilevanza biologica ed è un processo che deve essere finemente regolato. Per potere avere un'omeostasi dell'ammonio nelle cellule, i vari trasportatori dell'ammonio sintetizzati presentano proprietà biochimiche, localizzazioni e regolazioni a livello trascrizionale differenti.

La prima prova dell'esistenza di proteine deputate al trasporto attivo dell'ammonio viene da esperimenti condotti da Hackett e collaboratori nel 1970 sul fungo *Penicillium chrysogenum*. L'attività del trasportatore fu misurata osservando la capacità della proteina di trasportare (^{14}C)metilammonio il cui utilizzo è servito successivamente per lo studio dei trasportatori dell'ammonio in sistemi differenti. Il metilammonio è, infatti, un analogo dell'ammonio a differenza del quale però, non è metabolizzato all'interno delle cellule, permettendo così di misurare direttamente la sua concentrazione intracellulare (e quindi il suo trasporto da un mezzo esterno) nel tempo.

Anche nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* furono isolate tre differenti proteine, MEP (metilammonio permeasi), in grado di trasportare il metilammonio e quindi l'ammonio dal mezzo esterno all'interno delle cellule di lievito (Marini *et al.* 1994).

In pianta il primo trasportatore fu isolato nel sistema modello *Arabidopsis thaliana* (*AtAMT1;1*) (Ninnemann *et al.* 1994). L'espressione di *AtAMT1;1* era sufficiente a permettere la complementazione del triplo mutante di lievito ($\Delta mep1-2-3$) incapace, da solo, di crescere su un terreno minimo, contenente 1mM NH_4NO_3 come unica fonte di azoto. Il sequenziamento dell'intero genoma di *Arabidopsis* ha poi permesso l'identificazione di altri cinque trasportatori dell'ammonio (Gazzarini *et al.* 1999; Sohlekamp *et al.* 2000; Udvardi *et al.* 2000). Trasportatori dell'ammonio sono stati isolati in differenti sistemi modello di pianta come ad esempio nel pomodoro *Lycopersicon esculentum* in cui sono stati individuati tre trasportatori (*LeAMT1*) (Lauter *et al.* 1996; von Wirèn *et al.* 2000); nel riso *Oryza sativa* (6 geni *OsAMT1*) (Kumar *et al.* 2003); infine nella leguminosa *Lotus japonicus* (3 geni *LjAMT1*) (Salvemini *et al.* 2001; D'Apuzzo *et al.* 2004).

L'analisi filogenetica ha rivelato un'elevata omologia fra i trasportatori ad alta affinità che, assieme ai trasportatori dei cianobatteri, sono stati raggruppati in un'unica superfamiglia (AMT1).

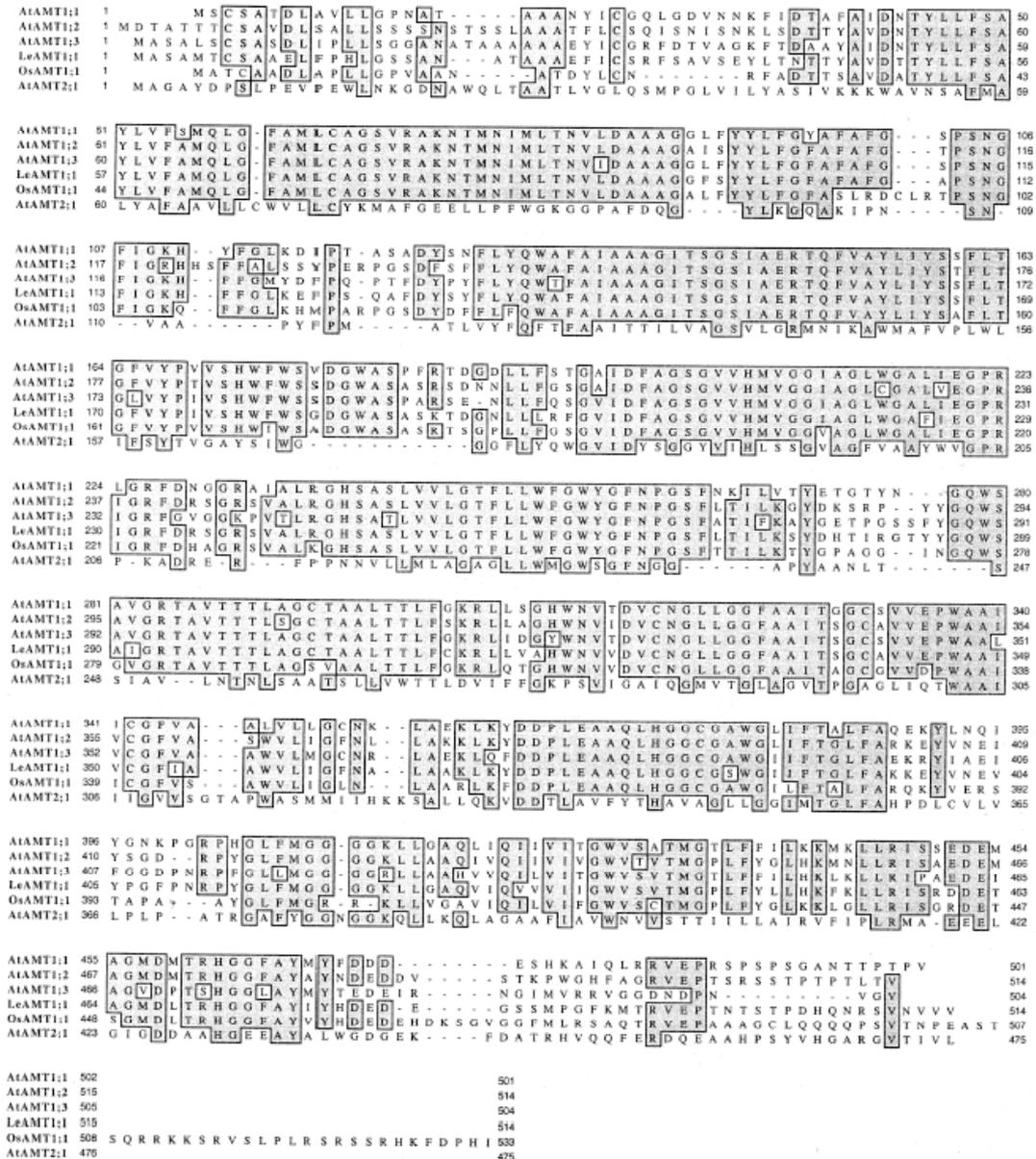


Figura 1 Allineamenti delle sequenze amminoacidiche dei trasportatori dell'ammonio (AMT1) isolati in pianta. Le regioni conservate sono incorniciate. Da, Merrick and von Wirèn, Topics in Current Genetics 2004.

Più recentemente, la classe dei trasportatori dell'ammonio ad alta affinità è stata suddivisa in due sottoclassi con l'identificazione dapprima in *A. thaliana*, ma poi anche in *L. japonicus* e *Oryza sativa* di altri geni (AMT2) con caratteristiche biochimiche (non sono in grado di trasportare il metilammonio) e profili di espressione diversi (Sohlenkamp *et al.* 2000; Simon-Rosin *et al.* 2003; Senega *et al.* 2003). Per quanto riguarda le sequenze primarie, il trasportatore di *Arabidopsis*

AtAMT2;1 insieme a quello di *Lotus LjAMT2;1* sono filogeneticamente molto più vicini ai trasportatori Mep1, 2 e 3 di *Saccharomyces cerevisiae* e, insieme al trasportatore di *Escherichia coli* amtB, sono stati raggruppati nella sottofamiglia MEP (Ludewig *et al.* 2001). Una terza classe di trasportatori, filogeneticamente distanti da quelli delle piante, sono rappresentati dalle proteine Rhesus, raggruppate nella sottofamiglia Rh.

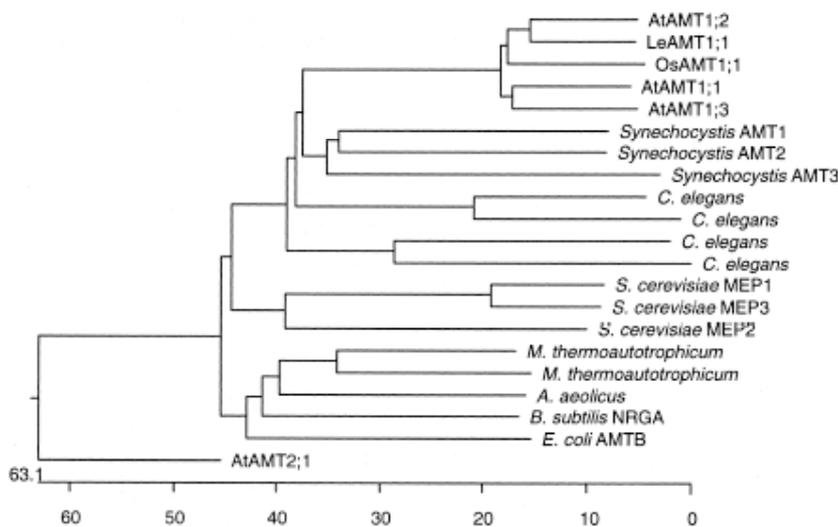


Figura 2. Albero filogenetico delle proteine AMT.

Le proteine AMT indicate, isolate negli eucarioti e in alcuni procarioti, sono state allineate utilizzando il programma Clustal W. La scala indica la percentuale di divergenza.

1.3 STRUTTURA DEI TRASPORTATORI DELL'AMMONIO

Studi cristallografici, condotti sul trasportatore amtB di *Escherichia coli*, hanno dimostrato che i trasportatori dell'ammonio sono proteine di membrana altamente idrofobiche con una massa molecolare di circa 45-55 kDa. Le proteine AMT1 di pianta sono costituiti da 11 segmenti trans-membrana mentre amtB di *Escherichia coli* contiene 12 segmenti trans-membrana anche se, nella sua forma matura, il

segmento all'estremità NH₂-terminale viene successivamente tagliato una volta raggiunta la sua localizzazione finale sulla membrana plasmatica. Ciascuno degli 11 segmenti idrofobici ha una lunghezza differente e quello che presenta un maggiore numero di residui amminocidici è quello all'estremità C-terminale. Tutti i loops, presenti sul lato periplasmatico, si presentano disposti in maniera ordinata contrariamente a quanto accade per quelli esposti sul lato citoplasmatico per i quali si osserva un maggiore disordine (Zheng *et al.* 2004). I trasportatori dei differenti sistemi presentano tutti il dominio NH₂-terminale sul lato extra-cellulare e quello C-terminale all'interno della cellula.

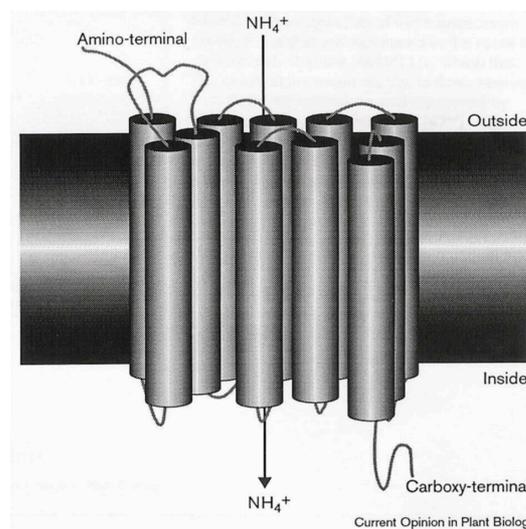


Figura 3. Struttura dei trasportatori dell'ammonio.

Da von Wirèn *et al.* Current Opinion in Plant Biology 2000.

Studi condotti in differenti sistemi modello, suggeriscono fortemente che i trasportatori hanno la capacità di interagire tra di loro, formando omo- ed eteromeri e che questa proprietà possa essere associata alla loro normale funzione di trasporto. Alcuni di questi studi sono stati condotti sulla proteina AMT1;1 di *L. esculentum*. In *L. esculentum* una singola mutazione puntiforme (G458D) nell'estremità citosolica

C-terminale del trasportatore *LeAMT1;1* comporta una perdita di funzione che non si traduce in un cambiamento di localizzazione della proteina, quando questa è espressa in lievito o in protoplasti di pianta. La co-espressione di *LeAMT1;1* wild type e della proteina mutata in oociti di *Xenopus laevis* inibisce il trasporto dell'ammonio in maniera dominante negativa (Ludewig et al. 2003); questo suggerisce quindi una omo-oligomerizzazione dei trasportatori. Tale interazione diretta è stata inoltre dimostrata *in vivo* attraverso il sistema in lievito del two-hybrid system (Ludewig et al. 2003). Sempre in pomodoro, si è dimostrato che anche la co-espressione, in oociti di *Xenopus*, di *LeAMT1;1* mutato e dell'altro trasportatore *LeAMT1;2* wild type, determina inibizione del trasporto dell'ammonio in maniera dominante negativa indicando quindi una capacità di eteromerizzazione (Ludewig et al. 2003).

Recentemente, la purificazione del trasportatore AmtB di *E. coli*, ha confermato che effettivamente i trasportatori dell'ammonio oligomerizzano, ed in particolare che la molecola attiva esiste sotto forma di omo-trimero. Lo studio del cristallo ha dimostrato come ogni monomero è costituito da un canale centrale, idrofobico, contenente due residui di istidina, altamente conservati (H168 e H318), legati da un legame a idrogeno. All'ingresso del poro vi è invece la presenza di due residui di Fenilalanina (F107 e F215), anche questi altamente conservati (Zheng et al. 2004).

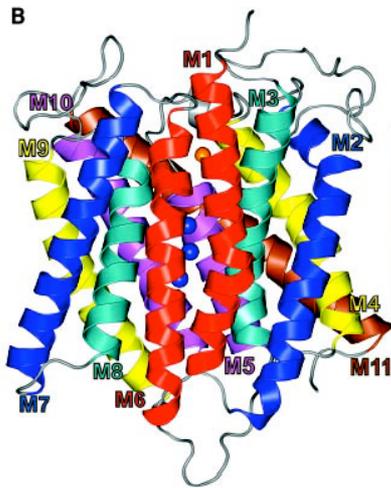


Figura 4. Visione tridimensionale del monomero di amtB di *E. coli*.

Da Khademi S. *et al.* Science 2004.

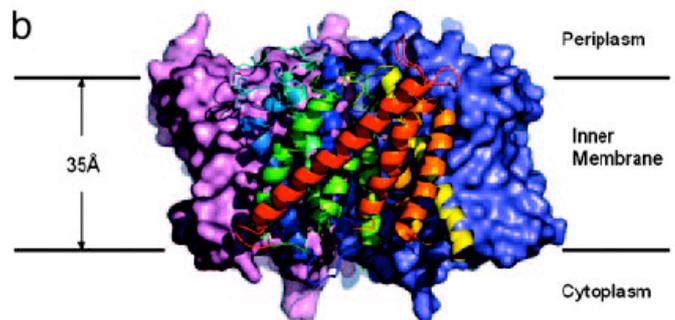


Figura 5. Visione frontale della struttura dell'omotrimerico amB di *E. coli*.

Da Zheng L. *et al.* PNAS 2004.

1.4 MECCANISMO DI TRASPORTO

Tutti gli studi funzionali delle proteine Mep/amt/Rh sono stati effettuati usando cellule wild type o mutanti e/o sistemi eterologhi di espressione. Dal momento che è più difficile misurare direttamente l'ammonio, il suo trasporto è stato studiato spesso analizzando il trasporto del metilammonio (Kleiner *et al.* 1985; Hackette *et al.* 1970; Marini *et al.* 1997) e/o attraverso studi di elettrofisiologia in oociti (Bakouh *et al.* 2004; Westhoff *et al.* 2002). L'interpretazione dei risultati sperimentali non è però univoca e questo è uno dei motivi per cui in letteratura esistono ancora dati controversi relativi al meccanismo di trasporto dell'ammonio, ed in particolare se la specie trasportata sia l'ammoniaca (NH_3) o la sua forma protonata (NH_4^+).

Sulla base dei risultati più recenti, ottenuti grazie allo studio della struttura del cristallo del trasportatore dell'ammonio amtB di *Escherichia coli*, è stato proposto un trasporto dell' NH_3 attraverso il canale (Khademi *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2004). Il trasporto del substrato avviene attraverso lo stretto poro idrofobico situato al centro di

ogni monomero dell'omotrimero amtB. Sul lato periplasmatico di ingresso del canale è stato osservato un sito di legame dello ione NH_4^+ dovuto, molto probabilmente, ai due residui aromatici di fenilalanina (F107 e F215) che bloccano l'accesso al poro. Non sono stati osservati significativi trasporti di altri cationi che possano competere per il sito di legame dei trasportatori Mep/Amt/Rh (Marini *et al.* 1997; Bakouh *et al.* 2004). I due residui conservati di istidina, presenti all'interno del poro, è stato ipotizzato che possano fungere da accettori di protoni, facilitando così la deprotonazione dell' NH_4^+ a NH_3 . I dati strutturali e le considerazioni energetiche suggeriscono fortemente che le proteine MEP/amt/Rh sono canali gassosi dell'ammoniaca (NH_3); questa viene poi presumibilmente riprotonata all'interno della cellula a contatto con l' H_2O . (Khademi *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2004).

In pianta il meccanismo di trasporto è stato studiato per il trasportatore dell'ammonio di pomodoro *Lycopersicon esculentum* (*LeAMT1;1*). Dal punto di vista strutturale, il modello cristallografico di *LeAMT1;1* ha evidenziato come, analogamente ad amtB, all'ingresso del canale ci sia la presenza di Fenilalanina e Tirosina che risultano quindi altamente conservati; tali residui amminoacidici sembrano avere un ruolo chiave nel trasporto dell'ammonio e in particolare nella raccolta degli ioni ammonio all'ingresso del poro, come dimostrato attraverso analisi di mutazioni specifiche. Il modello formulato per *LeAMT1;1* prevede anch'esso un canale centrale idrofobico dovuto alla presenza di due residui di Istidina (Mayer *et al.* 2006). A differenza dei batteri però, per i trasportatori dell'ammonio in pianta esistono evidenze che suggeriscono fortemente il trasporto dell'ammonio in forma protonata. Oociti di *Xenopus laevis*, trasformati con *LeAMT1;1*, in seguito all'aggiunta nel mezzo esterno dell'ammonio in concentrazioni micromolari, mostravano una corrente ionica dipendente dalla presenza del trasportatore e indipendente dai valori di pH del mezzo esterno (5.5-8.5) (Ludewig *et al.* 2002). L'effetto pH indipendente è particolarmente significativo in quanto le due forme di $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ sono in equilibrio in soluzione acquosa con una costante di dissociazione

acida (pK_a) di 9.25, che sta ad indicare che la maggior parte dell'ammonio ad un pH fisiologico è presente nella sua forma ionica. In conclusione, quindi, nonostante le similitudini di struttura tra il trasportatore amtB e quello di pianta *LeAMT1;1*, per quest'ultimo è stato dimostrato il trasporto della componente azotata sotto forma ionica ed è stato escluso il trasporto dell' NH_3 . Ciò porta a concludere che, proteine correlate e che mostrano una struttura molecolare simile, apparentemente possono supportare meccanismi di trasporto contrastanti (Mayer *et al.* 2006).

Comunque, una caratteristica comune è che il trasporto dell'ammonio è di tipo attivo, dipendendo infatti dalla sintesi di ATP. Negli esperimenti di complementazione è necessario aggiungere al mezzo il glucosio perché il lievito, contenente in c-DNA di *Arabidopsis*, possa assumere metilammonio (Ninneman *et al.* 1994). Studi più dettagliati in *S. cerevisiae* supportano la teoria che l'energia per il trasporto dell'ammonio, sotto forma di ATP, sia fornita dalla pompa H^+ -ATPase, presente sulla membrana plasmatica (Pena *et al.* 1987). Questi dati sono anche confermati dal fatto che inibitori dell'attività ATPasica della membrana plasmatica riducono fortemente il trasporto dello stesso metilammonio (Ninneman *et al.* 1994). In realtà non è però stato trovato nella molecola del trasportatore un dominio in grado di legare direttamente l'ATP, suggerendo quindi che si tratta di un trasporto di tipo secondario. Inoltre il metilammonio si accumula nella cellula indicando un trasporto attivo contro gradiente. Questi stessi risultati sono stati confermati per i trasportatori in riso.

In letteratura sono stati anche riportati dati che indicano la possibilità di un certo livello di trasporto aspecifico dell'ammonio. Sulla membrana plasmatica di cellule di pianta è stata dimostrata la presenza di canali per il K^+ (KAT1), che sembrano trasportare anche l'ammonio con una capacità pari ad 1/3 di quella con cui trasportano lo ione K^+ (Schachtmon *et al.* 1992). Questa evidenza è anche supportata da studi elettrofisiologici che dimostrano competizione tra i due ioni (Vale *et al.*, 1998; Henriksen *et al.* 1992; Ninnemann *et al.* 1994).

In conclusione quindi, i meccanismi postulati per il trasporto dell'ammonio sono molteplici e di diversa efficienza e vanno dal trasporto attivo mediato dalle proteine AMT a quello legato all'attività di canali cationici del K^+ e nel caso dell' NH_3 , per semplice diffusione attraverso pori per il trasporto dell'acqua (acquaporine) (Fig. 6; Howitt and Udvardi, 2000). Tutto ciò causa un accumulo di cariche positive che depolarizzano la membrana con la conseguente attivazione dell' H^+ -ATPasi, che pompa protoni all'esterno della cellula stessa, riportando così il potenziale di membrana all'equilibrio (Fig. 6).

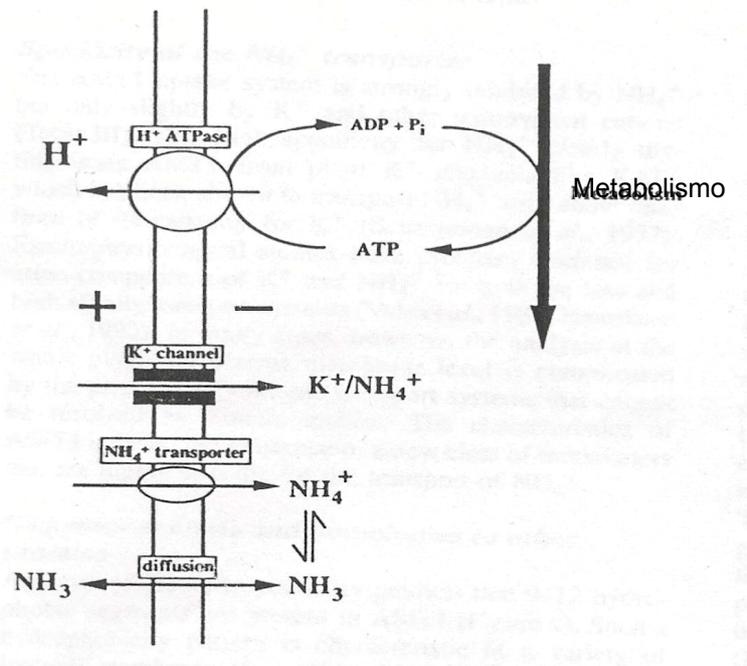


Figura 6. Possibili meccanismi di trasporto dell'ammonio in cellule di pianta.
Da Howitt and Udvardi, Biochim Biophys Acta 2000.

1.5 CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE

Le fonti azotate sono presenti nel suolo in differenti concentrazioni e variano a seconda delle condizioni del terreno. Per potere rispondere a questa eterogeneità, le piante hanno sviluppato differenti meccanismi in grado di soddisfare, in ogni

condizione, il loro fabbisogno azotato per potere assolvere alle loro normali funzioni fisiologiche ed assicurarsi un normale sviluppo. Inoltre hanno sviluppato un meccanismo in grado di coordinare e finemente regolare i flussi azotati biochimici all'interno dell'organismo stesso.

Studi fisiologici hanno dimostrato la presenza di due tipi di trasporto, uno a bassa affinità (LATS - Low Affinity Transport System), non saturabile e attivo quando la concentrazione del mezzo esterno è dell'ordine delle millimoli, (convenzionalmente a partire da 1mM); l'altro ad alta affinità, saturabile, che lavora a basse concentrazioni (convenzionalmente fino ad 1mM) HATS (High Affinity Transport System) (Clarkson, 1986).

I fattori coinvolti nel trasporto a bassa affinità non sono stati ancora identificati in pianta. Per quanto riguarda i trasportatori dell'ammonio, come accennato precedentemente, sono proteine ad alta affinità, che lavorano a concentrazioni molto basse di ammonio. Le loro caratteristiche biochimiche sono state molto spesso analizzate tramite esperimenti di complementazione eterologa in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*, mutato nei geni deputati al trasporto dell'ammonio. I saggi sono stati effettuati utilizzando l'analogo dell'ammonio, il (¹⁴C)-metilammonio che, non venendo metabolizzato all'interno della cellula, permette di potere misurare il suo accumulo nel tempo e quindi il suo trasporto all'interno della cellula di lievito. Questo consente di stabilire le cinetiche di trasporto tramite parametri quali la costante di affinità (K_m), vale a dire la concentrazione di substrato richiesta dall'enzima per operare alla metà della velocità massima; la velocità massima (V_{max}) che è la velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato ed è quindi una misura della capacità di trasporto.

I valori della K_m per il metilammonio, ad esempio, per i trasportatori di *Arabidopsis AtAMT1;1-1;2* e *1;3* risultano dell'ordine delle μM e precisamente 8, 24 e 11 μM .

In realtà, la costante di affinità per il metilammonio non riflette necessariamente l'affinità per l'ammonio (Venegoni *et al.* 1997), e questo può essere verificato attraverso il calcolo della costante di inibizione del trasporto del metilammonio (K_i) dovuto all'aggiunta di concentrazioni crescenti di ammonio. Con la costante d'inibizione, infatti, è possibile valutare la specificità del substrato, inibendo in maniera reversibile, con un competitore specifico, il trasporto del metilammonio. Il legame del metilammonio dei trasportatori di *Arabidopsis* è di tipo competitivo, essendo infatti inibito dalla presenza di ammonio nel mezzo con una costante con valori di 0,5 μM per *AtAMT1;1* e compreso fra i 25 e 40 μM per *AtAMT1;2* e *AtAMT1;3* (Gazzarini *et al.* 1999). Le diverse, sia pur paragonabili affinità fanno presupporre che ogni organismo sia in grado di rispondere in maniera appropriata a piccole variazioni di concentrazioni di ammonio presenti nell'ambiente e/o all'interno dei tessuti vegetali (Yuan *et al.* 2007).

1.6 RUOLO DEI TRASPORTATORI DELL'AMMONIO NEL TRASPORTO DAL MEZZO ESTERNO ALL'INTERNO DELLA PIANTA

Uno dei ruoli fondamentali dei trasportatori dell'ammonio in genere è quello di trasportare l'ammonio dall'ambiente esterno all'interno dell'organismo. In molte specie vegetali sono infatti state investigate le basi molecolari del trasporto dell'ammonio e la sua regolazione, dettata dallo *status* nutrizionale della pianta, evidenziando una forte correlazione tra l'influsso di ammonio ad alta affinità e l'espressione dei geni *AMT1*.

E' dall'analisi del gene *AtAMT1;1* nel sistema modello per eccellenza, *Arabidopsis thaliana*, che vengono le prime evidenze sperimentali sul ruolo giocato da questo nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno alla radice della pianta. Innanzitutto *AtAMT1;1* è maggiormente espresso nelle radici e in particolare a livello dei peli radicali, che coprono il 70% della radice stessa e giocano un ruolo centrale nell'assorbimento dei nutrienti (Marschner, 1995). *In vivo* è stato dimostrato che

trasferendo le piante da una condizione di eccesso di azoto ad una di carenza di azoto, i livelli di m-RNA di *AtAMT1;1* in radice aumentano rapidamente e transientemente e questo andamento è associato a quello del trasporto di ammonio ($^{13}\text{NH}_4^+$) dal mezzo esterno (Gazzarini *et al.* 1999; Rawat *et al.* 1999; Gansel *et al.* 2001). Gli orologi nel pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) e in riso (*Oryza sativa*), *LeAMT1;1* (von Wirèn *et al.* 2000) e *OsAMT1;1* (Kumar *et al.* 2003) mostrano un'espressione simile in radice. Inoltre è noto in letteratura che sia quattro dei sei trasportatori dell'ammonio di *Arabidopsis* che *LeAMT1;1* di pomodoro sono fortemente regolati dalla concentrazione di azoto presente nel mezzo ed indotti dopo trasferimento in mezzo con basse concentrazioni di quest'ultimo (Gansel *et al.* 2001) suggerendone un ruolo di trasporto dell'ammonio direttamente dal terreno, in condizioni di carenza azotata. Oltre al profilo di espressione, anche le proprietà delle proteine di trasportatori ad alta affinità che agiscono a basse concentrazioni di ammonio, sono consistenti con un ruolo di trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno (Lauter *et al.* 1996; Gazzarini *et al.* 1999; Rawat *et al.* 1999; von Virèn *et al.* 2000; Sheldevet *et al.* 2001). Inoltre, tale ruolo è anche in accordo con la loro localizzazione sulla membrana plasmatica. In particolare, fusioni con la Green Fluorescence Protein hanno dimostrato una specifica localizzazione sulla membrana plasmatica delle cellule della radice (Ludewig *et al.* 2003).

Comunque, solo successivamente, grazie all'analisi del mutante *knock-out* del gene *AtAMT1;1*, di *Arabidopsis thaliana* si è avuta una prova sperimentale diretta del ruolo primario svolto da questo nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno delle cellule della radice. Infatti, i mutanti per inserzione di T-DNA analizzati non mostrano trascrizione di *AtAMT1;1* in nessuno degli organi in cui normalmente questo è presente (foglie e radici) e ciò è associato ad un ridotto influsso di ammonio dal mezzo esterno di circa il 30% rispetto al wild type. L'analisi dell'espressione di altri due trasportatori *AtAMT1;2* e *AtAMT1;3* in questo background genetico mostra un aumento della trascrizione e ciò potrebbe spiegare

una riduzione di uptake del solo 30%, permettendo così di compensare, almeno in parte, la mancata attività di *AtAMT1;1* e garantire alla pianta il giusto apporto di azoto (Kaiser *et al.* 2002).

Il coinvolgimento di *AtAMT1;1* nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno della pianta è stato inoltre confermato da esperimenti condotti da Loquè e collaboratori nel 2006 che hanno ulteriormente caratterizzato dal punto di vista funzionale la famiglia AMT1 di *A. thaliana*. Mutanti per inserzione del gene *AtAMT1;1* mostrano anche in questo caso, in radici di piante trasferite in condizioni di carenza di azoto, una riduzione dell'influsso di ammonio, pari all'incirca al 30%. La cosa sorprendente è che anche quando sono stati analizzati mutanti per inserzione di T-DNA nel gene *AtAMT1;3*, questi mostravano una riduzione pari al 35% del trasporto dell'ammonio, in maniera analoga a quanto osservato per *AtAMT1;1*. Il doppio mutante, infine, in condizioni di carenza di azoto, mostrava una diminuzione del 70% nel trasporto dell'ammonio e una diminuita sensibilità al metilammonio rispetto alle piante wild type, suggerendo anche per *AtAMT1;3* un ruolo di trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno. In maniera consistente entrambe le proteine sono localizzate sulla membrana plasmatica e sono espresse nella zona dei peli radicali e nelle cellule corticali della radice primaria e secondaria (Loquè *et al.* 2006). Comunque, la riduzione del trasporto di ammonio nel doppio mutante, nonostante il mancato aumento dei livelli trascrizionali degli altri due trasportatori *AtAMT1;2* o *AtAMT2;1*, non si traduce in un alterato fenotipo di crescita anche in presenza di solo ammonio quale fonte di azoto presente nel mezzo. Tra l'altro nel lavoro di Loquè non si confermava la induzione dell'espressione di *AtAMT1;2* e quindi il possibile effetto di compensazione e quelle osservazioni supportavano l'idea che altri trasportatori dell'ammonio, che sono espressi in radice, possano avere una funzione ridondante rispetto ad *AtAMT1;1* e *AtAMT1;3*.

Ulteriori esperimenti condotti di recente chiariscono in maniera ancora più approfondita il ruolo dei trasportatori dell'ammonio nel trasporto di quest'ultimo dal

mezzo esterno a livello radicale. E' stata infatti riportata l'analisi di un quadruplo mutante *AtAMT1;1, 1;2, 1;3 e 2;1* che mostra una grossa riduzione della funzione di trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno, pari al 90-95% se comparata a quella delle piante wild type. Nel quadruplo mutante sembra che quella attività di trasporto residua (circa il 5%) sia dovuta al contributo di *AtAMT1;5*, espresso più blandamente in radice a livello dei peli radicali e indotto in condizioni di carenza di azoto (Yuan *et al.* 2007). In accordo con queste osservazioni, il quadruplo mutante mostra fenotipi deficienti di crescita, con una riduzione di circa il 50% della biomassa della parte aerea, rispetto a piante wild type, quando cresciuto in presenza di solo ammonio come fonte di azoto (Yuan *et al.* 2007).

I risultati descritti evidenziano quindi come il trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno della pianta sia il risultato di un'attiva cooperazione tra i quattro trasportatori che sono espressi a livello della radice e che sono tutti localizzati sulla membrana plasmatica delle cellule radicali. L'espressione di tutti e quattro i geni (*AtAMT1;1-1;2-1;3-1;5*) inoltre aumenta in condizioni di carenza di azoto nel mezzo. La cosa che li differenzia è il tipo di cellule della radice a livello delle quali questi sono espressi, dando un'idea di quanto essi si siano specializzati per potere fornire alla pianta un complesso ed efficiente trasporto, elegantemente coordinato, dell'ammonio (Fig. 7).

Ulteriori prove del ruolo svolto dalle proteine AMT1 nel trasporto dell'ammonio direttamente dal mezzo esterno sono fornite da studi svolti in riso (*Oryza sativa*). In questo caso il trasportatore *OsAMT1;1* è quello che è maggiormente espresso e che ha la più alta affinità per l'ammonio. Piante transgeniche, over-esprimenti *OsAMT1;1*, mostrano un incremento nel trasporto dell'ammonio in radice oltre a presentare un maggiore contenuto di ammonio all'interno della pianta (Hoque *et al.* 2006).

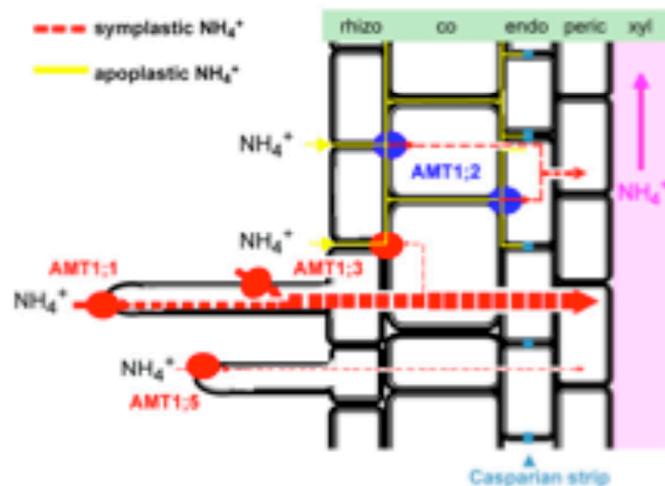


Figura 7. Modello che riassume le funzioni degli AMT1 nella radice di *Arabidopsis thaliana*

Rappresentazione schematica del contributo dei trasportatori *LjAMT1;1*; *LjAMT1;3*; *LjAMT1;5* (rappresentati in rosso) e di *LjAMT1;2* (rappresentato in blu) nell'assorbimento dell'ammonio in condizioni di carenza di azoto.

Da Yuan *et al.* The Plant Cell 2007.

1.7 ALTRI RUOLI DEI TRASPORTATORI DELL'AMMONIO IN RADICE

Le piante, come precedentemente accennato, a differenza di altri organismi, sono ristrette al loro habitat e questo crea problemi quando le condizioni nutrizionali diventano limitanti. Hanno pertanto evoluto una serie di adattamenti che permettono loro di rispondere alla variabilità dei nutrienti nel mezzo esterno e al conseguente cambiamento del loro status nutrizionale (Marschner, 1995) (vedi paragrafo 1.1).

Come descritto precedentemente, quando l'azoto, che è uno dei nutrienti fondamentali, diventa limitante, le piante alterano la struttura del loro apparato

radicale, aumentandone la superficie di contatto con l'allungamento della radice primaria e la formazione di un maggiore numero di peli radicali attraverso i quali avviene l'assorbimento della maggiore parte dei nutrienti (Marschner *et al.* 1986). Oltre alla risposta indiretta, mediata dal cambiamento dello *status* nutrizionale generale della pianta che determina un cambiamento nella concentrazione di alcuni metaboliti segnale (presumibilmente la glutammina nel caso delle piante in risposta alle diverse condizioni azotate), può esistere un meccanismo più diretto e quindi più veloce ed efficiente che permette alla pianta di rispondere velocemente a tali cambiamenti ambientali. Recentemente, in letteratura sono stati caratterizzati dei trasportatori del nitrato (*AtNTR2;1*) in grado di "sentire" la carenza di nutrienti e trasdurre questo segnale, collegando quindi in maniera diretta la disponibilità dei nutrienti nel mezzo esterno con la risposta fisiologica ed il programma di sviluppo della pianta (Little *et al.* 2005; Remans *et al.* 2006).

I trasportatori dell'ammonio (AMT), quindi oltre ad un ruolo nell'acquisizione dello ione ammonio direttamente dal terreno (vedi paragrafo 1.6), potrebbero avere anche un ruolo nella regolazione della risposta da stress in condizioni di carenza da azoto. La localizzazione ed il profilo di espressione dei geni *AMT* potrebbe essere consistente con tale ipotesi; infatti essi sono espressi in radice e in particolare a livello dei peli radicali e la loro espressione viene altamente indotta in condizioni di carenza di azoto. Gli AMT potrebbero quindi agire anche da sensori della concentrazione dell' NH_4^+ . Questo è di particolare interesse dal momento che l' $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ non è solo la forma primaria dell'assimilazione o riassimilazione dell'azoto, ma rappresenta anche un segnale per la comunicazione cellula-cellula in lievito (Palkova *et al.* 1997). E' infatti noto in letteratura che in risposta alla disponibilità di NH_4^+ nel mezzo di crescita il trasportatore ad alta affinità *Mep2* di *Saccharomyces cerevisiae* genera un segnale in grado di regolare la crescita di ife filamentose. Le pseudo-ife vengono indotte in *S. cerevisiae* in condizioni di carenza di azoto e ciò è determinante per favorire la ricerca di fonti azotate (Lorenz and

Heitman, 1998; Marini *et al.* 1999). Il mutante $\Delta mep2$, pur crescendo su un mezzo a bassa concentrazione di azoto (a causa dell'attività di trasporto degli altri due geni *mep*), perde la capacità di formare le psuedo-ife.

Recentemente funzioni analoghe a quella di *Mep2* sono state associate a trasportatori dell'ammonio di *Heleboma cylindrosporum* e *Tuber borchii* (Yakunin *et al.* 2002; Javelle *et al.* 2003).

1.8 ESPRESSIONE DEI TRASPORTATORI IN FOGLIA E LORO POSSIBILE RUOLO

Ci sono diverse evidenze sperimentali che indicano che il trasporto dell'ammonio è di particolare importanza per la nutrizione e per il metabolismo non solo delle radici ma anche della porzione aerea della pianta. E' importante sottolineare come una parte di azoto viene assorbito direttamente dalle foglie in forma gassosa attraverso le aperture stomatiche (Cowling and Lockyer, 1981; Husted and Schjoerring, 1996).

Inoltre le concentrazioni di ione ammonio nello xilema e nello spazio apoplastico delle foglie arriva a concentrazioni pari a 2 mM anche quando il NO_3^- rappresenta l'unica fonte azotata, fino a concentrazioni di 300 μM in assenza di ammonio (Cramer and Lewis, 1993; Husted and Schjoerring, 1995). Quindi, una parte di azoto trasportato dal terreno di crescita viene traslocato dalle radici alla porzione aerea sotto forma di NH_4^+ , che viene trasportato alle cellule del mesofillo anche contro gradiente di concentrazione (Finnemann and Schjoerring, 1999).

Inoltre basse concentrazioni di CO_2 atmosferico stimolano la fotorespirazione che comporta, come prodotto catabolico, il rilascio di NH_3 da parte dei mitocondri (Ogren, 1984). L'ammoniaca della fotorespirazione viene poi assimilata dalla glutammina sintetasi all'interno del cloroplasto (Wallsgrave *et al.* 1987) e perché questo accada è necessario che l' NH_3 venga trasportata all'interno del cloroplasto

stesso, richiedendo presumibilmente un sistema di trasporto (efflux/influx) attraverso la membrana mitocondriale e plastidica.

Quindi sono diverse le sorgenti di $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ che vengono generate nella foglie. Nella maggior parte di questi casi il trasporto dell' NH_4^+ più che dell' NH_3 dovrebbe essere favorito a causa dei valori di pH acidi nell'apoplasto delle foglie e il trasporto deve essere di tipo attivo dal momento che la concentrazione citoplasmatica dell' $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ è maggiore rispetto a quella apoplastica (Finnemann and Schjoerring, 1999).

Le proteine AMT potrebbero quindi essere implicati ad esempio nell'importo dell'ammonio dal sistema vascolare verso le cellule del mesofillo attraverso la membrana plasmatica, essendo infatti proteine di membrana. Potrebbero inoltre essere coinvolti nel trasporto dell'ammonio derivante dalla fotorespirazione. In accordo con tali ipotesi, i trasportatori dell'ammonio sono espressi anche in foglia e ve ne sono alcuni il cui trascritto è stato riscontrato solo nella porzione aerea delle piante. In *Lycopersicon esculentum*, ad esempio, il gene *LeAMT1;3*, è unicamente espresso nelle foglie (Von Wirèn *et al.* 2000). Tale trasportatore ha una più bassa omologia con gli altri geni della famiglia AMT1, presenta, infatti, una identità di sequenza < 63% e possiede una sequenza NH_2 -terminale molto corta, costituita da 14 amminoacidi, contro i 35-54 degli altri membri AMT1. Le sue peculiari caratteristiche fanno presupporre per questo un ruolo diverso nel metabolismo dell'azoto. La sua espressione è soggetta al ciclo giorno/notte ed è bassa durante il periodo di luce ma aumenta al buio; in presenza di elevate concentrazioni di CO_2 il suo trascritto diminuisce, suggerendo il coinvolgimento di *LeAMT1;3* nel trasporto o nel recupero dell' NH_3 , perso dai mitocondri e che viene riprotonato nel citoplasma o nell'apoplasto delle foglie (von Wirèn *et al.* 2000).

Altre proteine, AMT2, con caratteristiche biochimiche diverse dalle AMT1 (vedi par. 1.11), sono state isolate e queste presentano più alti livelli di espressione nelle foglie. Questo è il caso di AtAMT2 in *Arabidopsis* (Sohlenkamp *et al.* 2000) e

LjAMT2;1 in *Lotus japonicus*. Per entrambe le proteine è stata dimostrata, tramite fusioni con la GFP, la localizzazione sulla membrana plasmatica. Anche per queste proteine è stato ipotizzato un ruolo nel recupero dell'ammonio della fotorespirazione perso nello spazio apoplastico (Ulrike *et al.* 2003). Tale ruolo è infatti in perfetto accordo con le caratteristiche di trasportatori ad alta affinità.

1.9 REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE

Un efficiente trasporto dell'ammonio è critico per una crescita ottimale e un corretto sviluppo della pianta; tale processo è quindi fortemente coordinato e deve essere finemente regolato. Un controllo stretto del trasporto dell'ammonio infatti non è solo essenziale per mantenere il bilancio cationi-anioni (Bloom *et al.* 1993; Marschner, 1995) ma anche per regolare il livello di fito-ormoni coinvolti nello sviluppo delle foglie (Walch-Liu *et al.* 2000; Rahayuy *et al.* 2005) e per prevenire un eccessivo accumulo dell'ammonio che altrimenti provocherebbe una depolarizzazione della membrana e danni cellulari (Britto and Kronzucker, 2002).

