



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di Ricerca in
Biochimica e Patologia dell'Azione dei Farmaci
Ciclo XXIV (X Ciclo - Nuova Serie) - Anno di discussione 2015

***Analisi funzionale del gene UVR8 e suo ruolo nella
risposta delle piante a stress ambientali***

Settore Scientifico Disciplinare: AGR/07

Dottorando

Dott. ssa Paola RUGGIERO

Tutore

Chiar.ma Prof. ssa Antonietta LEONE

Coordinatore

Chiar.ma Prof. ssa Antonietta LEONE

INDICE

Riassunto	6
Abstract	9
1.Introduzione	
1.1 La proteina UVR8 orchestra la risposta fotomorfenica UV-B indotta	14
1.2 Percezione degli UV-B attraverso la proteina UVR8 di <i>A. thaliana</i>	16
1.3 La proteina UVR8 è coinvolta anche nella risposta a stress osmotici	18
1.4 Adattamenti morfogenici delle piante in risposta a stress ambientali	19
1.5 Lo stress ossidativo e sistemi antiossidanti in pianta	20
1.6 L'espressione UV-B dipendente dei geni di difesa da stress ossidativo induce risposte da acclimatamento	22
1.7 Stress e metabolismo primario: la fotorespirazione	23
1.8 Identificazione di proteine che interagiscono con UVR8	25
1.8.1 La tecnologia <i>fishing for partners</i> per l'identificazione di partner proteici di una proteina target	26
1.8.2 Immunoprecipitazione di complessi proteici	27
1.8.3 Conferma <i>in vivo</i> dell'interazione proteina-proteina	28
<i>Complementazione bimolecolare della fluorescenza "Bimolecular Fluorescence Complementation" BIFC</i>	28
<i>Co-immunoprecipitazione</i>	29
1.9 Scopo della tesi	30
2. Materiali e Metodi	33
2.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita	33
2.2 Trattamenti in condizioni di stress ambientali	33
2.3 Misura dei livelli di ROS in condizioni di stress osmotico	33
2.4 Caratterizzazione del mutante <i>knock-out</i> di <i>A.thaliana</i> nel gene <i>GGT1</i>	34
2.5 Crescita di cellule BY-2 di <i>N. tabacum</i>	34
2.6 Estrazione di protoplasti da cellule BY-2	34
2.7 Saggio di complementazione della fluorescenza (BiFC)	35
2.8 Generazione dei vettori per il saggio BiFC	36
2.9 Trasformazione di protoplasti	36
2.10 Osservazione dei protoplasti al microscopio a fluorescenza	37
2.11 Estrazione di RNA totale e sintesi di cDNA	37
2.12 RT-PCR semiquantitativa	37
2.13 Real time PCR quantitativa (qRT-PCR).....	38
2.14 Produzione della proteina ricombinante GGT1	38
2.14.1 Costruzione del Plasmide	38
2.14.2 Espressione e purificazione della proteina ricombinante GGT1	39
2.15 Purificazione della proteina ricombinante UVR8 nella forma nativa	39
2.16 Estrazione di proteine, separazione mediante SDS-PAGE e analisi <i>Western blot</i>	39
2.17 Immunoprecipitazione/ Co-IP	40
2.18 Saggio " <i>fishing for partners</i> ".....	40
2.19 Digestione proteolitica con tripsina	40
2.20 Analisi dei prodotti di digestione con tripsina mediante LC-MS/MS	41
2.21 Analisi MASCOT	41

2.22 Analisi statistica	41
3. Risultati	45
3. Identificazione di proteine che interagiscono con UVR8.....	45
3.1 Fishing for partners	45
3.1.1 Espressione e purificazione della proteina ricombinante UVR8	45
3.1.2 Identificazione di partner proteici della proteina UVR8	46
3.1.3 Conferma <i>in vivo</i> dell'interazione tra UVR8 e APX	48
<i>Co-immunoprecipitazione del complesso UVR8-APX</i>	<i>48</i>
<i>Saggio di complementazione bimolecolare della fluorescenza</i>	
<i>(BiFC) tra la proteina UVR8 e la proteina APX</i>	<i>49</i>
3.1.4 Analisi dei livelli dei ROS in piante sovraesprimenti o <i>knock-out</i>	
per il gene <i>UVR8</i>	52
3.2 Identificazione di putative proteine interattrici di UVR8 mediante	
immunoprecipitazione	53
3.2.1 Conferma dell'interazione tra la proteina UVR8 e la proteina	
GGT1 mediante coimmunoprecipitazione	54
<i>Produzione dell'anticorpo anti-GGT1</i>	<i>54</i>
<i>Co-immunoprecipitazione del complesso UVR8 e GGT1.....</i>	<i>55</i>
3.2.2 Saggio di complementazione bimolecolare della fluorescenza	
(BiFC) tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1	56
3.3 Studio della funzione del gene GGT1 nella risposta a stress salino	
in piante di <i>A. thaliana</i>	58
3.3.1 Analisi in silico dell'espressione del gene GGT1 in organi e tessuti	
di piante di <i>A. thaliana</i> e in risposta a condizioni di stress ambientali	
diversi	58
3.3.2 Analisi funzionale della risposta a stress salino in piante	
della linea mutante <i>ggt1</i>	60
<i>Caratterizzazione molecolare del mutante ggt1.....</i>	<i>60</i>
<i>Risposta a stress salino di piante knock-out per il gene GGT1.....</i>	<i>61</i>
3.3.3 Analisi dell'espressione di <i>GGT1</i> in piante <i>knock-out</i>	
o sovraesprimenti il gene <i>UVR8</i> in risposta a stress salino	63
4. Discussione	67
4. La risposta allo stress ossidativo UV-B e UVR8 mediata	68
4.1 Interazione <i>in vivo</i> della proteina UVR8 con la proteina APX	68
4.2 La proteina UVR8 interagisce <i>in vivo</i> anche con la proteina GGT1	70
5. Conclusioni	75
6. Bibliografia.....	79

Riassunto

Le piante sono organismi sessili e, pertanto sono continuamente sottoposti a condizioni ambientali sub-ottimali e di stress, anche multipli. In ambienti aridi, caratterizzati da carenza idrica ed eccessiva salinità del suolo, le condizioni di stress osmotico sono associate anche a stress ossidativo causato da una elevata intensità luminosa e luce ultravioletta (UV-B). Per superare queste condizioni sfavorevoli, le piante hanno evoluto diverse strategie di adattamento in comune tra lo stress osmotico, e la risposta alla luce UV-B. Infatti, recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato il coinvolgimento del fotorecettore degli UV-B, UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) in questa risposta incrociata.

Sebbene la funzione del fotorecettore *UVR8* sia stata ampiamente chiarita nella risposta della pianta ai raggi UV-B, è stato da noi dimostrato che l'espressione del gene *UVR8* è fortemente indotta da stress osmotico e stress salino in piantine *wild type* di *A. thaliana* (Fasano *et al.*, 2014). Inoltre, mediante un approccio di *gain and loss of function* in piante senso e antisenso di *A. thaliana* per il gene *UVR8*, è stato messo in evidenza il suo ruolo nel programma di crescita, sviluppo e differenziamento della pianta: le piante che sovraesprimono *UVR8* hanno un ridotto sviluppo vegetativo (minore diametro della rosetta, foglie più piccole, altezza inferiore), mentre le piante silenziato, sono caratterizzate da una maggiore crescita e, producono un numero maggiore di siliques e di semi (Fasano *et al.*, 2009; 2010), reminiscente della risposta SIMR (*Stress Induced Morphogenic Response*).

Sulla base di queste evidenze sperimentali, il presente progetto ha avuto il principale obiettivo di comprendere meglio il ruolo della proteina UVR8 nella risposta a stress osmotico, oltre il suo ruolo consolidato nella risposta a UV-B. In particolare, è stato dimostrato che la proteina UVR8 ha localizzazione prevalentemente citoplasmatica e che solo una piccola frazione (circa il 10%) monomerizza e trasloca nel nucleo in risposta a basse dosi di raggi UV-B, dove svolge una funzione di attivatore trascrizionale. La maggior parte della proteina UVR8 rimane nel citoplasma, dove è ipotizzabile possa svolgere funzioni aggiuntive, interagendo possibilmente con altre proteine citoplasmatiche, nel regolare il complesso network di risposte cellulari a condizioni di stress abiotici.

Il presente progetto ha avuto come obiettivo l'identificazione di putative proteine che interagiscono con la proteina UVR8, noto come fotorecettore degli UV-B, e di stabilire un ruolo funzionale di queste interazioni nella risposta delle piante a stress di tipo osmotico.

I principali risultati ottenuti sono di seguito riassunti:

1. utilizzando approcci complementari di proteomica e di immunoprecipitazione, sono state identificate diverse proteine che interagiscono con la proteina UVR8, in particolare, la nostra attenzione è stata focalizzata sulla proteina APX1 (ascorbato perossidasi) e la proteina GGT1 (glutammato gliossilato amminotransferasi), per il loro noto ruolo in meccanismi di detossificazione dell' H_2O_2 , specie reattiva dell'ossigeno che si accumula nella cellula vegetale in seguito a diverse condizioni ambientali associate a stress ossidativo;
2. l'interazione tra APX1 e UVR8 e di UVR8 e GGT1 sono state confermate *in vivo*, mediante due differenti saggi di BiFC e co-immunoprecipitazione;
3. mediante un'analisi funzionale, è stato evidenziato che livelli diversi della proteina UVR8 sono associati a un diverso livello di ROS, in risposta a

condizioni di stress osmotico, suggerendo una possibile funzione associata all'interazione tra queste due proteine;

4. è stata condotta l'analisi d'espressione del gene marcatore dello stress osmotico *RD29* e del gene *GGT1* in piante *knock-out* o sovraesprimenti il gene *UVR8* in risposta a stress salino, che hanno fornito una prima indicazione sull'effetto di livelli diversi della proteina UVR8 sul livello trascrizionale di questi due geni e, più in generale, nella risposta globale a stress salino in piante di *Arabidopsis*.

Ulteriori analisi più approfondite sono necessarie per stabilire se l'interazione di UVR8 con APX1 e GGT1 possa influenzare la loro attività enzimatica. Inoltre, precedenti studi hanno dimostrato che UVR8 si complessa con COP1 (una E3-ubiquitina ligasi) e invia alla degradazione via proteosoma regolatori negativi della via UV-B dipendente (Huang X *et al.*, 2013). L'uso di inibitori specifici di questa via degradativa potrebbero contribuire a stabilire se la proteina UVR8 possa reclutare le proteine APX o GGT1 e attraverso questo legame stabilizzarle o inviarle alla degradazione proteolitica, in risposta a condizioni di stress ossidativo diretto e/o generato da stress osmotico.

Abstract

Plants are sessile organisms and, therefore, are continuously subjected to environmental sub-optimal or stressful conditions. In an arid environment plants are challenging multiple stresses, such, as water shortage, excessive soil salinity, osmotic stress conditions and high light intensity, including an excess of ultraviolet light mainly (UV-B). To overcome these unfavorable conditions, plants have evolved different strategies to adapt to common osmotic stress and high UV-B light. Recently, the UV-B photoreceptor, UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8), has been identified and its role in the plant response to UV-B largely clarified. Besides its role in UV-B signaling, we have demonstrated that the expression of *UVR8* gene is strongly induced by osmotic and salt stress in wild type *A. thaliana* seedling (Fasano *et al.*, 2014). Moreover, by using a "gain and loss of function" approach we have evidenced a role of the UVR8 gene in plant growth, development and differentiation: UVR8 overexpressing plants have a reduced vegetative growth (minor diameter of the rosette, smaller leaves, height less), while silenced plants are characterized by a higher growth and produce a large number of siliques and seeds (Fasano *et al.*, 2009; 2010), reminiscent of the response SIMR (*Stress Induced Morphogenic Response*).

The UVR8 protein is predominantly localized in the cytoplasm and in response to low UV-B doses only a small fraction monomerizes and translocates to the nucleus, where it acts as a transcriptional activator. Most of the UVR8 protein remains in the cytoplasmic proteins and it might exert additional cellular functions by interacting with other proteins involved in the complex plant response to environmental stresses.