Questo spiega la presenza di un alto numero di trasportatori dell'ammonio all'interno di una pianta, basti pensare ai sei geni isolati per *Arabidopsis thaliana*, i tre di *Lycopersicon esculentum* e i sei di *Oryza sativa*. Questa potenziale molteplicità di funzione si accorda bene con la notevole variabilità di espressione dei vari membri che sono soggetti a meccanismi diversi di regolazione.

I trasportatori dell'ammonio sono preferenzialmente espressi in radice. A livello trascrizionale l'espressione di *AtAMT1;1*, che in *Arabidopsis* è il trasportatore maggiormente espresso e che presenta una più alta affinità per l'ammonio, è repressa da alte concentrazioni di azoto (5mM NH_4NO_3) e indotta in condizioni di carenza di azoto (Gazzarrini *et al.* 1999; Rawat *et al.* 1999; Von Wirèn *et al.* 2000). L'induzione della trascrizione è però transiente, l'espressione infatti, torna ai livelli basali dopo un periodo variabile di ore o giorni in base alle condizioni sperimentali in cui le

piante vengono mantenute. In realtà questo tipo di regolazione, dettata dalla concentrazione dell'azoto nel mezzo, non è di tipo sistemico ma locale. Gansel e collaboratori nel 2001 hanno infatti dimostrato che piante, il cui sistema radicale era stato diviso in due, con una porzione in alto azoto e l'altra in carenza di azoto, mostravano induzione di *AtAMT1;1* nella sola radice che era in condizioni di carenza di azoto.

Più recentemente è stata fatta un'analisi più dettagliata dell'espressione di *AtAMT1;1* in radici carenti di azoto. L'induzione dell'espressione all'inizio avviene infatti nei peli radicali e successivamente nelle radici secondarie e in quella primaria con il permanere della condizione di carenza di azoto e questa espressione è associata ai cambiamenti che avvengono a livello dell'architettura dell'apparato radicale. E' inoltre interessante notare che vi è una diversa regolazione della trascrizione dello stesso gene a livello della porzione aerea della pianta. In carenza di azoto, infatti, nelle foglie i livelli di trascrizione del gene si abbassano mentre invece vengono indotti quando al mezzo viene aggiunto azoto (Engineer and Kranz, 2007).

L'induzione dell'espressione, dovuta a carenza di azoto, è stata dimostrata anche in radici di pomodoro per il gene *LeAMT1;1* (Lauter *et al.* 1996; von Wirèn *et al.* 2000) e in riso per *OsAMT1;1* (Kumar *et al.* 2003). Al contrario, invece, in radice la trascrizione di *LeAMT1;2* in *Lycopersicon* e *OsAMT1;2* in *Oryza* è indotta in presenza di alte concentrazioni di ammonio nel mezzo.

Oltre all'ammonio anche il nitrato ha un effetto sull'espressione dei trasportatori e in particolare 1mM KNO₃ aggiunto al mezzo reprime l'espressione di *AtAMT1;1* (Gansel *et al.* 2001) e 5 mM KNO₃ inibisce invece la trascrizione di *LeAMT1;1* (Lauter *et al.* 1996).

La trascrizione dei trasportatori dell'ammonio dipende inoltre dal ciclo giorno/notte. In *Arabidopsis* è stato osservato, in particolare per il gene *AtAMT1;3*, un aumento dell'espressione con l'aumentare del periodo di luce fino al raggiungimento del picco di espressione alla fine di questo e un abbassamento dei livelli trascrizionali

al buio (Gazzarrini *et al.* 1999). Ulteriori studi hanno successivamente dimostrato che tale regolazione in *Arabidopsis* come in pomodoro è legata al diverso apporto di fotosintato disponibile durante le varie fasi di luce e buio ed infatti l'aggiunta di saccarosio nel mezzo di crescita previene la down-regolazione osservata al buio. A conferma di questo, altri zuccheri, quali il malato o il glutarato non sono in grado di influenzare l'espressione di questi geni (Hsieh *et al.* 1998).

Variazioni diurne sono state osservate anche in pomodoro, in particolare una maggiore espressione viene registrata nelle foglie per *LeAMT1;2* alla fine del periodo di luce. Quest'ultimo profilo di espressione è diverso da quello osservato per *LeAMT1;3*, maggiormente espresso nelle foglie, con una bassa espressione alla luce ed un'induzione del trascritto al buio. Questo, ancora una volta, suggerisce ruoli fisiologici diversi per i trasportatori dell'ammonio, probabilmente *LeAMT1;3* e il trasporto mediato da questo è richiesto anche in processi metabolici che non sono direttamente collegati all'assimilazione dell'ammonio in glutammina all'interno dei cloroplasti ma potrebbe, ad esempio, avere una funzione di riassimilazione dell'ammonio perso nello spazio apoplastico durante le reazioni di transaminazione (Lam *et al.* 1998; von Wirèn *et al.* 2000).

1.10 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE

Nei batteri enterici è stato da tempo identificato un sistema di regolazione da azoto (NTR) composto da 4 proteine: il complesso uridilil transferasi/deuridililasi (Utase/UR) codificato dal gene *glnD*, la proteina PII codificata dal gene *glnB*, la proteina (istidina) chinasi NtrB e l'attivatore trascrizionale NtrC. In condizioni di carenza di azoto, la proteina PII, che funge da sensore, viene uridililata da parte dell'uridililasi GlnD e quindi trasferisce questa informazione alla chinasi NtrB che fosforila l'attivatore trascrizionale NtrC, consentendo l'attivazione della trascrizione dei geni implicati nell'acquisizione e utilizzo dell'azoto, incluso *amtB*. Questo però,

oltre che a livello trascrizionale, è soggetto anche ad una regolazione post-trascrizionale come evidenziato da diversi studi effettuati in *Escherichia coli*.

Il gene *amtB* è all'interno di un operone insieme al gene *glnK*, che codifica per una proteina appartenente alla famiglia PII i cui membri sono coinvolti nella catena di eventi che permette la trasduzione del segnale “concentrazione di azoto” nei procarioti. Il risultato finale di questa cascata di reazioni è la regolazione dell'attività enzimatica e dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo dell'azoto (Arcondèguy *et al.* 2001). Esiste un'interazione fisica tra le proteine AmtB/GlnK che regola il trasporto dell'ammonio da parte di AmtB in base alla concentrazione di azoto (Dandekar *et al.* 1998). GlnK è infatti in grado di rispondere alle differenti concentrazioni di azoto, e in particolare di glutammina; il cambiamento dello stato azotato si traduce in modifiche covalenti di GlnK (uridililazione/deuridililazione) a carico di una Tyrosina (Tyr51), altamente conservata nella regione carbossi-terminale a livello del T loop che le permettono o meno di interagire con AmtB a livello della membrana plasmatica.

In condizioni di basso azoto GlnK è uridililato e non è fortemente associata alla membrana. AmtB è così libero di trasportare efficientemente l'ammonio dal mezzo circostante all'interno della cellula. Quando la concentrazione di azoto nella cellula aumenta, GlnK viene rapidamente de-uridililata e, in questa forma, la proteina si associa fortemente alla proteina AmtB sulla membrana plasmatica. In seguito a tale associazione si ha una riduzione dell'attività di trasporto di AmtB e l'ammonio non può essere trasportato attivamente all'interno della cellula (Merrik *et al.* 2004). Questo meccanismo consente una risposta cellulare, in condizioni di alto azoto, quando il batterio non ha bisogno di trasportare al suo interno altro ammonio e quindi blocca immediatamente l'attività del trasportatore specifico localizzato sulla membrana. Questo processo è reversibile, ma quando la concentrazione di azoto resta alta, anche la trascrizione di *amtB* cessa grazie alla defosforilazione dell'attivatore trascrizionale NtrC.

La regione C-terminale di AmtB in *E. coli* sembra essere il sito preferenziale di interazione con GlnK anche se mutazioni in questa regione non aboliscono il trasporto dell'ammonio ma lo riducono fortemente. Questa regione potrebbe quindi avere una funzione regolatoria tanto è vero che essa risulta altamente conservata nei batteri. Meccanismi simili di regolazione sono stati anche identificati in altri procarioti quali *Azoarcus* (Martin e Reinhold-Hurek 2002) e *Klebsiella pneumoniae* (Klopprogge *et al.* 2002).

Studi cristallografici hanno evidenziato come i trasportatori dell'ammonio siano in grado di oligomerizzare e in particolare si è visto che il trasportatore di *E. coli*, AmtB, si presenta sotto forma di un omotrimerico in cui ogni subunità forma un poro funzionale (vedi Par. 1.3); l'oligomerizzazione è dovuta a effetti idrofobici che comportano l'associazione con il doppio strato lipidico della membrana.

I primi suggerimenti sulla presenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionali dei trasportatori dell'ammonio di pianta sono legati ad esperimenti condotti da Rawat *et al.* (1999). In seguito al trasferimento di colture idroponiche di *A. thaliana* da mezzi con carenza di azoto a mezzi con eccesso di azoto, il declino della capacità di trasporto dell' $^{13}\text{NH}_4^+$ anticipava quello del messaggero di *AtAMT1;1*, suggerendo quindi un meccanismo di regolazione dell'attività di trasporto associato a quello di regolazione trascrizionale.

L'oligomerizzazione delle proteine AMT1 è stata successivamente dimostrata in tutti gli organismi in cui queste sono presenti, incluse le piante (Ludewig *et al.* 2003; Coutts *et al.* 2002; Conroy *et al.* 2004). Studi condotti in lievito e in pianta avevano suggerito un'interazione tra i monomeri, la mutazione Gly413Asp all'estremità C-terminale (CCT) inattiva il trasportatore MEP1 e comporta una soppressione epistatica di MEP3 quando questi sono co-espresi (Marini *et al.* 2000). Allo stesso modo mutanti equivalenti di *A. thaliana* (Gly456Asp) e *L. esculentum* risultavano non funzionali e inattivavano in trans i trasportatori wild type. La stabilità, però, di AMT1;1 sembra non esserne affetta e questo suggerisce l'ipotesi

seconda la quale ci sia una trans-attivazione allosterica tra i monomeri dei trasportatori. I 24-30 amminoacidi del CCT così come il loop intracellulare associato sono altamente conservati in batteri, piante e funghi. Nel caso di *AtAMT1;1*, mutanti che presentano una forma tronca con una delezione a monte della Tyr469 hanno una completa perdita di funzione; una forma con una delezione maggiore comporta una trans-inattivazione della forma wild type di *AtAMT1;1*. Allo stesso modo inserzioni nel CCT aboliscono l'attività di trasporto così come inserzioni nei loops L3-L4 e L5-L6 sono in grado di bloccare l'attività di trasporto.

Studi più approfonditi sul cristallo del trasportatore di *Archeoglobus fulgidus* suggeriscono un ruolo critico per la Tyr469; questa sembra infatti interagire direttamente con i loops adiacenti L5-L6, mentre la Tyr467 (CCT) sembra formi un legame idrogeno con l'His239 (L5-L6). Mutazioni in questi siti, infatti, comportano una trans-inattivazione dei trasportatori. Questo tipo di interazioni potrebbero comportare cambiamenti conformazionali in maniera tale che il CCT possa modulare la posizione del poro del trasportatore e quindi controllare l'accesso dell'ammonio (Loquè *et al.* 2007).

Esiste un'ulteriore regolazione che potrebbe avvenire a livello post-trascrizionale sempre nel CCT. Questo infatti presenta tre siti potenziali di fosforilazione, rappresentati da residui, altamente conservati, di Ser/Thr. Mutazioni nella Ser449 inibiscono l'attività di trasporto mentre questo non accade quando le mutazioni sono a carico della Ser450. Inoltre, anche mutazioni a livello della Thr460 riducono l'attività di trasporto. Gli esperimenti comunque sembrano suggerire che la fosforilazione in questi siti in uno qualsiasi dei tre monomeri, sia un segnale di trans-regolazione per le altre due subunità del trasportatore e rappresenta, dunque, un esempio di regolazione del trasporto di tipo cooperativo (Loquè *et al.* 2007).

1.11 I TRASPORTATORI DELL'AMMONIO IN LEGUMINOSA

I trasportatori dell'ammonio AMT1 sono stati isolati anche nella leguminosa modello *Lotus japonicus* ed i tre membri identificati sono stati denominati: *LjAMT1;1*, *1;2* e *1;3* (D'Apuzzo *et al.* 2004). L'evidenza che le proteine da questi codificate siano effettivamente implicate nel trasporto dell'ammonio, viene da tests di complementazione in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*, triplo mutante ($\Delta mep1,2,3$), difettivo nel trasporto dell'ammonio e incapace di crescere su un mezzo minimo, contenente concentrazioni inferiori a 5 mM NH_4NO_3 (D'Apuzzo *et al.* 2004)).

I trasportatori isolati sono proteine ad alta affinità per il proprio ligando, che lavorano a basse concentrazioni di ammonio dell'ordine delle μM ; l'analisi della loro struttura mostra un'elevata identità amminoacidica tra di loro, pari al 70 , oltre ad una forte identità con i trasportatori delle altre piante così da farli ascrivere alla superfamiglia AMT1.

Più recentemente è stato isolato un quarto gene, *LjAMT2;1* (Ulrike Simon-Rosin *et al.* 2003), che codifica per una proteina, anch'essa deputata al trasporto dell'ammonio, ma con meno del 25% di identità con gli altri trasportatori. Essa infatti è molto più simile ai trasportatori batterici di *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* e, insieme ad altri trasportatori isolati in *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, costituisce la famiglia AMT2.

L'isolamento dei trasportatori dell'ammonio e lo studio della loro regolazione e caratteristiche in piante leguminose è molto importante e offre un valore aggiuntivo agli studi condotti su altre piante; le leguminose, infatti, hanno una fonte azotata in più, dovuta all'interazione simbiotico/mutualistica che queste sono in grado di stabilire, in condizioni di carenza di azoto, con batteri azoto-fissatori, appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*. La risultante di tale interazione è la formazione di un nuovo organo, il nodulo, all'interno del quale i batteri si differenziano in batteroidi

e acquisiscono la capacità di fissare l' N_2 atmosferico, attraverso la nitrogenasi. Tali studi permettono quindi di definire l'espressione e la regolazione dei geni dei trasportatori dell'ammonio anche in relazione all'organogenesi del nodulo oltre che alle varie fasi dell'interazione simbiotica.

1.12 SIMBIOSI PIANTA-BATTERIO E FORMAZIONE DEL NODULO

L'interazione simbiotica è un processo che avviene attraverso lo scambio di complessi messaggi tra i due organismi coinvolti che comportano cambiamenti strutturali e fisiologici e variazione nell'espressione genica di entrambi (Verma and Long, 1993; De Bruij and Downie, 1991).

Quando sono soggette a stress di tipo abiotico, quale ad esempio la carenza di azoto nel suolo, le piante leguminose, rilasciano attraverso le radici composti fenolici, i flavonoidi. Questi, una volta rilasciati nel suolo, vengono riconosciuti da batteri del genere *Rhizobium*, attraverso la proteina NodD che è un attivatore trascrizionale; questa, una volta attivata, si lega ai promotori dei cosiddetti geni *nod* del batterio, attivandoli. L'operone dei geni *nod* contiene geni comuni: *nodA*, *nodB* e *nodC*, e geni ospite specifici come *nodP* e *nodQ*. Avviene così la sintesi dei fattori Nod, fondamentali per l'organogenesi del nodulo e nella determinazione della specificità d'ospite. I fattori Nod sono lipochito-oligosaccaridi, costituiti da uno scheletro carbonioso a cui sono legati 4 o 5 residui di β 1-4 N-acetil-glucosammina con una lunga catena acilica legata alla glucosammina terminale. In particolare il numero di residui di glucosammina, la lunghezza delle catene di acidi grassi saturi legati all'estremità non riducente della catena di zuccheri e il tipo di sostituente legato all'altra estremità (gruppo solfatilico, metilico, fucosilico, arabinosilico ecc.), determinano la specificità d'ospite.

Una volta sintetizzati i fattori Nod, vengono percepiti dalla pianta grazie a specifici recettori, presenti sulle cellule vegetali, sono infatti attivi già a

concentrazioni molto basse, dell'ordine di 10^{-12} M (Spaink *et al.* 1991). Una volta recepiti, in pianta inducono tutta una serie di cambiamenti morfologici e citologici oltre alla trascrizione di specifici geni vegetali, necessari perché la simbiosi vada a buon fine. Le leguminose, hanno infatti evoluto una classe di geni che vengono indotti in presenza di *Rhizobium*, le noduline, (van Krammer, 1984; Lagocki and Verma, 1980) che vengono espresse in maniera diversa durante lo sviluppo del nodulo: le noduline precoci sono coinvolte nel processo di infezione e nell'organogenesi del nodulo, le noduline tardive sono coinvolte nella fissazione dell'azoto e negli scambi tra i simbionti (Nap and Bisseling, 1990).

Recentemente, l'utilizzazione di fluorofori regolati da particolari segnali cellulari quali il calcio e studi di elettrofisiologia hanno consentito di identificare molti dei segnali che vengono indotti nel citoplasma dei peli radicali a partire da pochi secondi dopo l'aggiunta di fattori Nod e quindi di definire un preciso pathway molecolare di trasduzione di questo segnale associato ad una cascata di eventi che si susseguono temporalmente. Inizialmente, viene indotta una depolarizzazione transiente della membrana, che è il risultato di un influsso di ioni calcio a partire dal mezzo esterno. Questo influsso di Ca^{2+} è immediatamente seguito da un efflusso di Cl^- e K^+ con conseguente alcalinizzazione del citoplasma. Successivamente, a distanza di pochi minuti, vengono indotte oscillazioni nelle concentrazioni citosoliche del calcio, nelle vicinanze del nucleo del pelo radicale, fenomeno noto come *Ca²⁺ spiking*. Solo a distanza di almeno tre ore avviene il riarrangiamento citoscheletrico con conseguente deformazione del pelo nella zona radicale di competenza.

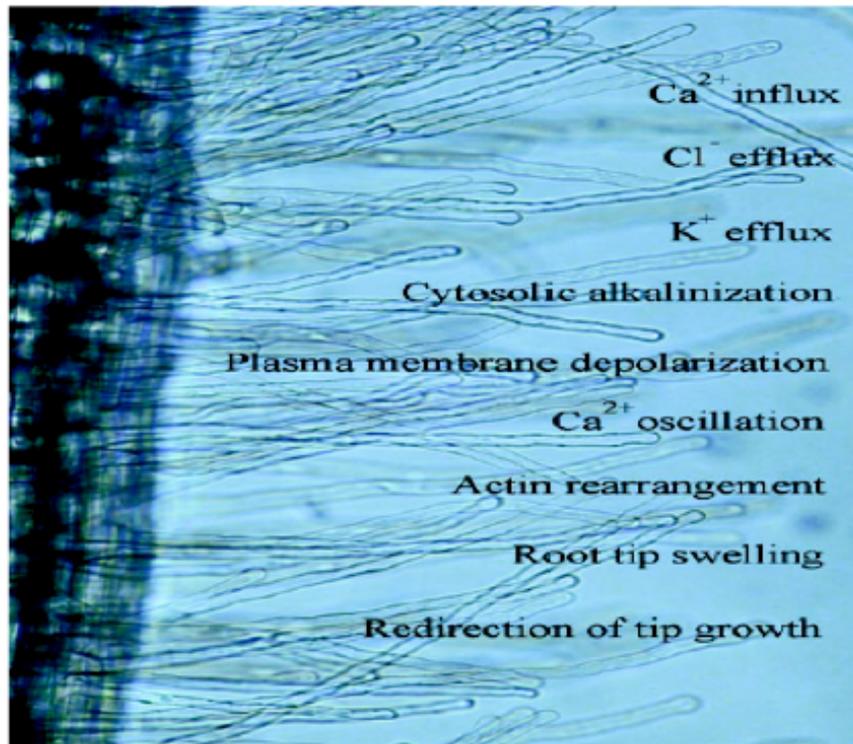


Figura 8. Eventi precoci dell'interazione simbiotica.

Questi eventi avvengono nel citoplasma dei peli radicali della regione competente della radice in seguito al rilascio dei fattori Nod da parte di *Rhizobium*.

La deformazione del pelo (fenotipo Had, hair deformation) avviene per un processo di re-inizio di crescita a livello della punta del pelo radicale. Questa avviene a circa tre ore dall'infezione e tale fenotipo si osserva anche in assenza del batterio, inoculando la pianta con fattori *nod* purificati.

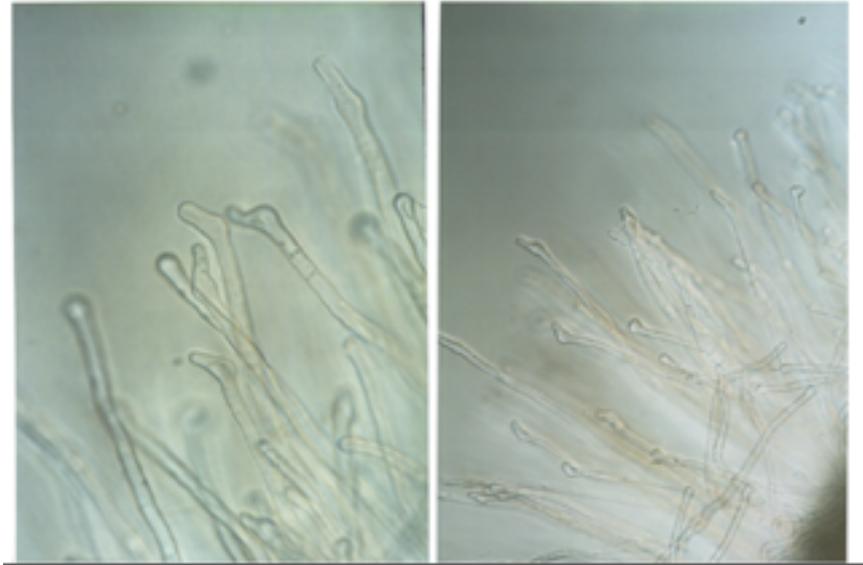


Figura 9. Deformazione dei peli radicali.

Immagini al microscopio ottico della deformazione dei peli radicali *in vivo* indotta dall'aggiunta di *Rhizobium* o dei fattori Nod purificati. Da Barbulova *et al.* Mol. Plant Micr. Inter. 2007.

Alla deformazione fa seguito l'arricciamento (fenotipo Hac, hair curling) in cui i batteri vengono intrappolati all'interno del pelo e idrolizzano la parete vegetale di questo. Successivamente si ha la formazione del cosiddetto tubo di infezione tramite deposizione di parete vegetale intorno ai batteri; tale filamento di infezione si allunga e ramifica fino a raggiungere le cellule della corteccia che nel frattempo si dedifferenziano (Spaino *et al.* 1991; Truchet *et al.* 1991; Relic *et al.* 1993) e iniziano a dividersi per formare il primordio del nodulo (Hirsch, 1992; Mylona *et al.* 1995). All'interno del tubo i batteri si dividono e raggiungono quindi le cellule vegetali, invadendole.

Nelle cellule corticali, per endocitosi, i batteri vengono avvolti da una membrana di origine vegetale, denominata membrana peri-batteroidale a formare il simbiosoma all'interno del quale smettono di dividersi, si differenziano in batteroidi e acquisiscono la capacità di fissare l'azoto atmosferico (Nap e Bisseling, 1989).

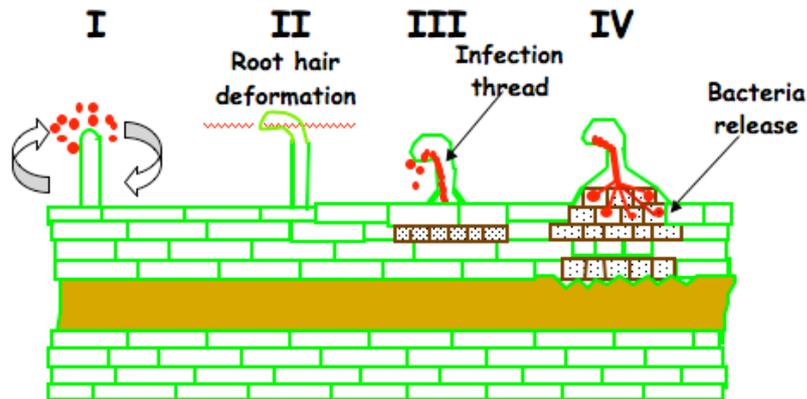


Figura 10. Schema della successione di alcune delle prime fasi dell'interazione simbiotica.

I, Scambio di segnali fra i due partners (flavonoidi/fattori Nod); II, deformazione dei peli radicali; III, arricciamento dei peli radicali, intrappolamento dei batteri, formazione e allungamento del canale di infezione, e divisione delle cellule corticali radicali; IV, ramificazione del tubo di infezione, invasione e rilascio dei batteri.

C'è da sottolineare che la risposta della pianta è limitata ad una regione specifica, la regione di allungamento dei peli radicali della radice e in particolare la regione in cui sono presenti i peli radicali che stanno concludendo il loro programma di allungamento.

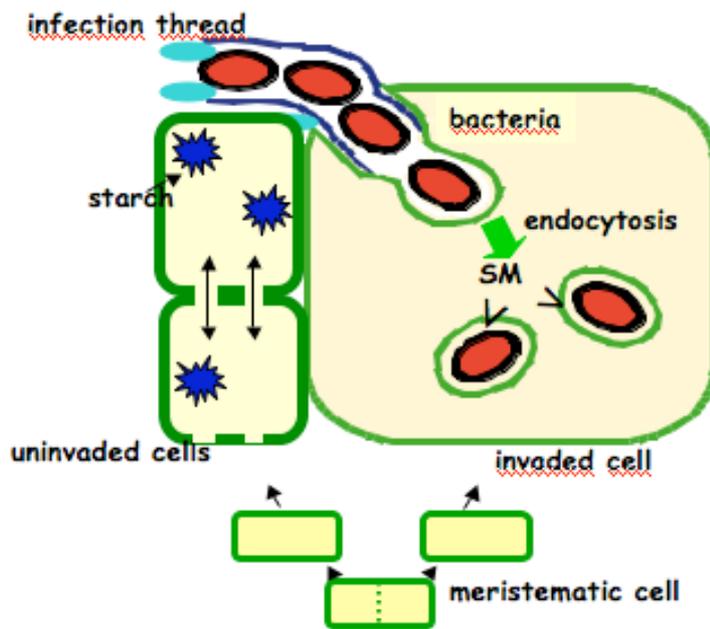


Figura 11 Rilascio dei batteri per endocitosi nelle cellule del primordio

Le cellule del primordio si formano in seguito ad induzione dell'attività mitotica delle cellule corticali; in queste vengono rilasciati i batteri tramite un processo di endocitosi. Le cellule invase, sono circondate da cellule non invase riconoscibili dall'accumulo di amido.

1.13 NODULO E SUA STRUTTURA

Il nodulo, che si forma per divisione delle cellule corticali, è un organo vascolarizzato e molto complesso. Le piante leguminose sono in grado di formarne due tipi distinti sulla base della morfologia e della struttura: noduli indeterminati, come nel caso di *Vicia*, *Pisum sativum*, e noduli determinati, come nel caso di *Soybean* e *Lotus japonicus*.

Il primo tipo è caratteristico delle leguminose da climi temperati, ha una forma allungata ed è caratterizzato dalla persistenza di un meristema apicale, che deposita nuove cellule differenziate all'estremità distale. In una sezione di nodulo allungato sono osservabili tutti gli stadi di sviluppo a partire dalla regione distale fino alla base del nodulo.

I noduli determinati o globosi sono tipici di leguminose tropicali. La crescita comincia dalla divisione delle cellule corticali della radice nel cortex esterno ma da un certo momento in poi, questa è determinata da un aumento di volume più che da una reale crescita mitotica; la divisione delle cellule corticali, infatti, si arresta precocemente durante lo sviluppo del nodulo (Stougaard *et al.* 2003). All'interno del nodulo si possono chiaramente distinguere un tessuto centrale ed uno periferico. Il tessuto centrale è costituito da cellule invase e non. Il tessuto periferico, invece, è costituito da cellule non invase che formano il parenchima del nodulo, costituito da cortex interno ed esterno separati dal singolo strato cellulare dell'endoderma (Van de Wiel *et al.* 1990; Frassen *et al.* 1992). In particolare il cortex interno avvolge le strutture vascolari del nodulo.

Generalmente il numero di noduli nelle piante wild type è geneticamente controllato mediante un meccanismo di "autoregolazione", il processo di nodulazione è infatti energeticamente molto dispendioso (è stato calcolato che circa il 20% del fotosintato viene allocato al nodulo per permettere lo svolgimento della fissazione dell'azoto da parte del batterio) così da rendere necessario uno stretto controllo di questo da parte della pianta; un'eccessiva nodulazione danneggerebbe la pianta, interferendo con la distribuzione dei nutrienti.

In *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* sono stati isolati mutanti non più dotati del processo di autoregolazione, che presentano infatti un fenotipo iper-nodulante oltre ad un maggiore numero di radici laterali. In *Lotus* il gene mutato, responsabile di tale fenotipo, è *HAR-1*, ortologo del gene *clavata-1* di *Arabidopsis*, *GmNARK* (*Glycine max*) *PSSym29* (*Pisum sativum* Symbiosis29) e *Medicago truncatula* *MtSUNN*. Esperimenti di "grafting" tra porzione aerea mutata e radici wild type hanno evidenziato come questo tipo di controllo sia mediato dalla porzione aerea della pianta. I suddetti geni codificano per recettori di membrana serina/treonina kinasi e l'alterazione nei mutanti si presenta a

livello del dominio chinasi, evidenziando come la fosforilazione sia essenziale per trasdurre il segnale all'interno della cellula (Krussel *et al.* 2002).

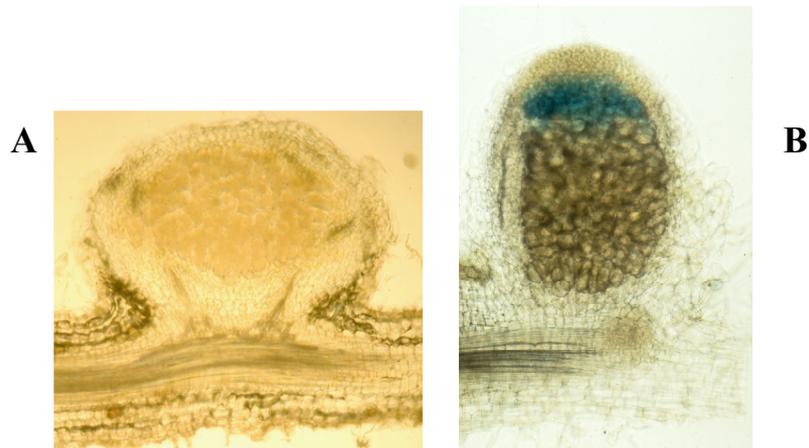


Figura 12. Sezioni longitudinali al vibratomo di noduli.

A, nodulo determinato **B**, nodulo indeterminato.

Da Patriarca *et al.*, Mol. Plant Micr. Inter. 2002.

1.14 CAMBIAMENTI FISILOGICI A CARICO DEI BATTERI DURANTE LA SIMBIOSI

Come accennato nel paragrafo precedente, i batteri si differenziano in batteroidi all'interno delle cellule vegetali del primordio del nodulo ed in questa forma non assimilano l'azoto, bensì lo fissano. Il metabolismo del batterio infatti passa da una forma di tipo assimilativo ad una di tipo fissativo ed in accordo con ciò, il trasportatore batterico *amtB* in questa fase non è espresso (Tatè *et al.*, 1998). In compenso si attivano i geni *nifH* che codificano per le subunità del complesso enzimatico della *nitrogenasi*, grazie alla quale l' N_2 atmosferico viene fissato.

La *nitrogenasi* è costituita da una ferro-proteina, un dimerico formato da due subunità identiche che contiene due siti di legame per l'ATP, e la ferro-molibdeno-

proteina, un tetramero. Nel processo di fissazione dell'azoto il NADH, donatore primario di elettroni, li trasferisce alla ferredossina, che così ridotta, a sua volta, li trasferisce alla ferroproteina della nitrogenasi. La ferroproteina quindi si lega all'ATP, che ne fa aumentare il potere riducente e rende possibile il trasferimento degli elettroni alla ferro molibdeno proteina. L'ATP viene idrolizzata in ADP-Pi quando la ferro-proteina è ossidata, e la proteina ferro-molibdeno a questo punto trasferisce gli elettroni all'azoto atmosferico che così si lega alla proteina. Perché questo possa avvenire, però, è necessario che le concentrazioni di O₂ nelle cellule invase siano basse, questo è possibile non solo perché la struttura del nodulo è tale da "proteggere" i batteri nel suo interno, creando un micro-ambiente a bassa pressione di ossigeno intorno a questi, ma è anche garantito dalla presenza della proteina vegetale Leghemoglobina, una nodulina tardiva, in grado di legare a sé l'ossigeno.

1.15 POSSIBILE RUOLO DEI TRASPORTATORI DURANTE IL PROCESSO DI SIMBIOSI

L'ammonio, oltre ad essere il principale prodotto della simbiosi, è anche una molecola in grado di influenzare la simbiosi stessa in diverse fasi. Già a partire dalle primissime fasi le fonti azotate hanno una regolazione di tipo negativo sull'interazione simbiotica. E' noto che, condizione essenziale perché l'interazione pianta-batterio abbia luogo, è la carenza di azoto nel mezzo esterno. Solo in queste condizioni la pianta sintetizza e secerne i composti fenolici che fungono da molecole chemio-attrattive per i batteri che sono, infatti in grado di percepirli. L'ammonio del mezzo esterno ha inoltre una funzione regolativa negativa anche direttamente sul partner batterico, inibendo, quando presente in elevate concentrazioni, la sintesi dei fattori nod, essenziali nelle prime fasi di interazione (Charrier *et al.* 1995; Coutts *et al.* 2002). In particolare inibisce la trascrizione dell'attivatore trascrizionale batterico *NodD* (Dusha and Kondorosi, 1993; Mendoza *et al.* 1995; Wang and Stacey, 1990).

L'aggiunta di fonti combinate di azoto, inoltre, regola negativamente la formazione di noduli. Esperimenti condotti su piante di *Medicago sativa* e *Pisum sativum* hanno dimostrato che, quando aggiunte al mezzo a tempi diversi dopo la fase iniziale di interazione, arrestano la crescita dei noduli indeterminati con una crescita ectopica dell'endoderme intorno al meristema apicale che viene così inattivato (Trouchet and Dazzo, 1982). Recentemente l'effetto di differenti fonti combinate di azoto sulle fasi molto precoci dell'interazione simbiotica sono stati caratterizzati (Barbulova et al. 2007).

La cosa interessante da notare è che non solo l'ammonio aggiunto dall'esterno ma anche quello prodotto dalla fissazione ad opera dei batteri endo-simbionti ha una funzione regolatrice. L'ammonio prodotto internamente alla pianta sembra infatti avere un ruolo chiave nel processo di organogenesi del nodulo. Ceppi mutati di *Sinorhizobium meliloti* in uno dei geni strutturali della nitrogenasi, *nifHDK*, che pertanto sono incapaci di fissare l'azoto, portano alla formazione di noduli abortivi che si arrestano precocemente durante lo sviluppo (Vasse et al. 1990; Arcondèguy et al. 1997).

Al contrario, nei noduli determinati questo non avviene ed il mutante *nifH* non mostra difetti nello sviluppo dei noduli (Patriarca et al. 2002).

L'ammonio che deriva dal processo simbiotico agisce inoltre anche da segnale che regola il numero di noduli. Questo in seguito ad infezione con un ceppo wild type di *Rhizobium* è geneticamente determinato dall'ospite attraverso il meccanismo di autoregolazione che permette di raggiungere quella soglia di azoto fissato che consentirà di soddisfare il fabbisogno azotato della pianta. Tale processo è direttamente correlato alla quantità di azoto fissato poiché, quando la pianta viene infettata con un ceppo Fix⁻, il numero di noduli prodotti è di gran lunga superiore a quello che si ottiene con un ceppo infettante wild type (Patriarca et al. 2002).

Dal momento, che l'ammonio, prodotto durante il processo di simbiosi, oltre ad avere un ruolo chiave in qualità di prodotto finale della dispendiosa interazione

simbiotica, riveste anche una funzione di regolazione durante le varie fasi dell'infezione e dell'organogenesi del nodulo stesso, è probabile che i trasportatori dell'ammonio possano essere implicati in tali processi.

Le proteine AMT potrebbero essere implicate nelle primissime fasi dell'interazione, quando *Rhizobium* interagisce con i tessuti radicali contribuendo alla percezione del segnale carenza di azoto nel mezzo esterno, che come detto precedentemente rappresenta un pre-requisito per lo svolgimento dell'interazione. Tale ruolo di "sensing" potrebbe inoltre essere svolto anche durante le prime fasi della simbiosi, quando il nodulo è ancora in via di sviluppo. Gli esperimenti condotti sul mutante *nifHDK* di *Sinorhizobium meliloti* (Vasse *et al.* 1990; Arcondèguy *et al.* 1997) sembrano infatti suggerire che l'ammonio rilasciato dal simbiosoma, possa da un certo momento in poi rappresentare un importante segnale per il completamento dello sviluppo e quindi le proteine AMT della pianta potrebbero essere coinvolte nella percezione di questo segnale, in questo caso positivo, determinando una sorta di check point che possa controllare l'ulteriore sviluppo nodulare. Gli esperimenti di Becher e collaboratori del 2001 su *Lycopersicon esculentum* hanno dimostrato che l'ammonio, prodotto dai batteri free-living azoto-fissatori, rappresenta un segnale importante nell'interazione tra questi (*Azospirillum brasilense*) e le radici di pomodoro. Le piante cresciute in carenza di azoto e inoculate con *A. brasilense* mostrano un'induzione del gene *LeAMT1;2*. L'inoculo delle stesse piante con il ceppo mutato, *nifDK*, incapace di fissare l'azoto atmosferico, non determina questa induzione. L'ammonio prodotto dalla fissazione dell'azoto atmosferico quindi, è in concentrazioni tali ($2-5 \mu\text{M NH}_4^+$) da potere essere avvertito dalle radici di pomodoro e fungere da segnale in grado di controllare l'espressione di *LeAMT1;2*. La presenza di un tale meccanismo nell'interazione fra radici di pomodoro e batteri free-living azoto fissatori, rende plausibile l'esistenza di analoghi meccanismi attivi nel corso dell'interazione endosimbiotica fra leguminose e *Rhizobi*.

I trasportatori in una leguminosa potrebbero inoltre essere implicati nel trasporto dell'ammonio, prodotto dalla fissazione, dal simbiosoma attraverso la membrana peri-batteroidale al citoplasma delle cellule infette. I trasportatori sono infatti proteine trans-membrana e, come tali, potrebbero essere presenti sulla membrana peri-batteroidale. Tale ipotesi è tuttavia indebolita dal fatto che le concentrazioni di ammonio all'interno dei simbiosomi sono elevatissime e non compatibili con le costanti di affinità delle proteine AMT.

Un ruolo importante nel processo di organogenesi del nodulo e/o nel suo funzionamento è comunque suggerito da esperimenti condotti in *Lotus japonicus* in cui è stata osservata l'espressione di due dei tre trasportatori AMT1 (*LjAMT1;1* e *LjAMT1;2*) all'interno del nodulo. In particolare per *LjAMT1;1* è stata osservata, tramite fusione della regione regolatrice 5' con il gene *gusA*, l'espressione nella regione centrale del nodulo e in particolare a livello delle cellule invase (D'Apuzzo *et al.* 2004).

Ulteriori analisi sono successivamente state effettuate sempre su noduli transgenici contenenti la fusione *LjAMT1;1-gusA*. L'espressione del gene è infatti stata seguita nel tempo a vari giorni di distanza dall'infezione con *M. loti*. I risultati mostrano una chiara regolazione nel tempo e nello spazio di *LjAMT1;1* la cui espressione è ancora assente quando, a 10 giorni dall'infezione, il nodulo è in via di formazione. La sua espressione comincia a comparire solo a tempi un pò più tardivi quando è possibile osservarla a livello del cilindro vascolare. Ma è solo quando il nodulo è ormai maturo che l'espressione appare anche a livello delle cellule infette per poi scomparire gradualmente, prima dalla zona centrale e poi dallo stesso cilindro vascolare fino a quando, nel nodulo maturo, non si osserva più alcuna espressione. Questi dati indicano quindi una precisa correlazione fra il profilo di espressione spaziale di *LjAMT1;1* e lo sviluppo del nodulo e potrebbero suggerire un suo ruolo nel programma di sviluppo di quest'ultimo (D'Apuzzo: dati non pubblicati).

1.16 CORRELAZIONE TRA IL METABOLISMO DEL CARBONIO E DELL'AZOTO

La maggiore parte dei processi biologici, per potere avvenire, richiede un notevole consumo di energia e questo è vero anche per tutti quei processi che sono legati ai flussi azotati in pianta. Lo stesso trasporto dell'ammonio ad opera dei trasportatori AMT1, è dovuto ad un trasporto secondario attivo, che richiede per il suo svolgimento il consumo di notevoli quantità di energia sotto forma di ATP (vedi paragrafo 1.4). L'ammonio, una volta trasportato all'interno delle cellule vegetali, viene assimilato, ad opera del complesso della glutammina sintetasi/glutammato sintasi, negli amminoacidi base Glutammina e Glutammato; successivamente, da questi, attraverso reazioni di trans-amminazione, si ha la sintesi di tutti gli altri amminoacidi. Anche questo processo necessita di un notevole quantitativo energetico, come del resto altamente energetico risulta lo stesso processo simbiotico e l'organogenesi dei noduli in leguminosa.

L'energia, necessaria, perché tutti i normali processi fisiologici della pianta possano essere espletati, vengono forniti dagli scheletri carboniosi, sintetizzati durante la fotosintesi. E' quindi chiaro che in qualche modo il metabolismo azotato, da un lato, e quello carbonioso dall'altro, debbano essere collegati tra loro. In letteratura è noto che in pianta, così come nella maggior parte degli organismi, esiste un equilibrio tra concentrazione di carbonio e di azoto, essendo infatti i due metabolismi legati e perfettamente coordinati tra di loro (Ninfa and Atkinson, 2000; Arcondèguy *et al.* 2001). La pianta deve quindi essere in grado di avvertire il rapporto C/N e le variazioni che a carico di questo, possono avvenire in particolari condizioni di crescita, così da poterne rispondere adeguatamente.

1.17 PII, PROTEINA CHIAVE NELL'INTERPRETAZIONE DEL RAPPORTO C/N

E' noto che nel batterio enterico *Escherichia coli* un ruolo chiave nell'avvertire il rapporto C/N e le variazioni a suo carico è svolto da una specifica proteina, appartenente alla famiglia PII e codificata dal gene *glnB*. PII è infatti sensibile e alle variazioni della concentrazione di azoto e alle variazioni dello status carbonioso in conseguenza delle quali subisce modifiche covalenti a carico della sua struttura che le permettono di trasdurre il segnale alla cellula così che questa possa rispondere adeguatamente. In particolare PII è sensibile alle variazioni di carbonio, rispondendo ai cambiamenti del 2-oxoglutarato, risponde invece a cambiamenti della concentrazione di azoto, avvertendo le variazioni dell'amminoacido glutammina.

Da quando PII fu identificata per la prima volta nel 1969, è stata poi identificata in una grande varietà di batteri anche se non risulta una proteina ubiquitaria. Essa è infatti assente in *Helicobacter pilori*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae* e in generale in tutti quegli organismi che sono patogeni o il cui genoma ha avuto una ridotta evoluzione (Arcondèguy *et al.* 2001); nelle specie in cui è presente però è una delle proteine più conservate proprio per il suo ruolo così fondamentale nel coordinare i metabolismi del carbonio e dell'azoto (Shapiro, 1969).