This project was aimed at the identification of putative proteins that interact with UVR8 protein, and to establish a functional role of these interactions in plant responses to osmotic stress.

The main results are summarized below:

1. by using complementary approaches of proteomics and immunoprecipitation, several potential proteins that interact with the UVR8 protein were identified; in particular, our attention was focused on the proteins APX1 (Ascorbate peroxidase) and GGT1 (glutamate-glyoxylate-aminotransferase), known for their role in the mechanisms of detoxification of H₂O₂, a reactive oxygen species that accumulates in the plant cell in response to different environmental conditions that generate an oxidative stress;
2. the interaction between APX1-UVR8 and UVR8-GGT1 were confirmed *in vivo*, by using two different assays: the BiFC and the co-immunoprecipitation;
3. through a functional analysis, it was shown that different levels of the UVR8 protein are associated with a different level of ROS, in response to conditions of osmotic stress, suggesting a possible function associated to the interaction of these between UVR8 e APX1
4. a gene expression analysis of the stress marker gene *RD29* and the gene *GGT1* in *UVR8*- knock-out or overexpressing plants was performed, in response to salt stress. These experiments provided an early indication of the effect of different levels of the UVR8 protein on the transcriptional level of these two genes and, more generally, in the global response to salt stress in Arabidopsis plants.

Further analyses are required to establish whether the interaction of UVR8 with APX1 or GGT1 might somehow influence their enzymatic activity. In addition, previous studies have shown that UVR8 binds to COP1 (an E3-ubiquitin ligase) and targets negative regulators of the UV-B dependent pathway to proteasome degradation (Huang X *et al.*, 2013). The use of inhibitors of this proteolytic pathway may contribute to determine whether UVR8 protein can recruit APX or GGT1 proteins in order to stabilize them or target them to the proteolytic degradation in response to direct or osmotic stress derived oxidative stress.

INTRODUZIONE

1. Introduzione

A causa della natura sessile delle piante, la loro crescita e sviluppo può essere influenzata negativamente da una serie di condizioni sub ottimali o stressanti, come la carenza idrica, eccessiva salinità del suolo, il freddo o l'eccesso di raggi UV, che singolarmente o insieme, possono causare perdite considerevoli della produzione agricola e instabilità degli ecosistemi (Cramer *et al.*, 2011). Diverse condizioni di stress ambientale hanno in comune una componente di stress osmotico (deficit idrico, salinità, basse temperature) e molte di esse inducono uno stress di tipo ossidativo (Adem *et al.*, 2014). I meccanismi di prevenzione e/o riparazione dei danni cellulari associati allo stress osmotico che le piante hanno evoluto sono molteplici, quali controllo dell' apertura/chiusura degli stomi, accumulo di osmoliti (come prolina, glicina-betaina e oligosaccaridi), per mantenere il turgore cellulare, sintesi di proteine da stress (es. deidrine, proteine *heat shock* ed altre), di metaboliti secondari ad azione anti-ossidante e/o di geni codificanti enzimi detossificanti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali catalasi e superossido-dismutasi, che proteggono proteine, membrane e componenti cellulari dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), (Racchi, 2013).

La risposta delle piante alla carenza idrica differisce significativamente a vari livelli organizzativi a seconda dell'intensità e della durata del periodo di stress, nonché dello stadio di sviluppo e della specie (Chaves *et al.*, 2002; Verslues *et al.*, 2006). In linea generale, una risposta generalizzata indotta nelle piante a condizioni di deficit idrico è la riduzione della crescita vegetativa (Skirycz and Inze, 2010), soprattutto del germoglio rispetto a quella delle radici. Infatti, è riportato per numerose specie di interesse agrario che condizioni lievi di deficit idrico causano una inibizione dell'allungamento dello stelo e della crescita fogliare (Heuer and Nadler, 1995; Specht *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2008; Farooq *et al.*, 2009). A livello cellulare, nella foglia, le piante rispondono allo stress idrico con una rapida riduzione della crescita iniziale, seguita da un adattamento della crescita, portando alla formazione di foglie ridotte in numero e dimensioni (Claeys and Inzé, 2013). Al contrario, in condizioni di limitata disponibilità di acqua e/o nutrienti la crescita delle radici è meno influenzata o addirittura promossa (Bartels and Sunkar, 2005; Pardo, 2010). Una crescita differenziale positiva delle radici è stata osservata anche in piante transgeniche tolleranti carenza idrica elevata e/o stress salino (Bartels and Sunkar, 2005; Werner *et al.*, 2010), come pure varietà di riso (*Oryza sativa*) resistenti alla siccità hanno un apparato radicale più profondo e più ramificato rispetto alle varietà sensibili alla carenza idrica (Price *et al.*, 1997). Lo sviluppo di un sistema radicale più esteso è considerato una strategia per migliorare l'assorbimento di acqua e di nutrienti quando la loro disponibilità nel suolo è limitata (Fukai and Cooper, 1995; Liao *et al.*, 2001; Sharp *et al.*, 2004).

Analoghi effetti differenziati sulla crescita dei germogli o delle radici sono stati osservati anche in piante coltivate in risposta ad altre condizioni di stress abiotici, come l'esposizione a metalli pesanti o carenza di fosfato, che hanno un impatto principalmente sulle radici, o un eccesso di radiazioni UV-B, che influenzano la crescita del germoglio. I cambiamenti morfologici di riduzione generale delle dimensioni delle piante sopra descritti in risposta a diverse condizioni ambientali esterne sub-ottimali, sono noti come *Stress Induced Morphogenic Response* (SIMR) (Potters *et al.*, 2007 e 2009), un adattamento globale della morfologia della pianta volto a ridistribuire le risorse esterne limitanti e, quindi, utili per la sopravvivenza della pianta in condizioni di stress più severe.

Il controllo dello sviluppo e della crescita della pianta è stato molto studiato in risposta a segnali luminosi, soprattutto luce rossa e luce rosso-lontano, grazie all'azione di una serie di fotorecettori, i fitocromi, che innescano un programma di fotomorfogenesi che regola il passaggio dalla fase eterotrofa di giovane plantula, derivata dall'embrione, alla fase autotrofica fotosintetizzante. Affianco ai fitocromi, più recentemente è stato dimostrato che anche bassa intensità di luce UV-B (280-320 nm) hanno un ruolo rilevante nella risposta foto-morfogenica. Questa risposta fotomorfogenica UV-B dipendente include l'inibizione della crescita dell'ipocotile, la riduzione dell'espansione fogliare o la crescita delle radici, la formazione di piccioli corti, l'accumulo di flavonoidi, associati a cambiamenti dell'espressione di set specifici di geni (Kim *et al.*, 1998; Boccalandro *et al.*, 2001; Casimiro *et al.*, 2001; Kliebenstein *et al.*, 2002; Frohnmeyer and Staiger, 2003; Suesslin and Frohnmeyer, 2003; Ulm and Nagy, 2005; Hectors *et al.*, 2010). Inoltre, le risposte a bassa intensità di UV-B sono importanti perché conferiscono vantaggi adattativi alle piante in condizioni di pieno campo, dove eccesso di intensità della luce è spesso associata a deficit idrico (Gitz and Liu-Gitz, 2003).

1.1 La proteina UVR8 orchestra la risposta fotomorfogenica UV-B indotta

Le piante, in quanto organismi autotrofi, sono estremamente sensibili all'ambiente luminoso e dipendono dalla luce per la loro sopravvivenza. La luce non è solo fonte di energia per svolgere la fotosintesi, ma anche un regolatore di informazione per dirigere lo sviluppo della pianta dalla germinazione alla fioritura.

La percezione della luce da parte delle piante, avviene mediante una serie di fotorecettori, caratterizzati dalla lunghezza d'onda della luce che percepiscono.

Come già riportato, la luce nello spettro del rosso/rosso lontano (600-750 nm) attiva i fitocromi, la luce Blu/UV-A (350-500 nm) i criptocromi e le fototropine, innescando una via di trasduzione del segnale che porta ad attivazione di vie fisiologiche e/o attivazione di geni, responsabile della risposta fotomorfogenica. Solo a pochi anni fa risale l'identificazione del fotorecettore degli UV-B, la proteina UVR8, (UV RESISTANCE LOCUS 8) (Fig. 1) (Kami *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). UVR8 si differenzia dai fitocromi, criptocromi e fototropine, per la mancanza di un cromoforo a essa associato, in quanto sono alcuni residui di triptofano, di cui la proteina è ricca, in particolare il Trp 233 e il Trp 285, responsabili dell'assorbimento degli UV-B e del cambio conformazionale della proteina, che innescano la via di segnalazione cellulare (Jenkins, 2014).

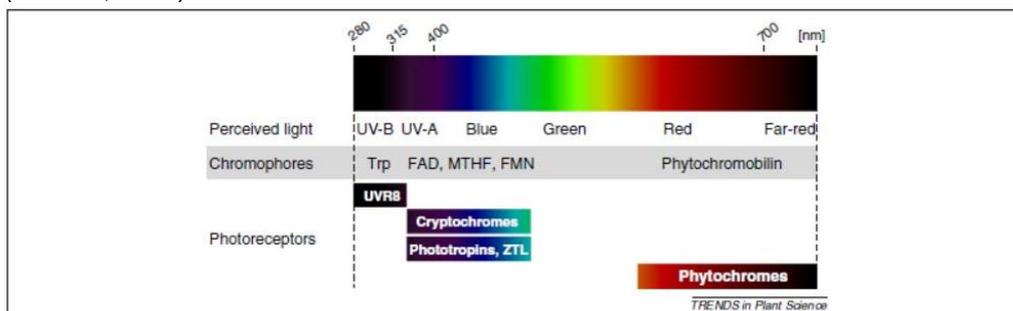


Figura 1.1 - Rappresentazione schematica della percezione della luce nelle piante superiori. Sono indicati i principali fotorecettori. (da Heijde and Ulm, 2012).

Lo spettro d'emissione solare, oltre che la luce visibile, comprende anche radiazioni nell'intervallo di lunghezza d'onda degli UV, ma il loro impatto sulla superficie terrestre è fortemente limitato dall'atmosfera. Mentre gli UV-C (<280 nm) sono totalmente bloccati dallo strato di ozono, una certa parte di UV-B (280-320 nm) riesce a filtrare ed è recepita dalle piante, inducendo due differenti tipi di risposte: quelle da stress (280 nm) e quelle d'acclimatazione (300-310 nm). In genere, gli effetti esercitati sulla pianta dalla radiazione UV-B dipendono non solo dalla dose di radiazione, ma anche dalla sua lunghezza d'onda e dalla sua durata (Ulm *et al.*, 2004; Shinkle *et al.*, 2004). Alte dosi di UV-B e di bassa lunghezza d'onda (intorno ai 280 nm) risultano dannose, a causa dell'elevato contenuto di energia per fotone, che danneggiano DNA, RNA, proteine e lipidi, e inducono la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Frohnmeier and Staiger, 2003; Casati and Walbot, 2004) e l'aumento del livello di ormoni da stress (come l'acido jasmonico e l'etilene) e dell'espressione di geni coinvolti nelle risposte da stress e di difesa (Mackerness *et al.*, 1999). Al contrario, basse dosi di UV-B e di elevata lunghezza d'onda (300-310 nm) inducono una serie di risposte metaboliche e fenotipiche, note come fotomorfogenesi UV-B-mediata, che comprendono l'accumulo di flavonoidi, l'inibizione dell'ipocotile, la riduzione dell'espansione dei germogli e delle foglie, la stimolazione delle ramificazioni laterali in radici e germogli ed un generale re-direzionamento dello sviluppo rispetto agli assi adassiali-abassiali (Jansen, 2002; Jenkins, 2009).