Esistono due principali tipi di sistemi per l'assimilazione dell'ammonio, quello della glutammina sintetasi/glutammato sintasi (GS/GOGAT) che è ubiquitario nei batteri, e quello della glutammato deidrogenasi, che è presente in molti batteri, inclusi i batteri enterici, come sistema alternativo e risulta energeticamente più efficiente dell'altro sistema ma ha una minore affinità per l'ammonio e quindi non funziona in cellule che crescono in condizioni limitanti di azoto.

L'enzima GS è altamente regolato sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale (Magasanik *et al.* 1993; Merrick *et al.* 1995; Reitzer, 1996). Nei batteri enterici viene covalentemente modificato ad opera dell'adenililtransferasi (ATase) in

risposta alla disponibilità di azoto, e l'adenililazione della GS regola la sua attività catalitica. Eleganti studi biochimici del 1960 in *E. coli* ne rivelarono il meccanismo. Furono infatti individuate due componenti proteiche PI e PII che avevano a che fare con i processi di adenililazione/de-adenililazione. La frazione PI conteneva una adenilil-transferasi la cui capacità di modificare la GS era dettata dalla proteina PII e dalle concentrazioni di PI, ATP, UTP, Glutamina e 2-chetoglutarato (Anderson et al. 1970). Successivamente fu chiarito che la frazione PI conteneva una attività ATasica e una uridilil-transferasica (UTase/UR, codificata dal gene *glnD*), quest'ultima in grado di uridililare/de-uridililare PII (Mangum et al. 1973; Brown et al. 1998). PII stimolava l'adenililazione della GS ad opera dell'ATase e PII-UMP la reazione inversa. PII fu quindi purificata e fu proposta la struttura di un tetramero con una massa molecolare di circa 44 kDa (Adler et al. 1975). Il sito di uridililazione fu identificato con una Tyrosina (Tyr51), altamente conservata nella regione carbossi-terminale a livello del T loop (Rhee, 1984).

Il gene *glnB*, che codifica per la proteina PII, era stato contemporaneamente isolato in *Klebsiella aerogenes* (Prival, 1973) e studi sui mutanti ottenuti, insieme all'identificazione in *Escherichia coli* del sistema di regolazione da azoto (NTR), permisero di chiarire il meccanismo di azione di PII, evidenziando come le proteine PII fungono quindi da sensori e trasduttori dello status nutrizionale azotato cellulare.

In condizioni di alto azoto, quando i livelli di glutamina sono alti, PII viene deuridililata, in questa forma interagisce con l'adenililtransferasi (ATase), che adenila la glutamina sintetasi (GS), inattivandola. Contemporaneamente PII interagisce con il regolatore dell'azoto II (NRII), sopprimendone la sua attività chinasi e attivando la sua attività fosfatasi, mantenendo il fattore trascrizionale NRI nella sua forma inattiva, defosforilata. Viceversa, in condizioni di carenza di azoto, quando i livelli intracellulari di glutamina sono bassi, la PII è uridililata dalla UTase/UR (gene *glnD*) e in questa forma stimola l'attività della GS; contemporaneamente la NRII, non venendo legata dalla PII, è in grado di attivare la NRI e promuovere la trascrizione

dei geni implicati nell'acquisizione e utilizzo dell'azoto, incluso *AmtB* (Moorhead and Smith, 2003).

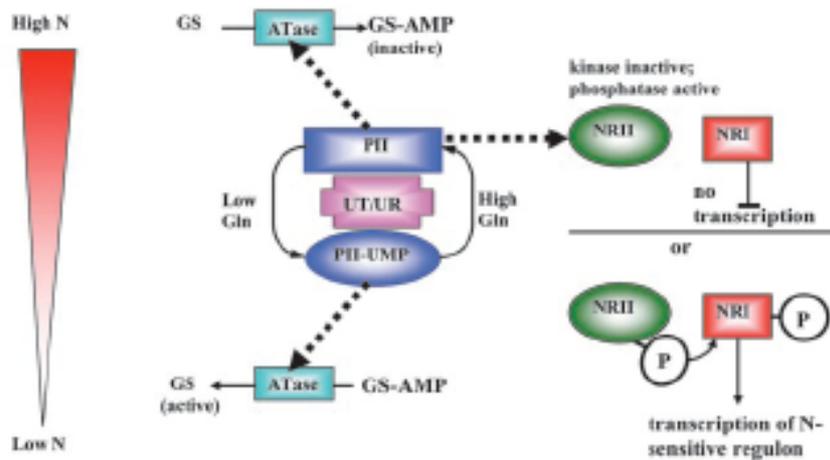


Figura 13. Meccanismo di azione di PII in condizioni di alto e basso azoto.
Da Moorhead *et al.* Plant Physiology 2003.

Questo meccanismo e questi fattori sono stati molto ben caratterizzati oltre che in *E. coli* in *Rhizobium leguminosarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azospirillum brasilense* e *Azorhizobium caulinodans* (Magasanik, 2000; Ninfa and Atkinson, 2000; Arcondéguy *et al.* 2001). Anche in questi è stata dimostrata l'uridililazione di PII ma mentre tale modifica covalente è ampiamente diffusa, essa non è universale; le proteine PII nei cianobatteri sono infatti fosforilate su un residuo di Serina Ser-49 sempre a livello del T-loop.

In *Escherichia coli* è stato identificato un secondo gene, *glnK* che codifica per una PII. Questo è presente sullo stesso *locus* genico del trasportatore dell'ammonio *amtB* e le proteine prodotte da entrambi i geni, interagiscono fisicamente tra loro

(Dandekar *et al.* 1998). GlnK funge da regolatore post-traduzionale dell'attività di trasporto di AmtB (vedi paragrafo 1.10). In *E. coli* il trasportatore dell'ammonio AmtB e PII costituiscono un sistema in grado di rispondere alle variazioni di azoto e regolano la quantità di azoto intracellulare in base alla disponibilità di ammonio nel mezzo esterno. Il legame tra GlnK e AmtB inattiva il trasportatore, controllando l'ingresso di ammonio. Esperimenti condotti da Durand e Merrick, che hanno purificato il complesso GlnK/AmtB, dimostrano che c'è un'interazione stabile e diretta tra le due proteine e che la loro stabilità non richiede l'intervento di altre proteine. Inoltre, esperimenti *in vitro*, hanno evidenziato che solo la forma deuridililata di GlnK è in grado di interagire con AmtB e tale interazione dipende dalla presenza di ATP e del 2-oxoglutarato (Durand and Merrick, 2006).

1.18 STRUTTURA DI PII E DI GLNK

La proteina PII di *E. coli* è costituita da 112 amminoacidi e il suo cristallo ha rivelato una struttura omo-trimerica. Ogni monomero contiene due motivi ad α -elica e sei motivi β , arrangiati in maniera tale che formano un doppio motivo α - β , collegato da un largo loop che va dalla Gly-37 alla Phe-55, all'apice del quale c'è il sito di uridililazione (Tyr51), nominato pertanto T-loop. Un loop più piccolo va dalla Gln-82 alla Asp-88 (B-loop). Legami idrogeno ne stabilizzano la struttura. Il trimero è arrangiato in maniera tale che i quattro filamenti di ciascun monomero siano affiancati da un lato dal T-loop del secondo monomero e dall'altro lato dall'estremità C-terminale del terzo monomero. L'arrangiamento di ciascun monomero rispetto all'altro crea una cavità che potrebbe avere un significato funzionale. Il T-loop è il sito di interazione con ATase, UTase e NtrB (proteina chinasi), GlnD (uridililtransferasi) (Jaggi *et al.* 1997 Jiang *et al.* 1997). Il T-loop si è visto che può assumere diverse conformazioni e questo può essere necessario per facilitare le diverse interazioni perché ciascuna di queste sia altamente specifica.

GlnK è molto simile a GlnB e simili sono le loro due strutture, si presenta sotto forma di omotrimerico di 112 amminoacidi; la differenza sostanziale risiede nel T-loop che nel cristallo di GlnK risulta più rigido. Anche il B-loop e l'estremità C-terminale differiscono da quelli di GlnB. Il B-loop differisce nella distanza tra le eliche. L'ATP inoltre si lega su tutta la lunghezza delle cavità e si lega ai residui amminoacidici di entrambi i monomeri. Il B-loop ha una sequenza consensus Thr-Gly-X-X-Gly-Asp-Gly-Lys-Ile-Phe che è molto simile a quella delle proteine che legano mononucleotidi come l'adenilato chinasi. Il motivo che lega l'ATP è uno dei più conservati nelle proteine degli eubatteri, archeobatteri e piante. Consistentemente, il legame con l'ATP di PII è stato dimostrato in *Synechococcus* (Forchhammer *et al.* 1997) anche se il ruolo preciso dell'ATP è tuttora sconosciuto; ogni omotrimerico presenta tre siti di legame per l'ATP; dati biochimici suggeriscono che il legame ad alta affinità per il 2-chetoglutarato richiede ATP (Forchhammer *et al.* 1997; Kamberov *et al.* 1995). Il legame con l'ATP potrebbe inoltre causare alterazioni nella struttura dei T e del B-loops, alterazioni che potrebbero influenzarne il riconoscimento molecolare.

Il 2-oxoglutarato si lega in maniera non covalente sia a GlnB che a GlnK e regola la loro attività (Atkinson and Ninfa, 1999; Kamberov *et al.* 1995; Jiang *et al.* 1998). Ciascuno è in grado di legare una molecola di 2-oxoglutarato con alta affinità ed è allostericamente regolato da questo (Atkinson and Ninfa, 1999).

In *E. coli* GlnB e GlnK sono in grado di eterodimerizzare *in vivo* quando sono co-espressi da un plasmide o quando il ceppo wild type è cresciuto in carenza di azoto (Forchhammer *et al.* 1999; van Heeswijk *et al.* 2000).

Esperimenti *in vitro* di adenilazione della GS dimostrano che l'eterotrimerico completamente uridililato è ancora capace di stimolare l'attività di deadenilazione dell'ATPase anche se con minore efficienza rispetto all'omotrimerico PII-UMP ma le conseguenze fisiologiche dell'eterotrimerizzazione non sono ancora state stabilite.

Un elevato numero di mutazioni sono state studiate nel gene *glnB* di *E. coli*, cercando di capire la funzione delle varie porzioni della proteina. Non avviene

uridilazione di GlnB quando le mutazioni coinvolgono la Tyrosina in posizione 51 (Tyr-51) così come la Phe, Asn o Ser della stessa regione ((Atkinson *et al.* 1999; He *et al.* 1998; Jaggi *et al.* 1996; Jiang *et al.* 1997). L'uridilazione è inoltre severamente alterata quando vengano mutagenizzati tutti gli amminoacidi esposti del T-loop (Holtel *et al.* 1988). Il residuo di Tyr-46 è altamente conservato. La sua mutazione non altera la struttura della proteina o i siti di legame dell'ATP o del 2-chetoglutarato ma suggerisce un ruolo nel legame con l'UTPasi (Jaggi *et al.* 1996 Jiang *et al.* 1997). Alterazioni nel T-loop rivelano inoltre problemi nell'interazione con le molecole target di GlnB (Jiang *et al.* 1997). La mutazione Thr29Met ha rivelato che questo sito è fondamentale nell'attivare la trascrizione di *glnA*. Mutazioni in Gly89Ala causa una completa perdita di funzione della proteina, probabilmente perché diviene incapace di legare piccole molecole effettrici.

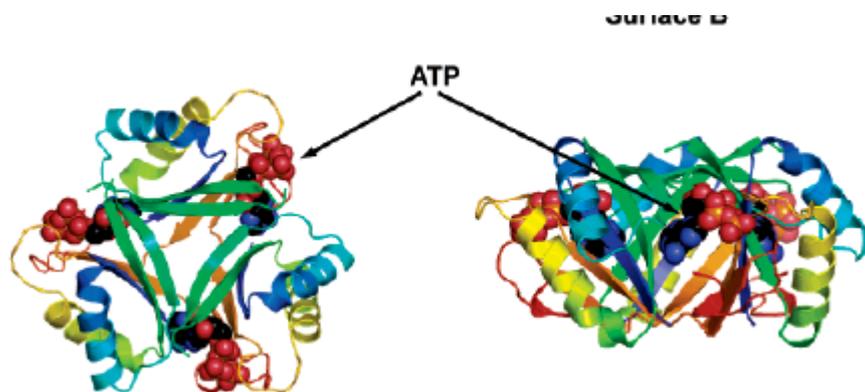


Figura 14. Simulazione del legame di GlnK con l'ATP in *Escherichia coli*.
Da Yutaka Mizuno *et al.* Biochemistry 2007.

1.19 RUOLO DI PII NEI BATTERI FOTOSINTETICI

Una proteina omologa a quella di *E. coli* è stata identificata nel batterio fotosintetico *Synechococcus* (Forchhammer and Bandeau de Marsac, 1994). Come in *E. coli* la grandezza del polipeptide è stata stimata intorno ai 36 kDa, suggerendo

anche in questo caso una struttura trimerica. PII è presente nel genoma di tutti i cianobatteri (Arcondèguy et al. 2001) ed è regolata a livello trascrizionale. Il livello di espressione è lo stesso sia che *Synechococcus* venga cresciuto in ammonio sia in nitrato come fonte di azoto; ma la sua trascrizione incrementa di circa dieci volte quando cresciuto in un mezzo privo di azoto. Il trascritto decresce al buio ma questo effetto può essere bloccato dall'aggiunta di glucosio al mezzo di crescita. I livelli della proteina restano invece costanti per molto tempo (Garcia-Dominguez and Florencio, 1997)

La PII, in risposta a cambiamenti del rapporto C/N intracellulare, subisce modifiche covalenti, viene, infatti, fosforilata a livello di un residuo di Serina in posizione 49, pur essendo conservato il residuo di Tyrosina51 che viene uridililato in *E. coli* (Forchhammer and Bandeau de Marsac, 1995). Il livello di fosforilazione varia al variare della concentrazione di azoto e di carbonio. Quando *Synechococcus* è in eccesso di ammonio, PII non è fosforilata, in carenza di azoto, invece, è fosforilata su due o tre subunità del trimero. Cresciuto in presenza di azoto, viene maggiormente fosforilato quando in presenza di un eccesso di carbonio e diminuisce quando la fissazione dell'anidride carbonica è bloccata a basse concentrazioni di C inorganico o D-L-gliceraldeide.

Studi di mutanti nulli di PII mostrano una funzione legata all'assorbimento di azoto. Quando l'ammonio è la fonte di azoto, la defosforilazione di PII controlla l'assorbimento di nitrito e nitrato (Lee et al. 1998). I mutanti nulli di PII hanno inoltre dimostrato che il trasporto ad alta affinità del bicarbonato in *Synechococcus* è sotto il controllo di PII (Hisbergues et al. 1999).

Il meccanismo che regola le modifiche post-traduzionali sono state caratterizzate parzialmente. L'attività della chinasi dipende dalla presenza e dal legame con l'ATP e il 2-oxoglutarato. Queste molecole non hanno effetto direttamente sull'attività della chinasi ma conferiscono alla PII una conformazione tale da potere essere riconosciuta dalla chinasi, così che il segnale molecolare

(fosforilazione/defosforilazione) possa funzionare in base alle concentrazioni dei due metaboliti. La fosforilazione, a differenza dell'uridililazione di *E. coli*, non dipende dalla glutammina (Moorhead and Smith, 2003).

1.20 PII IN PIANTA

Il meccanismo attraverso il quale le piante sono in grado di coordinare l'assimilazione dell'azoto e il metabolismo del carbonio è stato solo parzialmente caratterizzato. Le nozioni circa il modo in cui i due metabolismi sono integrati prendono spunto dagli studi sulla cascata di eventi attivata da PII nei batteri. PII tra le proteine regolatrici è una delle più conservate in archeobatteri, batteri ed eucarioti (piante) (Arcondeguy *et al.* 2001; Hsieh *et al.* 1998; Ninfa and Atkinson, 2000; Stadman, 1990). Ortologi della proteina PII sono, infatti, stati identificati nel genoma cloroplastidiale dell'alga rossa *Porphyra purpurea* (Reith *et al.* 1995) e in *Cyanidium caldarium*, oltre che in *Arabidopsis thaliana* (Hsieh *et al.* 1998), *Ricinus communis* (Hsieh *et al.* 1998) e successivamente in *Lycopersicon esculentum* e *Glicine max*.

PII in pianta è codificata dal gene *GLB1* che è stato meglio caratterizzato in *Arabidopsis*; in questa è espresso in tutti gli organi ed ha una regolazione trascrizionale in risposta a variazioni della luce e di metaboliti. Questo è in contrasto con il gene *glnB* di *E. coli* che è costitutivamente espresso ed è regolato a livello post-traduzionale. In realtà in *E. coli* è l'omologo di *glnB*, il gene *glnK* ad essere regolato a livello trascrizionale oltre che post-traduzionale, così come del resto il gene *glnB* di altri batteri quali *B. japonicum*, *A. brasilense*, *R. capsulatus* presenta regolazione trascrizionale (de Zamaroczy *et al.* 1993; Martin *et al.* 1989).

Dati in letteratura suggeriscono che, in maniera analoga a quanto accade nei batteri, PII anche in pianta è implicata nel sensing e nella trasduzione del segnale del rapporto C/N. In *Arabidopsis* è stato infatti dimostrato che *GLB1* ha livelli molto alti

di trascrizione alla luce e molto bassi al buio. In realtà quello che induce la trascrizione alla luce, sono i metaboliti della fotosintesi, i prodotti carboniosi; l'aggiunta di saccarosio al buio è, infatti, in grado di mimare ciò che succede alla luce, con un incremento della trascrizione del gene. Inoltre l'aggiunta di saccarosio alla luce induce un'espressione del gene che è superiore a quella che si osserva senza fonti di carbonio nel mezzo (Hsieh *et al.* 1998).

Studi più recenti hanno inoltre dimostrato la presenza di un sito di legame specifico per il 2-oxoglutarato, una fonte di carbonio; PII è però in grado di legare il 2-oxoglutarato solo in presenza di ATP con una costante di legame alta ($K_d = 107 \mu\text{M}$) (Kamberov *et al.* 1995; Smith *et al.* 2003).

PII oltre a rispondere a variazioni delle concentrazioni di carbonio è in grado di rispondere anche alle variazioni di azoto nel mezzo. Piante wild type cresciute in presenza di saccarosio ma senza fonti azotate mostrano un accumulo di antocianine (Mita *et al.* 1997; Taiz *et al.* 1991) e questo fenotipo può essere revertito dall'aggiunta di azoto inorganico quale ammonio nitrato o glutammina. Nelle stesse condizioni di crescita, piante di *Arabidopsis* che over-esprimono PII mostrano lo stesso fenotipo delle wild type, con un evidente accumulo di antocianine. Questo accumulo è eliminato quando al mezzo è aggiunto azoto inorganico ma non quando viene aggiunta glutammina, indicando come le piante over-esprimenti sono incapaci di sentire o metabolizzare quest'ultima (Hsieh *et al.* 1998).

PII sembra quindi essere sensibile alle variazioni di carbonio e azoto anche in pianta.

Un ulteriore supporto all'ipotesi di un ruolo della proteina PII in alcuni steps del metabolismo del carbonio e dell'azoto viene da studi condotti da Ferrario-Mèry e collaboratori, in mutanti di PII di *Arabidopsis* ottenuti tramite inserzione di T-DNA (Ferrario-Mèry *et al.* 2005); questi mutanti non mostrano un fenotipo di sviluppo alterato, quando cresciuti in condizioni non limitanti, dimostrando come PII non giochi un ruolo cruciale in pianta. In ogni caso esperimenti *in vitro* hanno evidenziato

come le piante mutanti sono maggiormente sensibili al nitrito (NO_2^-) se confrontate alle wild type. Questa osservazione ricorda il ruolo di PII nella regolazione del metabolismo del nitrito nei cianobatteri. Inoltre quando cresciute in condizioni idroponiche, le piante mutanti mostrano un lieve incremento dei carboidrati (saccarosio e amido) in risposta a condizioni di carenza di azoto che potrebbe essere dovuta ad un limitato uso di saccarosio per la sintesi di amminoacidi (Stitt and Krapp, 1999); quando l'ammonio viene utilizzata come unica fonte di azoto, si assiste comunque ad un accumulo di zuccheri, dovuto ad una ridotta crescita della porzione aerea della pianta e quindi ad un uso ridotto dei metaboliti del carbonio per l'assimilazione dell'ammonio (Walch-Liu *et al.* 2000). I mutanti mostrano inoltre nelle foglie un incremento del rapporto C/N come dimostra un minore accumulo di ammonio e amminoacidi, soprattutto glutammina, e un maggiore incremento degli zuccheri e di amido quando l'ammonio è usato come unica fonte di azoto (Ferrario-Mèry *et al.* 2005). I mutanti di PII sembrano quindi non riuscire a conservare un normale rapporto C/N in condizioni limitanti di azoto e di eccesso di ammonio. L'aumento del rapporto C/N nelle foglie di mutanti cresciuti in ammonio come unica fonte azotata potrebbe essere dovuto ad un diminuito assorbimento dell'ammonio da parte delle radici o ad un metabolismo dell'azoto alterato nelle foglie o da un'aumentata sintesi di carboidrati nelle foglie.

La proteina PII di pianta presenta all'estremità NH_2 -terminale un peptide segnale di circa 70 amminoacidi che le conferisce una localizzazione cloroplastidiale; tale peptide è tagliato via nella forma matura della proteina (Hsieh *et al.* 1998; Smith *et al.* 2002; Smith *et al.* 2004). La proteina matura di *Arabidopsis* mostra un'elevata identità amminoacidica con quella batterica. Sequenze amminoacidiche della proteina PII di batteri enterici, cianobatteri e archeobatteri sono state allineate con le sequenze della PII di pianta (*Arabidopsis thaliana*, *Rycinus communis*), rivelando, infatti, un'identità che si aggira intorno al 50% e 54% con quella di *E. coli* e *Synechocystis/Synechococcus* rispettivamente e il più alto grado di conservazione si

osserva nel T-loop a livello del I e del II dominio. In particolare nel dominio I è conservata la Ser49 che viene fosforilata in *Synechococcus* in base allo status azotato e, in luogo della Tyr51 che è uridililata in *E. coli*, c'è un residuo di fenilalanina. Dunque non c'è uridililazione di PII in pianta (Hsieh et al. 1998; Moorhead and Smith, 2003) come nei batteri (Forchhammer and Bandeau de Marsac, 1995) e quindi il sistema che trasmette il segnale è probabilmente diverso dal sistema batterico basato sui due componenti UTase-PII, mentre potrebbe essere legato ad una modifica post-traduzionale per fosforilazione di PII.

chinasica in grado di regolare, fosforilando, la PII. In *Synechococcus* si sa che la fosforilazione avviene solo in seguito al legame di PII con l'ATP e il 2-oxoglutarato, pertanto l'analisi è stata effettuata con il trimero di *Arabidopsis* in presenza o assenza degli effettori ATP e 2-oxoglutarato, ma tutte le combinazioni sperimentali utilizzate non hanno evidenziato fosforilazione (Smith *et al.* 2003).

In maniera analoga alla PII di *Escherichia coli*, la PII di *Arabidopsis* esiste come trimero (Smith *et al.* 2002; Smith *et al.* 2003). Inoltre lega in maniera selettiva l'ADP e l'ATP con alta affinità e la costante di legame determinata per il 2-oxoglutarato indica che può funzionare come un sensore della concentrazione di carbonio nel cloroplasto (Smith *et al.* 2003). E' stato proposto che molto probabilmente PII in pianta è controllato attraverso il legame con l'ATP e il 2-oxoglutarato e che questo è sufficiente per modulare l'affinità per le sue proteine target (Smith *et al.* 2004).



Figura 16. Struttura della PII in *Arabidopsis thaliana*.
Da Smith *et al.* The Plant Journal 2003.

1.21 PII E I SUOI INTERATTORI; RUOLO NELLA BIOSINTESI DELL'ARGININA

Come precedentemente detto, PII negli organismi in cui è presente, è riconosciuta come la proteina chiave in grado di avvertire e regolare l'equilibrio fra carbonio e azoto nella cellula (Forchhammer *et al.* 2004; Ninfa *et al.* 2000). PII in *Escherichia coli* sente lo *status* cellulare di ATP da un lato e del 2-oxoglutarato dall'altro. Lo *status* azotato è avvertito tramite il sensing della concentrazione della glutammina. Come descritto in dettaglio precedentemente, la regolazione dell'attività della proteina PII passa attraverso cambiamenti conformazionali che la rendono in grado di regolare l'espressione genica e attività enzimatiche tramite interazioni proteina-proteina (Arcondeguy *et al.* 2001; Magasanik, 2000).

In termini metabolici PII nei cianobatteri svolge un ruolo simile ma, come visto precedentemente, la modifica covalente che si ha a carico di PII è la fosforilazione (Forchhammer *et al.* 1994). Nei cianobatteri PII in questo modo è in grado di regolare diverse funzioni: l'assorbimento del nitrato-dipendente da ammonio, l'assorbimento del nitrito (Lee *et al.* 2000), il trasporto ad alta affinità del bicarbonato (Hisbergues *et al.* 1999), la regolazione dell'attivazione trascrizionale mediata da NtcA (Paz-Yepes *et al.* 2003; Fadi-Aldehni *et al.* 2003), la biosintesi dell'arginina (Heinrich *et al.* 2004).

Studi biochimici sono stati condotti nei cianobatteri per potere individuare eventuali molecole che interagiscono con PII così da poterne meglio chiarire il ruolo fisiologico. In particolare lo studio di *Synechococcus* ha identificato come interattore di PII, l'N-acetil-glutammato chinasi (NAGK), enzima chiave nella biosintesi dell'arginina. Inoltre l'integrità della Serina in posizione 49 sembra sia essenziale per il legame PII/NAGK. Gli effetti delle mutazioni in *glnB* sono consistenti con un ruolo di regolatore positivo di PII su NAGK (Burillo *et al.* 2004).

Nelle piante PII, come precedentemente detto, non è regolata da fosforilazione (Smith *et al.* 2004) e come nei batteri, è in grado di legare il 2-oxoglutarato ma solo dopo avere legato l'ATP, in questo modo è in grado di avvertire le variazioni energetiche che avvengono all'interno del cloroplasto e lo *status* del 2-alfa-chetoglutarato (Smith *et al.* 2003).

In pianta, così come in altri organismi, l'individuazione di interattori di PII è essenziale per meglio comprendere il suo ruolo e recentemente l'N-acetil-glutammato chinasi (NAGK) è stato individuato, attraverso studi biochimici, come potenziale interattore di PII anche in *Arabidopsis thaliana* e in *Oryza sativa* (Burillo *et al.* 2004; Sugiyama *et al.* 2004), in maniera del tutto analoga a quanto accade nei cianobatteri.

Entrambe le proteine, PII e NAGK, co-localizzano nel cloroplasto (Hsieh *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006). La formazione del complesso PII-NAGK è in grado di alterare le proprietà catalitiche di NAGK, come era stato precedentemente dimostrato anche nei cianobatteri da Maheswaran e collaboratori nel 2004. Inoltre in *Arabidopsis* è stato osservato che il complesso e la sua formazione sono influenzati dall'arginina, che è un prodotto finale del pathway metabolico e in particolare sembra che questa sia in grado di promuovere l'interazione tra PII e NAGK e quindi si autoregola, incrementando la sua stessa sintesi (Yan M Chen *et al.* 2005), come, del resto, già descritto nei cianobatteri (Maheswaran *et al.* 2004). PII in pianta ha quindi un ruolo nella sintesi dell'arginina, questa sintesi comporta il consumo di glutammina e aspartato e del carbammil-fosfato che è un donatore di molecole C/N e ciò stabilisce dunque il legame con il metabolismo dell'azoto (Yan M Chen *et al.* 2005).

In maniera analoga in *S. elongatus* è stata dimostrata l'interazione PII-NAGK e tale legame dipende dalla Ser49 e dalla sua fosforilazione in risposta ai cambiamenti del rapporto C/N. In alte concentrazioni di azoto la proteina PII in forma non fosforilata interagisce con NAGK, attivandolo (Heinrich *et al.* 2004). Il ruolo chiave della serina in posizione 49 è stata dimostrata da esperimenti in cui, quando sostituita con altri amminoacidi, si assiste ad una più blanda interazione o, in alcuni casi, ad

2 SCOPO DEL LAVORO

I trasportatori dell'ammonio rivestono un ruolo fondamentale nelle piante ed infatti sono numerosi gli studi che tendono a descriverne le caratteristiche, la regolazione dell'espressione e, in definitiva, il ruolo svolto nell'ambito del metabolismo dell'azoto.

In *Arabidopsis thaliana* sono stati condotti la maggiore parte degli studi che hanno in parte elucidato il loro ruolo.

L'isolamento di tali geni in una leguminosa e lo studio della loro regolazione e caratteristiche presenta un valore aggiuntivo rispetto a quelli condotti su *Arabidopsis* e ciò è legato alla capacità che le leguminose hanno di interagire simbioticamente con i batteri azoto-fissatori. Quindi lo studio nella leguminosa modello *Lotus japonicus* permette di definire l'espressione e la regolazione dei geni AMT anche in relazione alla distribuzione della fonte addizionale di ammonio rappresentata dal prodotto finale dell'interazione simbiotica, oltre che il loro eventuale ruolo nella regolazione delle varie fasi di quest'ultima.

Nel nostro laboratorio è stata recentemente isolata la famiglia genica *AMT1* della leguminosa modello *Lotus japonicus* (Salvemini *et al.* 2001; D'Apuzzo *et al.* 2004). Le caratteristiche biochimiche dei membri della famiglia sono state studiate nel lievito *S. cerevisiae* (K_m , K_i e V_{max}). I tre geni della famiglia sono stati inoltre caratterizzati dal punto di vista della espressione in vari organi e tessuti della pianta e della differente regolazione dell'espressione in risposta a stimoli ambientali quale, ad esempio, la disponibilità di azoto nel terreno (D'Apuzzo *et al.* 2004).

In questo contesto si inserisce il mio progetto di Dottorato che ha avuto come fine ultimo quello di caratterizzare dal punto di vista funzionale le proteine AMT1 di *Lotus*. Tale caratterizzazione è stata mirata da un lato alla delucidazione dell'azione da loro svolta nel trasporto dello ione ammonio dal mezzo esterno all'interno della pianta, e all'interno dei suoi vari tessuti e organi, e dall'altro, all'analisi del possibile

ruolo svolto nel signalling dell'azoto, che è determinante nel regolare processi di sviluppo e organogenesi quali, l'architettura del sistema radicale e la formazione del nodulo azoto-fissatore.

Per ottenere informazioni più dettagliate, ho quindi utilizzato un approccio di Reverse-Genetics e le informazioni ottenute precedentemente grazie all'isolamento delle sequenze geniche sono state utilizzate per silenziare contemporaneamente i tre geni *AMT1* mediante la tecnica dell'RNA- interference. Ho quindi ottenuto dei trasformanti stabili mediante trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens* equipaggiato con il costrutto appropriato. Questi trasformanti sono stati analizzati per comprendere l'effetto del silenziamento degli *AMT1* sul fenotipo di crescita in diverse condizioni. La definizione delle condizioni sperimentali in cui verificare la comparsa di fenotipi di crescita e sviluppo e/o simbiotici si è ovviamente basata sui numerosi dati acquisiti in laboratorio sia precedentemente che nel corso di questo dottorato, che hanno evidenziato espressione dei trasportatori in radice e nel nodulo (D'Apuzzo et al., 2004), e la regolazione di questa in varie condizioni di crescita.

Ulteriori informazioni che mi sono state utili per ipotizzare il ruolo dei trasportatori, sono state ottenute andando ad analizzare la localizzazione delle proteine AMT1 a livello sub-cellulare, tramite fusioni con un marcatore, visualizzabile *in vivo*, la Green Fluorescence Protein.

Ad esempio la localizzazione di AMT1;1 sulla membrana plasmatica e la sua espressione nei peli radicali (D'Apuzzo *et al.* 2004), che sono il primo sito di interazione tra la pianta e il partner simbiotico in condizioni di carenza di azoto, poteva suggerire un suo ruolo sia per l'attivazione del trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno in condizioni di scarso apporto di azoto, sia una funzione di sensing della concentrazione di azoto nel mezzo esterno che deve essere segnalata al resto della pianta per coordinare l'architettura del sistema radicale e/o accendere il programma morfogenetico che porterà alla formazione del nodulo azoto-fissatore. E' noto che alte concentrazioni di ammonio, risultano limitanti per la nodulazione di

piante selvatiche di *L. japonicus* (Barbulova *et al.* 2007) ed è stata valutata quindi la capacità delle piante interferite di nodulare in presenza di varie concentrazioni azotate.

La strategia utilizzata per l'analisi funzionale è stata inoltre differenziata per i tre membri della famiglia AMT1 di *Lotus*. Infatti, per quanto riguarda quello che tra i tre trasportatori è meno espresso, *LjAMT1;3*, ho valutato il suo ruolo, nelle condizioni descritte precedentemente, incrementandone il livello di espressione in *Lotus*, tramite trasformazione con costrutti over-esprimenti. Questo mi ha permesso di postulare un ruolo specifico per questo membro della famiglia AMT1, e inoltre, sulla base dei fenotipi osservati, ottenere nuove informazioni sul suo profilo di espressione in particolari condizioni di crescita nelle piante selvatiche, permettendomi quindi di identificare un legame fra il ruolo svolto da *LjAMT1;3* in condizioni fisiologiche nelle piante wild type ed il fenotipo delle piante transgeniche.

In letteratura è noto che in pianta così come nella maggior parte degli organismi esiste un equilibrio tra concentrazione di carbonio e di azoto, essendo i due metabolismi legati e coordinati tra di loro (Ninfa and Atkinson, 2000; Arcondèguy *et al.* 2001). Ciò che è noto nel batterio enterico *E. coli* infatti è che la proteina PII è in grado di sentire lo *status* carbonioso e azotato della cellula e di trasdurne il segnale, mediante modifiche covalenti che avvengono a suo carico, coordinando la risposta della cellula al variare della concentrazione di entrambi. Ortologi della proteina PII sono stati identificati anche in pianta, prima fra tutte in *Arabidopsis thaliana* (Hsieh *et al.*, 1998) poi successivamente in *Lycopersicon esculentum* e *Glicine max*. In maniera analoga alla PII batterica, anche in ambito vegetale questa è implicata nel sensing e nella trasduzione del segnale del rapporto C/N (Hsieh *et al.* 1998). Il gene *GLB1*, che codifica per una PII-like, è stato più recentemente isolato in *Lotus*.

Uno scopo della tesi è stato quindi quello di verificare se anche in leguminosa la proteina PII avesse funzioni analoghe a quelle osservate in altri sistemi. In particolare, se la sua funzione di coordinatore del rapporto C/N potesse essere

importante per lo svolgimento della simbiosi azoto-fissativa che dipende in maniera fondamentale dalle risorse carboniose e azotate e infine se avesse un ruolo nella regolazione dei geni *AMT* (così come dimostrato nei batteri enterici).

La seconda parte del progetto di ricerca ha avuto, quindi, come oggetto lo studio di PII, di cui è stato valutato il livello di espressione genica nei diversi organi sia a livello di espressione di RNA sia a livello sub-cellulare analizzando l'attività di fusioni traduzionali tra la sequenza regolatrice e il gene *gusA* di *Escherichia coli*. Questo tipo di informazioni sono quindi state associate a studi sulla localizzazione proteica tramite l'uso di fusioni con la GFP. Ho inoltre valutato la regolazione dell'espressione in risposta a diverse concentrazioni di azoto, oltre che al variare della concentrazione di carbonio, in particolar modo di saccarosio.

Anche in questo caso l'approccio sulla caratterizzazione funzionale del gene *GLB1* si è basato sull'ottenimento di una pianta transgenica over-esprimente la proteina PII.

3 *Lotus japonicus* COME SISTEMA MODELLO

Lotus japonicus è una pianta perenne ed appartiene alla famiglia delle leguminose (*Fabaceae*) che, per grandezza, è la terza famiglia delle Angiosperme. Di ambiente tropicale, il suo habitat naturale è l'Asia centrale, inclusa l'area del Giappone, Corea, Cina, dove sono stati trovati diversi ecotipi, con variabilità fenotipica e genetica.

Per le sue caratteristiche genetiche e fenotipiche, circa dodici anni fa è stata proposta come sistema modello, soprattutto in relazione allo studio del meccanismo simbiotico. *Lotus* ha un genoma relativamente piccolo, pari a 450 Mb. Una condizione essenziale nella scelta di *Lotus* come sistema modello è legata alle elevate capacità rigenerative dei suoi tessuti e alla possibilità di potere applicare tecniche di trasformazione, stabile e non, utilizzando i due vettori naturali, che normalmente interagiscono con la pianta *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*. A differenza della maggiore parte delle leguminose, *Lotus*, infatti, non risulta recalcitrante alla trasformazione genetica e sono stati messi a punto efficienti protocolli di trasformazione e rigenerazione *in vitro* (Lombardi et al. 2003; Barbulova et al. 2005).

Le piante sono di ridotte dimensioni, raggiungendo da adulte circa trenta centimetri di lunghezza. Tale caratteristica le rende quindi particolarmente maneggevoli e adatte alla crescita *in vitro*. Hanno un breve ciclo vitale che è pari circa a tre mesi, sono diploidi e self-fertili. I baccelli sono lunghi all'incirca tre centimetri e all'interno i semi sono disposti linearmente lungo l'asse, in numero di venti circa per baccello e in condizioni ottimali riesce ad ottenere un numero di mille-cinquemila semi per pianta.

La pianta presenta un elevato numero di foglie, presenti sottoforma di trifolium. Le condizioni di crescita sono facilmente riproducibili in camere di crescita con una vasta tolleranza a diverse condizioni di luce e temperatura.

Infine, le numerose informazioni disponibili relative a sequenze EST depositate in banche dati (il completamento del progetto di sequenziamento del genoma è previsto per la fine del 2008), disponibilità di markers molecolari e fenotipici, disponibilità di “facilities” quali Tilling e Chips per Affimetrix, rendono tale sistema particolarmente appetibile e adatto a studi sia di tipo molecolare che fisiologico.

Le leguminose sono piante “pioniere” in grado di crescere in terreni poveri di nutrienti grazie alla loro abilità di stabilire simbiosi mutualistiche con funghi, presenti nel suolo (Mycorrhize), e batteri, che fissano l’azoto atmosferico, della famiglia delle *Rhizobiaceae*. Gli uni riforniscono la pianta di fosforo, gli altri di azoto. Queste caratteristiche rendono le leguminose fondamentali nei sistemi agricoli.

Lotus, in particolare, stabilisce simbiosi con *Mesorhizobium loti*, un batterio del suolo gram-negativo in grado di formare noduli determinati sulle radici della pianta.

Gli studi effettuati durante questi ultimi dodici anni hanno contribuito soprattutto ad una migliore comprensione del processo simbiotico che la pianta è in grado di instaurare sia con batteri del genere *Rhizobiaceae* che con le micorrizze. Questo ha consentito di clonare una grande quantità di geni di pianta coinvolti nella simbiosi. *Lotus* è in grado di entrare in simbiosi oltre che *M. loti*, , anche con *Bradyrhizobium*. Mentre *M. loti* è in grado di portare alla formazione di noduli maturi in cui viene fissato correttamente l’azoto, *Bradyrhizobium* induce sulle radici della pianta lo sviluppo di noduli morfologicamente normali ma incapaci di ridurre l’azoto atmosferico.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Sterilizzazione dei semi di *Lotus japonicus*

Prima della germinazione, i semi di *Lotus japonicus*, vengono sterilizzati con una soluzione al 2,5% di ipoclorito di sodio e 0,05% di Triton-X100. I semi sono lasciati in questa soluzione per 20 minuti in leggera agitazione, quindi sciacquati per 6 volte con acqua sterile e posti su una piastra di agar all'1%. Prima di lasciarli germinare alla temperatura di 23°C con un ciclo giorno/notte di 16/8 ore, i semi sulla piastra sono mantenuti al buio capovolti per 24 ore a 4°C e per altre 24 ore a 23°C, questa operazione è necessaria per una parziale sincronizzazione della cinetica di germinazione. L'intensità luminosa negli armadi di crescita è di $246 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

4.2.1 Preparazione terreni di coltura e condizioni di crescita

Murashige e Skoog medium (MS): 0,5g di acido 2,4N-Morpholino etansulfossido (MES), 4,33 g di polvere MS (Duchefa) in un volume finale di 1 litro.

Il pH finale di 5,7 è ottenuto aggiungendo KOH.

Gamborg's B5 medium (B5): 0,5 g di acido 2,4N-Morpholino etansulfossido (MES), 3,04 g di polvere B5 (Duchefa) in un volume finale di 1 litro. Il pH finale di 5,7 è ottenuto aggiungendo KOH.

Jensen medium: preparare gli stocks dei diversi componenti e aggiungerli in un volume finale di 1 litro, per ottenere una mezzo 0,1X.

Ai terreni solidi viene aggiunto plant agar (DUCHEFA) in concentrazione 1%.

Ormoni: le auxine usate sono state acido indoloacetico (IAA), acido 1- naftalenico (NAA), acido 2,4-dicloro-fenossiacetico (2,4 D); le citochinine usate sono state N-benziladenina (BA), N-isopenteniladenosina (IPA), thidiazuron (TZN).

Antibiotici: per impedire la crescita di *Agrobacterium tumefaciens*, sono stati usati cefotaxime in concentrazione 0,2 mg/ml e vancomicina in concentrazione 50 mg/ml, inoltre come fungicida viene usata nistatina in concentrazione 25 mg/ml. Per la selezione degli espianti trasformati in seguito a trasformazione mediata da *A. tumefaciens* viene utilizzata igromicina in concentrazione 15 mg/l.

Ecotipi: l'ecotipo di *Lotus* utilizzato è stato "GIFU" F9.

4.2.2 Composizione dei mezzi di crescita

Murashige and Skoog medium (MS):

Microelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,11 _M
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,10 _M
NaFeEDTA	36,70	0,10 _M
H ₃ BO ₃	6,20	0,10 _M
KI	0,83	5,00 _M
MnSO ₄ · H ₂ O	16,90	0,10 _M
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	1,30 _M
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,60	29,91 _M

Macroelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CaCl ₂	332,02	2,99 mM
KH ₂ PO ₄	170,00	1,25 mM
KNO ₃	1900,00	18,79 mM
MgSO ₄	180,54	1,50 mM
NH ₄ NO ₃	1650,00	20,61 mM

Vitamine	Quantità in mg/ml	Concentrazione finale
Acido niconitico	1,00	8,12 μ M
Piridoxina- HCl	1,00	4,86 μ M
Tiamina HCl	10,00	29,65 μ M

Gamborg's B5 medium (B5)

Microelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,11 μ M
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,10 μ M
NaFeEDTA	36,70	0,10 μ M
H ₃ BO ₃	3,00	48,52 μ M
KI	0,75	4,52 μ M
MnSO ₄ · H ₂ O	10,00	56,16 μ M
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	1,30 μ M
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,00	6,96 μ M

Macroelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CaCl ₂	113,23	1.02 mM
KH ₂ PO ₄	2500,00	24,73 mM
KNO ₃	1900,00	18,79 mM
MgSO ₄	121,56	1,01 mM
NH ₄ NO ₃	130,44	1,09 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	1,01 mM

Vitamine	Quantità in mg/ml	Concentrazione final
Myo-inositolo	100,00	0,56mM
Acido niconitico	1,00	8,12 μ M
Piridoxina- HCl	1,00	4,86 μ M

Tiamina HCL	10,00	29,65 _M
-------------	-------	----------

MEZZO JENSEN

COMPONENTI:

1. CaHPO ₄	100g/l
2. K ₂ HPO ₄	20g/l
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	20g/l
4. NaCl	20g/l
5. Fe citrate*	10g/l
6. Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	40g/l
7. MIX:	
CuSO ₄ .5H ₂ O	3,5g/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	61g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	9,7g/l
8. H ₃ BO ₃	12,7g/l

4.3 PROCEDURA DI TRASFORMAZIONE- RIGENERAZIONE DI *LOTUS JAPONICUS* MEDIATA DA *Agrobacterium tumefaciens*

Considerazioni generali: la trasformazione *in vitro* viene fatta su espianti separati dal resto della pianta sui quali si creano le condizioni che in natura sono alla base dell'infezione da parte di *Agrobacterium tumefaciens*. La fase iniziale quindi prevede la produzione di ferite nel tessuto vegetale per permettere il rilascio di flavonoidi da parte della pianta stessa e la conseguente attivazione della risposta batterica. Gli espianti utilizzati possono essere prelevati da radici, foglie, cotiledoni, ipocotili, epicotili. La scelta del tessuto può variare da pianta a pianta sulla base della diversa suscettibilità ad *Agrobacterium* e della loro diversa capacità rigenerativa. In alcuni casi, la fase dell'infezione è preceduta da una fase in cui gli espianti sono coltivati in presenza di un regime ormonale ad alta concentrazione di auxine. Possono essere presenti anche citochinine ma il rapporto finale auxine/citochinine è sempre a favore delle prime. Questa prima fase di preincubazione degli espianti ha una duplice funzione: induce il de-differenziamento delle cellule, rendendole nuovamente totipotenti e pronte a redifferenziarsi e induce una proliferazione cellulare che rende gli espianti maggiormente competenti all'infezione con *Agrobacterium tumefaciens*.