E' interessante riportare che, a fianco al loro ruolo nel programma fotomorfogenico, le risposte adattative, indotte da luce UV-B di elevata d'onda, determinano l'acclimatazione della pianta a tale condizione luminosa e l'acquisizione di una maggiore tolleranza a esposizione successiva a livelli di UV-B dannose (Brosche and Strid, 2003; Frohnmeier e Staiger, 2003; Paul e Gwynn-Jones, 2003; Ulm e Nagy, 2005. Favory *et al.*, 2009). Infatti, la luce UV-B (300-310 nm) stimola l'attivazione della trascrizione di una serie di geni fondamentali per la risposta agli UV-B come, ad esempio, i geni che codificano per la biosintesi di pigmenti, flavonoidi e gli esteri dell'acido idrossicinnamico, che accumulandosi nell'epidermide, assorbono la radiazione UV-B e fungono da "filtri solari" (Hideg *et al.*, 2013); i geni codificanti per le fotoliasi, enzimi che riparano i danni a livello del DNA indotti generalmente da radiazioni UV-B di bassa lunghezza d'onda; i geni che codificano diversi enzimi con attività antiossidante (es. APX, ascorbato perossidasi; SOD, superossido dismutasi etc.) coinvolti nell'eliminazione dei ROS (Ulm e Nagy, 2005).

Infatti, piante mutanti *uvr8-6* esposte a luce UV-B (300 nm) non presentano attivazione della trascrizione del gene *CHS* (Calcione Sintasi), codificante il primo enzima della via biosintetica dei flavonoidi, né accumulo di flavonoidi o riduzione dell'allungamento dell'ipocotile. Queste piante, tuttavia, mantengono la capacità di attivare *CHS* in risposta a stimoli ambientali diversi come bassa temperatura, luce rossa, rosso lontano e luce blu, suggerendo che *UVR8* possa essere specifico per la risposta alla luce UV-B (Brown *et al.*, 2005; Favory *et al.*, 2009). Al contrario, in piante di *Arabidopsis* sovraesprimenti *UVR8* (35S-*UVR8*) la risposta fotomorfogenica indotta da UV-B è costitutivamente attivata (Favory *et al.*, 2009; Fasano *et al.*, 2014). Esse, infatti, presentano un maggiore accumulo di flavonoidi rispetto alle piante *wild type*, nelle foglie e nelle radici, una maggiore inibizione dell'espansione degli organi embrionali (cotiledoni e ipocotile) e delle foglie in piante adulte, ridotto diametro della rosetta e allungamento dello stelo. Anche l'apparato radicale delle piante 35S-*UVR8* è ridotto: la lunghezza della radice primaria e il numero di radici laterali sono, rispettivamente, del 15% e 65% inferiori a quelli delle piante *wild type*. Questi fenotipi sono stati attribuiti ad una ridotta espansione cellulare delle radici laterali, presumibilmente dovuta ad alterazioni nel trasporto dell'auxina, il principale fitormone

che regola lo sviluppo della radice. Inoltre le piante 35S-UVR8 mostrano la tendenza ad un accumulo minore in coniugati dell'auxina IAA (Acido Indol-Acetico) rispetto alle piante controllo. Al contrario, nei mutanti *uvr8-6* il loro contenuto è maggiore (Fasano *et al.*, 2014). Tutti questi dati, insieme con il maggiore accumulo di flavonoidi, noti regolatori endogeni del trasporto delle auxine (Petrášek and Friml, 2009), hanno suggerito che i fenotipi delle piante 35S-UVR8 fossero causati da alterazioni nel trasporto, distribuzione e omeostasi di questo fitormone, che si traducono a livello cellulare in una ridotta espansione della radice e del germoglio.

A livello molecolare la risposta fotomorfogenica UV-B-mediata, orchestrata da UVR8, è stata caratterizzata solo in parte. Recentemente il fotorecettore UVR8 è stato cristallizzato in forma di dimero, che è la forma presente in assenza di UV-B (Wu *et al.*, 2012; Christie *et al.*, 2012). È stato riportato, infatti, che UVR8, in seguito a esposizione a luce UV-B, monomerizza e trasloca nel nucleo, dove si complessa con COP1 e attiva la trascrizione di *HY5* (Brown and Jenkins, 2008; Favory *et al.*, 2009). *HY5* a sua volta induce l'espressione di un elevato numero di geni connessi con la tolleranza agli UV-B, come geni codificanti fattori di trascrizione ed enzimi della biosintesi dei flavonoidi tra cui MYB12, CHS, CHI, PAL1, PAL2 e FLS1 (Winkel-Shirley, 2002; Mehrrens *et al.*, 2005). Tuttavia, solo una piccola frazione di UVR8 trasloca nel nucleo in risposta ad UV-B, mentre la maggior parte della proteina, circa il 90%, risiede nel citoplasma (Kaiserli and Jenkins, 2007).

Recentemente è stato dimostrato che i mutanti nella biosintesi delle auxine *nit1-3* mostrano una risposta fotomorfogenica indotta dagli UV-B maggiore delle piante *wild type*, compreso un maggior accumulo di flavonoidi, un minor accumulo di auxine e una ridotta espansione fogliare (Hectors *et al.*, 2012). Queste evidenze hanno permesso, quindi, di stabilire anche per le auxine un ruolo fondamentale nel controllo di questa risposta possibilmente attraverso UVR8.

1.2 Percezione degli UV-B attraverso la proteina UVR8 di *A. thaliana*

Allo stato inattivo UVR8 è presente sotto forma di omodimero, ma in risposta a bassi dosi di radiazione UV-B monomerizza (Rizzini *et al.*, 2011). A differenza di altri fotorecettori convenzionali che utilizzano un gruppo cromoforo per rilevare specifiche lunghezze d'onda della luce, UVR8 utilizza residui amminoacidici presenti nella sua struttura. Infatti, è interessante notare che la proteina UVR8 presenta nella sua struttura 14 triptofani che assorbono l'UV. Il modello proposto suggerisce che la maggior parte di questi 14 triptofani siano raggruppati sulla superficie esterna di UVR8, dove interagiscono con residui carichi positivamente (basici), principalmente arginina e qualche tirosina (Rizzini *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011) (Fig 1.2).

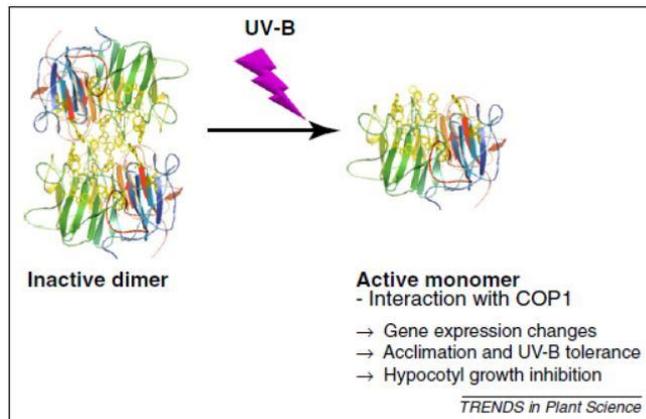


Figura 1.2 - Modello di percezione degli UV-B da parte della proteina UVR8 (da Heijde e Ulm, 2012).

I triptofani di UVR8 possono così agire come cromofori e assorbire l'UV-B. Tre di questi particolari triptofani sono localizzati in un cluster centrale predetto ed è stato mostrato che il triptofano in posizione 285 (Trp-285) è l'elemento chiave nella monomerizzazione di UVR8. Una mutazione del Trp-285 in fenilalanina conferisce un dimero costitutivo a UVR8 e annulla l'interazione UVR8–COP1 nel lievito (Rizzini *et al.*, 2011). Al contrario, la mutazione da Trp-285 in alanina porta ad un monomero costitutivo di UVR8 e ad una interazione costante UVR8–COP1; quindi la monomerizzazione di UVR8 è il più probabile meccanismo molecolare di attivazione del fotorecettore UV-B, portando all'interazione con COP1 in seguito a radiazione UV-B. L'importanza dei triptofani in UVR8 per la percezione dell'UV-B è supportata ulteriormente da calcoli di chimica quantistica che indicano che le interazioni tra i triptofani centrali e le arginine circostanti produrrebbero un massimo assorbimento a 280–300 nm (Wu *et al.*, 2011).

COP1 (una E3 ubiquitina ligasi) è una proteina multifunzionale meglio conosciuta per il suo ruolo di repressore della fotomorfogenesi (Yi e Deng, 2005). Tuttavia, COP1 svolge anche azione di promozione in alcune risposte del fitocromo B e nella via di segnalazione UV-B mediata (Oravecz *et al.*, 2006; Boccalandro *et al.*, 2004).

Piante di *Arabidopsis* mutate per il gene *cop1* presentano un fenotipo di crescita ridotta al buio, caratterizzato da ipocotili corti, cotiledoni aperti ed elevati livelli di pigmenti. Le piante *cop1* mostrano anche maggiore fotomorfogenesi e un fenotipo di crescita ridotto in presenza di luce (Yi and Deng, 2005). Importanti regolatori dell'attività di COP1 sono le proteine WD40-ripetute SUPPRESSOR OF PHYA (SPA1 a SPA4), le quali sono necessarie per la funzione di COP1 alla luce (Laubinger *et al.*, 2004) tranne in risposta agli UV-B (Oravecz *et al.*, 2006)

In risposta alla percezione di UV-B, UVR8 interagisce con COP1; mentre i livelli di proteina UVR8 rimangono invariati, COP1 è stabilizzata e si accumula in seguito ad esposizione ad UV-B in maniera UVR8-dipendente (Favory *et al.*, 2009). COP1 si accumula nel nucleo in seguito a radiazioni UV-B, suggerendo che COP1 è attiva nel nucleo (Oravecz *et al.*, 2006). Le proteine UVR8 e COP1, quindi, sono entrambe richieste per l'attivazione UV-B-mediata dell'espressione del gene *HY5* (Brown *et al.*, 2005). Pertanto, UVR8 e COP1 interagiscono direttamente e in modo specifico in modo UV-B dipendente, implicando che questa associazione fisica contribuisca alla specifica attività di COP1 nella via segnalazione mediata da UV-B (Favory *et al.*, 2009). Quindi in contrasto con la sua funzione di repressore nella fotomorfogenesi

indotta dalla luce visibile attraverso la degradazione di HY5 (Osterlund *et al.*, 2000; Saijo *et al.*, 2003), COP1 è un regolatore positivo della risposta agli UV-B attraverso l'interazione con il fotorecettore UVR8 (Oravec *et al.*, 2006; Cloix *et al.*, 2012). Il gene *HY5* (*ELONGATED HYPOCOTYL5*), un noto regolatore della fotomorfogenesi alla luce visibile (Chen *et al.*, 2004), è un effettore chiave del *pathway* di segnalazione di UVR8 (Ulm *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005; Brown and Jenkins, 2008; Jenkins, 2009), (Fig. 1.3).

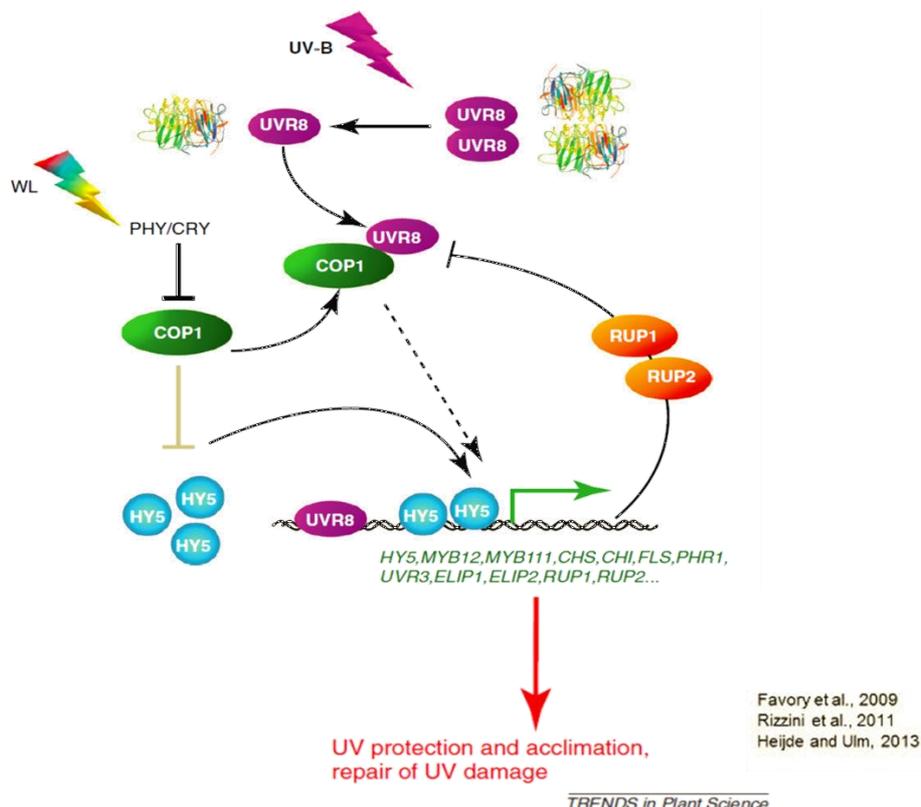


Figura 1.3 - Modello di segnalazione UV-B dipendente di UVR8. UVR8 in risposta a radiazioni UV-B, monomerizza e trasloca nel nucleo dove interagisce con COP1. UVR8 si lega al promotore di HY5 attivando la trascrizione dei geni connessi con la tolleranza agli UV-B (da Heijde and Ulm 2012).