La trasformazione è di solito condotta utilizzando un ceppo di *A. tumefaciens* che contiene un costrutto di T-DNA in cui è stato clonato il gene per la resistenza ad un antibiotico o ad un erbicida, sotto il controllo di un promotore costitutivo di pianta. Il promotore in questo caso utilizzato è il 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), in quanto riesce a massimizzare l'espressione delle sequenze esogene. La presenza del gene per una resistenza è necessaria per potere selezionare il tessuto trasformato. Maggiore è la sua espressione, maggiore è la concentrazione di antibiotico che può essere utilizzata. In questo modo si riduce la possibilità per il tessuto non trasformato di sopravvivere. Successivamente alla trasformazione, gli espianti subiscono una serie di passaggi in mezzi contenenti diversi rapporti tra i fitormoni, in modo da produrre un avanzato de-differenziamento e un successivo

differenziamento per potere ottenere la pianta transgenica. I vari passaggi possono essere schematizzati come descritto qui di seguito.

1) Incubazione in un mezzo contenente sia citochinine, che inducono divisione cellulare, sia auxine, che stimolano distensione e divisione cellulare, in modo da indurre proliferazione cellulare. Tale mezzo (CIM = *Callus Induction Medium*) è lo stesso utilizzato per la pre-incubazione degli espianti.

2) Selezione delle cellule trasformate. Al mezzo CIM viene aggiunto l'antibiotico per potere selezionare le cellule trasformate. Solo tali cellule quindi prolifereranno, dando luogo ad un tessuto vegetale calloso non differenziato (callo). Ogni callo è quindi un clone di una singola cellula trasformata e in ognuno di essi il T-DNA si sarà integrato in maniera diversa, singola o multi copia, e in locus diversi del genoma.

3) I calli verdi, fotosintetizzanti, vengono separati dal resto del tessuto morto e trasferiti in un mezzo contenente principalmente citochinine per consentire il differenziamento del tessuto e la formazione in particolare del tessuto fogliare (Mezzo SIM = *Shoot Induction Medium*). Infatti le citochinine, in particolare la benzil-adenina, stimolano lo sviluppo delle gemme laterali. Per questa procedura è stato utilizzato il thidiazuron (TDZ), una fenilurea sostituita (Nphenyl-N1,2,3-thidiazuron-5ylurea), composto ad azione citochino-simile (Barbulova *et al.*, 2005).

4) Quando gli shoot hanno raggiunto un'adeguata dimensione, vengono trasferiti in un mezzo contenente alte concentrazioni di auxine per un tempo di circa una settimana, le auxine infatti ad alte concentrazioni favoriscono lo sviluppo delle radici. In particolare si usa un'auxina sintetica, l'acido naftaline acetico.

5) Una volta sviluppate le radici, la piantina è pronta per essere trasferita in terreno per ottenere la generazione T1 di semi transgenici.

Mediante tale tipo di trasformazione si ottengono dei trasformanti primari (T0) che sono dei cloni eterozigoti (emizigoti) per i geni del T-DNA integrati nel genoma. Per ottenere omozigoti bisognerà attendere la generazione successiva (T1), nella quale il T-DNA segregherà in maniera Mendeliana (Lombardi *et al.*, 2003).

4.3.1 PROCEDURA DI TRASFORMAZIONE

Materiale di partenza: radici di piante cresciute *in vitro* per un periodo compreso tra i 30 a 60 giorni.

1. Pre-coltura: separare le radici dalla parte aerea della pianta e trasferirle su mezzo in grado di indurre la formazione del callo (CIM) per cinque giorni.
2. Infezione: tagliare le radici in piccoli pezzetti di circa 0,5 cm e immergerli nella coltura di *Agrobacterium*. Lasciare espunti in queste condizioni per 10 minuti.
3. Co-coltura: trasferire gli espunti su CIM per 48 ore.
4. Lavare i trasformanti con H₂O sterile, asciugarli su carta da filtro sterile e trasferirli su mezzo CIM selettivo, contenente 200 mg/l di Claforan; 15mg/l igromicina.
Incubazione di 3, 4 settimane fino all'ottenimento di calli verdi.
5. Trasferire i calli verdi, resistenti, su SIM per 20 giorni.
6. Trasferire i calli su un mezzo, contenente una concentrazione 10 volte inferiore di thidiazuron (concentrazione finale di TDZ – 0,05mg/l), e lasciare gli espunti per altri 15 giorni (Mezzo SEM = *Shoot Elongation Medium*).
7. Appena comincia a formarsi la parte aerea, gli espunti vanno trasferiti in un nuovo mezzo RIM per l'induzione della formazione delle radici senza selezione per altri dieci giorni
8. Trasferirli su mezzo B5 (REM = *Root Elongation Medium*), per l'allungamento delle radici, per un'altra settimana circa.

4.3.2 MEZZI DI CRESCITA PER LA PROCEDURA DI TRASFORMAZIONE-RIGENERAZIONE

Callus Inducing Medium (CIM): 3 mg/l acido indolacetico (IAA); 0,15 mg/l acido diclorofenossiacetico (2,4-D); 0,6 mg/l benziladenina (BA); 0,3 mg/l isopentenialadenina (IPA)

Shoot Inducing Medium (SIM): MS medium; saccarosio 3%; vitamine MS; 0,5mg/l TDZ+200 mg/l Cef+15mg/l Hyg

Root Inducing Medium (RIM): B5/2 medium; saccarosio 1%; vitamine B5; 0,1 mg/l acido naftalenacetico (NAA)

Root Elongation Medium (REM): B5/2 medium; saccarosio 1%; vitamine B5

4.4 PROCEDURA DI TRASFORMAZIONE CON *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes è un batterio in grado di interagire con le piante, trasferendo una parte del proprio DNA (T-DNA), presente all'interno del plasmide Ri. Il T-DNA trasferito è in grado di integrarsi nel genoma di pianta dove, servendosi dei sistemi enzimatici dell'ospite, attiva la trascrizione dei geni specifici contenuti nel suo T-DNA. Tra questi vi sono i geni *rolA*, B e C la cui azione è sinergica e in grado di indurre il caratteristico fenotipo "Hairy Root" che presenta una massiva formazione di tessuti radicali differenziati a partire dal sito di infezione batterica. I semi di *Lotus japonicus* vengono fatti germinare su piastre di acqua e agar (1,5%). Trascorsi sei giorni, quando già sono spuntati la radichetta e i cotiledoni, queste vengono trasferite su un mezzo carente di azoto (NLN). Uno stress quale può essere la condizione limitante di azoto, è infatti in grado di favorire il processo di trasformazione. Trascorsi un paio di giorni dal trasferimento in NLN, viene effettuato un taglio tra l'ipocotile e la radichetta primaria. Tale taglio comporta il rilascio da parte della pianta di flavonoidi in grado di attivare i batteri con cui la pianta viene messa in co-coltura per una decina di minuti. Nel sito di taglio dopo alcuni giorni compare una regione costituita da cellule de-differenziate da cui, successivamente,

cominciano a comparire i primi abbozzi di radice già a partire da circa due settimane da quando è stata effettuata la trasformazione. In questo stadio le piante così generate vengono trasferite su un terreno ricco di azoto così da permettere l'allungamento delle radici. Nel giro di quattro settimane si ottengono le piante, cosiddette composite, che sono infatti costituite da una porzione wild type, la parte aerea, e una transgenica, l'apparato radicale che si dipana dal sito di taglio effettuato inizialmente. Le radici, che in questo modo si ottengono, hanno una caratteristica perdita di geotropismo e una notevole ricchezza di peli radicali. Il ceppo di *Agrobacterium rhizogenes* da noi utilizzato è MSU440, precedentemente trasformato con un vettore binario, contenente le fusioni traduzionali per i tre trasportatori dell'ammonio di cui si voleva testare l'espressione in radice. Inoltre le radici sono perfettamente in grado di nodulare e di potere quindi fornire informazioni sull'espressione di una data sequenza anche all'interno del nodulo.

4.5 PROCEDURA DI NODULAZIONE *in vitro*

La messa a punto di condizioni *in vitro* riproducibili, sono essenziali per lo studio dei diversi momenti del processo simbiotico tra le piante leguminose e il batterio *Mesorhizobium loti*. I semi di *Lotus japonicus*, previa sterilizzazione vengono fatti germinare su mezzo Jensen 0,1% solido, in piastre Petri su un semicerchio di carta da filtro sterile.

4.5.1 PREPARAZIONE DEI BATTERI

Una singola colonia di *Mesorhizobium loti* ceppo R7A, viene fatta crescere per 16 ore a 30°C nel mezzo TYR contenente 6mM di CaCl₂ e 100µM di antibiotico Rifampicina. I batteri cresciuti, vengono centrifugati a 4500 giri per 10 minuti, il

pellet ottenuto viene lavato con una soluzione di PBS 1X, una volta ricentrifugato, viene risospeso in 1ml di PBS 1X. La densità ottica dei batteri (OD) viene misurata alla lunghezza d'onda di 600nm e 20 μ l di sospensione batterica, contenente $5 \cdot 10^7$ cellule, viene utilizzata per infettare i singoli meristemi radicali.

4.5.2 INFEZIONE

Dopo 4-5 giorni dalla germinazione dei semi, quando la radice primaria raggiunge una lunghezza di circa 1cm, le piante vengono inoculate con 20 μ l di sospensione batterica fresca. La carta da filtro è importante per ottenere una completa e uniforme diffusione dei batteri sul meristema radicale. La carta da filtro viene rimossa quattro giorni dopo l'infezione. Le radici infettate vengono tenute al buio per le successive 6 settimane dall'infezione.

4.6 TRATTAMENTO DELLE CELLULE BATTERICHE

4.6.1 PREPARAZIONE DELLE CELLULE COMPETENTI DI *E. coli*

Affinché una cellula possa essere trasformata, deve essere resa permeabile al DNA (competenza). A questo scopo una colonia del ceppo DH5 α viene inoculata in 5 ml di Ty e cresciuta con costante agitazione a 37°C per 16 ore. Successivamente 1 ml di questa coltura viene utilizzata per inoculare 100 ml di Ty. Le cellule vengono fatte crescere in un incubatore a 37°C con agitazione costante per 3 ore fino ad una concentrazione di circa 0.5-0.6 O.D./ml. Le cellule sono state centrifugate a 4000 giri per minuto (rpm) per 5 minuti a 4°C. Il pellet batterico, così ottenuto, è stato risospeso in 50 ml di una soluzione 50 mM calcio cloruro, precedentemente raffreddata, e le cellule incubate a 4°C per 30 minuti. Dopo centrifugazione, le cellule sono state risospese in 10 ml di una soluzione contenente 15% glicerolo e 50 mM calcio cloruro, suddivise in aliquote da 0,2 ml e conservate a -80°C.

4.6.2 TRASFORMAZIONE PER SHOCK TERMICO DI CELLULE COMPETENTI DI *E. coli*

A 0,1 ml di cellule competenti vengono aggiunti 50-100 ng di DNA plasmidico purificato. Le cellule vengono lasciate 15 minuti in ghiaccio, poi 5 minuti a 37° C, si aggiunge 1 ml di Ty e le cellule vengono incubate per 50 minuti a 37° C, per permettere la stabilizzazione del DNA trasformante. A questo punto da 50 a 200 µl della miscela sono piastrati su Ty con opportuno antibiotico.

4.6.3 ELETTROPORAZIONE

Il metodo calcio cloruro non consente, nel caso di *Agrobacterium*, di ottenere un'alta efficienza di trasformazione a causa della parete cellulare che non è resa particolarmente permeabile da questo metodo. Per questo motivo è stata usata l'elettroporazione (Nagel *et al.*, 1990), la cui resa è molto maggiore (10^{10} trasformanti/µg di DNA). A questo scopo, a 40 µl di cellule competenti di *Agrobacterium*, sono stati aggiunti 100 ng del DNA trasformante. Tale DNA deve essere puro e risospeso in una soluzione a bassa concentrazione ionica, per cui è stato utilizzato DNA ottenuto da midi preparazione di DNA plasmidico (midiprep) sciolto in TE. Alla soluzione, posta in cuvetta, viene applicata una differenza di potenziale di 2,5 KV (capacitanza 25 µF e resistenza µ200). Alle cellule elettroporate viene aggiunto 1 ml di terreno SOC e incubate a 30°C in costante agitazione per 4 ore, per permettere l'espressione dei marcatori fenotipici. Successivamente le cellule vengono piastrate a diverse concentrazioni su Ty con opportuno antibiotico ed incubate a 30° C per due giorni.

4.6.4 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *Agrobacterium tumefaciens*

A partire da una singola colonia, viene cresciuto un inoculo in mezzo liquido, 2ml di Ty e lasciato crescere con costante agitazione a 30°C per tutta la notte. Il giorno

dopo 1/100 di brodo di coltura viene successivamente cresciuto in 300 ml di Ty e lasciato crescere fino al raggiungimento di una densità ottica compresa tra 0,5 e 1,0 O. D.

Raggiunta tale concentrazione batterica, la crescita viene stoppata, ponendo i batteri in ghiaccio per 15 minuti. Successivamente questi vengono pellettati in tubi da centrifuga a 4000 rpm per 15 minuti. Eliminato il supernatante, il pellet viene risospeso in 300 ml di acqua sterile fredda e i batteri vengono nuovamente pellettati a 4000 rpm per 15 minuti. Il pellet, così ottenuto, viene risospeso in 8 ml di acqua più 10% glicerolo e i batteri centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti. Il pellet viene infine risospeso in 2 ml di acqua più 10% glicerolo, suddivisi, successivamente, in aliquote da 40 µl e conservati a -80°C.

4.7 DESCRIZIONE DEI PLASMIDI

4.7.1 VETTORE pCR2.1

Vettore (Invitrogen) di 3600 bp; contiene i geni che codificano per la resistenza ai due antibiotici, canamicina e ampicillina; un'origine di replicazione F1, che gli permette di potersi replicare in *E. coli*; possiede inoltre il gene reporter *lacZ* e un poly-linker con siti unici per vari enzimi di restrizione. Il vantaggio di tale vettore è quello di potere clonare direttamente in esso sequenze, a doppio filamento di DNA, prodotte da reazioni di PCR, pur non presentando queste, estremità coesive specifiche, necessarie per i clonaggi nei comuni vettori. L'alta efficienza di ligasi è assicurata dal fatto che il DNA del vettore, opportunamente linearizzato, presenta alle due estremità una T che andrà ad ibridare con le A che caratterizzano la maggior parte delle estremità dei frammenti di DNA, ottenuti per PCR, favorendo, quindi, la successiva reazione di ligasi. L'inserzione del prodotto di amplificazione avviene tra i due siti di restrizione per l'enzima *EcoRI* all'interno dei quali si trova la sequenza polylinker. Il promotore del gene *lacZ*, è a monte del primo sito *EcoRI*, in posizione -

283, mentre la sequenza del gene *lacZ*, codificante per la β -galattosidasi si trova a valle del secondo sito *EcoRI*, in posizione -301,. Tale enzima scinde il lattosio, ed il derivato sintetico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil.D-galattopiranoside), il cui prodotto di ossidazione esibisce una colorazione blu brillante. L'inserzione di sequenze di DNA tra i due siti *EcoRI*, interrompe dunque la sequenza del gene reporter, dando come risultato la non espressione dello stesso gene e quindi colonie batteriche bianche. Lo screening quindi, in base alla colorazione di quest'ultime (bianco/blu), permette di potere identificare quelle contenenti il vettore in cui è avvenuta l'inserzione del frammento di interesse.

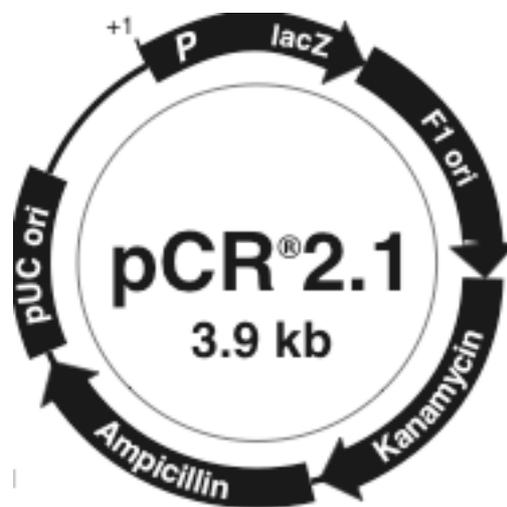


Figura 19 Plasmide pCR2.1

4.7.2 VETTORE p-CAMBIA

E' un vettore binario di 10 kB che viene utilizzato per consentire l'espressione di sequenze transgeniche in pianta (Figura 20). Contiene un polylinker con siti unici per gli enzimi di restrizione *XbaI*, *BglII*, *SallI*; *KpnI* e *SacI*, inserito fra la sequenza del promotore (35S) e la sequenza terminatrice della trascrizione del virus a mosaico del

cavolfiore. Contiene inoltre, all'interno del T-DNA, fra le sequenze Right Border (RB) e Left Border (LB), il gene per la resistenza all'igromicina per la selezione in pianta, anch'esso sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV.

Il gene per la resistenza all'antibiotico canamicina consente infine la selezione del plasmide nei batteri.

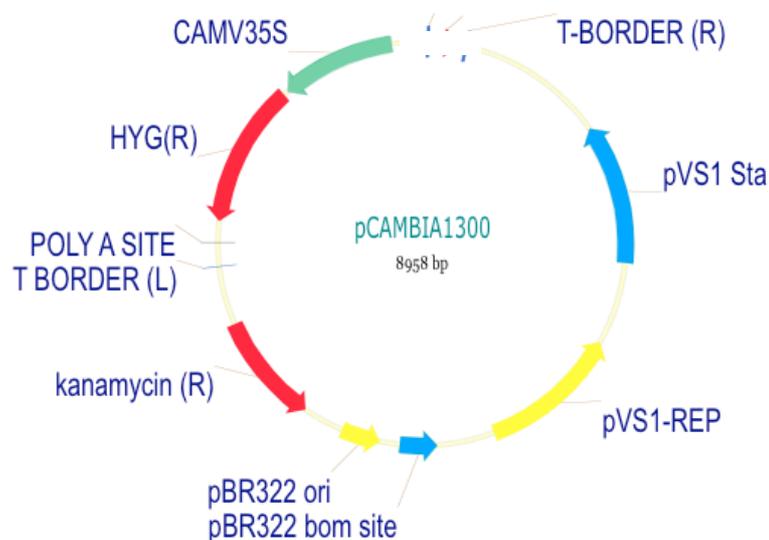


Figura 20 Vettore p-CAMBIA 1300

4.7.3 VETTORE pBI101

Vettore binario, disponibile in tre diverse versioni (pBI101.1-101.2-101.3), utilizzato per ottenere fusioni tradizionali con il gene reporter *gusA*. In esso è contenuta un'origine di replicazione; il gene che codifica per la resistenza all'antibiotico canamicina (NPT), sotto il controllo del promotore pNOS, per la selezione del plasmide nei batteri; un poli-linker, contenente siti unici per gli enzimi di restrizione,

in direzione 5'-3', *HindIII*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, le cui sequenze sono in tutti e tre i possibili registri di lettura rispetto alla regione della coding del gene *gusA*. A valle del poli-linker vi è la cassetta GUS, che una volta effettuati i clonaggi, sotto il controllo delle diverse sequenze clonate nel poli-linker. Successivo alla cassetta GUS, il gene che codifica per la resistenza all'antibiotico igromicina, posto quest'ultimo sotto il controllo di un promotore, costitutivamente espresso, il 35S, del virus del mosaico del tabacco così che la resistenza possa essere sempre espressa e usata per la selezione del tessuto trasformante di pianta.

Questo vettore è stato utilizzato per ottenere la fusione traduzionale tra la sequenza regolatrice di *GlnB* (800 bp) e il gene reporter, *gusA*.

Sequenze dei primers, utilizzati per effettuare la fusione traduzionale:

PII forw3-SalI

5'-GCGTCGACAAGCCCTGCGTAAGTAGTGAC-3'

PII-BamHI-gusfusion-Rev

5'-CGCGGATCCCATTGGAGCTTCGTTGAGCTG-3'

4.7.4 VETTORE pH7GWIWG2(I),0

Vettore binario (Gateway-Invitrogen) di 14 Kb (Fig. 21) che consente di ottenere costrutti interferiti, tramite la formazione di una struttura stem and loop in cui il gene di interesse è in entrambi gli orientamenti, spaziati da una sequenza intronica. All'interno del T-DNA, sotto il controllo del promotore 35S, vi sono, infatti due sequenze, in entrambi gli orientamenti, CmR-ccdb; l'una conferisce la resistenza al cloramfenicolo, l'altra è un selezionatore negativo che non permette, quando presente, la crescita di *E. coli*. Queste due sequenze sono fiancheggiate dai siti ATTR1 e ATTR2, spaziate da un introne. Tramite reazione di ricombinazione sito-

specifica tra tali siti (ATTR1- ATTR2) e quelli fiancheggianti la sequenza di interesse (ATTL1-ATTL2), è possibile clonare la sequenza negli orientamenti senso e antisenso; si avrà, così, la formazione dei siti ATTB1-ATTB2 ai lati delle due sequenze geniche inserite e la avvenuta ricombinazione permetterà dunque la crescita dei batteri, contenenti il plasmide.

Nel T-DNA, compreso tra il Right (RB) e il Left Border (LB), è inoltre contenuto il gene che conferisce la resistenza all'igromicina, sotto il controllo di un promotore costitutivamente espresso, il 35S, utilizzato per la selezione in pianta e il gene per la resistenza alla spectinomomicina per la selezione nei batteri.

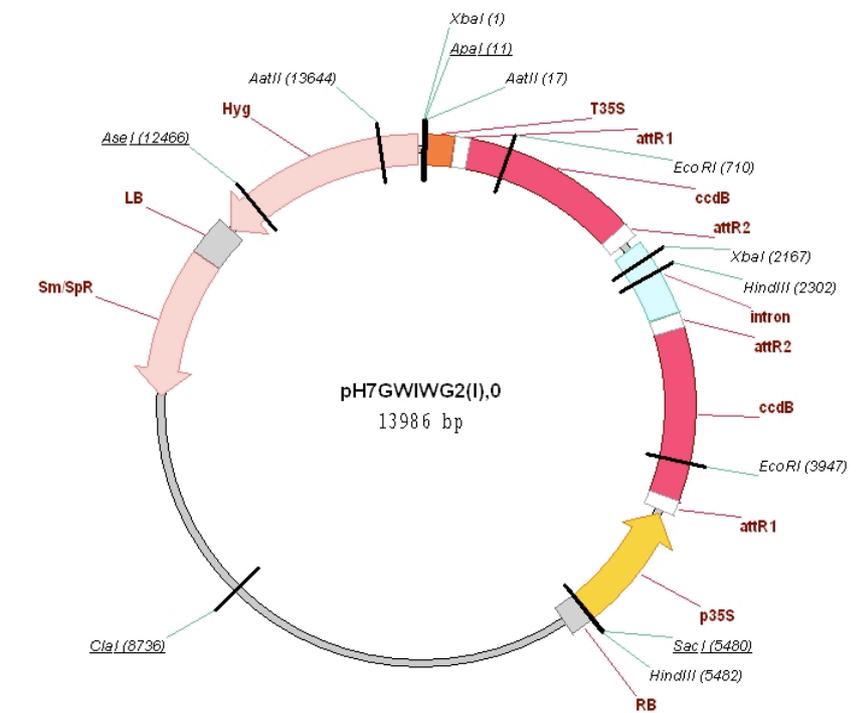


Figura 21 Vettore pH7GWIWG2(I),0

4.7.5 VETTORE p-DONR 207

Vettore di 5,5 Kb (Gateway-Invitrogen) (Fig. 22), contiene un'origine di replicazione pUC ori e i terminatori T1 e T2. Presenta la resistenza alla gentamicina,

per la selezione nei batteri. Al suo interno c'è il gene alla resistenza al cloramfenicolo, unitamente al gene *ccdB*, che non permette la crescita dei batteri quando trasformato in questi. Tali sequenze sono fiancheggiate dai siti *AttP1* e *AttP2*, che tramite ricombinazione sito specifica con siti omologi, permettono di inserire una sequenza genica di interesse, in luogo del Cm^{R} -*ccdB*.

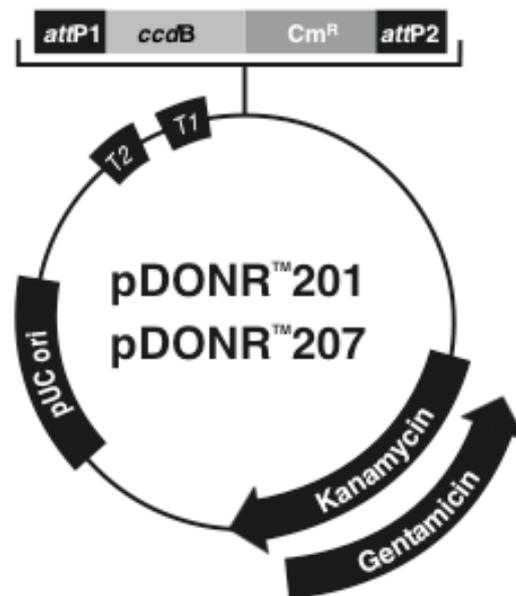


Figura 22 Vettore pDONR 207

4.7.6 VETTORE Beta-GFP

E' un vettore di espressione. Contiene il promotore del gene H^+ -ATPasi della membrana plasmatica (pm4) (Zhao et al., 1999) e il terminatore della nopalina sintetasi che controllano l'espressione della presequenza F1-beta-ATPasi legata alla Green Fluorescence Protein. La F1-beta-presequenza conferisce alla GFP localizzazione mitocondriale (Duby et al. 2001). Tra la B-presequenza e la GFP e a

valle di questa stessa ci sono due poli-linkers i cui siti possono essere usati per clonare specifiche sequenze geniche (Fig. 23).

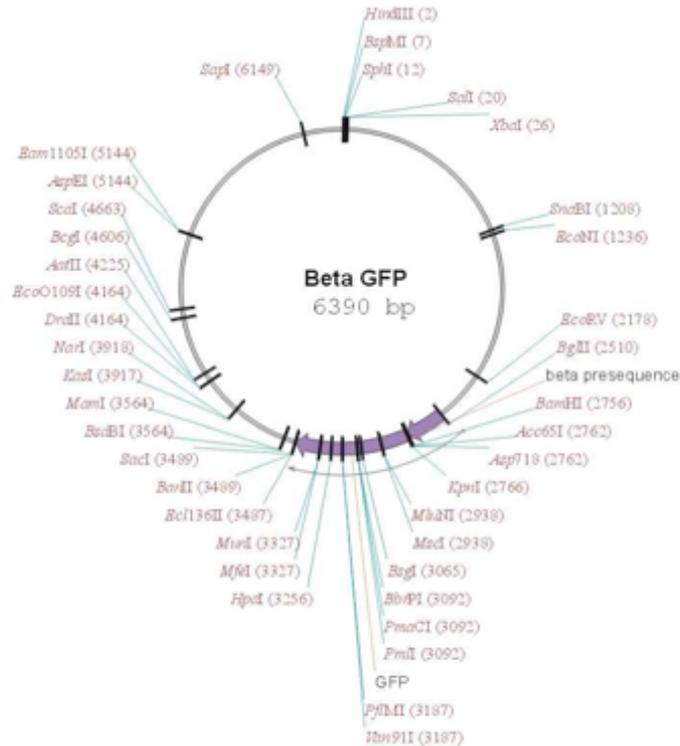


Figura 23 Vettore Beta-GFP

Tale vettore è stato utilizzato per ottenere la fusione tra GlnB e la GFP.

Sequenze dei primers:

PII-*KpnI* FORW 5'-GGGGTACCTACAGTAGATAATATGTCAGT-3'

PII-*BglIII* REV 5'-GAAGATCTATGGCGATTGCGAGAACGCAC-3'

AMT1;1-KpnI 5'-GCGGTACCTGACTCAGCACTAGGAGTGGA-3'

AMT1;1-BglIII 5'-GAAGATCTAGAATTATCTCCGGCCACTGG-3'

AMT1;2- KpnI 5'-GCGGTACCACAGTCATTGGCGGGCGGCGCT-3'

AMT1;2-BgIII 5'-GAAGATCTAACGGTTATTGGAGGGCCAC-3'

AMT1;3- KpnI 5'- GCGGTACCAACACGAATTTCCAAAGCTTT-3'

AMT1;3-BgIII 5'- GAAGATCTAGATTGCAAACAGGACATTGG-3'

4.7.7 VETTORE pCaMBIA1300:35S:AtrecA::DsRed

E' un vettore pCAMBIA 1300 (vedi paragrafo) in cui al posto della resistenza all'igromicina è stato inserito, sotto il controllo del 35S, la Red Fluorescence Protein (RFP) e l'AtrecA che è il peptide che conferisce alla RFP la localizzazione all'interno del cloroplasto. Il terminatore è quello della nopalina sintetasi (NOS-T) (Fig. 24).

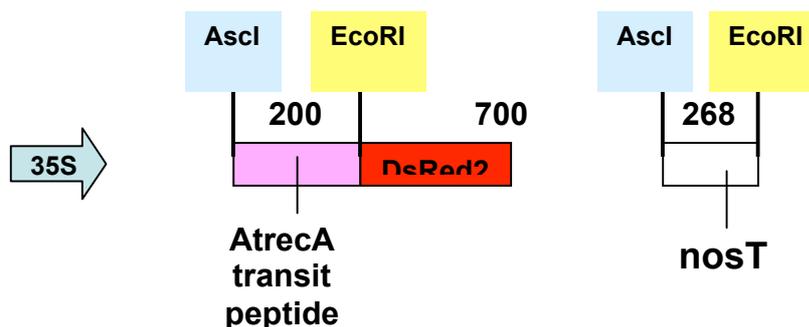


Figura 24 Vettore pCaMBIA1300:35S:AtrecA::DsRed

4.8 GATEWAY TECHNOLOGY

La tecnologia del Gateway (Invitrogen), permette di ottenere costrutti interferiti per uno specifico gene in diversi steps, grazie a reazioni di ricombinazione sito-specifica (BP e LR reaction) in particolari vettori. Tramite questa tecnica sono stati ottenuti i

costrutti interference per i trasportatori dell'ammonio *LjAMT1*;1-1;2-1;3. Le sequenze di interesse sono state amplificate tramite reazione di PCR con primers complementari al gene e a cui sono stati aggiunte la sequenza AttB1 e AttB2 al primer forward e al reverse rispettivamente. L'amplicone, così ottenuto, era fiancheggiato al 5' dalla sequenza AttB1 e al 3' dalla AttB2. Queste sequenze sono omologhe alle AttP1 e AttP2, presenti nel vettore accettore (pDONR 207), per semplice ricombinazione tra i siti è stata quindi inserita la sequenza genica. Tale ricombinazione è stata ottenuta con la BP clonase (Invitrogen) e il vettore risultante, denominato entry clone, contiene la sequenza di interesse e fiancheggiata dai siti ricombinati, AttL1 e AttL2.

L'entry clone può essere ulteriormente ricombinato con un Destination vector (pH7GWIWG2(I) che contiene i siti di ricombinazione AttR1 e AttR2, tramite reazione della LR clonase (Invitrogen). Dalla ricombinazione i siti, fiancheggianti la sequenza genica inserita, diventano AttB1 e AttB2 (Fig. 25)

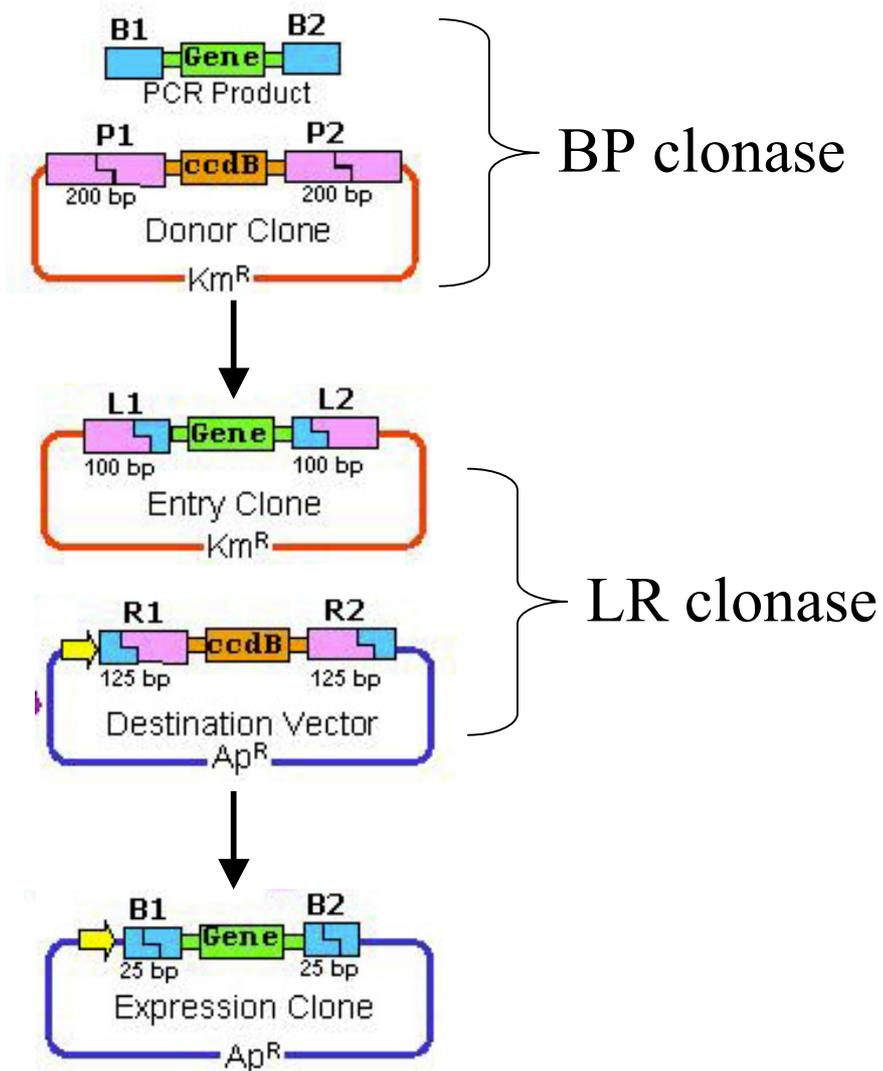


Figura 25 Schematizzazione del Gateway

Le sequenze dei primers utilizzate per amplificare i tre trasportatori sono:

AttB1-Amt1;1-For

5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATACGGGTTGTTTCATGGGT-3'

AttB2-Amt1;1-Rev

5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGGAGTGAAGAAGAGTTA-3'

AttB1-Amt1;2-For

5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGTAGATATTGGTGGTGTGT-3'

AttB2-Amt1;2-Rev

5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCATGGTGGAGGGAGAACT-3'

AttB1-Amt1;3-For

5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGTGTTTGCTAAGAAGCAGTA-3'

AttB2-Amt1;3-Rev

5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGAAGAGTCTTATAGTAGTTC-3'

4.9 REAL TIME RT-PCR

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (RTq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea dell'espressione genica. Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi e dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione si basano sull'analisi di fluorescenza, che può essere dovuta all'uso di coloranti che si intercalano con il DNA amplificato a doppio-filamento (ds) o ad oligonucleotidi modificati che diventano fluorescenti una volta ibridati con un DNA.

4.9.1 SAGGIO QUANTITATIVO CON LA PCR Real-time

Similmente alle reazioni di PCR, sono richiesti diversi passaggi per sviluppare un'analisi quantitativa di PCR. Questi includono: la produzione di templati puliti; la progettazione di primers; l'ottimizzazione degli stati di reazione. In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione. Siccome sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli

finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo della soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare.

La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti permettono agli utenti di generare delle curve di melting che seguono il completamento della PCR. Le curve di melting forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri dei primers.

4.9.2 QUANTIFICAZIONE

I prodotti di PCR possono essere quantificati generando una retta standard o essere quantificati rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. Il metodo della quantificazione relativa richiede la quantificazione di geni di controllo o house-keeping per normalizzare l'espressione del gene studiato. Tuttavia, la selezione dei geni di controllo adatti può causare problemi poiché possono non essere espressi ugualmente attraverso tutti i campioni.

Gli esperimenti di Real Time PCR sono stati condotti utilizzando il sistema DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, Boston). Per monitorare la sintesi del DNA doppia elica è stato utilizzato come fluorescente il SYBR Green (Finnenzyme), come standard interno è stato utilizzato il kit dell'Ambion, 18S Ribosomal RNA Primers-Competimers in rapporto di 1:9. Per ogni reazione sono state fatte due repliche, il programma usato prevede una denaturazione a 95°C per 13' e poi per 35 cicli una denaturazione a 95°C per 20'', annealing a 60°C per 15'', polimerizzazione a 72°C per 15''.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Opticon Monitor Analysis versione 2.01 (MJ Resaerch). Il relativo livello di espressione è stato calcolato secondo la formula del rapporto tra il relativo livello di espressione del gene di interesse e di quello di controllo, $2^{-\Delta CT}$, con $\Delta CT = C_{t \text{ gene}} - C_{t18s}$. Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per amplificare i geni specifici sono state disegnate nella regione carbossi-terminale, quella meno conservata, utilizzando il programma PRIMER3.

4.10 ESTRAZIONE DI RNA DA TESSUTO VEGETALE

I tessuti prelevati (circa 0,2- 0,3 gr) dalla pianta di *Lotus* vengono immediatamente congelati in azoto liquido e ridotti in polvere mediante schiacciamento nel tissue lyser (QIAGEN). Alla polvere vengono aggiunti 550 μ l di una soluzione di lisi contenente: 2% CTAB, 2% polyvinylpirrolydone (MW 360,000), 100 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 2M NaCl, 0,05% DEPC; a cui viene aggiunto prima dell'uso beta-mercaptoetanol al 2% finale. A questo punto vengono fatte due estrazioni con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (24:24:1); l'RNA contenuto nella soluzione, viene precipitato dopo l'aggiunta di un volume di isopropanolo, per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo una centrifugazione di 20 minuti a 14.000 rpm, il pellet ottenuto, viene lavato con etanolo 70%, asciugato e risospeso in acqua con l'aggiunta DEPC 0,005% (Matamoros *et al.*).

Per rimuovere contaminazioni da DNA dagli RNA preparati, è stato utilizzato un kit dell'Ambion DNA-free.

L'RNA totale ottenuto dall'estrazione viene successivamente utilizzato per la sintesi del cDNA. Il Kit dell'Ambion utilizzato prevede una prima fase di incubazione a 75°C di 3' per denaturare l'RNA in una soluzione contenente anche i random primers (50 μ M concentrazione finale) e la miscela di dNTPs (2,5 mM concentrazione finale ognuno). Successivamente vengono aggiunti gli altri componenti; RT Buffer (10x) RNase Inhibitor e l'enzima M-MLVRT (100 unità). La reazione di retrotrascrizione avviene a 42°C per un'ora.

4.11.1 ELETTROFORESI E TRASFERIMENTO DI RNA A BASSO PESO MOLECOLARE SU FILTRI DI NYLON NORTHERN BLOT (LMW)

Per effettuare il Northern blot per bassi pesi molecolari di RNA, si parte da una quantità di circa 15 µg di RNA totale. A questo è stato aggiunto un volume di Formammide 100% ed è stato denaturato a 95°C per cinque minuti e posto poi in ghiaccio per altri cinque minuti. Dopo una rapida spinnata, è stato aggiunto al campione 1/4 del volume di tampone di corsa, costituito da 50% glicerolo, 50mM Tris, pH 7,7, 5mM EDTA, 0,03% di Blue di Bromofenolo. I campioni sono poi stati caricati su gel di acrilammide 40%, effettuando una pre-corsa a 100V per 30 minuti e poi a 80V per 4 ore circa in TBE 0,5X.

Il trasferimento sulla membrana è stato effettuato a 4°C per 1 ora ad 80V-300mA.

Dopo il trasferimento la membrana è stata posta in SSC 2X per 10 minuti ed è stato effettuato il cross-link dell'RNA tramite raggi U. V.

La membrana è stata quindi pre-ibridata con 20 ml di tampone di ibridizzazione (Sigma) per 20 minuti a 42°C nel tubo di ibridazione, in costante movimento.

La sonda è stata poi inserita nel tubo, contenente il tampone di ibridazione ed è stato incubato a 42°C per tutta la notte.

La membrana è stata poi lavata due volte per 20 minuti a 50°C con una soluzione di SSC 2X e SDS 2%.

4.11.2 ELETTROFORESI E TRASFERIMENTO DI RNA AD ALTO PESO MOLECOLARE SU FILTRI DI NYLON, NORTHERN BLOT (HMW)

I campioni (15 µg di RNA), dopo essere stati incubati a 65°C per dieci minuti, sono stati caricati su un gel di agarosio all'1% , HEPES 10X, pH 7,8, Formaldeide. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 80V per circa 4 ore. Successivamente è stato effettuato il trasferimento degli RNA dal gel ad un filtro di nylon (nucleobond), per potere essere ibridati con un'opportuna sonda radioattiva. il gel viene posto su di un supporto di vetro, situato all'interno di una vaschetta contenente SSC 20x ed è posto

a contatto con tale soluzione tramite un ponte di carta Whatman 3 MM. Sul gel viene adagiato il filtro, 4 fogli di carta Whatman 3 MM (3 bagnati con SSC 20x e 1 asciutto), una pila di carta assorbente e un piccolo peso. La soluzione di SSC sale per capillarità, sfruttando il gradiente idrico, dalla vaschetta alla carta assorbente, trasferendo l'RNA dal gel al filtro per tutta la notte. Il filtro viene poi asciugato l'RNA fissato tramite U. V. .

4.11. 3 PREPARAZIONE DELLA SONDA

La sonda è stata preparata per Random Priming (Promega). Le sequenze che fungono da sonda sono state utilizzate ad una concentrazione compresa tra 100 e 150 ng. Queste sono state denaturate a 95°C per 5 minuti e successivamente poste in ghiaccio per altrettanto tempo. A queste se è stata aggiunta una miscela di dNTPs, 10µ di tampone, 2 µl di BSA, 5µl dCTP* e 1 µl di Klenow DNA pol I e incubate per un'ora a 37°C. Per eliminare gli oligo che non si sono incorporati e la radioattività in eccesso, è stata usata una colonna sephadex. Le sonde, così preparate sono state deaturate a 95°C per 2 minuti.