1.3 La proteina UVR8 è coinvolta anche nella risposta a stress osmotici

Sebbene la funzione della proteina UVR8 sia stata ampiamente studiata nella risposta della pianta ai raggi UV-B, come descritto precedentemente, è stato dimostrato da esperimenti effettuati nel nostro laboratorio che l'espressione del gene *UVR8* è fortemente indotta da stress osmotico e stress salino in piantine *wild type* di *A. thaliana* (Fasano *et al.*, 2014). Inoltre, mediante un approccio di "*gain and loss of function*" in piante senso e antisenso di *A. thaliana* per il gene *UVR8*, è stato messo in evidenza il ruolo di questo gene nel programma di crescita, sviluppo e differenziamento della pianta: le piante che sovraesprimono *UVR8* hanno un ridotto

sviluppo vegetativo (minore diametro della rosetta, foglie più piccole, altezza inferiore), mentre le piante silenziate, sono caratterizzate da una maggiore crescita e, producono un numero maggiore di silique e di semi (Fasano *et al.*, 2009; 2010). Anche in assenza di stress esogeno, il fenotipo delle piante sovraesprimenti è riminiscente di un fenotipo indotto in risposta a diversi tipi stress ambientali, conosciuta come SIMR (*Stress Induced Morphogenic Response*), che include riduzione dell'altezza delle piante (Ahlfors *et al.*, 2004; Teotia & Lamb, 2009), lunghezza della radice primaria ridotta associata ad un numero maggiore di radici laterali (Teotia & Lamb, 2009).

1. 4 Adattamenti morfogenici delle piante in risposta a stress ambientali

Come riportato nel paragrafo precedente, piante esposte a condizioni di stress ambientali diversi presentano una serie di risposte morfogeniche comuni, denominata SIMR (*Stress-Induced Morphogenic Response*). SIMR è composta da tre principali componenti, inibizione dell'espansione fogliare, alterazione della differenziazione cellulare e stimolo della divisione cellulare in aree localizzate: la pianta non cessa di crescere, ma piuttosto ridistribuisce le risorse limitanti per lo sviluppo di specifici tessuti e/o organi. Ad esempio, piante soggette a condizioni di deficit cronico hanno un ridotto sviluppo vegetativo, in modo da ridurre la traspirazione, ma hanno un apparato radicale più sviluppato. Numerosi studi hanno evidenziato un coinvolgimento di alterazione del metabolismo e/o trasporto delle auxine nella SIMR, anche associato a modifiche della sintesi di flavonoidi, noti inibitori del trasporto di questo ormone (Peer and Murphy, 2007). Altre evidenze sperimentali hanno indicato l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come possibili molecole di attivazione della SIMR nelle piante, in combinazione con le auxine. Infatti, l'accumulo di ROS nelle piante è una risposta comune a diversi tipi di stress ambientali; le piante innescano successivamente il sistema di detossificazione dei ROS, che fornisce successivamente un sistema di protezione contro altri stress ambientali (*cross-protection*). Numerose interazioni tra la via di segnalazione delle auxine e quella dei ROS sono state documentate, suggerendo che questi due *pathway* possano agire in concerto nel determinare la SIMR.

Molti gruppi di ricerca stanno concentrando la loro attenzione sull'identificazione di geni regolatori *master* capaci di regolare la SIMR. Recentemente, è stato identificato il gene *SIMILAR TO RCD ONE1 (SRO1)*: mutanti *sro1-1* hanno una risposta SIMR compromessa e anomalie nella risposta a stress abiotici (Teotia *et al.*, 2010).

Il gene *SRO* appartiene a una specifica sub-famiglia delle proteine PARP-simili, che sono coinvolte in numerosi stress abiotici (Doucet-Chabeaud *et al.*, 2001). È interessante riportare che evolutivamente questa famiglia è apparsa quando le piante sono passate dalla vita acquatica a quella terrestre e coincide con la necessità di proteggersi da nuovi stress, quali siccità ed eccesso di irradianza. È stato dimostrato che la Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) è uno degli enzimi coinvolti nei meccanismi apoptotici cellulari indotti da agenti che danneggiano il DNA o da stress ossidativo. Infatti, PARP è coinvolto nella risposta a stress ossidativo lieve o severo, mediando il riparo di danni del DNA e altri processi di morte programmata cellulare. Piante di *Arabidopsis thaliana* e di *Brassica napus* che sovraesprimono il costrutto *RNA interference-PARP* sono più resistenti a diversi stress ambientali, senza effetti negativi pleiotropici sulla crescita e sviluppo della pianta e sulla produzione di semi (Teotia *et al.*, 2010).

Anche se l'aumentata tolleranza in mutanti PARP è stata attribuita al mantenimento dell'omeostasi energetica, è stato dimostrato che la maggiore tolleranza di piante di

Arabidopsis silenziate nel gene PARP è associata ad una alterazione del livello di acido abscissico mediato da H₂O₂, che facilita l'attivazione di un set di geni di difesa (Vanderauwera *et al.*, 2007). Quindi, è stato ipotizzato che le proteine SRO possano prevenire una espressione inappropriata di *network* di geni di risposta a stress ambientali in assenza di stress. Sebbene, le proteine SRO sembrano non avere attività enzimatica, è stato suggerito che la loro funzione di regolatore negativo della SIRM in assenza di stress sia dovuto ad interazione con altre proteine, formando complessi multiproteici (Vainonen *et al.*, 2012).

Il ridotto sviluppo delle piante sovraesprimenti la proteina UVR8, associato ad una riduzione dello sviluppo della radice primaria e un aumento delle radici laterali, (Fasano *et al.*, 2014) suggerisce che anche UVR8 possa essere implicato nella SIRM, ma, al contrario di SRO, come regolatore positivo di questa risposta.

Come già accennato in precedenza, i ROS si accumulano nella cellula vegetale in risposta a stress ambientali diversi, agendo sia come molecole di segnalazione per innescare risposte multiple di adattamento, in condizioni di bassa intensità di stress e/o di breve durata, o causando danni cellulari e innescando un processo di morte cellulare in risposta a stress intensi e di lunga durata.

1.5 Lo stress ossidativo e i sistemi antiossidanti in pianta

Stress primari, come siccità, luce UV-B, eccesso di sali nel terreno, alte e basse temperature, e l'inquinamento da metalli pesanti, sono spesso interconnessi e possono causare danni cellulari e stress secondari, come lo stress osmotico e lo stress ossidativo (Fig. 1.4).

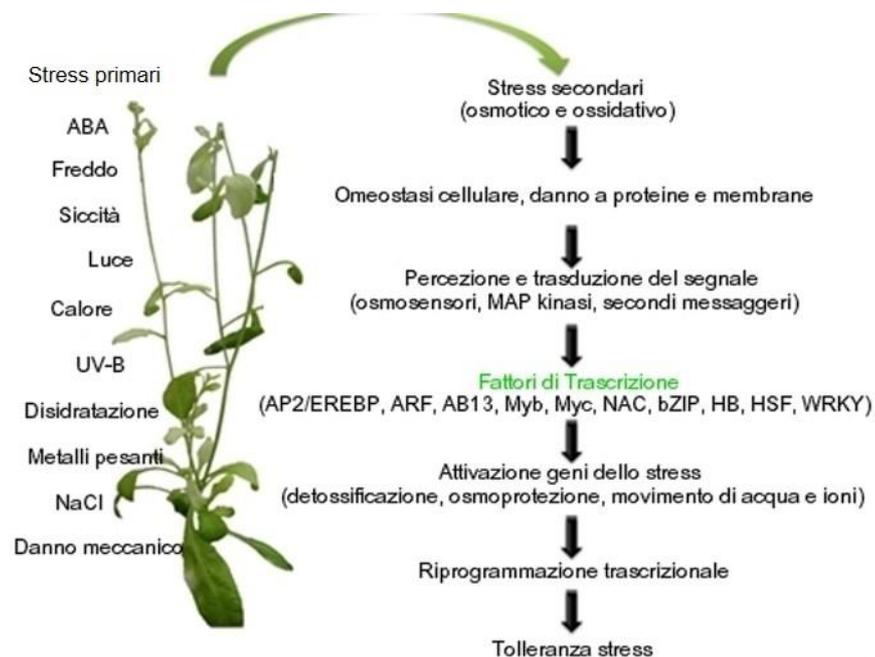


Fig. 1.4 - Condizioni di stress ambientali diversi causano uno stress secondario osmotico e ossidativo comune e inducono l'attivazione di una via complessa di segnalazione intracellulare, che porta ad una maggiore tolleranza o a morte cellulare, dipendendo dall'intensità e dalla durata dello stress e dallo stadio di sviluppo della pianta. Modificata dal sito del database STIFDB2 - *Stress Responsive Transcription Factor Database v2.0* (<http://caps.ncbs.res.in/stifdb2/>)

Le piante hanno evoluto diverse strategie di risposta, dipendenti dall'intensità e durata dello stress, dalla specie di pianta, nonché dallo stadio di sviluppo.

In risposta all'esposizione a condizioni ambientali sfavorevoli, una delle prime risposte che si osservano è un aumento della produzione di ROS, ovvero specie reattive dell'ossigeno, tra cui l'anione superossido (O_2^-), il radicale ossidrilico ($\bullet OH$), il perossido di idrogeno (H_2O_2).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono normalmente generate in tutti gli organismi aerobici, in seguito ad attività metaboliche o fotosintetiche. Eccessivi livelli di ROS, prodotti in risposta a stress di natura abiotica e biotica, sono tossici per la cellula, generando uno stress ossidativo, caratterizzato da perossidazione dei lipidi di membrana, ossidazione delle proteine, inibizione enzimatica, danni a carico del DNA ed RNA (Vinocur and Altman, 2005). Come strategia di difesa dallo stress ossidativo le piante hanno sviluppato una fitta rete di molecole antiossidanti e di enzimi necessari per la detossificazione dei ROS nella cellula, contribuendo al mantenimento della loro omeostasi in tutti i compartimenti subcellulari.

I diversi sistemi antiossidanti possono essere di natura enzimatica o non-enzimatica. I primi comprendono specifici enzimi, come l'ascorbato perossidasi (APX), la superossido dismutasi (SOD) e la glutatione perossidasi (GPX). La superossido dismutasi (SOD) è un enzima coinvolto nella reazione di dismutazione dello ione superossido in H_2O_2 e O_2 . Il perossido di idrogeno può reagire ulteriormente, diventando substrato di enzimi, come le catalasi e le perossidasi, che lo riducono ad H_2O . L'azione di questi enzimi è di fondamentale importanza, per evitare che

eccessivi livelli di ROS inducano danni irreparabili, che possono determinare l'attivazione del *pathway* di morte cellulare programmata (Mittler, 2002; 2004; Fujita *et al.*, 2006).

Inoltre, sono noti sistemi di difesa antiossidante di natura non enzimatica, quali i composti fenolici come flavonoidi e antocianine, prodotti dalla pianta in risposta a stress biotici e abiotici (Agati *et al.*, 2012).

In particolare le APX appartengono a una famiglia di perossidasi, che comprende numerosi isoenzimi in vari compartimenti cellulari. Sono state descritte otto proteine APX in *Arabidopsis*: 3 forme citosoliche (APX1, APX2, APX6), 2 cloroplastiche (sAPX e tAPX) e 3 microsomiali (APX3, APX4, APX5). Esse svolgono un ruolo chiave nella detossificazione dei ROS utilizzando l'ascorbato come donatore di elettroni nella reazione di riduzione dell' H_2O_2 ad H_2O .

Analisi di tipo fisiologico hanno, inoltre, rivelato che le ascorbato perossidasi, e in particolare quelle citosoliche, sono coinvolte nella comunicazione cellulare, poiché modulano il livello di perossido d'idrogeno nella cellula. L'APX ha, quindi, molti ruoli nel metabolismo cellulare: da un lato è coinvolto nei meccanismi di segnalazione della cellula, regolando la concentrazione di H_2O_2 , e dall'altro previene la sovrapproduzione di ROS, evitando così l'accumulo di specie tossiche e letali per la cellula (Ishikawa and Shigeoka, 2008).

1.6 L'espressione UV-B dipendente dei geni di difesa da stress ossidativo induce risposte da acclimatamento

In piante esposte per lungo periodo a luce UV-B di bassa energia, aumenta il contenuto di molecole antiossidanti, come l'acido ascorbico, il glutatione, le xantofille e l' α -tocoferolo. E' stato documentato anche un accumulo di flavonoidi, sia in condizioni di esposizione a basse dosi di UV-B, che a quelle alte. Per cui, le alterazioni nel metabolismo dei ROS, e la conseguente risposta antiossidativa, sembrano essere una caratteristica comune a tutte le condizioni di esposizione ai raggi UV-B. Evidenze in letteratura mostrano che alterazione nell'espressione di geni codificanti enzimi del metabolismo antiossidativo del glutatione, quali la glutatione perossidasi, la glutatione transferasi e le glutaredossine, si osservano non solo in seguito ad esposizione a basse dosi di UV-B ($0.093-0.137 W m^{-2}$), ma anche in seguito all'esposizione, per breve tempo, ad alte dosi. Al contrario, l'esposizione a dosi croniche ($12 d$ di $0.564 kJ m^{-2} d^{-1}$), non solo non induce un aumento nei livelli di espressione della glutaredossina, ma addirittura una diminuzione della sua espressione. Pertanto, sembrerebbe che le alterazioni dell'espressione di geni antiossidanti dipendano non solo dalla dose, ma anche dal tempo di esposizione agli UV-B e che, a un'iniziale sovra-espressione, possa seguire un'inibizione (Hideg *et al.*, 2013).

I ROS, oltre a indurre stress ossidativo, hanno anche un ruolo come molecole di segnalazione in grado di modulare l'espressione genica in maniera specifica. I cambiamenti nei livelli di ROS e nel metabolismo antiossidante sono parte integrante sia dell' "*eu-stress*", lo stress "buono per la pianta", che induce risposte di acclimatamento, sia del "*di-stress*", lo stress deleterio che riduce la sopravvivenza.

Analisi *microarray*, in piante *wild-type* e silenziate nel gene *UVR8* esposte a basse dosi di UV-B, hanno permesso di individuare diversi geni coinvolti non solo nella risposta a stress ossidativo, ma comuni anche alla risposta UV-B-mediata, quali SOD, enzimi del metabolismo del glutatione, nonché geni per la biosintesi di flavonoidi e piridossina. Da questi dati emerge che l'espressione della maggior parte di questi geni sia dipendente, oltre che da *UVR8*, anche da proteine regolative che

agiscono a valle, quali COP1 e HY5, lasciando ipotizzare che tali geni appartengano a una via di segnalazione UV-B dipendente, che risponde a basse dosi di UV-B ed è indipendente dalla via di segnalazione dei ROS. Questi dati, quindi, supportano l'ipotesi che basse dosi di UV-B possano causare variazioni nel metabolismo antiossidante non dipendenti dai ROS, determinando una risposta di acclimatazione, ovvero un "eu-stress", che predispone la pianta ad uno stato di "pre-allerta", così da rispondere meglio nel caso in cui le condizioni ambientali peggiorino. Al contrario, la risposta ad alte dosi di UV-B determina il cosiddetto "di-stress", caratterizzato da un massiccio sviluppo di ROS, che supera la capacità antiossidante UV-B mediata, e che determina l'attivazione di un meccanismo di risposta specifico dei ROS (Hideg *et al.*, 2013).

1.7 Stress e metabolismo primario: la fotorespirazione

Da un punto di vista della fisiologia del metabolismo primario, l'insorgere dello stress, in particolare quello idrico e/o osmotico, determina un'iniziale limitazione della fotosintesi con un rallentamento della diffusione della CO₂ dall'atmosfera verso l'interno del mesofillo fogliare. La conseguente riduzione della disponibilità di CO₂ all'interno dei cloroplasti, dove è presente l'enzima Rubisco, causa una diminuzione dell'assimilazione finale di CO₂ (Chavez e Olivera, 2004; Flexas *et al.*, 2004), favorendo la reazione di ossigenazione della Rubisco rispetto a quella di carbossilazione della CO₂ (Osmond *et al.*, 1997). Il fattore che maggiormente regola l'efficienza della fotosintesi è l'impatto della temperatura sulla solubilità dell'O₂ e della CO₂ che influenza l'attività dell'enzima Rubisco (Lea and Leegood, 1999). All'aumentare della temperatura, la maggiore solubilità dell'O₂ favorisce la reazione di fotorespirazione rispetto a quella di fotosintesi, diminuendo quindi, la fissazione netta di CO₂. La fotorespirazione è un *pathway* coordinato fra almeno tre organelli nelle cellule vegetali: cloroplasti, perossisomi e mitocondri (Fig. 1.4).

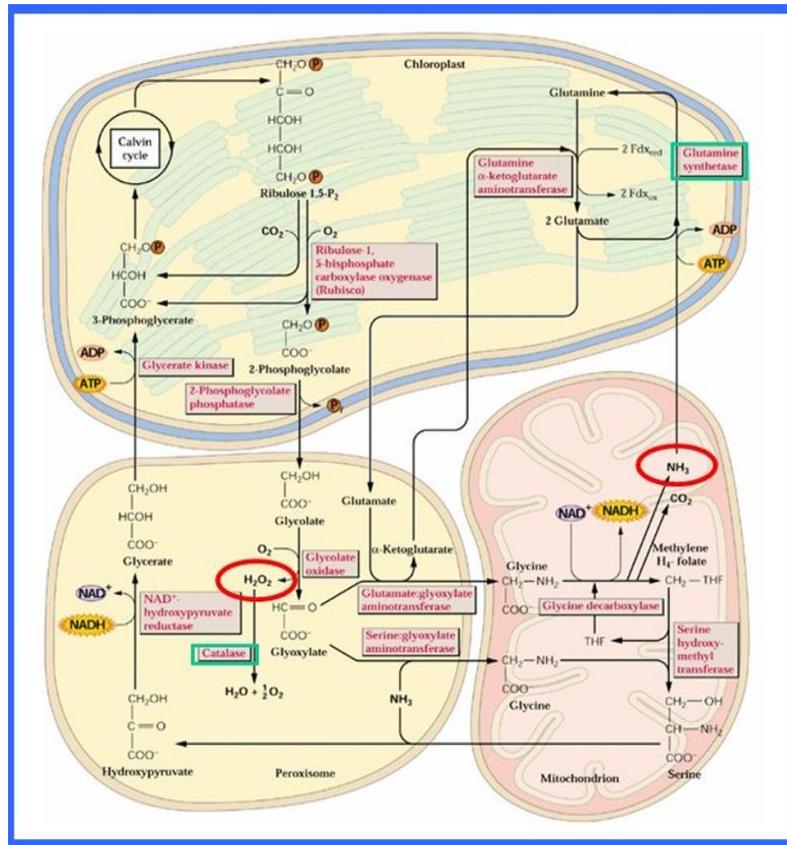


Figura 1.4 - Reazioni della via ossidativa fotosintetica del carbonio (C₂): la Fotorespirazione (Buchanan *et al.*, 2000).

Il processo di riciclo del fosfoglicolato, generato dalla attività ossigenasica di Rubisco, in fosfoglicerato utilizza una parte significativa dell'energia generata dalla fotosintesi nelle piante C₃ (Ogren, 1984; Husic *et al.*, 1987; Buchanan *et al.*, 2000; 2003).

La Rubisco è in grado di catalizzare una reazione ossigenasica, nella quale una molecola di ossigeno reagisce con con il RuBP (Ribuloso 1,5 bis fosfato) per produrre una molecola 3-fosfoglicerato e una di 2-fosfoglicolato.

La fotorespirazione ha inizio nel cloroplasto con la formazione del 2-fosfoglicolato che viene in seguito convertito a glicolato. Il glicolato per diffusione esce dal cloroplasto e trasloca nel perossisoma, dove reagisce con O₂ per produrre gliossilato e H₂O₂. Due molecole di gliossilato sono amminate per formare glicina in una reazione catalizzata da due amminotransferasi del perossisoma, serina:gliossilato (SGT) e glutammato :gliossilato amminotranferasi (GGT). Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di gliossilato-amminotransferasi perossisomiali occupano un ruolo centrale nella fotorespirazione (Kisaki and Tolbert, 1969; Somerville e Ogren, 1980; Chang and Huang, 1981; Betsche, 1983; Liang and Huang, 1983; Yu *et al.*, 1984), entrambi questi enzimi, devono funzionare per permettere l'attività continua del ciclo C₂. L'H₂O₂ prodotta viene rimossa ad opera di una catalasi perossisomiale (Mhamdi *et al.*, 2010).

La glicina prodotta nel perossisoma trasloca nel mitocondrio dove vengono prodotte serina, CO₂, NH₃ e un NADH. Ciò avviene per mezzo dell'azione di due enzimi: la

glicina carbossilasi e la serina idrossimetiltransferasi. Le foglie mantenute al buio mostrano bassa attività di questi enzimi, ma l'espressione degli enzimi è stimolata dall'esposizione alla luce probabilmente per utilizzare il grande flusso di glicina che accompagna l'inizio della fotorespirazione. La serina prodotta entra nel perossisoma dove viene deaminata dalla serina:gliossilato amminotransferasi formando idrossipiruvato. Un altro enzima del perossisoma l'idrossipiruvato reductasi, catalizza la riduzione di idrossipiruvato a glicerato. Il glicerato esce dal perossisoma ed è importato nel cloroplasto dallo stesso trasportatore che esporta il glicolato. Una volta nello stroma del cloroplasto, il glicerato è fosforilato dall'ATP, producendo 3-PGA e ADP. Questa reazione, catalizzata dall'enzima glicerato chinasi, completa la conversione di due molecole di fosfoglicolato a una di 3-PGA che può entrare nel ciclo C₃.

Dati riportati in letteratura dimostrano che mutanti nel gene *GGT1* hanno un maggiore contenuto in H₂O₂ alla luce (Verslues *et al.*, 2007), confermando il ruolo consolidato di *GGT1* nella fotorespirazione dei perossisomi (Liepman and Olsen 2001). Questo aumento di H₂O₂ in piante non stressate causa un aumento dell'Acido Abscissico (ABA) e un accumulo di prolina. In piante sottoposte a stress invece si osserva una diminuzione dei livelli di ABA nei mutanti *GGT1* conferendo una risposta alterata allo stress di questo mutante.

Studi recenti stanno dimostrando che la fotorespirazione è una risposta difensiva importante nelle piante per prevenire l'accumulo di ROS. Infatti, le reazioni fotorespiratorie possono dissipare l'eccesso di equivalenti riducenti e di energia direttamente (usando ATP, NAD(P)H e ferrodossina ridotta) o indirettamente. L'H₂O₂ è un prodotto collaterale della via fotorespiratoria, che può agire come molecola mediatrice di una via di segnalazione, ma che può causare danni cellulari irreversibili. Pertanto, si può ipotizzare un ruolo della fotorespirazione nel riaggiustamento dell'omeostasi redox e nel mitigare i danni di stress ossidativo nelle piante in condizioni di carenza idrica, eccesso di sale, bassa disponibilità di CO₂ o basse temperature.

1.8 Identificazione di proteine che interagiscono con UVR8

Partendo dall'evidenza che solo una piccola frazione di UVR8 trasloca nel nucleo in risposta a basse dosi di raggi UV-B, dove svolge una funzione di attivatore trascrizionale, e che la maggior parte della proteina UVR8 (90%) risiede nel citoplasma (Kaiserli and Jenkins, 2007), è stato ipotizzato che essa possa svolgere funzioni aggiuntive, interagendo possibilmente con altre proteine citoplasmatiche, nel regolare il complesso *network* di risposte cellulari a condizioni di stress abiotici.