4.12 SAGGIO ISTOCHIMICO DELLA β-GLUCURONIDASI

Il gene *gusA*, isolato da *E. coli* (Jefferson et al., 1986), codifica per una proteina, la β -glucuronidasi, in grado di idrolizzare i legami β -glicosidici. Il gene è molto spesso usato come gene reporter, per la facilità con la quale l'attività della proteina può essere rilevata. La caratterizzazione di sequenze promotrici, clonate a monte del gene *gusA*, può essere fatta rivelando l'attività enzimatica di *gusA* con un saggio istochimico. In presenza di un substrato artificiale, quale l'X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -glucuronide), la reazione di idrolisi proteica produce, attraverso un intermedio instabile, un precipitato blu insolubile, il dicloro-dibromo indigo, che immediatamente precipita. Questo permette una precisa localizzazione dell'attività

promotrice. Altri vantaggi del sistema sono la velocità del saggio, la mancanza di un'attività endogena dell'enzima, quindi un basso rumore di fondo, e la notevole sensibilità (Jefferson et al., 1987).

La colorazione GUS è stata fatta immergendo il materiale in una soluzione 1,1 M del tampone Na_3PO_4 pH 7,2 0.1% di triton 100x per permeabilizzare i tessuti, e 1 mM di X-gluc; si lascia per 10 minuti sotto vuoto per permettere l'ingresso del substrato e poi a 37°C per il tempo necessario allo sviluppo della colorazione.

4.13 ESTRAZIONE DELLE CLOROFILLE

Per una migliore visualizzazione della colorazione nelle foglie, queste sono state lavate con tampone Na_3PO_4 50mM e allontanate le clorofilla con etanolo 70%, cambiando più volte la soluzione. Lavate nuovamente con tampone fosfato, le foglie sono state analizzate al microscopio ottico.

5.1 LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DELLE PROTEINE AMT1

Nell'ambito di un approccio di caratterizzazione funzionale di un gene o di una famiglia genica, un'informazione che può essere estremamente preziosa, per ipotizzare possibili ruoli e meccanismi di azione, è rappresentata dalla localizzazione a livello subcellulare delle proteine codificate. La famiglia genica in questione è quella dei trasportatori dell'ammonio ad alta affinità *LjAMT1* di cui erano precedentemente state isolate le sequenze (D'Apuzzo *et al.* 2004). *LjAMT1;1*, *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* erano stati caratterizzati dal punto di vista dell'espressione nei diversi organi e tessuti della pianta, permettendo di ipotizzare differenti livelli di coinvolgimento dei membri della famiglia AMT1 nel metabolismo azotato (D'Apuzzo *et al.*, 2004).

Allo scopo di approfondire il livello di caratterizzazione della famiglia genica AMT1 di *Lotus japonicus* e, in particolare per potere comprendere meglio il ruolo, giocato da questi, nel trasporto dell'ammonio e nei flussi azotati all'interno della pianta, ho effettuato una fusione traduzionale tra i singoli geni AMT1 e il marcatore della Green Fluorescent Protein (GFP). Tale approccio permette, di potere analizzare la localizzazione delle proteine *in vivo* a livello sub-cellulare.

Le sequenze codificanti dei tre trasportatori *LjAMT1;1*, *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* sono state isolate e fuse alla GFP all'interno del vettore β -GFP (vedi Materiali e Metodi: Duby *et al.* 2001). Gli studi di predizione e le recenti purificazioni dei cristalli delle proteine AMT (Von Wirèn *et al.* 2000; Zheng *et al.* 2004 Khademi. *et al.* 2004) hanno indicato una struttura compatibile con quelle di proteine di membrana, con una estremità N-terminale periplasmatica ed una C-terminale citoplasmatica. Era quindi evidente che il tipo di costrutto più informativo sarebbe stato quello in cui era l'estremità C-terminale delle proteine AMT1, ad essere fusa alla GFP. La sequenza della fusione ottenuta è stata analizzata per verificare la precisione del sub-clonaggio e quindi la conservazione del registro di lettura fra le due proteine. Successivamente, le cassette AMT1-GFP sono state sub-clonate nel

vettore di espressione binario p-CAMBIA 1300 (vedi Materiali e Metodi), sotto il controllo di un forte promotore di pianta, costitutivamente espresso, il CAMV35S (Cauliflower Mosaic Virus) e di un terminatore trascrizionale tNOS (terminatore della *nopalina sintasi* di *Agrobacterium*).

La procedura di trasformazione e rigenerazione *in vitro*, mediata da *Agrobacterium tumefaciens*, basata su una embriogenesi somatica indiretta (che passa attraverso la selezione di un callo tumorale de-differenziato transgenico) è piuttosto lunga e laboriosa e richiede dai quattro ai cinque mesi per ottenere dei trasformanti primari. Dati i lunghi tempi di attesa, quindi, le tre fusioni AMT1-GFP sono state inserite nel ceppo di *Agrobacterium rhizogenes*, MSU440 (Tirichine *et al.* 2007) Questo tipo di trasformazione mediata da *A. rhizogenes*, permette un'analisi dei costrutti in tempi più brevi, circa ventuno giorni. Tale metodica, a partire da piante wild type, permette di ottenere piante composite, vale a dire piante che hanno la porzione aerea selvatica e l'apparato radicale transgenico (hairy roots; vedi Materiali e metodi, paragrafo 4.4).

L'analisi al microscopio confocale mostra una chiara localizzazione delle fusioni AMT1;1-GFP e AMT1;3-GFP sulla membrana plasmatica delle cellule della radice (Fig. 26). Questo indica che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, le proteine AMT1;1 e 1;3 entrano correttamente nel pathway di secrezione e sono veicolate a partire dal reticolo endoplasmico al loro sito bersaglio rappresentato dalla membrana plasmatica. Questo tipo di localizzazione è anche in accordo con la presenza in entrambe queste proteine di segnali peptidi localizzati nelle vicinanze dell'estremità N-terminale (fra i residui in posizione 23-24 per AMT1;1 e 26-27 per AMT1;3; D'Apuzzo *et al.* 2004).

Per quanto riguarda la fusione *Lj*AMT1;2-GFP, non è stato ottenuto un chiaro risultato data la presenza di un segnale di fluorescenza diffuso. Ciò è improbabile che sia dovuto ad artefatti di clonaggio, essendo state conservate per tutte e tre le fusioni le medesime caratteristiche, e potrebbe essere legato ad un percorso diverso e/o ad un

turnover diverso di questa proteina nell'ambito del pathway di secrezione delle proteine di membrana.

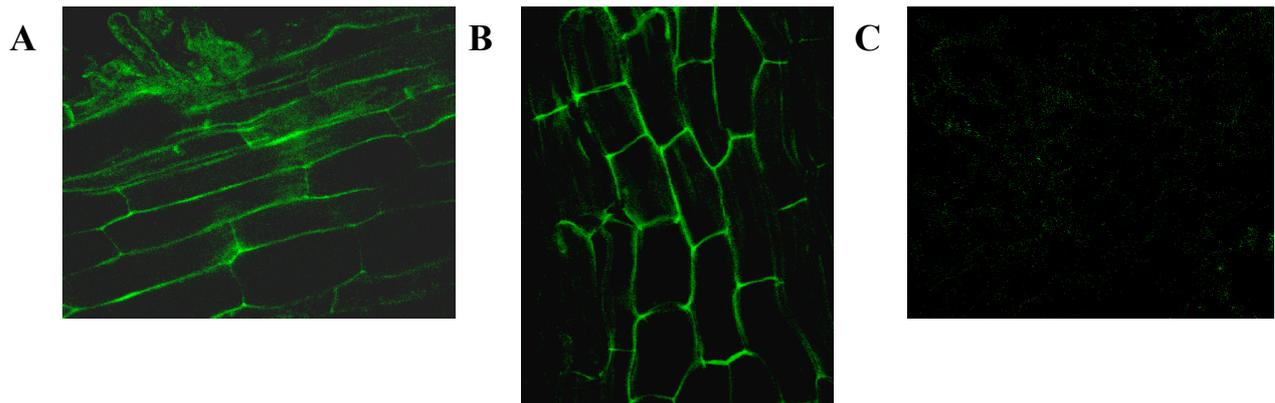


Figura 26. Analisi al confocale di radici trasgeniche, contenenti le fusioni *LjAMT-GFP*

A, fusione *LjAMT1;1-GFP* **B**, fusione *LjAMT1;3* **C**, controllo wild type

Il sistema sperimentale hairy roots, presenta comunque dei limiti nel tipo di analisi consentita, *in primis*, non permette di valutare l'espressione del trasgene in tutto l'organismo, *in secundis*, le radici di una singola pianta che si vengono a formare, sono il frutto di eventi indipendenti di trasformazione che determinano la formazione di un sistema radicale chimerico composto da radici non trasformate e radici contenenti una o più copie del T-DNA specifico. I dati che si ottengono da questo tipo di analisi, devono quindi essere preferenzialmente validati dall'analisi dei trasformanti stabili in cui il T-DNA è trasmesso alle generazioni successive. I trasformanti stabili rappresentano inoltre un materiale più versatile e manipolabile su cui andare a verificare per esempio, la localizzazione proteica durante varie fasi dello sviluppo ed in varie condizioni sperimentali. I plasmidi con le fusioni sono stati elettroporati nel ceppo di *A. tumefaciens* AGL1 e quindi utilizzate per trasformare

stabilmente espianti radicali di piante wild type di *L. japonicus* (Lombardi *et al.* 2005; Barbulova *et al.* 2007). I trasformanti primari per tutte e tre le fusioni sono stati ottenuti e trasferiti *in vivo* per la propagazione e l'ottenimento della generazione successiva (T1) da analizzare.

Al momento sono state ottenute quattro, tre e due linee transgeniche contenenti le fusioni *LjAMT1;1-GFP*, *LjAMT1;2-GFP* e *LjAMT1;3-GFP* rispettivamente. Per queste, al momento, è stata analizzata la segregazione del fenotipo igromicina resistenza nella generazione T1 (Tabella 1).

<i>Lj</i> AMT1;1-GFP Linee transgeniche	Resistenza all'igromicina R/S
1;1-15	6/19
1;1-43	10/12
1;1-45	4/24
1;1-48	16/8

<i>Lj</i> AMT1;2-GFP Linee transgeniche	Resistenza all'igromicina R/S
1;2-8	19/9
1;2-205	20/9
1;2-206	22/4

<i>Lj</i> AMT1;3-GFP Linee transgeniche	Resistenza all'igromicina R/S
1;3-1	8/12
1;3-2	11/18

Tabella 1. Analisi della segregazione del fenotipo igromicina resistenza nella T1 delle linee *Lj*AMT1-GFP

5.2 RNA-INTERFERENCE: MECCANISMI GENERALI

L'uso dell'RNA per ridurre l'espressione genica nelle piante, è una procedura comunemente usata da molti anni. RNA antisenso a singolo filamento venivano introdotti nelle cellule vegetali dove si appaiano con l'RNA messaggero a singolo filamento ad esso complementare; l'RNA a doppio filamento a sua volta avvia il meccanismo dell'interferenza. L'uso dell'RNA a doppio filamento è diventato più diffuso dopo la scoperta del meccanismo molecolare dell'RNA-i, inizialmente in petunia e poi in *C. elegans*.

L'RNAi è diverso dagli altri sistemi di silenziamento genetico, in *C. elegans*, ad esempio si è visto che è in grado di diffondere da cellula a cellula ed è inoltre ereditabile. Questo è stato osservato anche in pianta dove viene indotto, a differenza che in *C. elegans*, da costrutti a T-DNA, stabilmente integrati nel genoma, in grado di guidare l'espressione dell'RNA a doppio filamento. In ambito vegetale l'RNA-i è una tecnica molto utilizzata che consente di ottenere il silenziamento di geni bersaglio con un'alta percentuale di successo.

L'RNA-i è un processo specifico e, sebbene, non tutti i dettagli del meccanismo siano stati chiariti, questo è mediato dal RNA-i machinery che, una volta individuato una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA), è in grado di avviare il meccanismo che porta al silenziamento genico. Innanzitutto, l'enzima DICER1 taglia la molecola di dsRNA bersaglio in frammenti della lunghezza di 21-24 coppie di basi; questi frammenti, detti si-RNAs (short interfering RNA) si associano al complesso enzimatico, denominato RISC (RNA Interference Silencing Complex). Il dsRNA viene aperto, probabilmente da un'elicasi e solo il filamento di RNA antisenso rimane associato al RISC mentre il filamento senso viene degradato. In questo modo la RISC viene attivata e diviene in grado di scansare molti m-RNA presenti nel citoplasma fino a trovarne uno complementare al frammento di RNA antisenso associato al complesso stesso. Se l'appaiamento tra si-RNA e m-RNA è perfetto o

quasi, una componente della RISC, detta ARGONAUTE, è in grado di operare un taglio sull'm-RNA. Il frammento di m-RNA risultante, privo di CAP al 5', viene così rapidamente degradato dalle RNAsi endogene. Se l'appaiamento invece non è perfetto, la RISC sembra comunque in grado di inibire la trascrizione del gene (Fig. 27). Sebbene il meccanismo di questo secondo evento non sia chiaro, sembra che possa essere più diffuso negli animali.

L'RNA-i è un meccanismo endogeno molto importante per la regolazione dell'espressione genica ed è stato osservato che certe regioni genomiche codificano per alcune brevi molecole di RNA-i, i micro-RNA, in grado di ripiegarsi a formare una forcina (si parla, in questo caso, di short hairpin RNA, shRNA). Quando gli enzimi dell'RNA-i individuano tali molecole, le processano, come precedentemente detto e quindi, sono in grado di portare alla degradazione degli m-RNA complementari, presenti nel citoplasma. La riduzione della presenza degli m-RNA ha, come ovvia conseguenza, il calo di sintesi della proteina da essi codificata. Questo meccanismo è stato inizialmente individuato in *Arabidopsis thaliana* per la regolazione di alcuni geni che regolano la forma e lo sviluppo della pianta. In seguito sono stati individuati numerosi altri micro-RNA dal meccanismo simile in numerosi organismi eucarioti (più di 300).

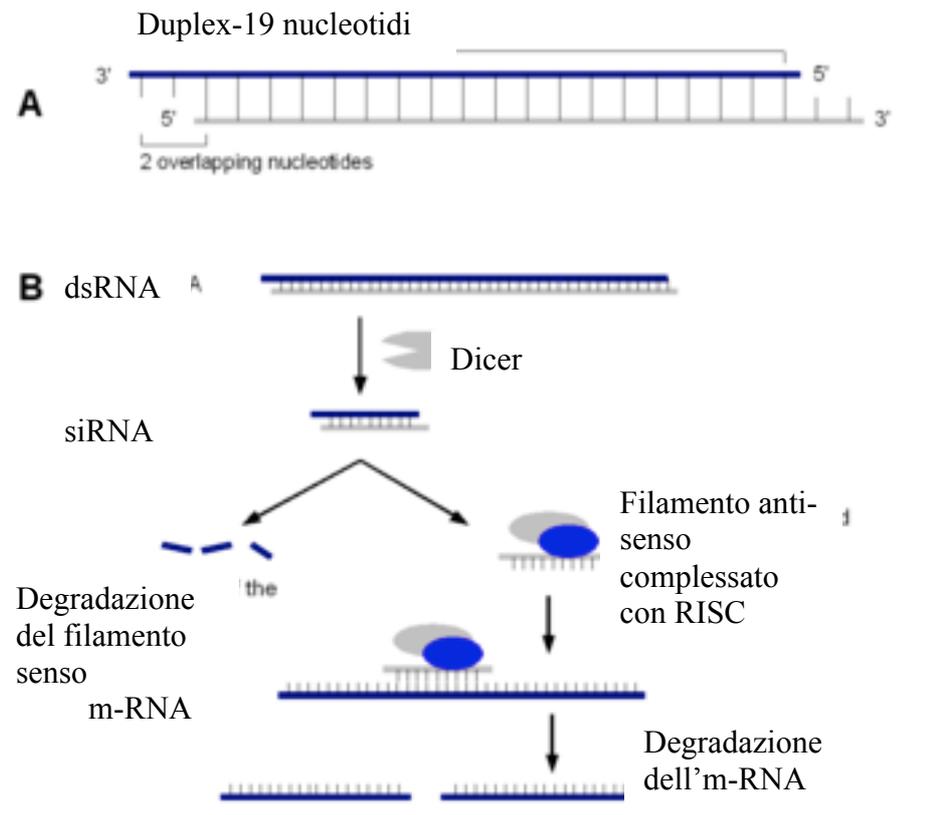


Figura 27. Schematizzazione del processo di RNA-interference

A, molecola di RNA a doppia elica (dsRNA); **B**, attacco del dsRNA da parte delle Dicer e successivo taglio con formazione di corte sequenze di RNA a doppio filamento di 21-24 coppie di basi (siRNA); degradazione del filamento senso, legame del filamento anti-senso con il complesso RISC e degradazione dell'm-RNA endogeno.

5.2.1 STRATEGIA PER IL SILENZIAMENTO DELL'INTERA FAMIGLIA *LjAMT1*

I trasportatori dell'ammonio in *Lotus japonicus* sono proteine di membrana ad alta affinità; i geni codificanti hanno diversi livelli di espressione nei maggiori organi della pianta, che lasciano presupporre diversi ruoli nel trasporto dell'ammonio. I trasportatori sono anche espressi nel nodulo, organo che si forma in seguito alla simbiosi che la leguminosa *Lotus* instaura con il batterio azoto-fissatore *Mesorhizobium loti* (D'Apuzzo *et al.* 2004).

Per potere effettuare, dunque, un'analisi più approfondita ed ottenere una maggiore caratterizzazione dei trasportatori di *Lotus japonicus*, cercando di comprendere meglio il ruolo svolto da questi nel trasporto dell'ammonio e nel generale flusso azotato della pianta e investigare inoltre il loro potenziale coinvolgimento nella regolazione dei diversi stadi del processo simbiotico, mi sono avvalsa della tecnica dell'RNA interference.

I trasportatori dell'ammonio, come noto dalla letteratura, agiscono in maniera sinergica. Nel mutante *knock-out* per *AtAMT1;1* di *A. thaliana* si ha, ad esempio, un innalzamento dei livelli trascrizionali di altri due trasportatori *AtAMT1;2* e *AtAMT1;3*, che compensano, almeno in parte l'effetto della mancanza di *AtAMT1;1* (Kaiser *et al.* 2002). Come conseguenza, si assiste, ad una diminuzione del trasporto dell'ammonio dall'esterno all'interno della pianta solo del 30%. Pertanto, per potere avere una visione globale sul ruolo dei trasportatori e a livello del fenotipo simbiotico e a livello del fenotipo di crescita, ho deciso di seguire una strategia per il silenziamento di tutti e tre i trasportatori contemporaneamente. La sequenza, in grado di interferire tutti i tre geni *LjAMT1*, è stata scelta sulla base dell'allineamento delle sequenze codificanti dei tre geni ottenuto con il programma ClustalW. I trasportatori *LjAMT1;1*, *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* appartengono ad un'unica superfamiglia, AMT1 e mostrano una elevata identità amminoacidica con i membri della stessa oltre che tra di loro, tale identità si aggira, infatti, intorno al 60-80%. L'allineamento mi ha permesso di individuare all'estremità C-terminale, una regione con un'alta identità nucleotidica, e che allo stesso tempo marcasse specificamente la famiglia degli AMT1 (Fig. 28).

Per potere ottenere il costrutto interference mi sono avvalsa della tecnologia "Gateway". La sequenza amplificata per RT-PCR è stata clonata nel vettore pDONR (Invitrogen) (vedi Materiali e metodi, paragrafo 4.8.4) e successivamente sub-clonata nel pH7GWIWG2(I) (Invitrogen) (vedi Materiali e metodi, paragrafo 4.8.5). Questo permette di inserire la sequenza di interesse in entrambi gli orientamenti (senso e antisenso) separati da una intervening sequence (un introne di *Oryza sativa*), sotto il

controllo del promotore costitutivo 35S. L'espressione di questa cassetta consente la formazione di RNA con una struttura a forcina, dovuta all'appaiamento delle sequenze senso e antisense. In questo modo, una volta espresso in pianta il dsRNA viene riconosciuto e tagliato specificamente dalle Dicer, dando quindi inizio al processo che porta al silenziamento del(i) gene(i) di interesse (vedi paragrafo 5.2).

```

LjAmt1.2      ---ATGGCTTCTCTCTTGTCTCAGCCACAGACCTCGCTCCACTCTTAACCGCCACAACC
LjAmt1.3      ATGGCTGCGGCGTTCACTTGTCTGCGCGGACCTCCACCCTTCTTGGGCACCGGGGCT
LjAmt1.1      ATGGCGGCGCTGCCGGAGTGTCTGCGCGGCGAACCTAGCGCAGCTCATCGGCCCAACGCG
      .  **          .  ***** ** . * .****. . * . ** * . * ** . *

LjAmt1.2      AACGCAACCGCAACCGCGCCGCCACCTACCTCTGCAACCAGCTCGATAACAATCTCCAGG
LjAmt1.3      AATGCTACGGCGGCGGCAGAG-----TTCATTTGTTCCCGGTTGGTGCCATCTCGAAC
LjAmt1.1      ACAGACGCGCGCGCAGTCGCGG---GATTTCATCTGCGACCAAGTTCACCGCGTGGGTCAA
      * . * . * ** . * * . * .          * : * . * ** . ** . * * . . * . * . .

LjAmt1.2      AAGCTCAGCGACACCACCTATGCCGTTGACAACACCTACCTCCTCTTCTCAGCTTATCTA
LjAmt1.3      AAGTTCAGTACACCGCCTACGCCGTTGACAACACCTACCTCCTGTTCTCTGCTTACCTC
LjAmt1.1      CGATTCTCGACACAGCATTGCGGTTGACAGCACCTACCTCCTCTTCTCCGCTACCTC
      . . . ** : . ***** . * . * : ** ** ***** .***** * ***** ** ** ** .

LjAmt1.2      GTCTTCGCCATGCGCTCGGTTTTGCCATGCTCTGCGCCGGCTCCGTCCGAGCCAAAAAC
LjAmt1.3      GTCTTCGCCATGCGCTCGGTTTTGCCATGCTCTGCGCCGGTCCGTCCGTGCCAAGAAC
LjAmt1.1      GTATTCTCGATGCGCTCGGCTTCCGCATGCTCTGCGCCGGTCCGTCCGCGCCAAAAAC
      ** .*** * ***** ** ** ***** ***** ***** ***** .***

LjAmt1.2      ACCATGAACATCATGCTAACCAATGTTCTTGATGCGAGCCGGCGGCCTATCCTACTAC
LjAmt1.3      ACCATGAACATCATGCTCACCAACGTTCTTGATGCCGCCACCGTGGCATCTTCTTCTAC
LjAmt1.1      ACCATGAACATCATGCTCACCAACGTTCTGACGCGCGCCGGCGGCCTCTTCTACTAT
      ***** .***** ** ** ** ** ** ** .** .**** ** . * * ** :***

LjAmt1.2      CTCTTCGGCTTCGCGTTGCGCCTTCGGAGCCCCCTCCAACGGGTTTCATCGGCCGCCACTTC
LjAmt1.3      ATCTTCGGTTTTGCGCTTGGCCTTTGGCACCCCATCAAATGGTTTCATCGGGGAGCACTTC
LjAmt1.1      CTCTTCGGTTTTGCGCCTTTCGGCGCACCCCTCCAACGGGTTTCATCGGCCGCCACTTC
      .***** ***** ** ***** ** . * .** .** .** ** ***** . . *****

LjAmt1.2      TTCGGCCTCAAACACTACCCTTCGCCACCTACGACTACAGCTTCTTCCCTCTACCAAGTGG
LjAmt1.3      TTTGGTCTCAACGAGTTTCCCTTCCCTTCTTTTGACTATGGATTCTTTCTTTATCAGTGG
LjAmt1.1      TTCGGCCTCAAAGACGTCCCCACCGTAGCCTTCGACTACAGCTACTTCTCTACCAAGTGG
      ** ** ***** . * : ** : *          * * : ***** . * . * :*** ** ** *****

LjAmt1.2      GCCTTCGCCATCGCCGCTGCGGGAATCACCAGCGGCTCCATCGCCGAGAGGACACAATTC
LjAmt1.3      GCTTTTCGCCATCGCCGCTGCGGGGATTACCAGTGGTTTCGATTGCAGAGAGGACTCAGTTT
LjAmt1.1      GCGTTTGCATCGCCGCGCGGGATCACCAGCGGCTCAATCGCTGAACGCACACAGTTC
      ** ** ***** ** ** .** ***** ** ** ** ** ** ** ** . * * ** :*** **

```

Figura 28. Allineamento multiplo delle sequenze nucleotidiche di *LjAMT1;1*, *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*

In rosso è evidenziata la regione all'estremità C-terminale, utilizzata per interferire tutti e tre i trasportatori contemporaneamente. Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalW.

Il costrutto ottenuto, *LjAMT-Com-RNA-i*, è stato quindi sequenziato per verificarne l'integrità, elettroporato in *Agrobacterium tumefaciens* (AGL0) e successivamente utilizzato per ottenere trasformanti stabili di *L. japonicus*.

5.2.2 ANALISI DEL FENOTIPO SIMBIOTICO IN HAIRY ROOTS

Anche in questo caso, il costrutto interferito è stato dapprima utilizzato per l'analisi fenotipica nell'apparato radicale di piante composite ottenute, come precedentemente descritto (Materiali e metodi, paragrafo 4.4), tramite trasformazione di piante wild type con il ceppo *Agrobacterium rhizogenes* (MSU440). In particolare, in questo modo ho analizzato l'effetto dell'interferenza in relazione al fenotipo simbiotico.

Ho quindi effettuato una trasformazione di dieci piante, e, una volta ottenuto il sistema radicale transgenico, queste sono state trasferite su mezzo Jensen, privo di azoto, per una decina di giorni, tempo sufficiente perché le piante riacquisiscano la competenza all'interazione simbiotica. Successivamente le piante composite sono state infettate con *Mesorhizobium loti*, partner simbiotico di *Lotus*.

A tre settimane dall'infezione, ho effettuato un'analisi del fenotipo simbiotico. Il numero di noduli presente sulle radici transgeniche di tutte le piante era comparabile a quello di radici trasformate con un costrutto controllo (cinque/sei noduli per radice) e inoltre la morfologia dei noduli, osservati al microscopio, si presentava del tutto simile a quello delle piante controllo (dati non mostrati).

5.2.3 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE LINEE INTERFERITE

Allo scopo di poter analizzare con maggior dettaglio i fenotipi di crescita e simbiotici nelle linee interferite per i geni *LjAMT1*, ho deciso, anche in questo caso,

di procedere alla trasformazione di espianti radicali di *Lotus*, con *Agrobacterium tumefaciens*, equipaggiato con il costrutto a RNA-i per ottenere linee transgeniche stabili. Una volta ottenuti i trasformanti primari (T0), questi sono stati trasferiti in terreno per potere ottenere e analizzare la generazione successiva (T1). I semi delle quattro diverse linee ottenute, sono stati inizialmente analizzate per la percentuale di germinazione e la segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina, che è il marcatore utilizzato per selezionare le piante transgeniche (Tabella 2). La segregazione mostra come per tutte le linee siano state effettivamente ottenute piante transgeniche e che i trasformanti primari non rappresentavano escapes, vale a dire piante non trasformante che avevano evitato la pressione selettiva con igromicina nel corso della procedura di rigenerazione. Comunque, anche se il numero di semi germinato non era statisticamente significativo (a causa della bassa resa di semi ottenuta dai trasformanti primari), nessuna delle linee analizzate mostra una segregazione di tipo mendeliano (tranne forse la linea *LjAMT-21*), ed i rispettivi trasformanti primari selezionati potrebbero quindi essere dei trasformanti chimerici.

LINEE <i>LjAMT</i> - Comune-RNA-i	% DI GERMINAZI ONE	IGROMICINA ^R R/S
<i>LjAMT-2</i>	68%	9/8
<i>LjAMT-6</i>	76%	10/9
<i>LjAMT-13</i>	60%	5/10
<i>LjAMT-21</i>	80%	13/7

Tabella 2.
Percentuale di germinazione e della segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina della generazione T1 delle linee di trasformanti *LjAMT*-Comune-RNA-i.

I diversi segreganti, igromicina resistenti (due per ogni linea) sono stati successivamente analizzati per valutare il livello di espressione dei geni *AMT1*,

confrontandoli con quelli di piante wild type. E' stato quindi estratto l'RNA dalle foglie di piante cresciute in un terreno ricco di azoto (Gamborg B5) ed è stata effettuata un'analisi preliminare semi-quantitativa per RT-PCR. Come mostrato nelle Fig. 29 e 30, questa ha rivelato che tutte e quattro le linee analizzate presentano silenziamento genico per entrambi i geni *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2*, analizzati, anche se con livelli diversi. Come controllo è stata valutata l'espressione dei trasportatori sia in una pianta wild type che in una trasformata con un generico costrutto igromicina resistente.

L'analisi quantitativa con le percentuali di silenziamento, relative alle diverse linee sono indicate in tabella 3, in particolare i segreganti 2 e 4 della linea 21 presentano il più alto grado di silenziamento del gene *LjAMT1;1*, pari a 68,8% e 84,85% e un livello di silenziamento di *LjAMT1;2* pari al 63% e 55,6% rispettivamente. L'analisi quantitativa dell'espressione di *LjAMT1;3* non è invece stata possibile, considerato che già in condizioni fisiologiche, nelle piante wild type, c'è un profilo di espressione così basso di questo gene da non essere facilmente quantizzabile per RT-PCR.

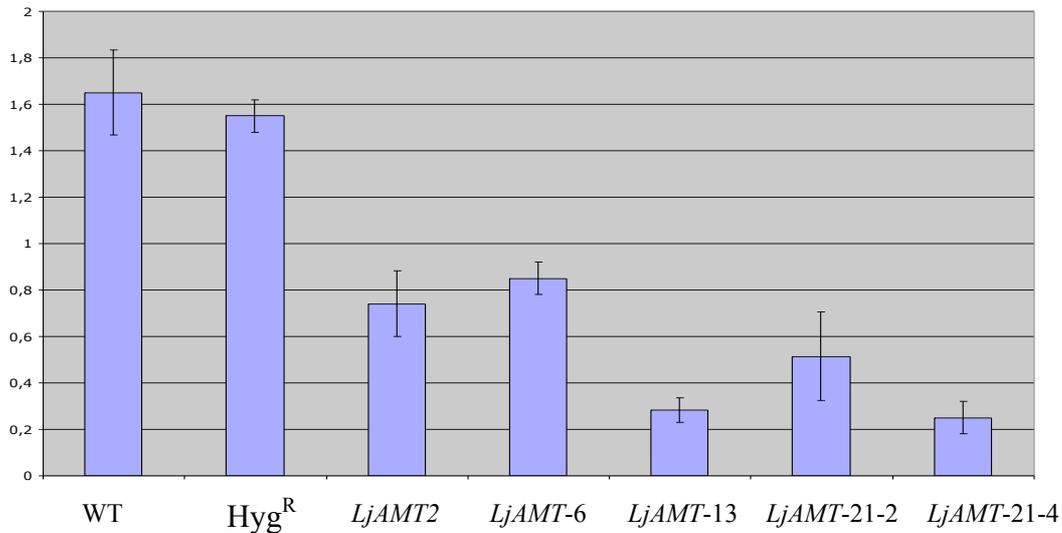


Figura 29. Analisi per RT-PCR del livello di espressione del gene *LjAMT1;1*

Le quattro linee, igromicina resistenti, contenenti il costrutto *LjAMT-Comune-RNAi* sono indicate. I risultati mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti di RT-PCR condotti su due campioni biologici. Il livello di espressione è normalizzato rispetto a quello dell'ubiquitina. Le deviazioni standard sono indicate.

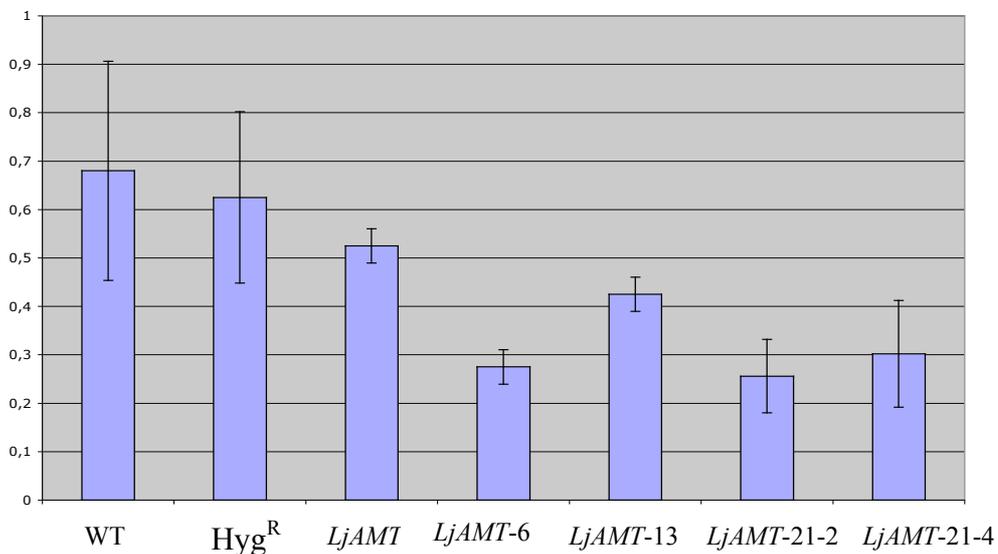


Figura 30. Analisi per RT-PCR del livello di espressione del gene *LjAMT1;2*

Le quattro linee, igromicina resistenti, contenenti il costrutto *LjAMT-Comune-RNAi* sono indicate. I risultati mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti di RT-PCR condotti su due diversi campioni biologici. Il livello di espressione è normalizzato rispetto a quello dell'ubiquitina. Le deviazioni standard sono indicate.

Linee <i>LjAMT</i> -Comune-RNA-i	Espressione di <i>LjAMT1;1</i>	Espressione di <i>LjAMT1;2</i>
2-2	55,2%	22,8%
6-2	48,5%	60%
13-2	82,91%	37,5%
21-2	68,8%	63%
21-4	84,85%	55,6%

Tabella 3. Percentuale di silenziamento dei trasportatori *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2* nelle linee interferite

Analisi delle quattro linee interferite rispetto alle linee di controllo. I numeri mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti di RT-PCR condotti su due diversi campioni biologici. Il livello di espressione è normalizzato rispetto a quello dell'ubiquitina.

5.2.4 ANALISI PER NORTHERN BLOT LMW (LOW MOLECULAR WEIGHT)

Il passo successivo è stato quello di verificare che il livello di down-regolazione osservato fosse dovuto specificamente all'effetto diretto del silenziamento genico indotto nelle linee transgeniche e non ad un effetto indiretto, dovuto a meccanismi non specifici. A questo scopo, ho effettuato un Northern blot per bassi pesi molecolari (LMW) (vedi materiali e metodi, paragrafo 4.12.1). Questa tecnica permette, di valutare la presenza degli small interference RNAs (si-RNAs) della grandezza di 21-24 coppie di basi, che si formano in seguito all'attacco di un doppio filamento di RNA (RNAds) da parte delle Dicer dell'organismo in cui sia stato introdotto il transgene e che sono responsabili della degradazione degli m-RNA endogeni ad essi complementari.

Questo tipo di analisi è stata effettuata per il momento, sui segreganti 21-2 e 21-4, che mostravano maggiori livelli di silenziamento per RT-PCR, sia del trasportatore *LjAMT1;1* che *LjAMT1;2*. 15 µg di RNA estratto dalla porzione aerea delle piante scelte, sono stati caricati su un gel di acrilammide 40%. Dopo trasferimento su filtro, gli RNA sono stati successivamente ibridati con una sonda specifica, complementare alla sequenza scelta per effettuare il costrutto interference. L'analisi ha rivelato, come atteso, assenza dei si-RNA nel controllo wild type e, viceversa, presenza di questi negli RNA di entrambi i segreganti 21-2 e 21-4 (Fig. 31). L'accumulo dei siRNA nel segregante 21-4 è maggiore rispetto a quello osservato per 21-2, in accordo con i dati dell'RT-PCR che mostravano nel primo, un silenziamento maggiore (Fig. 29, 30).

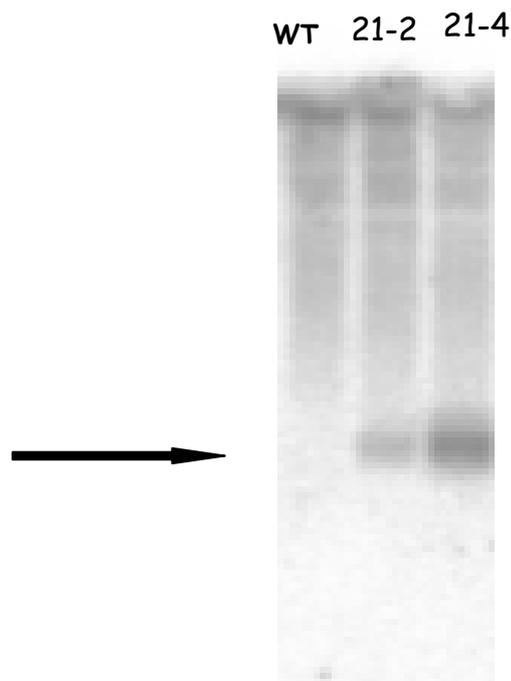


Figura 31. Northern blot per bassi pesi molecolari su piante wt e piante interferite 21-2 e 21-4. I si-RNA (21-24 bp) sono indicati dalla freccia

5.2.5 ANALISI PER NORTHERN BLOT HMW (HIGH MOLECULAR WEIGHT)

I campioni sono stati inoltre analizzati per Northern HMW, per potere valutare, in maniera più sicura, l'espressione dei trasportatori in quelle linee che avevano mostrato un accumulo di si-RNAs. Anche in questo caso sono stati utilizzati 15 µg di RNA per ogni campione. I campioni sono stati caricati su un gel di agarosio denaturante all'1%. Successivamente sono stati trasferiti su filtro di nitrocellulosa, e ibridati con una sonda radioattiva specifica per *LjAMT1;1*. In accordo con quanto osservato nelle altre analisi di RT-PCR, ho osservato, come è evidente dalla figura 32, la presenza di una quantità di trascritto inferiore, se confrontata a quella del wild type, nel caso del segregante *LjAMTCom-21-2*, pari a circa il 50%, e pari al 70% nel caso del segregante *LjAmtCom-21-4*.

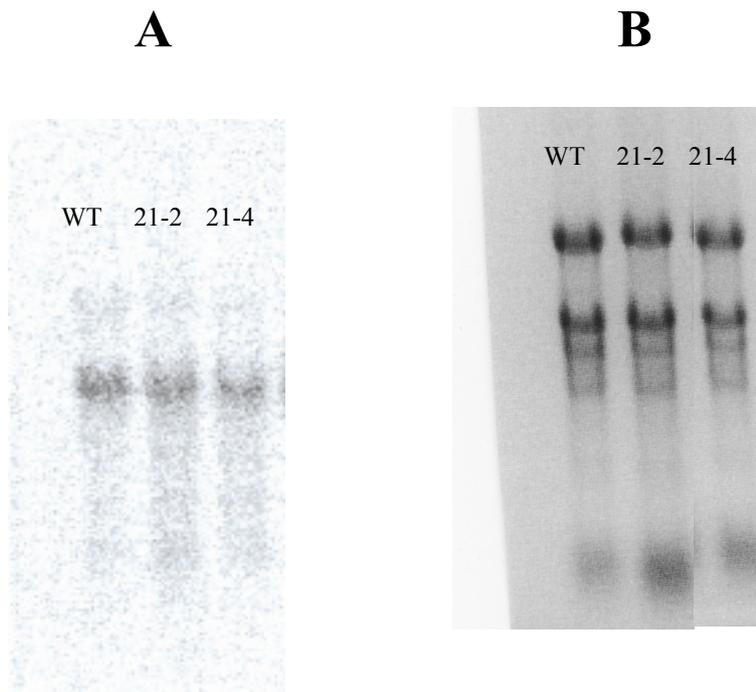


Figura 32. Northern blot per alti pesi molecolari (HMW). A, RNA estratto da foglie di piante wild type e piante interferite 21-2 e 21-4 ibridate con una sonda *LjAMT1;1*-specifica. B, controllo delle quantità di RNA caricate sul gel mediante colorazione con bromuro di etidio

5.2.6 ANALISI DEL FENOTIPO DI CRESCITA E DI QUELLO SIMBIOTICO NEI SEGREGANTI T1

I segreganti stabili delle linee interferite sono quindi stati analizzati per il fenotipo di crescita. Le piante, dopo essere state selezionate su igromicina, a circa dieci giorni dalla germinazione, sono state trasferite su mezzo ricco di azoto (B5 Gamborg) e piante di controllo igromicina resistenti, sono state usate come controllo. Le piante sono state monitorate per circa un mese e parametri quali lunghezza della radice primaria, lunghezza della porzione aerea, numero di trifolii, sono stati valutati. Dall'analisi è risultato che le piante interferite mostrano un fenotipo non distinguibile da quello delle piante di controllo (dato non mostrato). Tale risultato è assolutamente preliminare ed è naturalmente atteso sulla base della caratterizzazione fenotipica del quadruplo mutante di *A. thaliana* che, solo in particolari condizioni di crescita, mostra un fenotipo evidente (Yuan *et al.* 2007). Il quadruplo mutante, infatti, mostra un evidente fenotipo (riduzione della biomassa della porzione aerea), solo quando è cresciuto su un mezzo, contenente basse concentrazioni di ammonio, come unica fonte di azoto.

Allo scopo di analizzare il fenotipo simbiotico, una parte delle piante, igromicina resistenti, sono state trasferite su mezzo Jensen, privo di azoto, per un tempo sufficiente perché queste potessero avvertire la carenza di azoto e dopo dieci giorni sono state infettate con *Mesorhizobium loti*. A circa dieci giorni dall'infezione, con una normale cinetica di nodulazione, sono comparsi i primi noduli e l'osservazione è continuata per un mese. Il fenotipo delle piante interferite è assolutamente comparabile a quello delle piante wild type in termini di cinetica di nodulazione, sviluppo del nodulo, numero di noduli e funzionamento di questi ultimi (Figura 33). Quindi, il livello di down-regolazione dei trasportatori AMT1 osservato (Fig. 29, 30 e 32), nelle condizioni sperimentali utilizzate (totale mancanza di azoto nel mezzo di crescita), non sembra inficiare il programma di nodulazione di *Lotus*

japonicus. Il dato è in accordo con quello precedentemente ottenuto sulle piante composite che mostravano un fenotipo di tipo wild type in termini di cinetica di nodulazione, numero di noduli e struttura nodulare (vedi paragrafo 5.2.2).

Questo risultato, in realtà, potrebbe essere spiegato considerando che nelle linee analizzate non c'è un completo silenziamento dei trasportatori dell'ammonio, il cui livello di espressione, pur essendo inferiore rispetto a quello di una pianta wild type, potrebbe essere in grado di garantire le funzioni necessarie perché una corretta interazione pianta-batterio possa avvenire.



WT

LjAMT-21-RNA-i

Figura 33. Fenotipo simbiotico delle piante interferite.

Piante interferite (linea *LjAMT-21*) e piante wild type, a un mese dall'infezione con *M. loti*

5.2.7 OTTENIMENTO DI PIANTE CHE OVER-ESPRIMONO IL TRASPORTATORE *LjAMT1;3*

Il gene *LjAMT1;3*, è quello fra i membri della famiglia *AMT1* che presenta il più basso profilo di espressione in tutti gli organi della pianta analizzati (D'Apuzzo *et al.* 2004), tanto da non essere facilmente quantificabile per RT-PCR. La strategia

preferenziale per potere quindi analizzare e meglio comprendere il suo ruolo nel metabolismo azotato, è quello di aumentarne l'espressione oltre i livelli basali e analizzare l'eventuale fenotipo indotto.