Infatti, nella cellula molti processi sono regolati non solo dalla relativa abbondanza delle proteine, ma anche dalla regolazione di interazione, localizzazione delle proteine e dei complessi proteici. In particolare, è oggi chiaro che un gran numero di proteine è presente nella cellula sotto forma di complessi multiproteici; ne consegue che la comprensione delle funzioni biologiche di queste proteine è legata all'identificazione dei loro partners molecolari (Pawson, 1997). L'interazione di una proteina, di cui non si conoscono le sue funzioni, con partners appartenenti ad un complesso proteico specifico coinvolto in una particolare processo, è fortemente indicativo della sua funzione biologica. Diverse strategie possono essere utilizzate allo scopo di identificare proteine interattrici basate essenzialmente su strategie di affinità.

Nei paragrafi successivi, sono riportati i principi fondamentali delle tecniche utilizzate nel presente progetto per l'identificazione di potenziali interattori proteici della proteina UVR8.

1.8.1 La tecnologia *fishing for partners* per l'identificazione di partner proteici di una proteina target

Questa strategia permette l'identificazione di proteine che interagiscono, anche in modo transiente, con una particolare proteina bersaglio e rappresenta un efficace metodo alternativo alle procedure di immunoprecipitazione o all'approccio di biologia molecolare basato sulla tecnica del doppio ibrido (Fritz and Green, 1992). Questo metodo consiste nell'uso di sistemi di espressione di proteine commercialmente disponibili per produrre una proteina ricombinante che possa fungere da esca per pescare i suoi specifici partners molecolari all'interno di un estratto cellulare. La proteina esca può essere espressa come proteina di fusione con la Glutazione-S-transferasi (GST-) o con l'epitopo FLAG, o con una coda di poli-His o modificata covalentemente con la biotina (Orrù *et al.*, 2007). In tutti i casi, l'esca può essere immobilizzata su un supporto solido, come ad esempio particelle di agarosio (cromatografia di affinità) derivatizzato con un appropriato ligando anti-tag (glutazione, anticorpo anti-FLAG, ioni nichel, streptavidina, etc.). La stessa strategia può anche essere applicata all'identificazione di proteine che interagiscono con DNA/RNA utilizzando uno specifico oligonucleotide come esca. Una volta immobilizzata, l'esca è incubata con l'intero estratto proteico cellulare o di estratti di organelli specifici. La proteina (o l'oligonucleotide) stabilisce interazioni non covalenti con *partner* specifici presenti nell'estratto proteico cellulare, mentre le proteine non legate saranno eluite facilmente durante il lavaggio con buffer di eluzione meno stringenti. Le proteine specificamente riconosciute dall'esca sono, successivamente separate mediante SDS-PAGE e le bande proteiche visualizzate sul gel digerite proteoliticamente o con metodi chimici *in situ*. Le miscele di peptidi risultanti sono analizzate mediante MALDI-MS, consentendo l'identificazione delle proteine (Fig. 1.5).

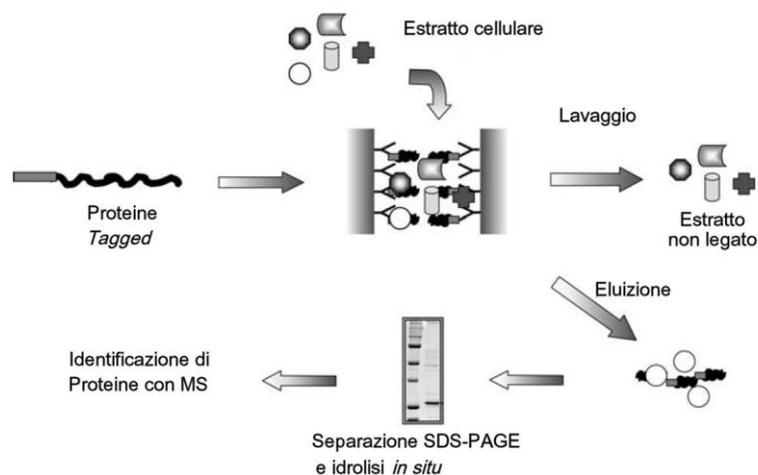


Figura 1.5 - Strategia del *fishing for partners* per l'identificazione di partner proteici di una proteina target (modificata da Monti et al, 2005).

Dopo separazione elettroforetica, le proteine sono colorate con Coomassie colloidale, escisse dal gel e sottoposte a diverse cicli di idratazione e disidratazione alternando

soluzioni acquose e organiche. Le miscele di proteine sono successivamente ridotte e alchilate con iodacetammide, per bloccare irreversibilmente i residui di cisteina, e digerite *in situ* con tripsina. Dalla miscela risultante sono estratti i peptidi ripetendo la procedura di idratazione e disidratazione che sono successivamente analizzati tramite spettrometria di massa MALDI-MS. L'identificazione delle proteine viene effettuata utilizzando i valori di massa accurati dei peptidi determinati mediante MALDI-MS. Questi valori, infatti, insieme con altri parametri, quali tipo di proteasi usata per l'idrolisi o il peso molecolare della proteina presunto dal gel di SDS, sono introdotti in *data base* disponibili in rete (ProFound, Mascot, MS-Fit, etc.) che permettono di confrontare i valori di massa registrati sugli spettri con quelli provenienti dalla digestione teorica di tutte le proteine della banca dati, consentendo l'identificazione delle proteine. Quando questa procedura non fornisce dati definitivi, vengono utilizzate metodologie di spettrometria di massa *tandem* basate sulla ionizzazione ad *electrospray* (ES-MS/MS) per ottenere informazioni anche parziali di sequenza di uno o più frammenti proteolitici. E' stato dimostrato che le informazioni ottenute dalla sequenza parziale di un solo peptide sono spesso sufficienti per identificare la proteina in banca dati (Fig. 1.6).

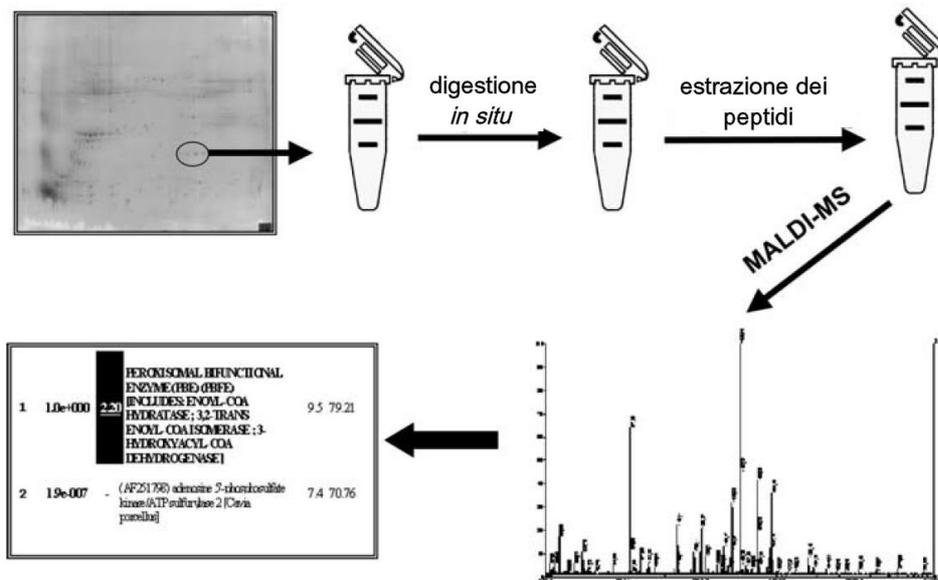


Figura 1.6 - Strategia di identificazione delle proteina mediate spettrometria di Massa (modificata da Monti *et al.*, 2005).

1.8.2 Immunoprecipitazione di complessi proteici

Un'altra strategia molto utilizzata per identificare proteine che interagiscono tra loro è la tecnica dell'immunoprecipitazione.

L'approccio classico di immunoprecipitazione di una proteina endogena consiste nel legare l'anticorpo diretto contro la proteina esca su *beads* di agarosio e/o sefarosio derivatizzate con la proteina A- (o G-). Dato che la porzione di anticorpo riconosciuta dalla proteina A- (o G-) è diverso dal sito di legame dell'antigene, l'anticorpo immobilizzato sarà in grado di immunoprecipitare la proteina bersaglio e può, quindi,

essere usato per isolare i suoi complessi proteici nativi. Una volta stabilito lo specifico legame antigene-anticorpo, le *beads* derivatizzate con Proteina A-(o G-) sono aggiunte all'estratto proteico per "pescare" eventuali complessi presenti. Dopo diversi lavaggi, le proteine che interagiscono con la proteina-esca possono essere eluiti dalle *beads* in condizioni denaturanti e le proteine identificate, come indicato in precedenza, attraverso analisi di spettrometria di massa (Fig. 1.7).

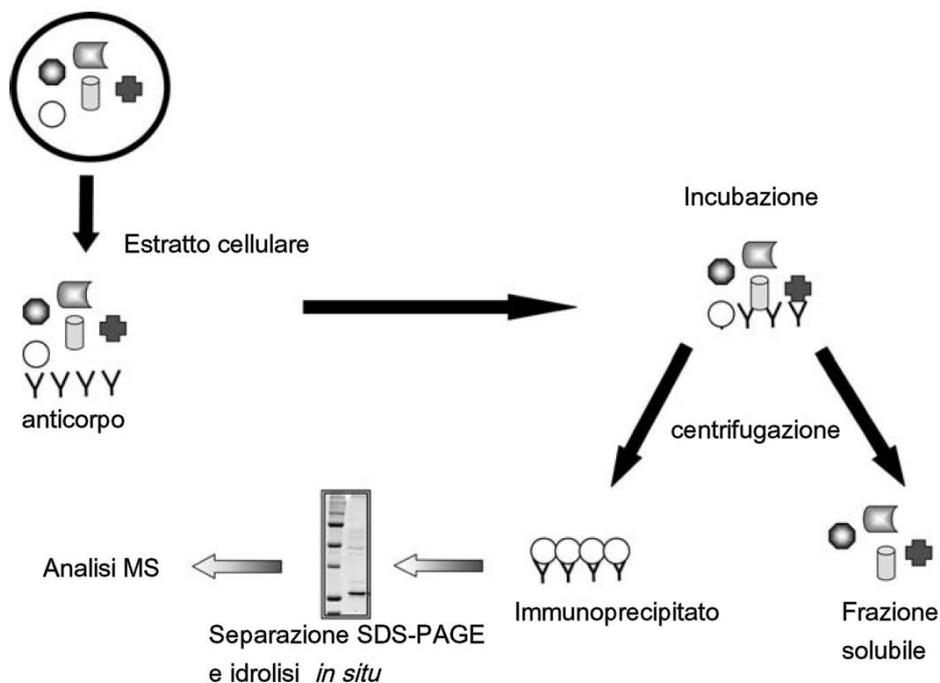


Figura 1.7 - Rappresentazione schematica della strategia di immunoprecipitazione (modificata da Monti *et al.*, 2005).

1.8.3 Conferma *in vivo* dell'interazione proteina-proteina

Qualsiasi sia stata la strategia *in vitro*, di identificazione di proteine interagenti è necessario confermare tale interazione in sistemi *in vivo*. Le tecniche attualmente più utilizzate per lo studio di interazioni proteina-proteina *in vivo* sono:

- a) la Complementazione Bimolecolare della Fluorescenza (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, *BIFC*) (Hu *et al.*, 2002);
- b) la co-immunoprecipitazione.

Complementazione bimolecolare della fluorescenza (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, *BIFC*)

Questa tecnologia è stata inizialmente sviluppata per studi di interazione proteina-proteina in cellule di mammifero, ma il sistema è stato adattato anche per cellule vegetali con ottimi risultati (Citovsky *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 2004; Lavy *et al.*, 2007, Waadt *et al.*, 2008, Favory *et al.*, 2009).

Ognuna delle proteine di cui si vuole confermare l'interazione *in vivo* sono fuse con una frazione complementare di una proteina *reporter* fluorescente (generalmente YFP o altre isoforme con spettro di fluorescenza specifico) e coesprese in maniera transiente in cellule vive, mediante agro-infiltrazione o trasfezione in protoplasti. Solo l'interazione tra le due proteine permetterà ai due frammenti non fluorescenti della proteina *reporter* di essere in prossimità e di ricostituire la sua struttura nativa tridimensionale ed emettere fluorescenza. Il segnale di fluorescenza può essere rilevato e localizzato nella cellula mediante microscopia fluorescente o microscopia confocale. Pertanto, attraverso la visualizzazione e la distribuzione della fluorescenza, è possibile identificare non solo l'interazione di due proteine in un sistema *in vivo*, ma anche la loro localizzazione.

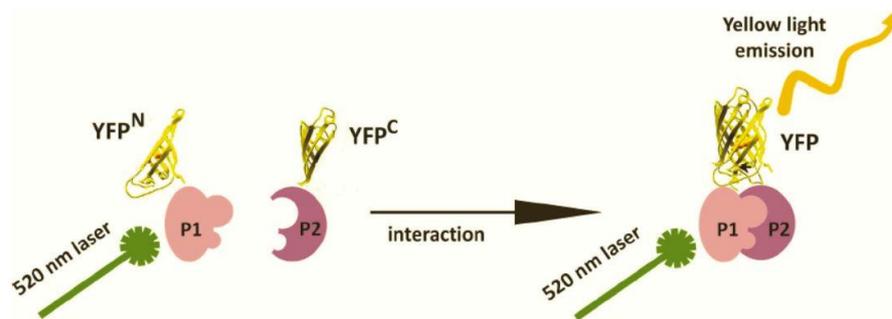


Figura 1.8 - Rappresentazione schematica del saggio BiFC (da Horstman *et al.*, 2014).

Co-immunoprecipitazione

La co-immunoprecipitazione (Co-IP) è una procedura ampiamente utilizzata per analizzare interazioni proteina-proteina. Un anticorpo specifico contro una delle due proteine di cui si vuole stabilire l'interazione è usato per immunoprecipitare complessi proteici da proteine totali estratte in condizioni native da cellule, tessuti e organi vegetali. Nella seconda fase, la proteina G- o proteina A- sefarosio sono utilizzate per legare il complesso anticorpo-proteina. Successivamente, le proteine immunoprecipitate con il primo anticorpo sono separate mediante SDS-PAGE e la proteina putativamente interagente, visualizzata mediante analisi *western-blotting* con un anticorpo specifico.

1.9 Scopo della tesi

Sebbene la funzione del gene *UVR8* è stata ampiamente chiarita nella risposta della pianta ai raggi UV-B (Kliebenstein *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2012), è stato dimostrato che l'espressione del gene *UVR8* è fortemente indotta da stress osmotico e stress salino in piantine *wild type* di *A. thaliana* (Fasano *et al.*, 2014). Inoltre, mediante un approccio di "gain and loss of function" in piante senso e antisenso di *A. thaliana* per il gene *UVR8*, è stato messo in evidenza il ruolo di questo gene nel programma di crescita, sviluppo e differenziamento della pianta; le piante che sovraesprimono *UVR8* hanno un ridotto sviluppo vegetativo (minore diametro della rosetta, foglie più piccole, altezza inferiore), mentre le piante silenziatae, sono caratterizzate da una maggiore crescita e, producono un numero maggiore di siliques e di semi (Fasano *et al.*, 2009 e 2010).

Sulla base di queste evidenze sperimentali, è stato deciso di intraprendere una serie di studi volti a comprendere meglio il ruolo della proteina UVR8 nella risposta a stress osmotico, oltre il suo ruolo consolidato nella risposta a UV-B. In particolare, è stato dimostrato che la proteina UVR8 è principalmente localizzata nel citoplasma e che solo una piccola frazione trasloca nel nucleo in risposta a basse dosi di raggi UV-B, dove svolge una funzione di attivatore trascrizionale. La maggior parte della proteina UVR8 (90%) risiede nel citoplasma (Kaiserli and Jenkins, 2007), dove è ipotizzabile possa svolgere funzioni aggiuntive, interagendo possibilmente con altre proteine citoplasmatiche, nel regolare il complesso *network* di risposte cellulari a condizioni di stress abiotici.

L'obiettivo del presente progetto di dottorato è stato identificare potenziali proteine capaci di legare la proteina UVR8 e di stabilire un ruolo funzionale di questa interazione nella risposta delle piante a stress di tipo osmotico.

In particolare, gli obiettivi specifici del presente progetto sono stati:

- a) identificazione di potenziali proteine che interagiscono con la proteina UVR8, mediante due tecnologie complementari usate per lo studio di interazioni proteina-proteina: *fishing for partners* e immunoprecipitazione;
- b) conferma *in vivo* dell'interazione tra la proteina UVR8 con la proteina APX e la proteina GGT1, due putative proteine identificate mediante i due approcci sopra riportati, entrambi implicate nella risposta a stress ossidativo, risposta comune a diversi stress ambientali, tramite co-immunoprecipitazione e saggio BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*);
- c) analisi del livello di ROS in piante di *A. thaliana* silenziatae o che sovraesprimono la proteina UVR8;
- d) analisi dei livelli di espressione del gene *GGT1* in piante silenziatae o che sovraesprimono la proteina UVR8 e risposta fisiologica allo stress salino in piante del mutante del gene *GGT1*.

MATERIALI E METODI

2. Materiali e Metodi

2.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Tutti gli esperimenti sono stati condotti con piante di *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). I semi delle piante sovraesprimenti UVR8 (35S-UVR8), dei mutanti silenziati nel gene *UVR8* (*uvr8-6*) e delle piante controllo trasformate col vettore vuoto (PKY) erano già disponibili in laboratorio. La linea mutante *knock-out nel gene GGAT1* *SALK_64982C* è stata identificata nella collezione del *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*.

Sterilizzazione semi

I semi, sono stati sterilizzati con una soluzione di 0,1% candeggina commerciale, 0,05% Tween-20, per 10 minuti e lavati ripetutamente (5/6 volte) con acqua bidistillata sterile; dopo aggiunta di 1 ml di agar 0.1%, i semi sono stati mantenuti a 4°C per 72 ore, per rompere la dormienza.

Crescita *in vitro* di piante di *A. thaliana*

I semi sterili sono stati seminati in piastre Petri (40/50 semi per piastra) contenenti 20 ml di substrato di crescita MS costituito 2,15 g L⁻¹ sali Murashige & Skoog (basal salt mixture), 0.5 g di MES (9 g L⁻¹ di agar, e 10 g L⁻¹ saccarosio, portato a pH 5.8 con KOH). Piantine di *A. thaliana* sono state allevate *in vitro* in condizioni di crescita controllate (16h di luce/8h di buio; luce 110 μmol m⁻² s⁻¹; T=23°C).

Crescita *in vivo* di piante di *A. thaliana*

Piantine di 10 giorni sono state trapiantate *in vivo* su terriccio "Florigard" misto a sabbia di fiume (1:5) e trasferite in camera di crescita (t=25°; umidità=70%).

2.2 Trattamenti in condizioni di stress ambientali

Piantine *wild type* di *A. thaliana* 35S-UVR8, del mutante *Knock out uvr8-6* e a linea *SALK_64982C* (mutante *Knock out* nel gene *GGT1*) sono state allevate per 14 giorni *in vitro* su mezzo solido, e successivamente trasferite per 30 minuti, 1 , 3 , 6 e 24 ore su terreno MS o MS contenente 150 mM NaCl. Dopo ogni trattamento le piantine sono state lavate con H₂O bidistillata e congelate in azoto liquido per l'estrazione di RNA totale.

2.3 Misura dei livelli di ROS in condizioni di stress osmotico

Piantine di 7 giorni sono state trattate per tempi diversi (1 e 24 ore) con 200 mM mannitolo o 150 mM NaCl. Al termine, le radici sono state trattate con 10 μM DCFH-DA (Dicloro-diidro-fluoresceina diacetato), un colorante che si complessa ai ROS emettendo fluorescenza. L'intensità di fluorescenza è stata misurata mediante il software per immagini digitali Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), la quale risulta essere proporzionale ai livelli dei ROS.

2.4 Caratterizzazione del mutante *knock-out* di *A.thaliana* nel gene *GGT1*

Il mutante T-DNA inserzionale SALK_64982C (*ggt1-2*) è stato acquisito dalla collezione SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). I semi ottenuti sono stati posti a germinare su terreno MS; i mutanti omozigoti sono stati selezionati per PCR utilizzando oligonucleotidi disegnati sulle sequenze fiancheggianti la putativa inserzione e un oligonucleotide specifico per il T-DNA (LBb31)(Tabella 2.2) (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (Fig. 2.1). L'analisi RT-PCR ha confermato l'assenza di trascritto nel mutante inserzionale omozigote.

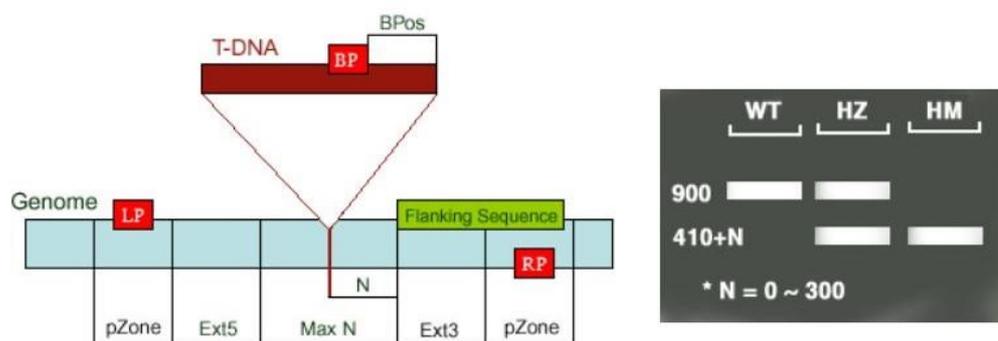


Figura 2.1 - Schema rappresentativo della caratterizzazione molecolare del mutante *knockout GGT1*. Gli oligonucleotidi LP e RP sono stati costruiti sulle regioni fiancheggianti il sito di inserzione del T-DNA, i quali in combinazione con uno specifico oligonucleotide complementare ad una regione del T-DNA permettono di discriminare i mutanti eterozigoti (HZ) dai mutanti omozigoti (HM).

2.5 Crescita di cellule BY-2 di *N. tabacum*

Sospensioni di cellule di *N. tabacum* BY-2, sono state cresciute in terreno liquido contenente 4,3 g L⁻¹ di sali MS, 100mg/l mio-inositolo, tiamina-HCl 1 mg L⁻¹ , 2,4-D 0,2 mg L⁻¹ 255 mg/l KH₂PO₄, saccarosio 30 g L⁻¹ , a pH 5,8 con KOH.

Le cellule sono state propagate ogni sette giorni diluendo 20 ml di una coltura al settimo giorno di crescita in 100 ml finali di substrato e mantenute a 23° in costante agitazione (130 rpm), al buio.

La vitalità delle cellule di *A. thaliana* è stata verificata mediante colorazione con fluoresceina diacetato (FDA) (Widholm, 1972). A 100 µl di sospensione cellulare sono stati aggiunti 2 µl di FDA (5 mg ml⁻¹) e le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza.

Cellule al terzo giorno di crescita sono state utilizzate per isolare i protoplasti utilizzati per il saggio BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*).

2.6 Estrazione di protoplasti da cellule BY-2

I protoplasti sono stati isolati da cellule in sospensione di *Nicotiana tabacum* (BY-2) al

terzo giorno di subcultura. Le cellule sono state centrifugate a 400 g per 5 min; lavate con 10 ml di soluzione di digestione senza enzimi (BSA 0.5 % , CaCl₂ x2H₂O 50 mM, mannitolo 0.25 M , Na-acetato 10 mM pH 5.8) e risospese in 7 ml di soluzione di digestione con gli enzimi, cellulasi 1 % , macerozima 0.5 % , CaCl₂ x2H₂O 50 mM , mannitolo 0.25 M, Na-acetato 10 mM pH 5.8). Dopo incubazione alla temperatura di 24-26 °C al buio per una notte, i protoplasti sono stati raccolti tramite centrifugazione (100 g per 5 minuti) e risospesi in 10 ml di soluzione W5 (NaCl 150 mM, CaCl₂ 125 mM , KCl 5 mM , glucosio 5 mM , pH 5.8-6.0). Questo passaggio è stato ripetuto due volte. I protoplasti sono stati nuovamente risospesi in 10 ml di soluzione W5 ed incubati al buio a 4°C per 20 minuti.