La sequenza codificante e 115 bp del 3' non tradotto del gene sono state quindi isolate per PCR e poste sotto il controllo del promotore costitutivo 35S, all'interno del vettore binario di espressione p-CAMBIA 1300. I trasformanti stabili sono stati ottenuti in seguito a co-coltura di espianti radicali di piante wild type con *Agrobacterium tumefaciens*, contenente il costrutto di interesse (vedi Materiali e metodi, paragrafo 4.3). I trasformanti primari (7) sono stati trasferiti in terreno, in camera di crescita con condizioni di luce, umidità e temperatura controllate. I semi della prima generazione sono stati ottenuti ed analizzati. Per ogni linea sono stati sterilizzati trenta semi e posti su mezzo ricco (B5 Gamborg) con e senza igromicina (5 µg/ml). E' stata in questo modo valutata l'efficienza di germinazione e la segregazione del fenotipo igromicina resistenza nella generazione T1 (Tabella 4).

Linee Over	<i>LjAmt1;3</i>	% di germinazione	Igromicina resistenza R/S
7		0%	0/0
8		67%	11/9
11		70%	12/9
13		57%	6/11
15		10%	2/1
16		90%	18/9
17		34%	7/3

Tabella 4. Percentuale di germinazione e fenotipo igromicina resistenza della generazione T1 delle sette diverse linee over-esprimenti *LjAMT1;3*.

In generale, i dati della tabella 4 non sono facilmente interpretabili perché il numero di semi analizzato non è statisticamente significativo ma comunque, suggeriscono per le linee 8, 11 e 13 un rapporto non mendeliano dovuto probabilmente a dei trasformanti primari chimerici; le linee 15, 16 e 17 mostrano un rapporto più simile ad uno di tipo mendeliano suggerendo la presenza di un'unica copia di T-DNA. La linea 7 rappresenta invece un escape che è sopravvissuto alla selezione con l'igromicina. L'RNA è stato quindi estratto, per alcune di queste linee, dalle foglie e, tramite RT-PCR, utilizzando dei primers specifici per questo membro della famiglia, è stato analizzato il livello di espressione di *LjAMT1;3*. Come atteso, l'm-RNA di *LjAMT1;3* è appena visualizzabile nelle piante wild type, mentre osservo un significativo livello di over-espressione nelle linee 8, 13, 16 e 17, quest'ultima, in particolare, è risultata quella maggiormente over-esprimente (Fig. 34). Per confermare la specificità dell'amplicone ottenuto, la banda di 430 bp è stata eluita dal gel e sequenziata.

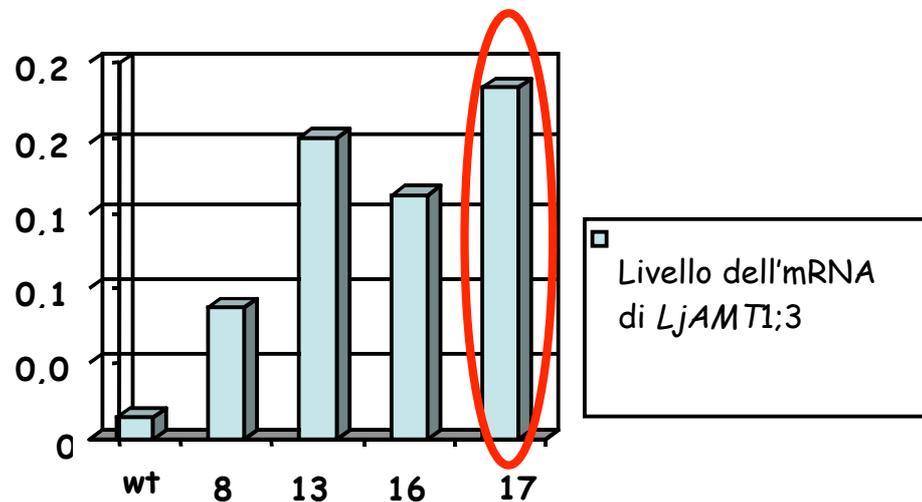


Figura 34. Analisi per RT-PCR del livello di espressione del gene *LjAMT1;3*
Le linee over-esprimenti 8, 13, 16 e 17 e wt sono indicate. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto a quelli dell'ubiquitina.

Questa linea è stata dunque scelta per analizzare gli effetti dell'over-espressione del trasportatore *LjAMT1;3*. 15 segreganti (T1) di questa linea sono stati trasferiti *in vivo* per l'analisi della generazione successiva (T2) e per isolare una linea omozigote. In realtà, nel passaggio dal *vitro* al *vivo* le piante necessitano di un periodo di acclimatazione per potere superare il forte stress cui sono sottoposte e non sempre questo avviene con successo, pertanto sono sopravvissuti solo 7 segreganti. I semi T2 di questi 7 segreganti della linea 17 sono stati quindi germinati e analizzati per il fenotipo igromicina resistenza. Come è visibile dalla tabella 5, sono stati ottenuti 3 segreganti omozigoti e tale frequenza è abbastanza in accordo con quella attesa.

<i>LjAMT1;3-17</i>	% germinazione	d i	Igromicina resistenza R/S
1	92%		21/3
2	66%		15/1
4	76%		14/2
9	88%		23/0
10	70%		16/0
12	52%		8/3
13	72%		15/0

Tabella 5. Percentuale di germinazione e fenotipo igromicina resistente dei segreganti T2 della linea over-esprimente *LjAMT1;3-17*.

Dalle foglie dei tre segreganti omozigoti è stato estratto l'RNA e valutato, per RT-PCR il livello quantitativo dell'm-RNA di *LjAMT1;3* confermandone l'over-espressione (Figura 35).

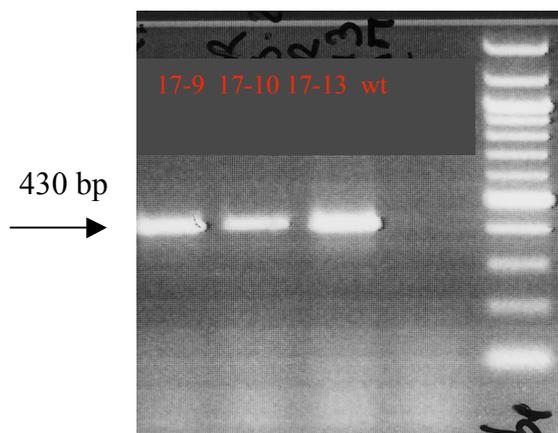


Figura 35. Analisi molecolare per RT-PCR dell'espressione di *LjAMT1;3*

L'RNA analizzato è quello dei segreganti T2 omozigoti: 17-9, 17-10, 17-13 e di piante wild type. La dimensione dell'amplicone è indicata.

5.2.8 TEST DI SENSIBILITÀ AL METILAMMONIO

Il metilammonio è l'analogo dell'ammonio e, in quanto tale, viene riconosciuto e trasportato dalle proteine AMT1 dei vari organismi. A differenza dell'ammonio, non viene metabolizzato ad opera della GS/GOGAT ed il conseguente accumulo, risulta tossico per la cellula. Il metilammonio viene, infatti, utilizzato in luogo dell'ammonio, per potere saggiare l'attività di trasporto degli AMT.

Sulla linea omozigote 17-13 che, come visto, presenta il maggiore livello di over-espressione di *LjAMT1;3*, è stato effettuato il test di sensibilità al metilammonio per potere verificare se, oltre ad avere un maggiore livello di trascritto, la proteina fosse effettivamente funzionante. 20 piante *LjAMT1;3-17* e 20 wild type, usate come controllo, sono state germinate su 1mM potassio nitrato. A quattro giorni dalla germinazione, quando l'apparato radicale aveva già raggiunto una lunghezza di circa 3 cm, sono state trasferite su 2,5 mM metilammonio. In fase precoce, a circa sei giorni dal trasferimento, mentre le piante wild type continuavano a crescere, senza mostrare evidenti sintomi di tossicità, le piante over-esprimenti mostravano un precoce arresto della crescita (Fig. 36). In queste, evidentemente, l'over-espressione del trasportatore *LjAMT1;3*, causa un maggiore accumulo di metilammonio che, non

venendo rapidamente metabolizzato, risulta immediatamente tossico, determinando il fenotipo osservato.

Tale risultato indicava quindi chiaramente che la proteina AMT1;3, over-espressa nelle piante transgeniche, manteneva la sua funzionalità.



wt 17-13

Figura 36. Test di sensibilità al metilammonio

Fenotipo di piante over-esprimenti (linea *LjAMT1;3-17-13*) e di piante wild type, cresciute per quattro giorni su 1mM potassio nitrato e trasferite su 2,5 mM metilammonio.

5.2.9 ANALISI DEL FENOTIPO SIMBIOTICO

Per potere analizzare se l'over-espressione era in qualche modo in grado di influenzare la simbiosi tra *Lotus* e *Mesorhizobium loti*, 15 piante *LjAMT1;3-17* e 15 wild type sono state germinate su acqua e agar. A sei giorni dalla germinazione sono state trasferite su un mezzo, contenente basse concentrazioni di azoto (10 μ M ammonio nitrato) e infettate con *Mesorhizobium loti*. Le piante sono state analizzate due volte a settimana per cinque settimane. L'analisi ha mostrato la presenza di un

regolare numero di noduli sulle piante over-esprimenti (circa 6-7); i noduli si presentavano normalmente rosati, per la presenza della leghemoglobina che mantiene basse le concentrazioni di ossigeno all'interno del nodulo per permettere un normale funzionamento della nitrogenasi batterica (Fig. 37); la morfologia, inoltre, analizzata in dettaglio al microscopio ottico, non mostrava segni di alterazioni ultrastrutturali. Questo dato suggerisce, quindi, che il trasportatore *LjAMT1;3* non è implicato nel processo di organogenesi del nodulo. Questo dato è in accordo con quello, precedentemente ottenuto in laboratorio, in cui *LjAMT1;3* è tra i tre membri della famiglia, quello più blandamente espresso e l'unico in cui l'analisi dell'attività GUS di fusioni traduzionali della regione promotrice non mostra colorazione all'interno del nodulo stesso (D'Apuzzo *et al.* 2004).

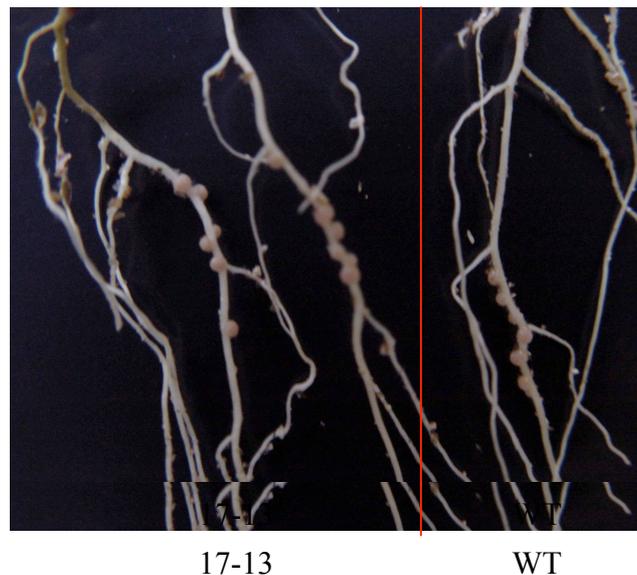


Figura 37. Fenotipo simbiotico

Piante della linea *LjAMT1;3-17* e piante wild type, su 10 μ M ammonio nitrato, infettate con *M. loti*. Analisi a cinque settimane dall'infezione.

5.2.10 ANALISI DEL FENOTIPO DI CRESCITA

L'analisi fenotipica della linea *LjAMT1;3-17* mostrava tuttavia un evidente e sorprendente fenotipo di crescita. Le piante presentano, infatti, ridotte dimensioni della porzione aerea e dell'apparato radicale se confrontate alle wild type; questo è vero sia per colture *in vivo* che *in vitro* (Fig. 38).

E' stato quindi analizzato il fenotipo di crescita più in dettaglio, in particolare in presenza di diverse concentrazioni di ammonio nitrato, come unica fonte azotata, e in completa assenza di azoto. Quindici semi del segregante 17-13 e altrettanti semi wild type sono stati germinati su 10 e 100 μM e 1 e 5 mM ammonio nitrato oltre che in assenza di azoto. L'analisi fenotipica è stata effettuata ogni quattro giorni per tre settimane e quindi è stata tracciata una cinetica di crescita e, in particolare, è stata analizzata la lunghezza della radice primaria confrontandola con quella di piante wild type cresciute nelle medesime condizioni.

I risultati, hanno mostrato nelle piante over-esprimenti, ridotte dimensioni delle radici primarie rispetto alle wild type, indipendentemente dalla concentrazione di ammonio nitrato nel mezzo (Fig. 39 A e B). Le ridotte dimensioni sono infatti osservate anche nelle piante cresciute in assenza di fonti azotate (Fig. 39 C). Il fenotipo dunque, risulta essere indipendente dalla presenza o meno di fonti azotate nel mezzo e dalla loro eventuale concentrazione. Il dato suggerisce, quindi, un probabile ruolo del trasportatore *LjAMT1;3*, indipendente dalla funzione di trasporto e collegata al programma di sviluppo della pianta.

In letteratura è noto che alte concentrazioni di ammonio causano un fenotipo da stress con riduzione della crescita. Piante wild type sono quindi state cresciute su mezzo privo di azoto e su mezzi contenenti concentrazioni crescenti di ammonio nitrato (0,1mM, 5mM, 10mM, 20mM). La lunghezza della radice primaria è stata analizzata a vari tempi. In accordo con i dati presenti in letteratura, la cinetica di allungamento della radice primaria è effettivamente rallentata all'aumentare della concentrazione di ammonio (Fig. 39 D). Tali andamenti sono perfettamente

sovrapponibili con quelli osservati nella linea over-esprimente *LjAMT1;3* indipendentemente dalla concentrazione di ammonio (Fig. 39 A, B, C). Il fenotipo osservato nelle piante wild type, cresciute in alte concentrazioni di ammonio, ricorda quindi molto da vicino quello osservato per la linea over-esprimente anche in assenza di azoto.

Ho quindi cercato di verificare se vi fosse un legame tra l'espressione di *LjAMT1;3* nelle piante wild type, e il fenotipo osservato in presenza di elevate concentrazioni di ammonio, vale a dire se in alto azoto il gene fosse maggiormente espresso. L'ipotesi era che le alte concentrazioni di azoto sono le condizioni in cui il trasportatore *LjAMT1;3* è maggiormente espresso e ciò sarebbe tra l'altro in accordo con il fenotipo, azoto-indipendente, della linea over-esprimente. Per tale motivo è stato estratto l'RNA da radici di piante wild type cresciute in -N e 20 mM ammonio nitrato. L'espressione di *LjAMT1;3* è stata valutata per RT-PCR e mentre, come atteso, in -N il trasportatore non ha livelli di espressione tali da potere essere rilevati, nelle radici di piante cresciute in 20 mM ammonio nitrato, invece, sono stati osservati livelli di espressione più alti, tanto da potere essere visualizzati su gel (Fig. 40). Questo dato è stato confermato per Real-Time (Fig. 41 A). Il dato è stato ulteriormente validato dall'analisi del livello di espressione degli altri due trasportatori, *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2*. In questi casi, come atteso, c'è un profilo di espressione completamente diverso, con un'induzione in -N e una bassa espressione nelle radici cresciute a 20 mM (Fig. 41 B, C).



Figura 38. Fenotipo di crescita

A, Piante cresciute *in vitro* (wild type a sinistra e over-esprimenti *LjAMT1;3-17* a destra); **B**, Piante cresciute *in vivo*.

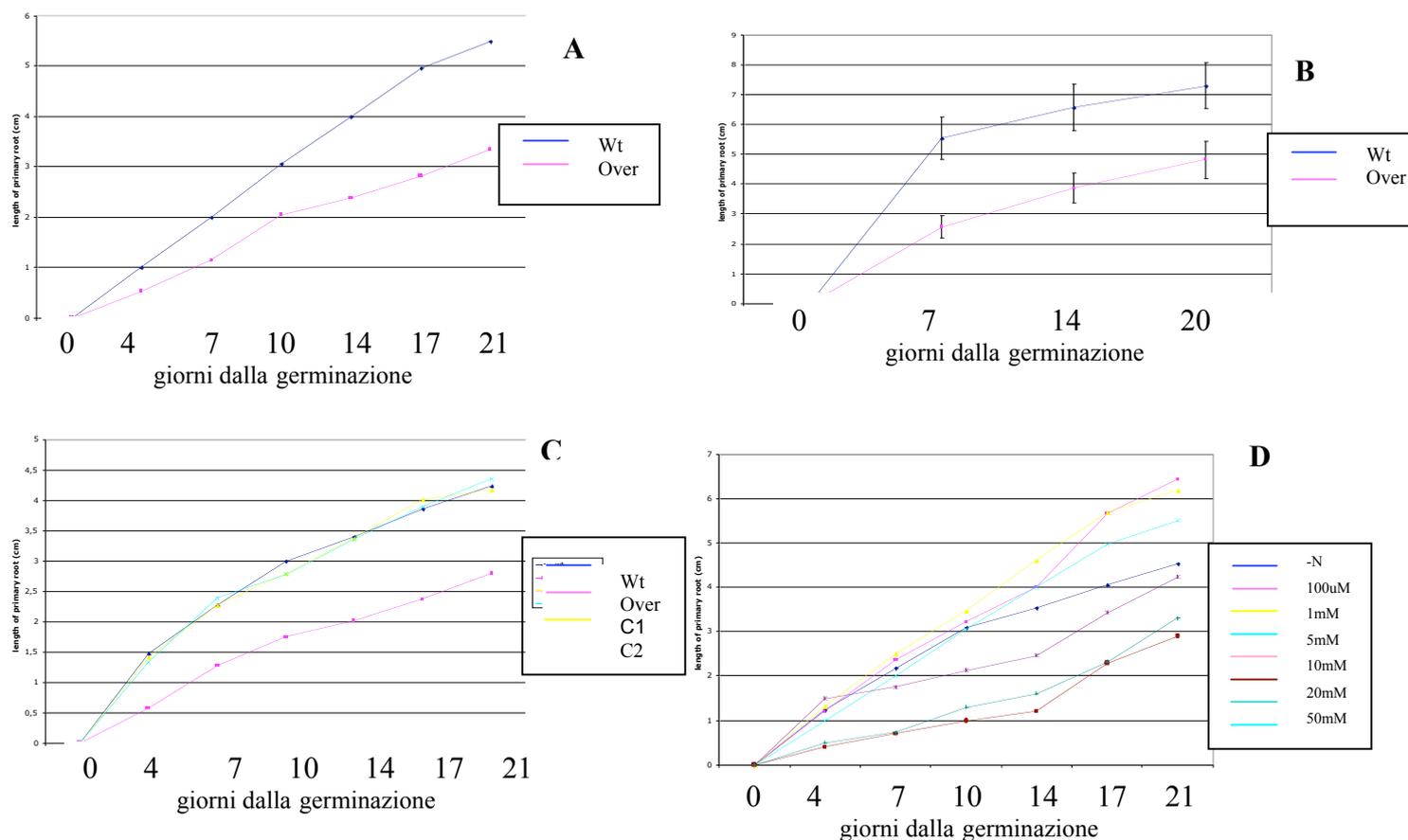


Figura 39. Analisi del fenotipo di crescita

Cinetica dell'allungamento della radice primaria delle piante wild type e della linea over-esprimente *LjAMT1;3-17-13* cresciute su mezzo privo di azoto (A); in 10 μ M ammonio nitrato (B); in 5 mM ammonio nitrato (C). Nel pannello C è riportata anche la cinetica di allungamento di due linee transgeniche di controllo (D), cinetica dell'allungamento della radice primaria di piante wild type, cresciute in -N e in concentrazioni crescenti di ammonio nitrato (100 μ M, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM).

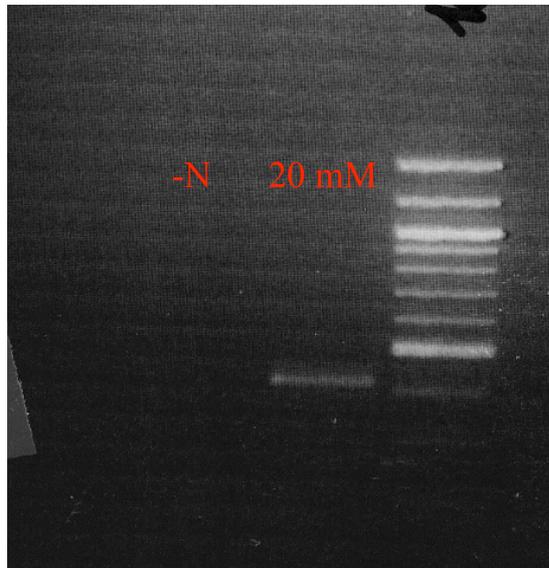


Figura 40. Analisi per RT-PCR dell'espressione di *LjAMT1;3* in piante wild type
 Le piante wild type sono cresciute in un mezzo privo di fonti azotate (-N) e contenente 20 mM ammonio nitrato come unica fonte di azoto e l'RNA è estratto da radici.

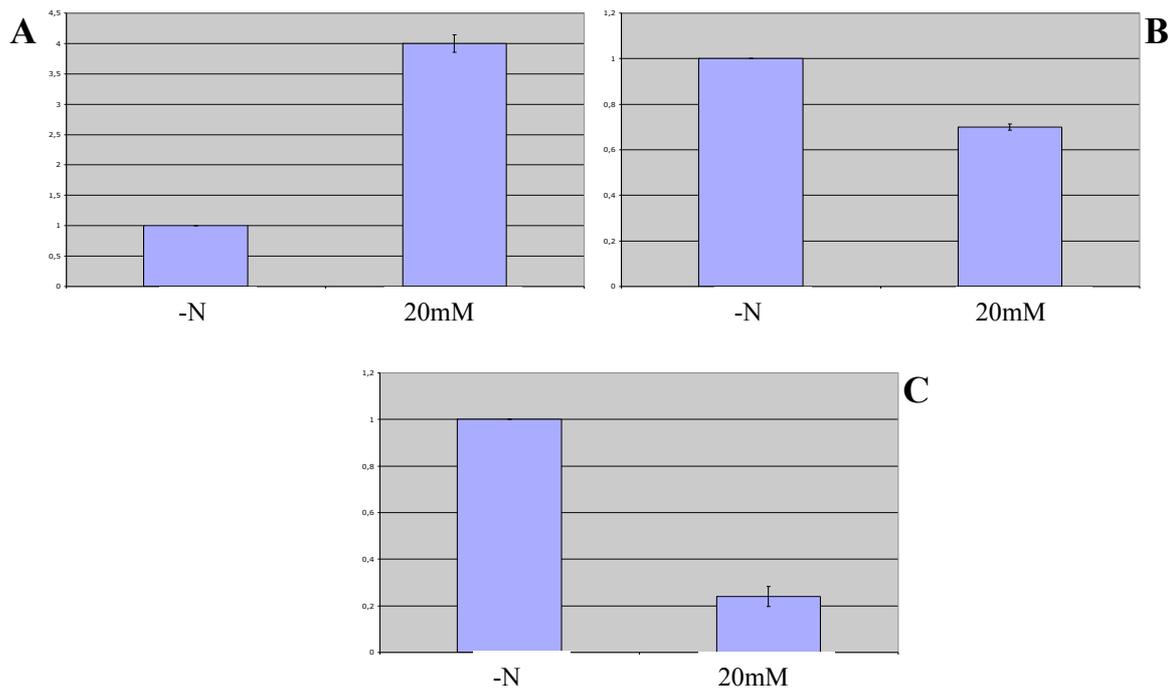


Figura 41. Analisi dell'espressione per Real Time RT-PCR.
 L'RNA è estratto da radici di piante wild type cresciute in -N e 20 mM ammonio nitrato come indicato. L'RNA è stato estratto a 6 giorni dall'inizio della germinazione. A, Analisi del livello di espressione di *LjAMT1;3*. B, Analisi del livello di espressione di *LjAmt1;1*; C, Analisi del livello di espressione di *LjAMT1;2*.

5.3 PII, UN REGOLATORE DEL RAPPORTO C/N

E' noto in letteratura che il metabolismo del Carbonio e quello dell'Azoto sono strettamente correlati e che la variazione del rapporto C/N viene rapidamente avvertita dagli organismi così che possano rispondere in maniera adeguata. Questa funzione è svolta dalla proteina PII il cui ruolo e la cui regolazione è stata ampiamente studiata in *Escherichia coli* dove è in grado, di coordinare la risposta della cellula al variare della concentrazione di Carbonio e di Azoto. In particolare, PII è in grado di avvertire le variazioni del carbonio "sentendo" le concentrazioni del 2-oxoglutarato e dell'azoto tramite la glutammina. Le proteine, appartenenti alla famiglia PII (PII-like), sono presenti in organismi filogeneticamente distanti tra loro quali archeobatteri, batteri, alghe e piante dove risultano infatti altamente conservate, soprattutto a livello di quei domini che hanno un ruolo fondamentale nella regolazione e nel funzionamento della proteina stessa.

Recentemente, nel sistema modello *Arabidopsis thaliana*, è stato isolato il gene *GLB1*, che codifica per una proteina PII-like ed anche per questa è stato ipotizzato un ruolo di sensing del rapporto C/N e nella trasduzione di questo segnale (Hsieh *et al.*, 1998).

Ho quindi innanzitutto verificato, tramite un'analisi *in silico*, se il gene *GLB1* fosse stato già isolato in *Lotus japonicus* e cioè se fosse presente la sequenza genomica e/o del cDNA nelle banche dati pubbliche consultabili di questo sistema modello (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=l_japonicus). Questa ricerca mi ha permesso di isolare una TC di *Lotus* (TC19511) che proviene da due sequenze EST identificate in una libreria di cDNA di semi e baccelli e in una di gemme fiorali immature. Ho quindi disegnato degli oligonucleotidi che mi consentissero di isolare l'intero cDNA a partire da RNA estratto da foglie di *Lotus*. L'amplicone ottenuto di 640 bp era delle dimensioni attese e la sequenza ne ha confermato l'identità. A questo punto ho iniziato la caratterizzazione di *LjGLB1* per verificare se anche in leguminosa, dove

non è mai stata caratterizzata, questo gene svolgesse un ruolo di sensing e di trasduzione del segnale Carbonio/Azoto e se avesse una funzione nella regolazione dei geni AMT e/o nella regolazione del processo simbiotico che è strettamente correlato sia al metabolismo dell'azoto che del carbonio.

5.3.1 ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DI *LJGLB1* NEI VARI ORGANI

Innanzitutto, la caratterizzazione di *GLB1* è partita da un'analisi semi-quantitativa per RT-PCR per valutare se il gene fosse espresso nei vari organi di *Lotus* e in che misura. I primers utilizzati sono complementari alla regione codificante del gene, comprendendo una sequenza di 156 coppie di basi. Piante wild type, sono state cresciute su acqua e agar, a sei giorni dalla germinazione una metà è stata trasferita su mezzo ricco di azoto (B5 Gamborg) e l'altra su mezzo Jensen, privo di azoto, e successivamente infettate con *Mesorhizobium loti*. Trascorsi circa venti giorni dal trasferimento sui due diversi mezzi, le piante sono state prelevate e l'RNA è stato estratto dalla porzione aerea, dall'apparato radicale e dai noduli.

Il livello di trascritto è stato quindi analizzato per RT-PCR semi-quantitativa. L'analisi ha mostrato livelli di espressione del gene simili in tutti gli organi analizzati; il livello di trascritto non cambia significativamente se si analizzano i livelli nella porzione aerea e nelle radici di piante cresciute su mezzo ricco di azoto (B5-Gamborg, 1mM NH₄NO₃, 1 mM NH₄SO₄) e in quelle cresciute su Jensen (privo di azoto) e successivamente infettate. Questo livello preliminare di caratterizzazione infine indica che c'è espressione di *GLB1* anche nei noduli (Fig. 42 A e B).

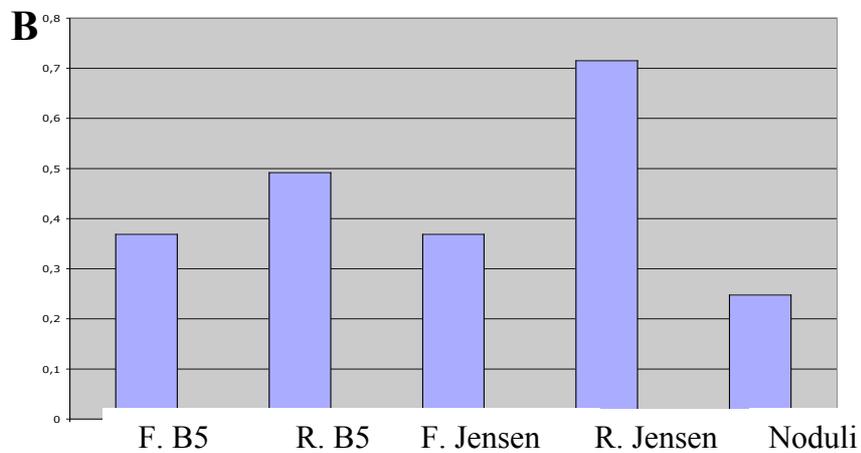
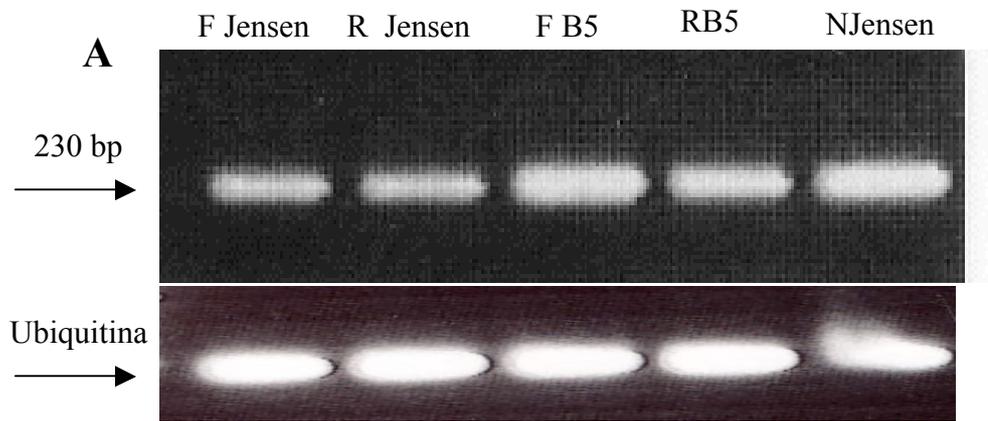


Figura 42. Analisi per RT-PCR semi-quantitativa dell'espressione di *LjGLB1* in vari organi

A Analisi dell'espressione del gene *LjGLB1* in foglie (F), radici (R) e noduli (N) di piante cresciute in due diversi mezzi: Jensen, privo di fonti di azoto, B5 (Gamborg), contenente 1 mM ammonio nitrate e 1 mM ammonio solfato come fonti di azoto. La dimensione dell'amplicone di *LjGLB1* è indicata. In basso è mostrata l'amplificazione del gene house keeping (ubiquitina); **B**, quantizzazione dei livelli di espressione. I livelli mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti di RT-PCR condotto su due campioni biologici diversi. Il livello di espressione è normalizzato rispetto a quello dell'ubiquitina

5.3.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI *LJGLB1* DURANTE IL CICLO GIORNO/NOTTE

Per potere analizzare l'espressione di *GLB1* durante il ciclo giorno/notte, piante wild type sono state germinate su acqua e agar e a sei giorni dalla germinazione, trasferite in coltura idroponica, in mezzo ricco, contenente 1mM ammonio nitrato. Le piante sono state cresciute in queste condizioni in camera di crescita con luce (ciclo giorno/notte di 16/8 ore), umidità e temperatura controllate per quindici giorni nel corso dei quali è stato periodicamente sostituito il mezzo (ogni 3 giorni), per evitare che si avesse un'eccessiva acidificazione dello stesso.

I campioni sono successivamente stati prelevati alle 13.00 (metà del periodo di luce), e alle 7.00 (fine del periodo di buio). L'RNA è stato estratto separatamente dalla porzione aerea e dalle radici e la regolazione dell'espressione nei due diversi organi, ai vari tempi, è stata analizzata per RT-PCR semi-quantitativa. Nelle foglie è stata osservata una forte regolazione dell'espressione genica, in particolare *GLB1* mostra un'espressione ridotta nel periodo di buio, mentre alla luce, si ha un notevole incremento della trascrizione (circa 6 volte; Fig. 43). Questo risultato è in accordo con i dati osservati in letteratura circa l'espressione di *GLB1* di *Arabidopsis thaliana* in cui è stato osservato un andamento analogo dell'espressione del gene (Hsieh *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda, invece, la regolazione dell'espressione di *LjGLB1* nelle radici, l'aumento osservato alla luce della quantità di trascritto è minore sebbene significativo (circa 50%, Fig. 44).

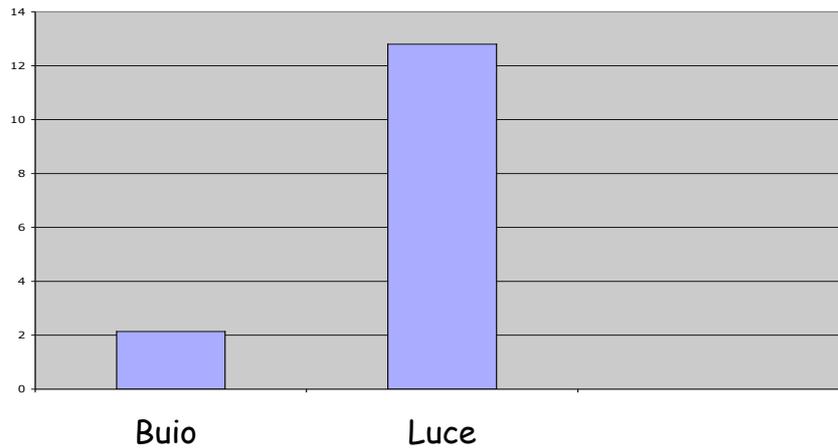


Figura 43. Analisi dei livelli di espressione di *GLB1* in foglie durante il ciclo giorno/notte.

L'RNA è estratto dalle foglie di piante alla fine del periodo di buio (8 ore) e dopo 7 ore di luce.

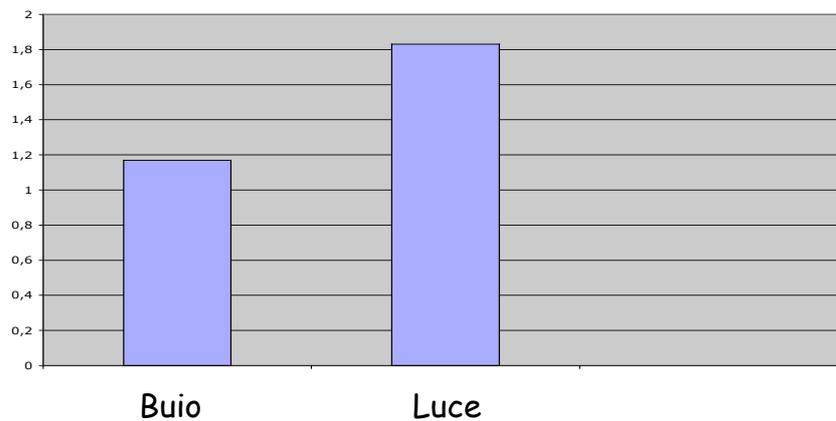


Figura 44. Analisi dei livelli di espressione di *GLB1* in radice durante il ciclo giorno/notte.

L'RNA è estratto da radici di piante alla fine del periodo di buio (8 ore) e dopo 7 ore di luce

5.3.3 LA REGOLAZIONE LUCE/BUIO-DIPENDENTE DELL'ESPRESSIONE DI *LJGLB1* È INFLUENZATA DALLA PRESENZA DI SACCAROSIO

Come visto nel paragrafo 4.4.2, l'espressione di *GLB1* nelle foglie è indotta alla luce mentre i livelli scendono notevolmente al buio, in accordo con i dati relativi al gene *GLB1* di *Arabidopsis thaliana* dove inoltre, è stato osservato che l'aggiunta di saccarosio (3%) come fonte di carbonio, induce un incremento dei livelli di trascritto al buio, fino ad ottenere livelli comparabili a quelli osservati alla luce. L'aggiunta di saccarosio nel mezzo è inoltre in grado di incrementare i livelli di trascritto anche alla luce (Hsieh *et al.*, 1998). In *Arabidopsis*, dunque, l'induzione dell'espressione che si osserva alla luce in condizioni fisiologiche, è dettata dagli scheletri carboniosi che vengono prodotti durante la fotosintesi e l'aggiunta di saccarosio mima gli effetti della fotosintesi stessa.

Per verificare se anche in *Lotus* l'espressione di *GLB1* fosse influenzata dai fotosintati e dall'aggiunta di saccarosio dall'esterno, ho effettuato un esperimento in cui piante wild type sono state germinate su acqua e agar e, a sei giorni dalla germinazione, sono state trasferite in coltura idroponica, senza saccarosio o in presenza di questo (3%). Le piante, a sedici giorni dall'inizio della incubazione, sono state tenute in condizioni di luce o di buio continuo per 48 ore per ottenere condizioni che marcassero questo ciclo in maniera più stringente. Successivamente, l'RNA è stato estratto dalla porzione aerea e dall'apparato radicale. I livelli di espressione e il tipo di regolazione della trascrizione di *GLB1* sono stati analizzati per RT-PCR semi-quantitativa. Come è evidente dal grafico mostrato nella Fig. 45, viene ancora una volta confermato un livello di espressione simile fra foglie e radici e questo risulta in entrambi i casi, maggiore in condizione di luce. Inoltre, si può notare che anche in *Lotus* l'aggiunta di 3% saccarosio nel mezzo esterno, produce un'induzione della trascrizione di 2-3 volte, nelle foglie e nelle radici di piante cresciute alla luce o al buio continuo. Il tipo di regolazione dipendente dal ciclo giorno/notte di *GLB1* non è

dunque dovuto ai ritmi circadiani, essendo influenzato, in accordo con i dati presenti in letteratura, dalla presenza dei fotosintati che alla luce vengono prodotti durante la fotosintesi clorofilliana.

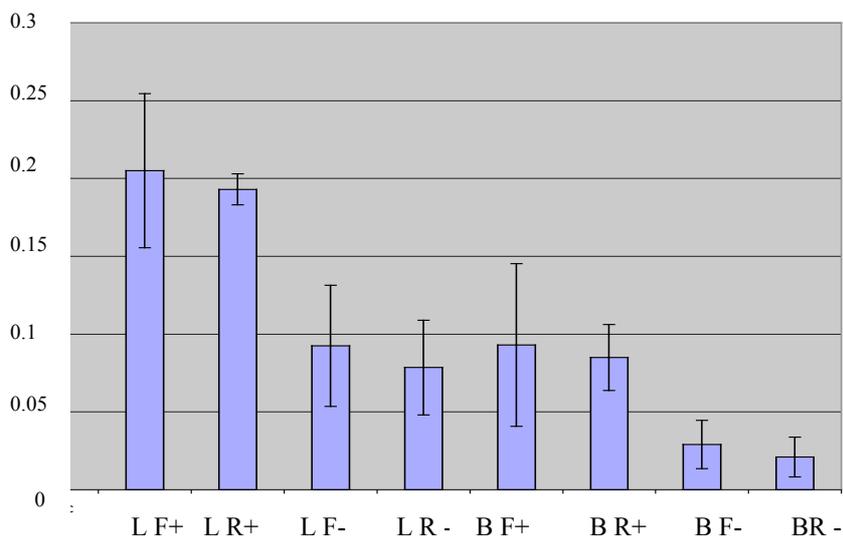


Figura 45. Analisi per dell'espressione di *GLB1* in foglie e radici di piante cresciute in condizioni di luce/buio continuo (48h) e in assenza e presenza di saccarosio

I risultati mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti di RT-PCR con due diversi campioni biologici. Il livello di espressione è normalizzato rispetto a quello dell'ubiquitina. Le deviazioni standard sono indicate. I simboli + e - si riferiscono alla presenza (3%) o assenza di saccarosio. F = foglie; R = radice; L = luce; B = buio.

5.3.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI *LJGLB1* IN CONDIZIONI LIMITANTI DI AZOTO

PII, come più volte ribadito, in tutti gli organismi in cui è presente, funge da regolatore del rapporto C/N e come tale, è in grado di avvertire le variazioni di carbonio e di azoto cui l'organismo è sottoposto. Per tale motivo era interessante andare a verificare quale fosse la regolazione a carico di *GLB1* in *Lotus* in presenza di diverse concentrazioni di azoto. Colture idroponiche wild type sono state cresciute

in presenza di 1mM ammonio nitrato come fonte di azoto e successivamente trasferite su un mezzo privo di azoto. Le piante sono state prelevate per l'estrazione di RNA dalle radici a vari tempi dal trasferimento: 9 ore (h), 24h, 48h, 60h, 72h, 5 e 6 giorni.

La successiva analisi per RT-PCR del livello di espressione del gene *GLB1*, ha mostrato una regolazione da carenza di azoto. In particolare, come è chiaro dal grafico (Fig. 46), l'espressione diminuisce con il passare del tempo in cui le piante vengono tenute in carenza di azoto.

In letteratura è noto che nei batteri, PII risponde alle diverse concentrazioni di azoto nel mezzo, attivando o meno la trascrizione di geni che sono coinvolti nel metabolismo dell'azoto. Inoltre in *E. coli*, la proteina omologa di PII, GLNK, in risposta alle variazioni di azoto, interagisce fisicamente con il trasportatore dell'ammonio, AmtB, inibendone, in alto azoto, la funzione di trasporto. In pianta non sono ancora stati identificati i bersagli della regolazione di PII ed era quindi interessante andare a verificare, nelle condizioni in cui si era osservata regolazione di *GLB1*, se questa si rifletteva in una regolazione a carico del trasportatore dell'ammonio che in *Lotus* è maggiormente espresso, *LjAMT1;1*.

L'analisi mostra per *LjAMT1;1*, un tipo di regolazione esattamente opposta rispetto a quella di *LjGLB1*, con un'espressione che viene indotta transientemente in carenza di azoto (D'Apuzzo *et al.* 2004).

Il risultato suggerisce in maniera indiretta che, in *Lotus*, PII potrebbe agire da regolatore negativo dell'espressione del gene *LjAMT1*.

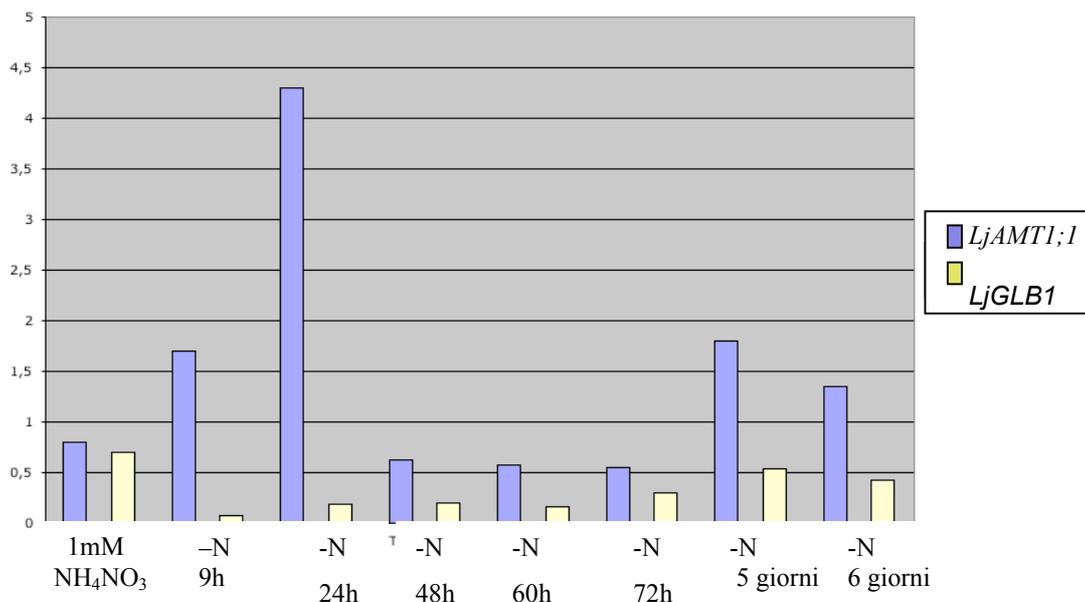


Figura 46. Analisi dell'espressione di *GLB1* e *LjAMT1;1* in varie condizioni azotate.

Le piante di *Lotus wild type* cresciute in colture idroponiche in presenza di ammonio nitrato 1mM sono trasferite per i tempi indicati in un mezzo di crescita privo di azoto. I risultati mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti di RT-PCR condotti su due diversi campioni biologici. Il livello di espressione è normalizzato rispetto a quello dell'ubiquitina.

5.3.5 LOCALIZZAZIONE SPAZIALE DELL'ATTIVITÀ PROMOTRICE DI *LjGLB1*

Per potere ottenere livelli ulteriori di informazione sul profilo di espressione di *GLB1* in *Lotus japonicus* e ipotizzarne un ruolo all'interno della pianta ho cercato di ottenere una mappa della localizzazione della sua espressione utilizzando come strumento sperimentale delle fusioni fra la regione regolatrice al 5' ed il marcatore *gusA*. Tra l'altro questo livello di indagine non è mai stato riportato in letteratura per gli orologi di PII di pianta ed in particolare gli studi di espressione effettuati non si sono mai focalizzati sul tessuto radicale.

L'analisi in silico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) mi ha consentito di identificare anche il locus genomico di *Lotus*, contenente il gene

LjGLB1, che è mappato precisamente sul cromosoma 1 di *Lotus japonicus* (Numero di accesso AP004949.1). Ho quindi isolato per PCR una sequenza regolatrice di 1600 coppie di basi al 5' di *LjGLB1*; la regione scelta era abbastanza estesa da contenere tutte le sequenze necessarie perché il controllo della regolazione dell'espressione genica possa essere perfettamente espletata. La sequenza è stata analizzata tramite il programma SoftBerry per potere evidenziare eventuali motivi di interesse (<http://www.softberry.ru/cgi-bin/programs/promoter/tssp.pl>) e, come indicato nella figura 47, oltre ad una possibile TATA box nella posizione 869, sono stati ritrovati siti putativi di legame per fattori di trascrizione di pianta; i fattori di trascrizione, individuati dal programma, appartengono a diverse specie vegetali (*A. thaliana*, *O. sativa*) ma per i quali non si conosce il tipo di regolazione cui sono soggetti.

```

Length of sequence-          1600
Thresholds for TATA+ promoters - 0.02, for TATA-/enhancers
- 0.04
  1 promoter/enhancer(s) are predicted
Promoter Pos:      902 LDF- 0.08 TATA box at      869      22.47
Transcription factor binding sites/RegSite DB:
for promoter at position -      902
821 (-) RSP00045      acaagtttgTTTTGTTTTTactaccaaca
814 (-) RSP00045      acaagtttgTTTTGTTTTTactaccaaca
773 (-) RSP00096      GGTTT
762 (-) RSP00096      GGTTT
711 (-) RSP00102      aaaTGACGaaaatgc
812 (+) RSP00161      WAAAG
777 (-) RSP00161      WAAAG
664 (-) RSP00161      WAAAG
622 (-) RSP00161      WAAAG
723 (-) RSP00269      atcttatgtcattgaTGACGacctcc
772 (+) RSP00305      CCTTTT
897 (+) RSP00308      CAACA
668 (-) RSP00308      CAACA
759 (+) RSP00338      AACCCA
668 (+) RSP00383      GGTCAA
689 (-) RSP00431      rdygRCRGTTTs
660 (-) RSP00431      rdygRCRGTTTs
643 (-) RSP00431      rdygRCRGTTTs
667 (+) RSP00467      tGGTCAatTc
666 (+) RSP00468      ttGGTCAatTc

```

754	(+)	RSP00477	TTTAA
759	(-)	RSP00477	TTTAA
636	(+)	RSP00508	gcaTTTTTatca
851	(+)	RSP00508	gcaTTTTTatca
852	(+)	RSP00508	gcaTTTTTatca
818	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
817	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
816	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
815	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
809	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
808	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
802	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
801	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
800	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
799	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
798	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
797	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
796	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
795	(-)	RSP00508	gcaTTTTTatca
680	(+)	RSP00512	cttgtaacCATCAgccaatcgaccagccaatcattc
858	(-)	RSP00629	AAAAATCT

Figura 47. Analisi in silico (programma SoftBerry) della sequenza promotrice del gene *LjGLB1*.

L'amplicone è stato sub-clonato nel vettore pBI101.1 per ottenere la fusione traduzionale con il gene reporter *gusA* e la fusione *pGLB1::gusA* è stata successivamente sub-clonata nel vettore di espressione binario, p-CAMBIA 1300 dopo aver, in questo caso, eliminato la sequenza del promotore 35S. Il costrutto è stato inserito in *Agrobacterium tumefaciens* e utilizzato per ottenere piante transgeniche contenenti la fusione *pGLB1::gusA*. Come già precedentemente accennato, questo sistema sperimentale, sebbene ottenibile con procedure lunghe e laboriose, offre una maggiore versatilità per la verifica dell'espressione in diverse condizioni e rappresenta un materiale isogenico a differenza di quanto succede con il sistema hairy roots in cui ogni radice rappresenta un evento differente di integrazione del T-DNA.

Quattro linee diverse sono state analizzate alla generazione T1. I semi sono stati germinati su acqua e agar e, a sei giorni dalla germinazione, sono state trasferite

su mezzo Jensen, per potere essere infettate con *Mesorhizobium loti*. A tre settimane dall'infezione, su queste è stato effettuato il saggio dell'attività GUS. Nella tabella 6 è illustrata l'efficienza di germinazione e il numero di piante per linea, che sono risultate positive al saggio.

Linee pGLB1-gusA	% di germinazione	Gus+/Gus-
1	93%	8/6
2	86%	10/3
3	80%	7/5
4	33%	0/5

Tabella 6. Analisi della percentuale di germinazione e della frequenza di piante GUS+ nella generazione T1 di linee trasformate con il costrutto pLjGLB1-gusA.

L'analisi al microscopio ottico ha confermato i dati ottenuti per RT-PCR con una espressione in tutti i diversi organi analizzati. L'analisi mostrava comunque una precisa localizzazione spaziale dell'attività GUS. Per quanto riguarda il sistema radicale, questa è presente nel cilindro vascolare (Fig. 48 A), nei peli radicali (Fig. 48 B) e nella cuffia delle radici principali e secondarie (Fig. 48 C). In particolare, sezioni trasversali di 60 µm della radice, ottenute al vibratomo, hanno evidenziato maggiori dettagli di tale localizzazione indicando presumibilmente un'attività promotrice anche a livello dell'epidermide mentre, per quanto riguarda il cilindro vascolare, l'attività sembra essere localizzata all'interno di questo, nei vasi xilematici e floematici (Fig. 48D).

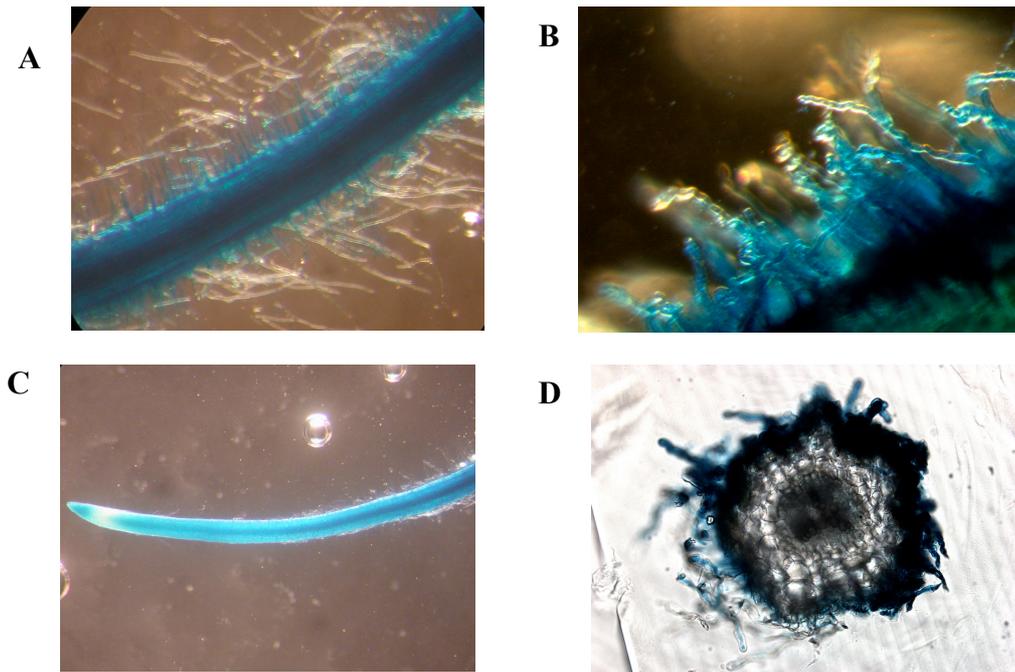


Figura 48. Profilo di espressione della fusione *pGLB1::gusA* in radice. Radici whole mounts (**A, B, C**) e sezioni (**D**). **A**, sistema vascolare; **B**, peli radicali; **C**, cuffia radicale; **D**, peli radicali, epidermide, vasi floematici e xilematici.

In accordo con l'analisi per RT-PCR il promotore di *LjGLB1* è attivo anche nel tessuto nodulare (fig. 49 A). Per meglio comprendere in quale zona del nodulo la fusione fosse espressa, ho effettuato sezioni longitudinali al vibratomo, dello spessore di 60 μm . Queste hanno evidenziato colorazione a livello dell'inner cortex e del sistema vascolare del nodulo (Fig. 49 B). Anche nelle foglie ho osservato attività GUS, nel sistema vascolare principale e secondario oltre che nelle cellule del mesofillo (Fig. 50 A) ed in particolare a livello delle cellule di guardia degli stomi (Fig. 50 B).

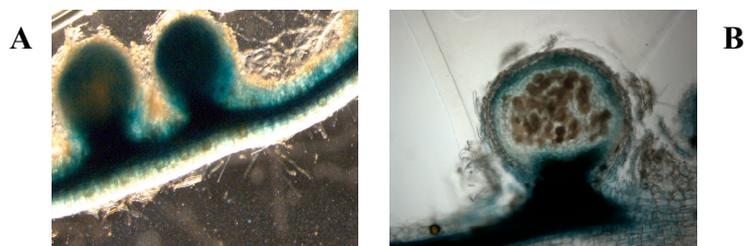


Figura 49. Profilo di espressione della fusione pGLB1::gusA nel nodulo.
A, whole mount di noduli maturi; **B**, sezione longitudinale di nodulo.

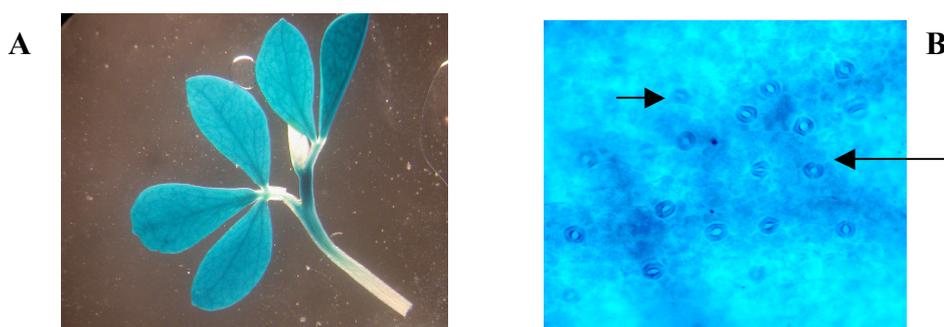


Figura 50. Profilo di espressione della fusione pGLB1::gusA in foglie.
A, espressione nelle foglie a livello delle cellule del mesofillo e del sistema vascolare principale e secondario; **B**, espressione nelle foglie a livello delle cellule di guardia delle aperture stomatiche. Le cellule di guardia sono indicate dalle frecce.

5.3.6 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA FUSIONE *GLB1::GUSA* IN MEZZI CONTENENTI DIVERSI FONTI AZOTATE

Le piante contenenti la fusione *GLB1::gusA*, sono uno strumento utile e versatile che può essere utilizzato per l'analisi della regolazione di *GLB1* in diverse condizioni di crescita. Come più volte detto, PII, negli organismi in cui è stato isolato, è coinvolto nella risposta alle variazioni di carbonio e di azoto e in particolare questo è sensibile alla variazione del rapporto C/N. Per potere verificare se PII presentava profili di espressione diversi nei vari organi al variare di tale rapporto, ho deciso di utilizzare i trasformanti stabili, contenenti la fusione *gusA*, in un esperimento in cui le piante sono state cresciute in assenza di azoto (-N) o in presenza

di due diverse fonti (ammonio nitrato e potassio nitrato) in due diverse concentrazioni (1mM, 5mM), in combinazione con il saccarosio (3%) e in assenza di questo. L'analisi delle piante è stata effettuata a quindici giorni dalla germinazione. L'osservazione, effettuata al microscopio ottico, ha mostrato che in presenza e in assenza di azoto le piante non presentavano differenze nel pattern di espressione, vale a dire nelle foglie la fusione GUS si esprimeva nel sistema vascolare principale e secondario e nelle cellule di guardia delle aperture stomatiche; nelle radici l'espressione era presente a livello del cilindro vascolare, e precisamente nei vasi xilematici e floematici, a livello dell'epidermide, nei peli radicali e nella cuffia radicale della radice primaria e secondaria (dati non mostrati). Lo stesso espressione è stato osservato nelle piante cresciute nelle due diverse fonti di azoto e con entrambe le concentrazioni utilizzate; inoltre non vi era differenza di espressione quando la fonte di carbonio era presente o meno.

I dati ottenuti indicano quindi che *GLB1* è espresso in tutte le condizioni utilizzate e che non vi è variazione del suo profilo di espressione spaziale nei diversi tessuti degli organi in cui è trascritto.

5.3.7 LOCALIZZAZIONE DI PII A LIVELLO SUB-CELLULARE

Un ulteriore livello di indagine per la caratterizzazione della PII di Lotus, passa attraverso l'analisi della sua localizzazione a livello sub-cellulare. Ho quindi effettuato una fusione tra GLB1 e un marcatore, visualizzabile *in vivo*, la Green Florescence Protein (GFP). In letteratura è stata riportata la localizzazione cloroplastica della PII di piante (Smith *et al.* 2002; Smith *et al.* 2004), in accordo con la presenza sulla sequenza aminoacidica di tipici domini associati al transito su questo organello. Comunque, la ricerca di tale dominio nella sequenza di Lotus, utilizzando due diversi programmi disponibili in rete (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; <http://apicoplast.cis.upenn.edu/pclr/>) aveva

dato esiti negativi ed era quindi di particolare interesse verificare la localizzazione della proteina. Questi domini di transito sono localizzati all'estremità N-terminale delle proteine ed assicurano la corretta veicolazione di queste proteine nel citoplasma fino all'organello bersaglio rappresentato dai cloroplasti. Tali segnali sono successivamente rimossi dopo il raggiungimento del compartimento cloroplastico ad opera di peptidasi. Era quindi anche in questo caso, ovvio che la fusione proteica fosse disegnata fra l'estremità C-terminale della *LjGLB1* e la GFP.

La regione codificante del gene è stata quindi sub-clonata nel vettore β -GFP (Duby *et al.* 2001) e la fusione GLB1::GFP è stata successivamente inserita all'interno del vettore di espressione, binario p-CAMBIA 1300, sotto il controllo del promotore costitutivo, 35S. Una prima analisi è stata effettuata su radici transgeniche, ottenute previa trasformazione di piante di *Lotus* con *Agrobacterium rhizogenes*. L'analisi al microscopio confocale delle radici transgeniche ha rivelato una fluorescenza a spot in tutte le cellule, compresi i peli radicali (Fig. 51 A, B). Questo tipo di segnale è compatibile con una localizzazione plastidiale della fusione anche per la PII di *Lotus*, in accordo con quanto osservato in *Arabidopsis*. Per potere confermare al di là di ogni ambiguità tale conclusione, ho effettuato una co-trasformazione mediata da *A. rhizogenes* del Ti plasmid, contenente la fusione GLB1::GFP, con un costrutto, contenente un peptide che localizza sui plastidi, fuso alla Red Fluorescence Protein (Imaizumi-Anraku *et al.*; AtRecA::Ds Red). Le radici ottenute sono quindi state osservate al microscopio confocale. L'analisi ha confermato l'ipotesi formulata, ed infatti, si osserva una perfetta sovrapposizione della fluorescenza della GFP e della RFP con spot gialli di fluorescenza, che indicano una precisa ed effettiva co-localizzazione delle due proteine a livello plastidiale (Fig. 52).

Il costrutto GLB1::GFP è stato inoltre utilizzato per ottenere trasformanti stabili primari (T0). Questi, una volta ottenuti, sono stati trasferiti *in vivo* per ottenere la generazione T1. Anche queste piante alla generazione T1 sono state analizzate al

microscopio confocale. L'analisi delle radici ha confermato i dati, ottenuti sulle radici delle piante composite, con la localizzazione plastidiale di GLB1 anche in *Lotus*; la fusione GLB1::GFP si localizzava, infatti, all'interno dei plastidi. Per quanto riguarda l'analisi delle foglie, questa ha rivelato una precisa localizzazione cloroplastica, sia sui nelle cellule del mesofillo che nelle cellule di guardia delle aperture stomatiche (Fig. 53). Come controllo in questo caso, è stata utilizzata la fluorescenza emessa dalla clorofilla presente nei cloroplasti che come visibile in Figura 53 co-localizza con la GFP.

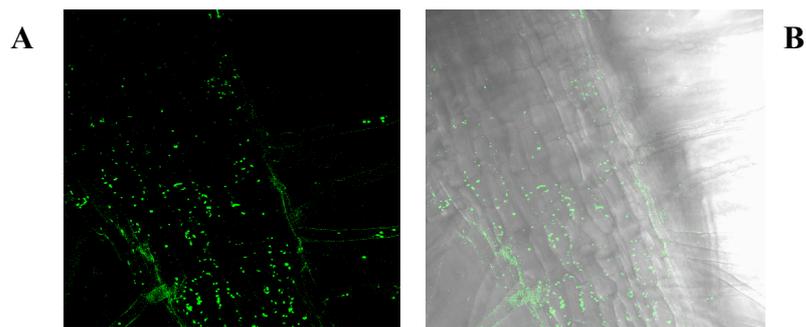


Figura 51. Localizzazione della fusione GLB1::GFP in radici

A, fluorescenza emessa dalla GFP in cellule di radici; B, sovrapposizione fra i segnali di fluorescenza e l'immagine della radice alla luce bianca.

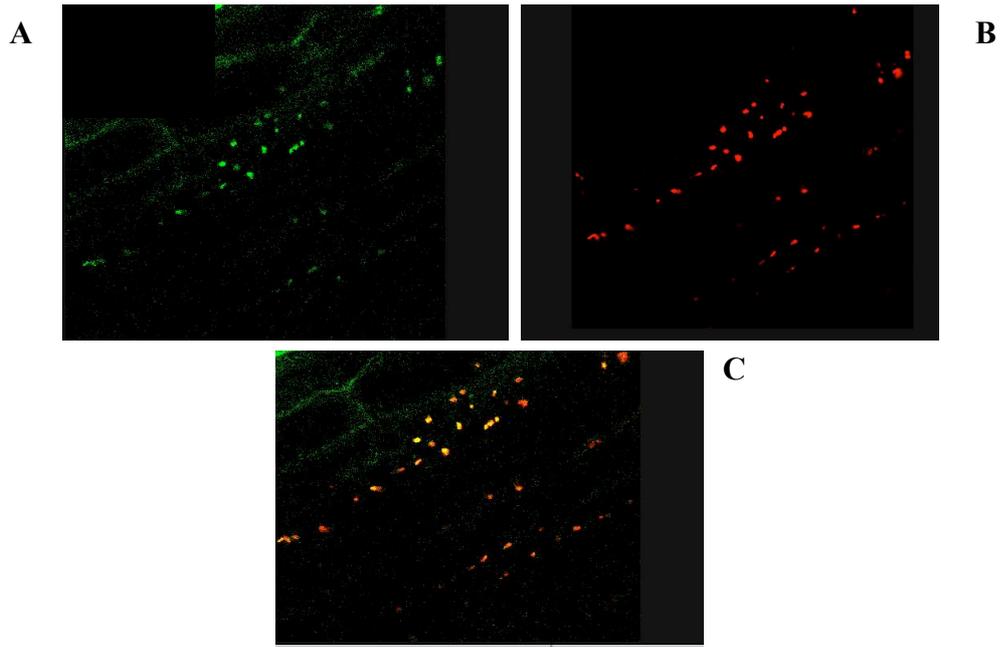


Figura 52. Analisi al confocale di radici co-trasformate con le fusioni GLB1::GFP e AtRecA::DsRed

A, fluorescenza emessa dalla GFP; B, fluorescenza emessa dalla RFP; C, immagine risultante dalla sovrapposizione di A e B.

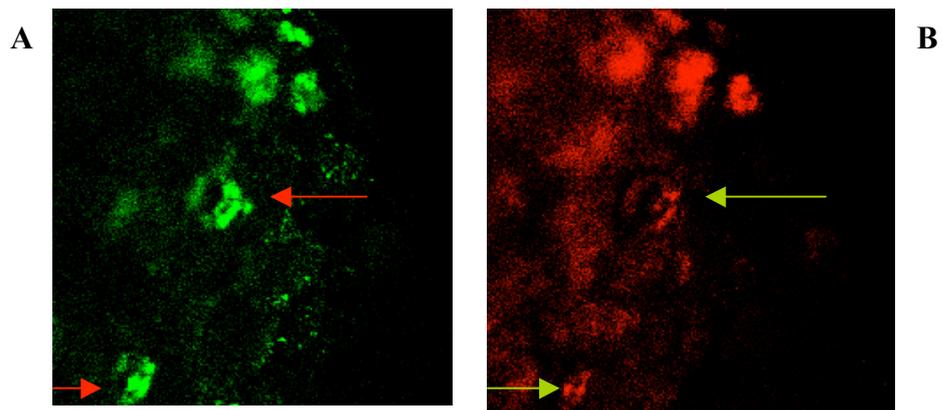


Figura 53. Analisi della localizzazione della fusione GLB1-GFP in foglie

A, fluorescenza emessa dalla GFP; B, fluorescenza emessa dalla clorofilla. Le cellule di guardia sono indicate dalle frecce in rosso (pannello A) e in verde (pannello B).

6 DISCUSSIONE

I trasportatori dell'ammonio ad alta affinità AMT1 presentano caratteristiche biochimiche e strutturali molto simili che ne rendono possibile il raggruppamento in un'unica famiglia genica. I geni che codificano per tali proteine sono stati identificati in diversi organismi, comprese le piante. Per quanto riguarda *A. thaliana* e *Oryza sativa*, il cui genoma è stato completamente sequenziato, sono stati identificati sei e dieci geni rispettivamente, che codificano per proteine appartenenti alla famiglia AMT1 (Kumar *et al.*, 2003; Sonoda *et al.*, 2003; Loquè *et al.*, 2006).

Inoltre nelle piante sono state identificate altre proteine coinvolte nel trasporto dell'ammonio, che sono, invece, ascrivibili alla famiglia AMT2. Le proteine raggruppate nella famiglia AMT2 sono meno numerose e mostrano un'identità inferiore al 25% con i membri appartenenti alla superfamiglia AMT1. Sono in grado di trasportare l'ammonio e non il metilammonio così come dimostrato da esperimenti condotti in lievito. Questi sistemi di trasporto sono presumibilmente in grado di rispondere alle varie condizioni ambientali e varie possibili concentrazioni di azoto nel mezzo in cui può venire a trovarsi una pianta, oltre che capaci di soddisfare le esigenze dei diversi tessuti nel corso delle varie fasi di sviluppo.

Come precedentemente discusso, lo studio di geni che codificano per i trasportatori dell'ammonio in piante leguminose presenta specifici motivi di interesse e può consentire una più completa comprensione dell'espressione e della regolazione degli stessi. La specificità del sistema sperimentale è, infatti, legata alla capacità che le leguminose hanno di instaurare un rapporto simbiotico con batteri azoto-fissatori, appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*. La caratterizzazione dei geni dei trasportatori AMT1 in una leguminosa, in particolare, può consentire di comprendere come una fonte addizionale di azoto, gli ioni ammonio formati all'interno del nodulo, sia integrata nel più generale meccanismo che controlla l'assunzione e la redistribuzione di azoto in pianta.

Lotus japonicus, per le sue caratteristiche genotipiche e per il suo relativamente breve ciclo vitale, rappresenta un ottimo sistema modello (vedi paragrafo 2.1). In laboratorio sono stati isolati e caratterizzati tre diversi trasportatori dell'ammonio *LjAMT1;1*, *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*. Questi risultano positivi ai tests di complementazione condotti nel triplo mutante di *S. cerevisiae* ($\Delta mep 1,2,3$). Inoltre è stata analizzata la loro espressione nei vari organi e tessuti, oltre alla regolazione in risposta a diversi stimoli abiotici, quale la disponibilità di azoto presente nel mezzo esterno (Salvemini *et al.* 2001; D'Apuzzo *et al.* 2004).

Il mio progetto di Dottorato è partito da questa caratterizzazione preliminare dei tre diversi trasportatori di *Lotus* per arrivare a comprenderne il ruolo svolto non soltanto nell'ambito dei flussi azotati che sono presenti all'interno della pianta, ma anche quello svolto in relazione a processi di organogenesi quali lo sviluppo del sistema radicale e del nodulo azoto fissatore.

Per potere fare questo, mi sono servita di approcci differenti. Un primo approccio è stato l'uso di un marcatore, visualizzabile *in vivo*, la Green Fluorescence Protein, che mi ha permesso di analizzare la localizzazione delle proteine AMT1 a livello sub-cellulare. L'analisi è stata fatta utilizzando il promotore eterologo 35S a causa dei bassi livelli di espressione garantiti dai promotori endogeni dei tre geni *LjAMT1*. Le fusioni AMT1;1-GFP e AMT1;3-GFP sono state localizzate sulla membrana plasmatica delle cellule radicali (Fig. 26). Le proteine AMT1 sono, quindi, correttamente tradotte e altrettanto correttamente vanno a localizzarsi sulla membrana plasmatica così come ipotizzabile sulla base della presenza di un peptide segnale, all'estremità ammino-terminale di entrambe le proteine (D'Apuzzo *et al.* 2004). Il risultato ottenuto inoltre è in accordo con quanto osservato per altri trasportatori in altre specie vegetali (*AtAMT1;1-AtAMT1;2-AtAMT1;3-AtAMT1;5-AtAMT2;1*) per i quali, i dati in letteratura indicano una localizzazione sulla membrana plasmatica (Udvardi *et al.* 2002; Loquè *et al.*, 2006; Yuan *et al.* 2007).

Il dato della localizzazione proteica va interpretato anche sulla base di quelli, precedentemente ottenuti, riguardanti la localizzazione spaziale dell'attività promotrice dei geni *LjAMT1;1* e *LjAMT1;3* (D'Apuzzo *et al.*, 2004). Per quanto riguarda *LjAMT1;1*, l'analisi dell'attività GUS nelle radici, indicava una espressione a livello dei peli radicali, cellule corticali, endoderme e periciclo, per cui la localizzazione sulla membrana plasmatica suggerisce un ruolo nell'assorbimento dell'ammonio dall'ambiente circostante e nel suo trasporto attraverso i vari strati cellulari fino ai vasi xilematici e/o nel recupero dello stesso, perso nell'ambiente esterno o nello spazio apoplastico. Del resto funzioni analoghe nel trasporto dell'ammonio dal suolo attraverso le cellule della radice della pianta sono in accordo con quelle postulate per le proteine AMT1 degli altri sistemi. I primi esperimenti che mostrano un diretto coinvolgimento delle proteine AMT1 nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno delle cellule vegetali, sono stati pubblicati da Kaiser e collaboratori nel 2002. In quel lavoro è stato caratterizzato un mutante *knockout* di *Arabidopsis* per il gene *AtAMT1;1* che mostra una riduzione della capacità del trasporto di ammonio dal mezzo esterno alle radici, pari al 30% rispetto a quella delle piante wild type. Più recentemente il quadruplo mutante per i geni *AtAMT1;1-1;2-1;3-1;5* di *Arabidopsis thaliana* ipotizza come i quattro trasportatori, che hanno una spazialità di espressione solo parzialmente sovrapponibile a livello delle cellule della radice e che sono tutti localizzati sulla membrana plasmatica, svolgano un'azione coordinata nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno fino al cilindro vascolare (vedi Par. 1.6; Yuan *et al.* 2007).

Per quanto riguarda il gene *LjAMT1;3*, le fusioni traduzionali tra la sua sequenza regolatrice e il gene *gusA* avevano evidenziato espressione a livello del cilindro vascolare (D'Apuzzo *et al.* 2004) ed in questo caso il ruolo specifico della proteina, localizzata sulla PM, potrebbe essere quello di effettuare il down-loading dell'ammonio ai vasi xilematici. Anche in *Lotus* quindi l'espressione e la localizzazione dei trasportatori AMT1 potrebbe essere coordinata in maniera da

permettere il trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno alle cellule dei peli radicali ed epidermide ed il suo successivo passaggio, attraverso i vari strati cellulari, fino ai vasi xilematici.

Per quanto riguarda, invece, la fusione *Lj*AMT1;2-GFP, le radici, contenenti il costrutto, quando osservate al microscopio confocale, davano un segnale di fluorescenza diffuso al punto da non permettermi di individuare la precisa localizzazione di questo trasportatore (dato non mostrato). E' possibile che la localizzazione della proteina *Lj*AMT1;2 sia meno stabile rispetto a quella di AMT1;1 ed 1;3 e che non rimanga ancorata alla PM ma sia soggetta ad un tipo di regolazione post-traduzionale che preveda una sua ri-veicolazione dalla PM per entrare nel circuito di degradazione proteica (proteasoma) mediato dalla poliubiquitinazione (Frugis and Chua 2002) . Un'altra possibilità è che questo segnale diffuso, non rifletta un reale significato fisiologico ma sia un artefatto legato ad un "position-effect" e cioè ad un evento di integrazione del T-DNA in un sito che determina una espressione particolarmente elevata della fusione AMT1;2-GFP. Comunque, è interessante notare che lo stesso tipo di risultato è stato ottenuto in ceppi di *S. cerevisiae* trasformati con le tre fusioni AMT1-GFP (dati non mostrati). L'analisi dei trasformanti stabili ottenuti sicuramente gioverà all'analisi, confermando o meno i risultati sin qui ottenuti per *Lj*AMT1;1 e *Lj*AMT1;3 e probabilmente mi permetterà di chiarire meglio la localizzazione di *Lj*AMT1;2 e la sua eventuale regolazione, anche in relazione alle varie fasi di sviluppo della pianta oltre che alle diverse condizioni di crescita.

Una caratterizzazione funzionale mirata di una sequenza genica passa necessariamente attraverso un approccio di tipo genetico che consenta di analizzare il fenotipo associato ad una mutazione introdotta nel gene di interesse. Questo approccio di "Reverse Genetics" in pianta, dove le procedure di gene targeting mediate da ricombinazione omologa non sono abbastanza efficienti, si basa preferenzialmente su strategie di silenziamento del gene bersaglio basate sul

meccanismo di RNA interference (vedi Par. 5.2). Questa tecnica, ampiamente usata in ambito vegetale, permette infatti, di ottenere silenziamento di geni bersaglio con un'alta efficienza (80-95% dei trasformanti). I trasportatori dell'ammonio in *Lotus* sono espressi in tutti gli organi della pianta, compreso il nodulo, anche se con livelli e localizzazioni diverse, come dimostrato dall'analisi di fusioni traduzionali con il gene *gusA*, che suggeriscono per questi una specializzazione di funzione (D'Apuzzo *et al.*, 2004). Bisogna però sottolineare che, come evidente dai dati relativi ai mutanti *knock-out* di *Arabidopsis* (Kaiser *et al.* 2002; Yuan *et al.* 2007), i trasportatori hanno anche funzioni ridondanti nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno della pianta e inoltre agiscono in maniera sinergica. Pertanto, per potere avere una visione globale sul ruolo dei trasportatori e a livello del fenotipo simbiotico e a livello del fenotipo di crescita, ho deciso di silenziare tutti e tre i geni *AMT1* contemporaneamente. Una strategia simile è stata recentemente utilizzata con successo da Ott e collaboratori (2005) che sono riusciti nell'intento di silenziare contemporaneamente ed efficientemente l'intera famiglia delle tre leghemoglobine simbiotiche utilizzando dei domini di sequenza comuni.

L'allineamento delle tre sequenze *LjAMT1* con il programma ClustalW, mi ha consentito di individuare la regione che presentava la maggiore identità nucleotidica all'estremità C-terminale, e che marcasse in maniera specifica i trasportatori (Fig. 28). L'analisi molecolare dei trasformanti ha indicato un maggiore livello di silenziamento dei geni *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2* nella linea *LjAMT-Com-21*. In particolare, diversi tipi di indagine per RT-PCR semiquantitativa e Northern blot hanno indicato una significativa down-regolazione (intorno al 70%) dei due geni (Fig. 29, 30, 32 e Tabella 3). L'analisi dei livelli di espressione del trasportatore *LjAMT1;3* non è stata possibile, perché normalmente in piante wild type questo ha un così basso livello di trascrizione da non potere essere quantizzato neanche per RT-PCR semi-quantitativa (D'Apuzzo *et al.* 2004). Inoltre, la presenza degli small RNA interference (si-RNAs) nelle linee interferite mi ha indicato che il silenziamento

genico osservato fosse effettivamente dovuto ad un meccanismo diretto di RNA-interference, confermando quindi che il materiale ottenuto era adatto alla valutazione dei fenotipi di crescita e simbiotici associati al silenziamento (sfortunatamente non completo) dei geni *LjAMT1*.

La linea 21 è stata dunque analizzata per il fenotipo di crescita, in termini di lunghezza della radice primaria e della porzione aerea. L'analisi ancora preliminare, si è limitata al momento a condizioni di crescita standard rappresentate dal mezzo B5 Gamborg che contiene una elevata concentrazione sia di ammonio solfato (1mM) che potassio nitrato (29mM). In queste condizioni di crescita, non sono state riscontrate differenze significative tra le piante wild type, utilizzate come controllo, e la linea interferita. Una ovvia spiegazione di questo risultato, potrebbe essere legata al fatto che la linea interferita presenta un significativo ma non completo silenziamento per entrambi i trasportatori analizzati. E' possibile, dunque che la percentuale di silenziamento osservata non sia sufficiente a determinare anomalie nel fenotipo di crescita. Un'altra spiegazione potrebbe essere legata alle condizioni di crescita utilizzate che non evidenzierebbero un fenotipo difettivo. Va infatti ricordato che oltre ai trasportatori AMT1 ad alta affinità (HATS), che lavorano a basse concentrazioni di ammonio (intervallo micromolare), in pianta, esiste un'altra classe di trasportatori a bassa affinità (LATS) che, evidentemente, nella linea interferita potrebbe trasportare l'ammonio in quantità tali da garantire alla pianta un giusto apporto di fonti azotate, necessarie per assicurarle una crescita di tipo selvatico. Inoltre, se l'ammonio è la fonte azotata preferita in particolari condizioni di crescita, anche il nitrato viene fortemente assorbito dal mezzo esterno ad opera di efficienti sistemi di trasporto, (trasportatori del nitrato, *NTRI*), questi ultimi, dunque, assieme ai trasportatori dell'ammonio LATS, probabilmente riescono a sopperire alla carenza di fonti di ammonio, dovuta al parziale silenziamento dei trasportatori AMT1. Infine, l'ammonio trasportato dal mezzo esterno all'interno delle cellule radicali della pianta, non è l'unica fonte di cui possono disporre le piante, che infatti possono ottenerlo

“internamente” attraverso diverse vie cataboliche come, ad esempio, la degradazione di amminoacidi o la fotorespirazione.

L’analisi del fenotipo di crescita andrà quindi analizzato in condizioni sperimentali diverse, anche sulla base dei dati recentemente comparsi in letteratura, che riportano come il quadruplo mutante di *Arabidopsis*, evidenzia un particolare fenotipo di crescita, con una riduzione di circa il 50% della biomassa della parte aerea, solo quando un particolare intervallo di concentrazioni di ammonio (200-1000 micromolare ammonio succinato) è utilizzato per la crescita (Yuan *et al.* 2007).

In laboratorio era stato precedentemente osservato che i trasportatori *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2* sono espressi, con localizzazioni diverse, anche nel tessuto nodulare (D’Apuzzo *et al.* 2004). In particolare, *LjAMT1;1* è espresso nelle cellule invase nella zona centrale del nodulo maturo e nelle strutture vascolari di quest’ultimo, mentre *LjAMT1;2* è espresso solo nella parte periferica della zona centrale. Per quanto riguarda *LjAMT1;1*, ho ottenuto ulteriori dati, che non fanno parte dell’attività sperimentale associata a questa tesi, sul suo profilo di espressione nel tessuto nodulare nel corso dell’organogenesi del nodulo azoto fissatore, evidenziando che l’attività della fusione *prom-LjAMT1;1-gusA* cambia spazialmente e temporalmente nel corso dello sviluppo del nodulo e che tale profilo non è influenzato dalla mancata fissazione dell’azoto, perché è conservato nel caso di inoculazioni con ceppi di *M. loti fix⁻* (dati non mostrati). Comunque, i profili di espressione nel nodulo maturo fanno immaginare un ruolo di *AMT1;1* e/o *1;2* nel funzionamento di questo e possibilmente nel flusso dell’azoto atmosferico fissato che viene rilasciato dai batteroidi sotto forma di ammonio (vedi Par. 1.12). Le caratteristiche di trasportatori ad alta affinità degli *AMT1* mal si adattano al microambiente delle cellule invase del nodulo in cui la concentrazione di ammonio è altissima (circa 20 mM). Quindi, un possibile ruolo potrebbe essere quello del recupero dell’ammonio perso nello spazio apoplastico del tessuto nodulare. In ogni caso, tali putative funzioni dovrebbero risultare limitanti per il flusso dell’azoto fissato al resto della pianta e quindi piante

nodulate interferite potrebbero mostrare condizioni di stress con fenotipi clorotici dello shoot. L'osservazione delle piante interferite, inoculate con *M. loti*, in realtà, non ha mostrato alterazioni nella simbiosi che, in termini di cinetica di nodulazione, numero di noduli, fenotipo e biomassa dello shoot, non presentava, anomalie quando i dati sono confrontati con quelli di piante wild type, utilizzate come controllo (Fig. 33). Ancora una volta, il mancato completo silenziamento osservato nelle piante interferite, potrebbe essere responsabile della mancanza di fenotipi simbiotici alterati.

In letteratura è noto che elevate concentrazioni di ammonio, in particolare 2 mM ammonio succinato e 10 mM ammonio nitrato, hanno un'azione inibitoria precoce sul fenotipo simbiotico di piante wild type (Barbulova *et al.* 2007). Il meccanismo di inibizione dell'organogenesi nodulare e di interferenza con il normale pathway di trasduzione dei fattori Nod non è ancora noto, ma le piante leguminose sono certamente in grado di percepire il segnale di eccesso di azoto combinato nel terreno.

Come descritto precedentemente, i trasportatori dell'ammonio sono espressi in radice nel cilindro vascolare, nel cortex e nell'endoderme e in particolare *LjAmt1;1*, è anche espresso a livello dei peli radicali, che sono il primo sito di interazione tra pianta e batterio. Questo profilo di espressione potrebbe suggerire per il trasportatore *LjAMT1;1* una funzione di sensing della concentrazione di azoto, in particolare della condizione di carenza di azoto del mezzo esterno (D'Apuzzo *et al.*, 2004). Se così fosse, le piante interferite, in cui c'è silenziamento dei trasportatori e, in particolare di *LjAMT1;1*, quando cresciute in alto ammonio potrebbero non essere in grado di avvertire questa concentrazione inibitoria (2 mM ammonio succinato, 10 mM ammonio nitrato) e il fenotipo simbiotico, contrariamente a quanto si osserva nelle piante wild type, potrebbe non essere totalmente inibito. Questo tipo di ipotesi sarà chiarito analizzando i fenotipi simbiotici precoci nelle piante interferite dopo inoculazione con *M. loti*.

Come noto dalla letteratura, *LjAMT1;3* è il trasportatore di *Lotus* meno espresso in tutti gli organi (D'Apuzzo *et al.* 2004), per potere quindi studiare la sua funzione mi sono avvalsa di un costrutto che over-esprimesse il gene, per verificare se l'espressione di *LjAMT1;3* in tessuti e momenti diversi da quelli in cui è normalmente espresso, determinasse un fenotipo da guadagno di funzione. La sequenza codificante *LjAMT1;3* e la regione 3' non tradotta è stata quindi posta sotto il controllo del promotore costitutivo 35S. Nelle piante che mostravano un incremento della quantità di trascritto (Fig. 34 e 35) è stato verificato, attraverso un saggio funzionale, se la proteina over-espressa fosse effettivamente funzionante. In effetti la linea transgenica analizzata mostra un chiaro fenotipo di iper-sensibilità a 2,5 mM metilammonio (Fig. 36). Quest'ultimo, è l'analogo dell'ammonio ma, a differenza di questo, non viene assimilato e si accumula nella pianta fino a raggiungere livelli che risultano tossici per questa. L'osservazione della linea over-esprimente, a tempi precoci (6 giorni dal trasferimento su metilammonio), mostrava chiaramente un arresto precoce di crescita rispetto alle piante wild type che avevano un normale fenotipo (Fig. 36). Evidentemente l'over-espressione causa un maggiore trasporto di metilammonio che non potendo essere metabolizzato ad opera del sistema GS/GOGAT, si accumula molto più rapidamente che nelle piante wild type, determinandone il precoce arresto di crescita.

Sorprendentemente, la linea over-esprimente tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, mostra un fenotipo di crescita alterato, con ridotte dimensioni sia della porzione aerea che della radice principale e di quelle secondarie (Fig. 38). Questo fenotipo di ridotta crescita non è certamente quello che ci si aspetterebbe dall'over-espressione di un trasportatore, che dovrebbe portare un beneficio alla pianta, almeno in determinate condizioni.

Il fenotipo riscontrato, se dipendente dall'over-espressione del trasportatore dell'ammonio può essere giustificato in diversi modi.

1) il maggiore apporto di ammonio all'interno della pianta determina un cambiamento dello *status* nutrizionale che ne determina un rallentamento della crescita non avendo la pianta la necessità, di sviluppare ulteriormente le sue radici alla ricerca di fonti azotate.

2) il maggiore apporto di ammonio all'interno della pianta determina tossicità ed il fenotipo osservato è associato ad una condizione di stress della pianta.

3) l'aumentata espressione di *LjAMT1;3* aziona un meccanismo di signalling che è associato al programma di sviluppo del sistema radicale e *LjAMT1;3* svolge un ruolo all'interno di tale meccanismo, indipendente dalla sua funzione di trasportatore.

Per poter validare tali ipotesi è stato analizzato il fenotipo di crescita in presenza di diverse concentrazioni di ammonio nitrato, come unica fonte azotata, e in completa assenza di azoto. Come si può notare in Figura 39, quando le piante vengono cresciute in diverse concentrazioni di ammonio (10 μ M e 1 mM ammonio nitrato), queste continuano a mostrare un fenotipo ridotto e lo stesso risultato è ottenuto quando le piante over-esprimenti sono state cresciute su di un mezzo completamente privo di fonti azotate (Fig. 39). L'over-espressione, dunque, determina la formazione di un fenotipo di crescita alterato, indipendentemente dalla presenza o meno di fonti azotate nel mezzo esterno e dalla concentrazione di queste, quando presenti. I dati suggeriscono, quindi, che *LjAMT1;3*, oltre ad una funzione di mero trasporto dell'ammonio, come postulato sulla base dei dati relativi all'espressione del gene in radice e alla localizzazione della proteina sulla membrana plasmatica delle cellule radicali, oltre a quelli di sensibilità al metilammonio osservato nelle linee over-esprimenti (Fig. 26 e 36), sia probabilmente coinvolto nel programma di sviluppo della pianta. A supporto di questa ipotesi esistono dati in letteratura, relativi ad altre proteine, facenti parte del metabolismo azotato, come il trasportatore del nitrato ad alta affinità di *Arabidopsis thaliana*, *AtNTR2.1*. L'analisi del *knock-out* ha, infatti, dimostrato che, indipendentemente dalla concentrazione di nitrato presente nel mezzo di crescita, e quindi dalla sua attività di trasporto, questo è

in grado di influenzare l'architettura del sistema radicale (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.* 2006).

Per quanto riguarda il ruolo di sensore delle condizioni azotate giocato da un trasportatore dell'ammonio, questo è già stato riportato in letteratura per il gene *mep2* di *Saccharomyces cerevisiae* e negli ortologi di *Heleboma cylindrosporum* e *Tuber borchii* che oltre a funzionare da trasportatori dell'ammonio, controllano il programma di sviluppo che, in condizioni di carenza azotata, porta allo sviluppo di pseudoife (Lorenz and Heitman 1998; Yakunin *et al.* 2002; Javelle *et al.* 2003).

La ricerca di proteine AMT di pianta in grado di svolgere una funzione analoga a quella da noi suggerita per *LjAMT1;3* identifica *AtAMT1;4* di *A. thaliana* come un suo possibile ortologo. Quest'ultimo infatti, è l'unico della famiglia *AMT1* di *Arabidopsis* a mostrare un profilo di espressione simile a quello di *LjAMT1;3* con bassissimi livelli di trascritto in tutti gli organi e in tutte le condizioni sperimentali analizzate nelle numerosissime banche dati disponibili in rete.

I dati ottenuti dall'analisi fenotipica delle linee over-esprimenti che suggeriscono un ruolo di sensore per *AMT1;3*, indipendentemente dalla sua funzione di trasporto, pongono in maniera stringente la domanda se tale funzione sia svolta da questa proteina normalmente nelle condizioni fisiologiche di crescita delle piante wild-type ed in questo caso, in quali condizioni eserciti tale ruolo. In letteratura è noto che crescenti concentrazioni di ammonio nel mezzo sono in grado di influenzare lo sviluppo di pianta alterando il piano di sviluppo della pianta ed in particolare lo sviluppo del suo sistema radicale. Diverse ipotesi sono state avanzate per spiegare l'effetto tossico dell'ammonio e talvolta i dati riportati risultano in contraddizione fra di loro. Una possibilità è che i meccanismi di trasporto dell' NH_4^+ , essendo associati all'efflusso di protoni nel mezzo esterno, possano determinare acidificazione del mezzo o alterazione dei valori di pH citoplasmatico; ma in taluni casi la tossicità è anche osservata con mezzi tamponati (Barker *et al.* 1966; Bligny *et al.* 1997; Blacquiere *et al.* 1998). Un'altra possibilità è che la limitazione di carboidrati

utilizzati per l'assimilazione dell'ammonio in eccesso nelle radici possa essere responsabile del fenotipo, ma anche in questo caso si è visto recentemente che l' NH_4^+ può anche essere trasportato come tale nei vasi xilematici e quindi il suo trasporto dal terreno alle radici non significa necessariamente un suo accumulo tossico all'interno di queste (Britto *et al.* 2001). In alcuni casi si è visto che effettivamente l'aggiunta di α -chetoglutarato, una sorgente carboniosa chiave per l'assimilazione dell'ammonio, può ridurre i sintomi di tossicità, ma ciò non è sempre vero (Magalhaes *et al.* 1992; Kronzucker *et al.* 1995). Un'altra ipotesi formulata è che la tossicità sia legata al disaccoppiamento della foto-fosforilazione nei cloroplasti (Pearson and Stewart 1993) oppure che sia dovuta alla diminuzione della concentrazione citoplasmatica di alcuni cationi essenziali come K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} (Holldampf and Barker 1993).

La nostra analisi fenotipica condotta su piante wild type cresciute su mezzo solido privo di azoto o contenente 10 μM , 100 μM o 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM e 50 mM ammonio nitrato, si è focalizzata in particolare sui dati relativi alla cinetica di allungamento della radice primaria. In accordo con i dati presenti in letteratura, la radice primaria presentava una riduzione delle sue dimensioni all'aumentare della concentrazione di ammonio nel mezzo (Fig. 39D). Tale fenotipo è particolarmente evidente a 20 e 50 mM ammonio nitrato e, rassomiglia molto al fenotipo osservato per la linea over-esprimente cresciuta in presenza o assenza di fonti azotate. Per cercare di verificare se esisteva una correlazione fra questi due dati sono andata a verificare l'espressione di *LjAMT1;3* nelle piante wild type, cresciute in presenza delle diverse concentrazioni di ammonio nitrato. Come atteso e come già noto dalla letteratura, l'analisi effettuata per Real-Time RT-PCR, ha mostrato livelli basali di *LjAMT1;3* nelle piante cresciute in carenza di azoto (D'Apuzzo *et al.* 2004), mentre si osservava, invece, un'induzione della sua espressione genica in presenza di 20 mM ammonio nitrato (Fig. 40). Gli altri due trasportatori della famiglia, *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2* presentavano un profilo di espressione completamente diverso in quanto, la loro espressione genica era leggermente indotta in assenza di azoto e presentava

livelli ridotti in alto ammonio (Fig. 41). In letteratura è già stato riportato solo un altro caso di trasportatore dell'ammonio ad alta affinità, la cui espressione viene indotta da altre concentrazioni di ammonio, il gene *LeAMT1;2* di *Lycopersicon esculentum* (Lauter *et al.* 1996; von Wirèn *et al.* 2000). Questi dati suggeriscono quindi un ruolo specifico di *AMT1;3* in accordo con un profilo di espressione assolutamente peculiare nell'ambito della famiglie *AMT1*. I trasportatori, dunque, potrebbero svolgere ruoli differenti nel trasporto dell'ammonio, entrando in gioco a differenti concentrazioni esterne (Lauter *et al.* 1996).

Questi dati nel loro insieme mi hanno permesso di ipotizzare un modello di funzionamento del trasportatore *LjAMT1;3*; in cui questo, oltre ad una funzione di trasporto dell'ammonio, possa essere coinvolto anche in un pathway di “signalling” della concentrazione di ammonio presente nel mezzo che potrebbe essere collegato ad un programma di sviluppo della pianta stessa. In particolare, in funzione della quantità di ammonio disponibile, viene segnalato alla pianta se è necessario o meno modificare/allungare il proprio apparato radicale. Naturalmente, sarà in futuro interessante identificare il fattore responsabile dell'induzione della trascrizione di *LjAMT1;3*. Una volta che l' NH_4^+ viene assorbito attraverso le radici dal mezzo esterno, è successivamente trasportato, tal quale, o sotto forma di amminoacidi, attraverso il cilindro vascolare ai vari organi. Una delle possibilità è che *LjAMT1;3* venga attivato in seguito all'ingresso di NH_4^+ all'interno della pianta. L'ammonio in quanto tale o i prodotti della sua assimilazione (glutamina/glutammato), in determinate concentrazioni, potrebbero agire direttamente o indirettamente tramite metaboliti intermedi, sulla regolazione della trascrizione del gene. In letteratura è noto, ad esempio, che la glutamina è in grado di regolare la trascrizione degli *OsAMT1* in riso, come evidenziato da Sonoda e collaboratori. Questi hanno, dimostrato che la metionina sulfoximina (MSX), che è un inibitore della glutamina sintetasi, è in grado di inibire gli effetti dell'ammonio sull'espressione del trasportatore *OsAMT1;1*, e inoltre che la glutamina aggiunta nel mezzo esterno

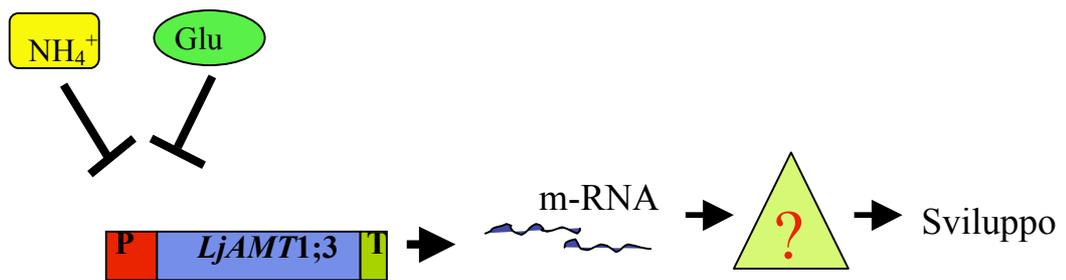
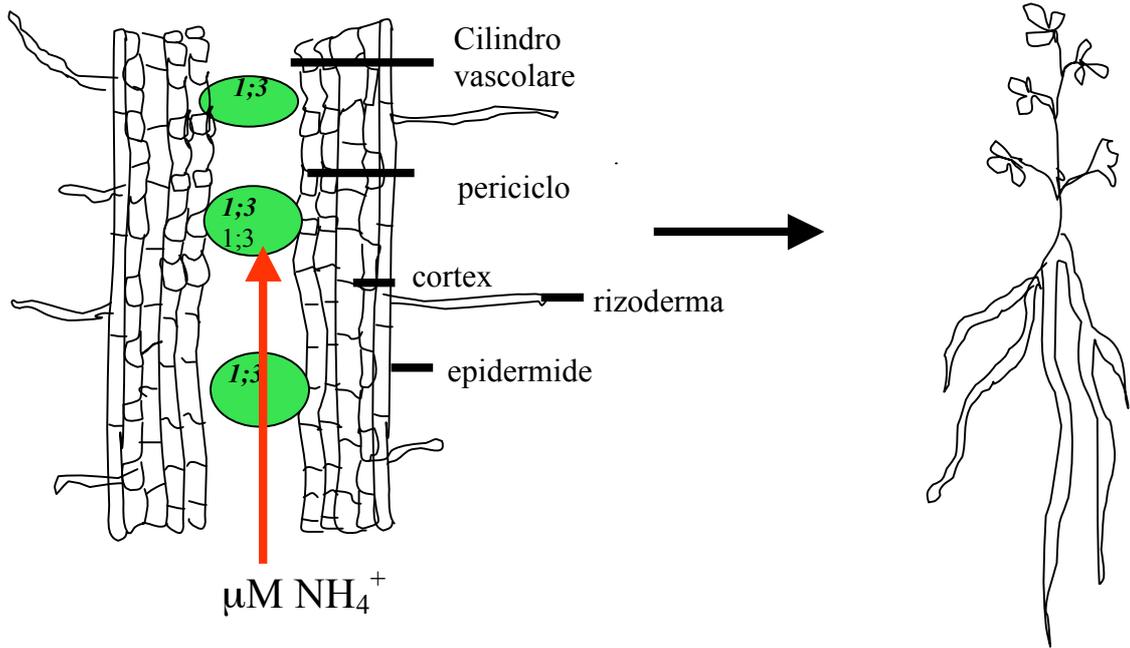
produce gli stessi effetti dell'ammonio sulla regolazione degli *OsAMT1*, attivandone o reprimendone la trascrizione (Sonoda *et al.* 2003).

Nel modello proposto, quando l'ammonio è presente in basse concentrazioni, dell'ordine delle micromoli, non è in grado di interagire direttamente o di attivare la possibile cascata di eventi che regolano la trascrizione del gene, *LjAMT1;3* e questo, pertanto, risulta espresso a livelli basali a livello del cilindro vascolare, come dimostrato tramite le fusioni *gusA* (D'Apuzzo *et al.* 2004). I bassi livelli di espressione rappresentano un segnale per la pianta tale da determinare una normale crescita e, in particolare, un normale sviluppo del suo apparato radicale. Viceversa, quando la concentrazione di ammonio nel mezzo esterno è elevata (20 mM), si ha un maggiore influx di NH_4^+ che di per se o attraverso la sintesi dei suoi prodotti di assimilazione, glutammina e glutammato, attiva direttamente o indirettamente la trascrizione di *LjAMT1;3* la cui espressione. Gli aumentati livelli di trascritto rappresentano un segnale che in qualche modo si inserisce nei meccanismi che determinano lo sviluppo della pianta, probabilmente fungendo da molecola effettrice, attivando o disattivando molecole, quali, ad esempio, fito-ormoni. Di conseguenza, in queste condizioni in cui non c'è la necessità di allungare ulteriormente l'apparato radicale della pianta, il meccanismo attivato ne arresta la crescita. In questo modello, quindi, un ruolo chiave è giocato dall'ammonio esterno o dai prodotti della sua assimilazione nel determinare, quando presenti in alte concentrazioni, la maggiore espressione di *LjAMT1;3* e ciò, a sua volta, giocherebbe un ruolo chiave nel segnalare alla pianta dove e come indirizzare il proprio sviluppo, divenendo così, responsabile del fenotipo osservato. Nel caso delle piante over-esprimenti, quindi, la over-espressione di *LjAMT1;3*, determina una situazione analoga a quella che si ha quando piante wild type vengono cresciute in alte concentrazioni di ammonio (20 mM, ammonio nitrato), e indipendentemente dalla presenza o meno di azoto nel mezzo esterno o dalla sua concentrazione, la condizione sentita nelle piante over-*AMT1;3* è

quella di “alto ammonio” che si traduce nel rallentamento della cinetica di allungamento dell'apparato radicale (Fig 54).

E' probabile che la regolazione della trascrizione di *LjAMT1;3*, influenzata dall'ammonio tal quale o da metaboliti quali la glutammina, non è solo dettata dalle diverse concentrazioni di ammonio presenti nel mezzo esterno, ma anche dall'ammonio prodotto internamente alla pianta. In altre parole, è probabile che *LjAMT1;3* venga regolato dallo *status* azotato generale della pianta e che ne risponda, attivando a sua volta i meccanismi necessari affinché la pianta, in funzione della disponibilità di ammonio o di fonti azotate in generale, regoli il suo sviluppo. A sostegno di tale ipotesi ci sono i dati relativi al mutante di *Lotus*, *har1-1*. Questo, quando inoculato con il partner simbiotico *M. loti*, presenta un fenotipo iper-nodulante, presentando, un numero di noduli di gran lunga superiore a quello normalmente osservato in una pianta wild type. In associazione a tale fenotipo il mutante presenta anche ridotte dimensioni dell'apparato radicale con una radice primaria significativamente più corta ed un numero maggiore di radici secondarie il cui allungamento è però precocemente bloccato. La presenza di un maggiore numero di noduli e quindi di una maggiore concentrazione di azoto fissato, potrebbe, anche in questo caso, indirettamente determinare la ridotta cinetica di allungamento delle radici. Per potere validare tale ipotesi, sarebbe quindi interessante, in futuro, andare ad analizzare nelle piante iper-nodulanti il livello di espressione del trasportatore *LjAMT1;3*.

A



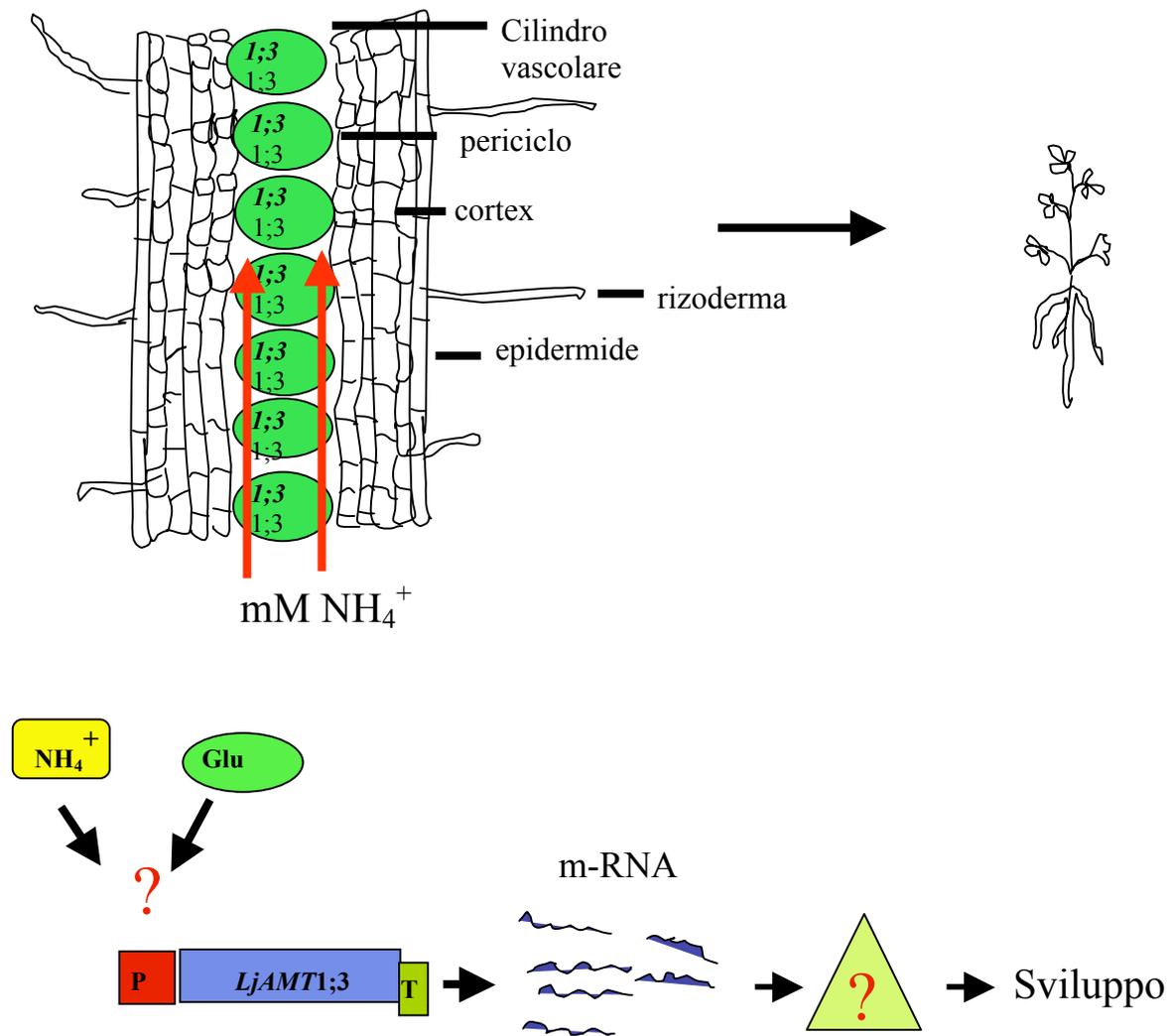


Figura 54. Modello proposto per la funzione di *LjAMT1;3*

A, basse concentrazioni di NH_4NO_3 (μM) **B**, alte concentrazioni di NH_4NO_3 (mM)

La linea over-esprimente, infine, è stata analizzata per il fenotipo simbiotico, per potere verificare se in qualche modo *LjAMT1;3* fosse coinvolto nell'interazione tra *Lotus* e *M. loti*. Le piante, infettate, sono state seguite per circa un mese e la loro analisi non ha mostrato anomalie nel fenotipo simbiotico. Il dato ottenuto è in accordo con quello riportato in letteratura che vede *LjAMT1;3* blandamente espresso nella radice e per il quale inoltre non è stata osservata espressione all'interno del nodulo (D'Apuzzo *et al.* 2004) e suggerisce che questo trasportatore non è implicato

nelle varie fasi dell'interazione simbiotica e nel processo di organogenesi del nodulo stesso.

La seconda parte del progetto di Dottorato è stato volto all'analisi della proteina PII-like di *Lotus*, codificata dal gene *GLB1*. In letteratura è noto che il metabolismo dell'azoto è strettamente collegato a quello del carbonio, pertanto la variazione del rapporto C/N viene generalmente avvertita e l'organismo ne risponde adeguatamente. Il ruolo di coordinatore dei due metabolismi è stato dimostrato, in alcuni casi, essere svolto dalla proteina PII, la cui funzione e la cui regolazione è stata efficientemente studiata nel batterio enterico *Escherichia coli*. In questo si è visto che, in risposta alle variazioni di carbonio (2-oxoglutarato) e di azoto (glutammina), subisce modifiche covalenti (uridililazione/de-uridililazione) in grado di regolare la sua attività (Arcondeguy *et al.* 2001; Ninfa and Atkinson, 2000). Una proteina PII-like, codificata dal gene *GLB1* è stata isolata anche in ambito vegetale, in particolare in *Arabidopsis thaliana* per la quale è stato osservato un ruolo analogo a quello svolto in *E. coli*, risponde, infatti, alla variazione del rapporto C/N (Hsieh *et al.* 1998; Ferrario-Mèry *et al.* 2005). In *Lotus japonicus* recentemente è stato identificato in una delle banche EST rilasciate, la sequenza del cDNA intero del gene *GLB1* codificante per la proteina PII-like. Era quindi interessante verificare se anche in una leguminosa la PII svolgesse ruoli analoghi a quelli riportati in letteratura per altri sistemi sperimentali. Inoltre, nel nostro caso lo studio di PII era strettamente connesso alle investigazioni sul trasporto dell'ammonio e sul ruolo giocato dalle proteine AMT1; infatti, in *E. coli* è stato identificato un omologo di *glnB* che codifica per la PII, il gene *glnK*, che codifica per una seconda proteina, appartenente alla famiglia PII che è in grado di regolare l'attività del trasportatore dell'ammonio *AmtB* in risposta alla variazione della concentrazione di azoto presente nel mezzo esterno (Dandekar *et al.* 1998). Pertanto, lo studio di PII in *Lotus* si riprometteva anche di chiarire se fra i possibili bersagli dell'attività regolativa di PII ci fossero anche i trasportatori *LjAMT1*. Inoltre, lo studio della proteina PII in *Lotus* è di grande

interesse in considerazione del fatto che l'interazione simbiotica, che la pianta è in grado di instaurare con i batteri azoto-fissatori, e in particolare la conseguente formazione del nodulo, è controllata da un fine equilibrio tra le fonti azotate da un lato e quelle carboniose dall'altro.

L'analisi del livello di espressione genica nei diversi organi a livello di espressione di RNA e la sua localizzazione spaziale a livello sub-cellulare, analizzando l'attività di fusioni traduzionali tra la sequenza regolatrice e il gene *gusA* di *Escherichia coli* ha innanzitutto mostrato espressione in tutti gli organi analizzati, foglie, radici e noduli (Fig. 48, 49 e 50). In particolare l'analisi della fusione p*GLBI*::*gusA* ha evidenziato espressione nelle foglie a livello del sistema vascolare principale e secondario, oltre che a livello delle cellule di guardia delle aperture stomatiche (Fig. 50). Per quanto riguarda, invece, l'espressione in radice, questa si esprime nel cilindro vascolare e precisamente nello xilema e nel floema, inoltre è espressa nei peli radicali e nella cuffia delle radici principali e secondarie (Fig. 48). In accordo con i dati molecolari di RT-PCR semi-quantitativa, è stata osservata attività GUS anche nei noduli maturi. Sezioni al vibratomo di 60 µm, hanno evidenziato un'espressione a livello dell'inner cortex, in particolare nelle strutture vascolari (Fig. 49). La sovrapposibilità fra i dati di RT-PCR e l'analisi dell'attività GUS, indica che la sequenza regolatrice isolata, della grandezza di 1600 coppie di basi contiene quindi tutte le regioni e domini necessari per il controllo del profilo di espressione trascrizionale di *GLBI*. L'analisi *in silico* della sequenza regolatrice ha rivelato la presenza di una putativa TATA box in posizione 869, e diversi domini putativi di legame con fattori trascrizionali di pianta (*A. thaliana* e *Oryza sativa*) anche se per questi, non è ancora noto il tipo di regolazione e in risposta a quali stimoli, biotici o abiotici, entrino in gioco (Fig. 47). I profili di espressione rilevati in radice e noduli sono di estremo interesse, in quanto fino ad oggi, la funzione di questa proteina era stata associata esclusivamente alle foglie dove si riteneva svolgesse la sua azione. Quest'ultima, è stata recentemente correlata, in mutanti *knock-out* di *Arabidopsis* in cui si osserva riduzione dei livelli di

ornitina, citrullina e arginina, alla regolazione dell'attività dell'N-acetyl glutamate kinase (NAGK), un enzima chiave del pathway di biosintesi dell'arginina (Ferrario-Mery *et al.* 2006).

La regolazione a livello trascrizionale di *GLBI* è stata valutata nel corso del ciclo luce/buio per confrontare i profili di espressione con quelli osservati in altre piante. Piante wild type, cresciute in coltura idroponica, sono state prelevate a due tempi diversi, a metà del periodo di luce e alla fine del periodo di buio. L'analisi molecolare ha mostrato che in radice c'è una piccola differenza di livello di trascritto nei due tempi analizzati (Fig. 44). Per quanto riguarda le foglie, invece, ho osservato una forte regolazione del gene ed in particolare, mentre nelle ore di buio l'espressione del gene è down-regolata, alla luce si assiste ad un maggiore accumulo di m-RNA (Fig. 43). Il dato relativo all'espressione in foglia è in perfetto accordo con quanto osservato per il gene *GLBI* di *Arabidopsis thaliana* (Hsieh *et al.* 1998). Questo tipo di regolazione luce-dipendente osservato per l'espressione di *GLBI* in foglie è, consistente con la funzione di sensore delle variazioni della concentrazione di carbonio all'interno dell'organismo. Infatti, la produzione di fotosintati durante il periodo di luce, potrebbe evidentemente essere responsabile della regolazione osservata a carico dell'espressione genica.

Per ottenere informazioni più dettagliate circa la regolazione di *GLBI* e validare l'ipotesi, che, effettivamente, l'induzione dell'espressione osservata in foglia alla luce fosse dovuta ai prodotti della fotosintesi, ho effettuato un'analisi dell'espressione in foglia e radice di piante wild type, cresciute in condizioni idroponiche, tenute in condizioni di luce e di buio continuo (48h) in assenza di saccarosio e in presenza di questo (3%). I risultati hanno confermato anche in queste condizioni sperimentali per *GLBI* livelli di espressione simili in foglia e in radice e in entrambi gli organi, maggiori livelli di trascritto sono osservati alla luce (Fig. 45). In particolare, in queste condizioni sperimentali di buio e luce continua, l'induzione di espressione nel tessuto radicale aumenta fino a circa 3,5 volte (Fig. 45). Inoltre, in

accordo con quanto ipotizzato, la trascrizione sia in foglie che in radici, è indotta dalla presenza della fonte di carbonio (saccarosio, 3%) sia alla luce che al buio. In particolare al buio, la down-regolazione osservata in assenza di saccarosio, viene praticamente annullata dall'aggiunta di quest'ultimo (Fig. 45). Tali dati sono in perfetto accordo con quelli presenti in letteratura e relativi al gene *GLB1* di *Arabidopsis thaliana* (Hsieh *et al.* 1998). Si può, pertanto concludere che anche la trascrizione di *LjGLB1* è indotta alla luce e che questa è determinata dai metaboliti della fotosintesi (probabilmente 2-oxoglutarate; Smith *et al.* 2003) in quanto l'aggiunta di saccarosio al buio è in grado di mimare l'effetto della luce.

Le proteine PII-like analizzate nei diversi organismi, vegetali e non, come più volte detto, non sono solo sensibili alle variazioni di carbonio ma anche alle variazioni dello *status* azotato, pertanto ho valutato se anche *LjGLB1* fosse regolato da diverse concentrazioni di azoto nel mezzo esterno. L'analisi molecolare per RT-PCR semi-quantitativa di piante shiftate da una condizione di alto azoto (1 mM NH_4NO_3) ad una di assenza di azoto, ha mostrato che *LjGLB1* presenta effettivamente un certo livello di regolazione trascrizionale dipendente dalla concentrazione di azoto ed in particolare ho osservato maggiore espressione del gene in alto ammonio, espressione che si riduce transientemente (di circa 4 volte) nelle piante cresciute in carenza di azoto, per poi tornare ai livelli normali a partire da 5 giorni dallo shift (Fig. 46). La cosa interessante è che l'analisi molecolare del trasportatore dell'ammonio maggiormente espresso, *LjAMT1;1*, in accordo con il dato riportato in letteratura (D'Apuzzo *et al.* 2004), ha rivelato un tipo di regolazione del tutto opposta rispetto a quella osservata per *GLB1*. Questo dato suggerisce, in maniera indiretta, un possibile ruolo per PII di regolatore negativo del trasportatore *LjAMT1;1*, analogamente a quanto si osserva in *Escherichia coli* in cui la proteina omologa di PII, *glnK*, che interagisce fisicamente con il trasportatore dell'ammonio, *amtB*, inibendone in alto azoto, la funzione di trasporto, ha una regolazione trascrizionale di tipo esattamente opposta a quella di *amtB* (*glnK* è indotto in alto

azoto e down-regolato in carenza di questo). Tale ipotesi è inoltre supportata dal fatto che l'analisi delle fusioni *pGLB1::gusA* ha rivelato un profilo spaziale di espressione, in radice, paragonabile a quelli di *LjAMT1;1* (D'Apuzzo *et al.* 2004). Questa ipotesi che identifica AMT1 di *Lotus* come un potenziale bersaglio dell'attività regolativa di PII va comunque attentamente verificata. In letteratura infatti le uniche evidenze che riportano una attività regolativa di PII in piante si riferiscono al controllo esercitato sull'attività enzimatica di proteine bersaglio e non sulla loro espressione (Ferrario-Mery *et al.* 2006).

E' stato valutato, inoltre, se la variazione della concentrazione di azoto e di carbonio nel mezzo oltre a riflettersi sulla regolazione trascrizionale comportasse anche un cambiamento del profilo di espressione nei diversi organi all'interno dei quali la fusione *pGLB1::gusA* è attiva. Le condizioni di crescita utilizzate: 1mM e 5mM ammonio nitrato, o 1mM e 5 mM potassio nitrato come unica fonte di azoto, in presenza o assenza di saccarosio 3% non hanno evidenziato cambiamenti nel profilo spaziale di espressione all'interno dei vari organi e tessuti.

Tutte le informazioni ottenute circa la trascrizione di *GLB1* e la sua regolazione sono state anche associate a studi sulla localizzazione proteica tramite l'uso di fusioni con la GFP. Queste hanno rivelato una specifica localizzazione della proteina sui plastidi delle cellule della radice, inclusi i peli radicali (Fig. 51 e 52) e nei cloroplasti delle foglie, sia in cellule del mesofillo che delle cellule di guardia delle aperture stomatiche (Fig. 53). La localizzazione a livello dei cloroplasti, era già stata riportata in letteratura in *Arabidopsis thaliana* e *Oriza sativa* (Hsieh *et al.* 1998; Smith *et al.* 2002; Smith *et al.* 2004), in accordo con l'identificazione di un peptide segnale specifico per il cloroplasto presente all'estremità NH₂-terminale di queste proteine. Tale segnale non era invece identificabile nella sequenza di *Lotus*. Un risultato del genere pone ovviamente l'interrogativo di come la funzione di sensore del rapporto C/N ipotizzata per la proteina PII, possa essere compatibile con la sua localizzazione. Per quanto riguarda le foglie, la localizzazione sul sito dove ha luogo

la fotosintesi e si producono scheletri carboniosi è ovviamente in accordo con la funzione ipotizzata per PII. Nelle radici, il ruolo dei plastidi non fotosintetizzanti è associato con lo svolgimento del metabolismo glicolitico e con la sintesi degli acidi grassi ed è stato ipotizzato che siano coinvolti nel flusso di sorgenti carboniose dalla glicolisi al pathway di sintesi degli acidi grassi. Anche in questo caso quindi il ruolo di PII potrebbe essere legato alla capacità di sensing di un particolare stato del metabolismo attraverso l'interazione con specifici metaboliti carboniosi. E' interessante notare come sia stato ipotizzato recentemente un ruolo dei plastidi radicali non fotosintetizzanti, nella creazione del segnale di calcium spiking che avviene nelle fasi precoci dell'interazione simbiotica leguminose-rizobio, a livello dei peli radicali (Imaizumi-Anraku *et al.* 2004). Inoltre, un coinvolgimento dei plastidi radicali è stato anche ipotizzato nell'instaurazione della simbiosi micorrizica (Fester *et al.* 2004). Un approccio ancora in fase di realizzazione che ho scelto per caratterizzare la funzione della PII di *Lotus* è quello di analizzare piante transgeniche in grado di over-esprimere *LjGLB1*. La sequenza codificante di *GLB1* è stata posta sotto il controllo del promotore costitutivo 35S e cinque diverse linee transgeniche sono state ottenute e saranno analizzate nella successiva generazione (T1). L'analisi di queste linee potrebbe permettermi di avere informazioni più dettagliate circa il ruolo svolto da PII in *Lotus*. In particolare verrà analizzato il fenotipo di crescita di queste piante in diverse concentrazioni di azoto e di carbonio per potere osservare eventuali fenotipi di crescita e simbiotici in presenza di diversi rapporti C/N.

BIBLIOGRAFIA

Arcondeguy T., Jack R., Merrick M. (2001).

P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control.
Microbiol Mol Biol Rev.65(1):80-105. Review

Atkinson MR, Ninfa AJ.

Characterization of the GlnK protein of Escherichia coli.

Mol Microbiol. 1999 Apr;32(2):301-13.

PMID: 10231487

Barbulova A., D'Apuzzo E., Rogato A., Chiurazzi M. (2005)

Improved procedures for *in vitro* regeneration and for phenotypic analysis in the model legume *Lotus japonicus*.

Functional Plant Biology, 32: 529-536.

Britto D.T., Siddiqi Y., Glass A.D.M., Kronzucker H.J., (2001).

Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants.

PNAS 98 (7): 4255-4258

Brown C.M., Dilworth M.J. (1975).

Ammonia assimilation by rhizobium cultures and bacteroids.

Journal Gen. Microbiol. 86(1): 39-48

Burillo S, Luque I, Fuentes I, Contreras A.

Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis.

J Bacteriol. 2004 Jun;186(11):3346-54. Erratum in: J Bacteriol. 2004

Aug;186(16):5555.

PMID: 15150219

Clarkson, D.T. (1986) Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells.

A review of current ideas and methodology. In Fundamental, Ecological, and Agricultural aspect of Nitrogen Metabolism in higher plants.

Dordrecht, the Netherlands: Martinus-Nijhoff, 113-126.

Coutts G., Thomas G., Blakey D., Merrick M. (2002).

Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB.

EMBO J. 15;21(4):536-45

Dandekar T., Snel B., Huynen M., Bork P. (1998).
Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact.
Trend Biochem. Sci. 23: 324-328.

D'Apuzzo E., Rogato A., Simon-Rosin Ulrike, El Alaoui H., Barbulova A., Betti M., Dimou M., Katinakis P., Marquez A., Marini A.M., Udvardi K.M., Chiurazzi M. (2004). Characterization of three functional High Affinity Ammonium Transporter in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression.
Plant Physiology 134: 1763-1774

Durand A., Merrick M.

In vitro analysis of the Escherichia coli AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate.

J Biol Chem. 2006 Oct 6;281(40):29558-67. Epub 2006 Jul 24.

PMID: 16864585

Ferrario-Méry S., Bouvet M, Leleu O, Savino G, Hodges M, Meyer C.

Physiological characterisation of Arabidopsis mutants affected in the expression of the putative regulatory protein PII.

Planta. 2005 Dec;223(1):28-39. Epub 2005 Aug 16

Forchhammer K., Hedler A.

Phosphoprotein PII from cyanobacteria--analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from Escherichia coli.

Eur J Biochem. 1997 Mar 15;244(3):869-75.

PMID: 910825

Forchhammer K., Tandeau de Marsac N.

The PII protein in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status.

J Bacteriol. 1994 Jan;176(1):84-91.

PMID: 828271

Frugis and Chua

Ubiquitin-mediated proteolysis in plant hormone signal transduction. 2002

Trends Cell Biol 12:308-311

Gansel X., Munos S., Tillard P., Gojon A. (2001). Differential regulation of the NO₃ and ammonium transporter genes *AtNrt2;1* and *AtAmt1;1* in *Arabidopsis*: relation with long- distance and local controls by N status of the plant. *The Plant J.* 26: 143-155

Gazzarrini S., Leijay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W.B., von Wiren N., (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots Plant Cell 11: 937-948.

Glass A.D.M., Britto D.T., Kaiser B.N., Kinghorn J.R., Kronzucker H.J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S., Siddiqi M.Y., Unkles E., Vidmar J.J., (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. Journal of Experimental Botany 53: 855-864.

Howitt S. M., Udvardi M. K. (2000)
Structure, Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants
Biochimica and Biophysica acta 152- 170

Hsieh M, Lam H, Van de loo FJ, Coruzzi G (1998)
A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing
Proc Natl Acad Sci USA 95: 13965-13970

Kademi S., O'Connell Ill J., Remis J., Robles-Colmenares Y., Mierck L. J. W., Stroud R. M. (2004)
Mechanism of ammonia transport by Amt-Mep-Rh: Structure of AmtB at 1.35Å.
Science 305: 1587-1594.

Kaiser B.N., Rawat S.R., Siddiqi M.Y., Masle J., Glass A., (2002).
Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "Knockout" of the High Affinity Ammonium Transporter *AtAMT1;1*
Plant Physiology 130: 1263-1275.

Klopprogge K., Stips J., Schmitz R.A. (2002).
The inhibitory form of NifL from *Klebsiella pneumoniae* exhibits ATP hydrolyzing activity only when synthesized under nitrogen sufficiency.
Biochim Biophys Acta. 11;1594(2):243-54.

Krussel L., Madsen L. H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Duc G., Keneko T., Tabata S., De Broijn F., Pajuelo E., Sandal N., Stougaard J. (2002).
Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor like kinase.
Nature: 1-5

Kumar A, Silim SN, Okamoto M, Siddiqi MY, Glass AD.

Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH₄⁺ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica.

Plant Cell Environ. 2003 Jun;26(6):907-914.
PMID: 12803618

Imsande J, Touraine B (1994)
N demand and regulation of nitrate uptake
Plant Physiol. 105:3-7

Lamm H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Corazzi g.M. (1996).
The molecular genetic of nitrogen assimilation into ammino acid in higer plants.
Plant physiology Plant. Mol. Biol.47: 569-593.

Lauter F.R., Ninnemann O., BucherM., Riesmeier J.W., Frommer W.B. (1996).
Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato.
Proc Natl Acad Sci U S A 23;93(15):8139-44.

Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE (2005)
The putative high-affinity nitrate transporter NTR2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues.
Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 13693-13698.

Loquè D., Von Wiren N. (2004).
Regulatory levels for the tarnsport of ammonium in plants roots.
Journal of Experimental Botany 55: 1293-1305.

Loquè D., Yuan L., Kojima S., Gojon A., Wirth J., Gazzarrini S., Ishiyama K., Takahashi H., von Wirèn N. (2006).
Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen deficient Arabidopsis root.
The Plant Journal 48: 522-534.

Lorenz M.C., Heitman J. (1998).
Regulators of pseudo-hyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. Genetics 150: 1443-145.

Ludewig U., Von Wiren N., Frommer W. B. (2002).

Uniport of NH_4^+ by the roots hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1.
The Journal of Biological Chemistry 277: 13548-13555.

Ludewig U., Stephanie Wilken, Binghua Wu, Wolfgang Jost, Petr Obrdlik, Mohamed El Bakkoury, Anne-Marie Marini, Bruno Andre, Tanja Hamacher, Eckhard Boles, Nicolaus von Wiren, and Wolf B. Frommer (2003).
Homo- and Hetero-oligomerization of Ammonium Transporter-1 NH_4 Uniporters.
The Journal of Biological Chemistry 278: 45603- 45610.

Magasanik B (2000) PII: A remarkable regulatory protein
Trends Microbiol 8:447-448

Marini A. M., Soussi-Boudekou S., Vissers S., Andre B. (1999).
A family of Ammonium Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molecular and cellular Biology: 4282-4293.

Marini A. M., Matassi G., Raynald V., Andre B., Cartron J.P., Cherif-zahar B. (2000).
The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast.
Nat Genet. 200026(3):341-344.

Marshner H., Kirkby E.A., Engels C. (1997).
Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. Bot. Act 4:265-274.

Martin D.E., Reinhold-Hurek B. (2002).
Distinct roles of P(II)-like signal transmitter proteins and amtB in regulation of nif gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in Azoarcus sp. strain BH72.
J Bacteriol. 184(8):2251-9.

Merrick Mike and Von Virén Nicolaus (2004).
Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants.
Topics in Current Genetics: 1-26

Mizuno Y, Berenger B, Moorhead GB, Ng KK.
Crystal structure of Arabidopsis PII reveals novel structural elements unique to plants.
Biochemistry. 2007 Feb 13;46(6):1477-83.
PMID: 17279613

Ninnemann O., Jauniaux J.C., Frommer W.B. (1994).

Identification of a High-Affinity Transporter from plants.
EMBO J. 13:3463-3471

Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero JM, Marquez AJ.
Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiol Plant*. 2002 Jul;115 (3):352-361.

Patriarca E. J., Tatè R., Iaccarino M, (2002)
Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in rhizobium-plant symbiosis.
Microbiology and Molecular Biology, 66 (2), 203-222.

Pena A., Pardo J.P., Ramirez J. (1987)
Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast.
Arch Biochem Biophys. 253(2):431-8

Rawat S.R., Silim N.S., Kronzucker H.J., Siddiqui M.Y., Glass A.D.M., (1999)
AtAMT1 gene expression and NH₄ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels.
The Plant Journal 19 (2), 143-152.

Salvemini F., Marini A.M., Riccio A., Patriarca E. J., Chiurazzi M. (2001).
Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus Japonicus*.
Gene 270: 37-43.

Schjoerring J.K., Husted S., Mack G., Mattsson M. (2002).
The regulation of ammonium translocation in plants.
Journal of Experimental Botany, 53: 883-890

Shapiro BM, Stadtman ER (1968)
Glutamine synthetase deadenylating enzyme
Biochem Biophys Res Commun 30: 32-37

Simon-Rosin U., Wood C., Udvardi M. K., (2003).
Molecular and cellular characterization of Lj AMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*.
Plant molecular Biology 51: 99-108

Smith C, Welljie AM, Moorhead GBG (2003)
Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*
Plant J 33: 353-360

Sonoda Y., Ikeda A., Saiki S., von Wiren N., Yamaya T., Yamaguchi J. (2003).
Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3)
in rice.
Plant Cell Physiology 44(7): 206- 211

Sonoda Y., Ikeda A., Saiki S., Yamaya T., Yamaguchi J.
Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine
in rice.
Plant Cell Physiol. 2003 Dec;44(12):1396-402.
PMID: 14701935

Tatè R., Patriarca E.J., Iaccarino M., (2004).
Organogenesis of legume root nodules.
Int. Rev. Cytol. 234: 201-262.

Udvardi M.K., Day D.A. (1990).
Ammonia (C-methylamine) Transport across the Bacteroid and Peribacteroid Membranes
of Soybean Root Nodules.
Plant Physiology 94(1):71-76.

Von Wiren N., Lauter F.R., Ninnemann O., Gillissen B., Walch-Liu P., Engels C., Jost
W., Frommaer W.B., (2000).
Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root
hairs and by light in leaves of tomato.
The Plant Journal, 12: 167-175.

Von Wiren N., Gazzarrini S., Gojon A., Frommer W.B. (2000).
The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval.
Current Opinion in Plant Biology 3: 254-261.

Zengh L., Kostrewa D., Berneche S., Winkler F., Li X. D. (2004).
The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of E. coli
Proc. Natl Acad. Sci USA 101 (49): 17090-17095.