I protoplasti sono stati contati utilizzando la camera di Burkner e diluiti a 2x10⁶ pps/ml con soluzione MMM (MgCl₂ x6 H₂O 15 mM, MES 0.1 % , mannitolo 0.5 M , pH 5.8). La vitalità dei protoplasti di cellule BY-2 è stata verificata mediante colorazione con fluoresceina diacetato (FDA) (Widholm, 1972). A 100 µl di sospensione cellulare sono stati aggiunti 2 µl di FDA (5 mg ml⁻¹) e i protoplasti sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

2.7 Saggio di complementazione della fluorescenza (BiFC)

Il saggio di complementazione della fluorescenza (BiFC) (Hu et al., 2002), è una tecnica che permette di individuare interazioni proteina-proteina *in vivo* e può essere anche utilizzata per determinare la localizzazione di proteine che interagiscono. Questa tecnica prevede l'espressione eterologa di due proteine fuse ognuna ad una porzione della YFP (N- e C- terminale). Solo in caso di interazione tra le due specifiche proteine la proteina YFP potrà essere funzionale ed in grado di emettere della fluorescenza (Fig 2.2).

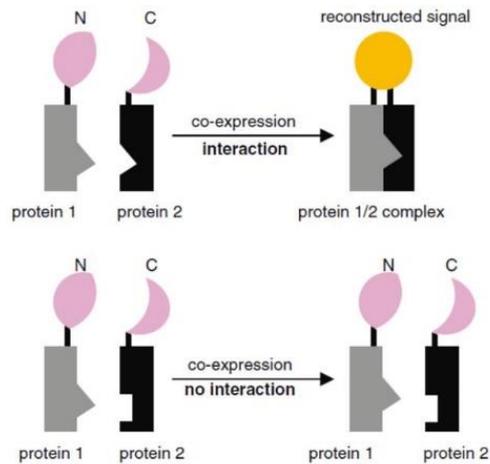


Figura 2.2 - Principio del saggio BiFC. La porzione N- o C- terminale della proteina YFP vengono fuse rispettivamente a due putativi interattori (proteina 1 e 2). In seguito alla loro coespressione il segnale di fluorescenza della YFP viene ricostituito solo in caso di interazione (da Citovsky *et al.*, 2008).

2.8 Generazione di vettori per il saggio BiFC

Il sistema di clonaggio *Gateway* (Invitrogen) è stato utilizzato per l'ottenimento di vettori binari da utilizzare per la trasformazione di protoplasti di *N. tabacum*, per il saggio BiFC.

Le sequenze codificanti i geni *APX1* (At1g07890), *GGT1* (At1g23310) e *UVR8* (At5g63860) sono state amplificate da cDNA di piantine di *A. thaliana*, dal plasmide pQE-30-GGT1 e pQE-31-UVR8 rispettivamente, con oligonucleotidi specifici (Tabella 2.2), per il clonaggio direzionale nel vettore d'ingresso pENTR/D-TOPO (Invitrogen).

L'assenza di eventuali errori nella sequenza nucleotidica clonata è stata verificata mediante sequenziamento (Primm Biotech, Milano, Italia).

Le sequenze così ottenute sono state sub-clonate attraverso una reazione di ricombinazione sito specifica con l'enzima LR (Gateway® LR Clonase™ enzyme mix kit, Invitrogen) nei vettori finali pGW42 contenente la YFP *full lenght* e usato come controllo positivo (Fig 2.3) pnYGW e pcYGW contenente la porzione N e C terminali fuse all'estremità ammino terminale, pGWcY e pGWnY contenente la porzione N e C terminali fuse all'estremità carbossi terminale (Tabella 2.1) a valle del promotore costitutivo 35SCaMV.

Tabella 2.1 - Plasmidi utilizzati per il saggio BiFC

Vector name	Former name*	Back bone	Bacterial selection	Gateway cassette	Type	Accession Number
pGWnY	nYFP/pUGW2	pUC119	Amp ^r	P _{35S} -attR1-Cm ^r -ccd-attR2-nYFP-T _{NOS}	35S pro, C-nYFP	AB626693
pnYGW	nYFP/pUGW0	pUC119	Amp ^r	P _{35S} -nYFP-attR1-Cm ^r -ccd-attR2-T _{NOS}	35S pro, N-nYFP	AB626694
pGWcY	cYFP/pUGW2	pUC119	Amp ^r	P _{35S} -attR1-Cm ^r -ccd-attR2-cYFP-T _{NOS}	35S pro, C-cYFP	AB626695
pcYGW	cYFP/pUGW0	pUC119	Amp ^r	P _{35S} -cYFP-attR1-Cm ^r -ccd-attR2-T _{NOS}	35S pro, N-cYFP	AB626696



Figura 2.3 - Cassetta d'espressione del plasmide utilizzato come controllo positivo nel saggio BiFC.

2.9 Trasformazione di protoplasti

I protoplasti (300 µl) sono stati trasformati con 20 µg di DNA plasmidico contenente le sequenze codificanti le proteine di fusione:

- UVR8-YFP (controllo positivo)
- APX-YFP (controllo positivo)
- GGT1-YFP (controllo positivo)

oppure co-trasformati con

- UVR8-cYFP e APX-nYFP (per verificare l'interazione)
- UVR8-nYFP e pGWcY (controllo negativo)
- APX-cYFP e pGWnY (controllo negativo).
- nYFP-GGT1 e cYFP-UVR8 (per verificare l'interazione)
- cYFP-GGT1 e nYFP-UVR8 (per verificare l'interazione)
- nYFP-UVR8 e pcYGW (controllo negativo)
- cYFP-GGT1 e pnYGW (controllo negativo).

Successivamente, sono stati aggiunti 300 µl di soluzione PEG (PEG 4000 al 40 %,

mannitolo 0.4 M , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 M , pH 8-9), molto lentamente per evitare la lisi dei protoplasti. Infine, i protoplasti sono stati lavati con una soluzione di lavaggio (W5 (paragrafo 2.6) 10 ml), raccolti tramite centrifugazione (100 g per 5 min) e risospesi nella soluzione di sali MS+saccarosio 0.4M (0.5 ml). I protoplasti sono stati incubati a 25 °C, per una notte al buio e successivamente osservati al microscopio a fluorescenza.

2.10 Osservazione dei protoplasti al microscopio a fluorescenza

Per l'osservazione al microscopio i protoplasti trasformati (20 μl) sono stati posti sui vetrini portaoggetto. I vetrini sono stati posizionati su un microscopio a fluorescenza (Zeiss-Axioplan 2), dotato di fotocamera digitale ed interfaccia software, utilizzando un obiettivo 20X. Le immagini sono state acquisite grazie al software Axio Vision (Carl Zeiss, Germany) oppure è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza Leica (LIVE CELL WORKSTATION LEICA AF-6000 LX) utilizzando un obiettivo 40X e le immagini acquisite grazie al software LAS AF lite.

L'emissione della fluorescenza è stata catturata in modalità di scanning della proteina YFP a 507-562 nm. Le immagini sono state acquisite con una risoluzione di 512x512 pixel.

2.11 Estrazione di RNA totale e sintesi di cDNA

Per le analisi trascrizionali l'RNA totale è stato estratto da 100 mg di tessuto vegetale, con il kit "*RNeasy Plant Mini kit*" (Qiagen, Valencia CA, USA) seguendo le istruzioni del manuale. La concentrazione dei campioni di RNA estratto è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro "NanoDrop" (Thermo Scientific, USA) alla lunghezza d'onda di 260 nm. I campioni di RNA sono stati separati su gel di agarosio all'1% per verificare l'assenza di eventuale degradazione e contaminazione di DNA genomico residuo.

Per la sintesi di cDNA, 1 μg di RNA estratto è stato trattato con DNasi I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per eliminare eventuali contaminazione da DNA. La sintesi del primo filamento di cDNA è stata eseguita con l'oligo (dT) 12-18 e l'enzima trascrittasi inversa *SuperScript III* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 50° per 50', seguendo le istruzioni del produttore.

2.12 RT-PCR semiquantitativa

Il cDNA ottenuto è stato usato come stampo per la successiva reazione di PCR. L'amplificazione dei geni è stata ottenuta a partire da 1 μl cDNA, utilizzando 2,5 U di Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), con oligonucleotidi specifici (tabella 2.2) in un volume finale di 25 μl . La miscela è stata incubata in un termociclatore (GeneAmp®PCR System 9700 Applied Biosystems) con il seguente ciclo termico: iniziale denaturazione a 94°C per 5 minuti, seguita da 30 cicli comprendenti una fase di denaturazione a 94°C per 45 secondi; appaiamento per 30 secondi ad una T_m dipendente dagli oligo usati, polimerizzazione di DNA a 72°C per 1' , ed estensione finale a 72°C per 7 minuti. Le dimensioni dei frammenti amplificati sono state controllate su gel d'agarosio, utilizzando un marcatore di peso molecolare a concentrazione nota (1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)). Le bande sono state

visualizzate mediante UV. Per normalizzare le preparazioni di cDNA, gli stessi campioni sono stati amplificati con gli oligonucleotidi specifici per l'actina.

2.13 Real time PCR quantitativa (qRT-PCR)

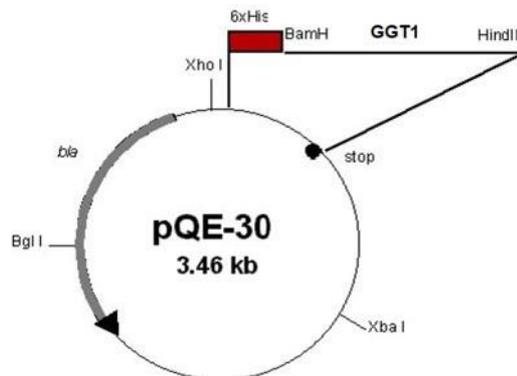
I cDNA sono stati sintetizzati a partire da 1 µg di RNA totale, come descritto in precedenza. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un volume finale di 20 µl in presenza di 0,5 µM di oligonucleotidi specifici (Tabella 2.2) e Light Cycler-DNA Master SYBR Green I mix (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK) ed effettuate in un termociclatore *Light Cycler Rapid Thermal Cycler* (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK) secondo le istruzioni del produttore. Per la normalizzazione dei campioni, il valore del Ct del trascritto del 18S è stato sottratto a quello ottenuto per l'amplificazione dei singoli geni analizzati, per ottenere il valore Δ CT. Il valore Δ CT del gene utilizzato per la normalizzazione è stato sottratto al valore Δ CT di ogni campione per ottenere il valore $\Delta\Delta$ CT (Livak and Schmittgen, 2001). Le reazioni sono state eseguite in due replicati biologici e tre repliche tecniche, per l'analisi statistica.

2.14 Produzione della proteina ricombinante GGT1

2.14.1 Costruzione del plasmide

La sequenza codificante la proteina GGT1 è stata amplificata dal vettore pLIC, ottenuto dal TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). In particolare sono stati utilizzati oligonucleotidi specifici (tabella 2.2) che hanno permesso di modificare l'estremità della sequenza da clonare, mediante l'aggiunta dei siti di restrizione per gli enzimi BamHI e HindIII, rispettivamente all'estremità 5' e 3'.

Il frammento amplificato e purificato da gel utilizzando *Quia Quick Gel Extraction kit* (Qiagen, Valencia CA, USA), è stato digerito con gli enzimi *Bam*HI e *Hind*III e clonato nel vettore pQE-30 (Qiagen, Valencia CA, USA) (figura 23), precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Il vettore finale è stato sequenziato per verificare l'assenza di mutazioni. Cellule competenti di *E. coli* M15[pREP4] (Qiagen, Valencia CA, USA), sono state trasformate con un'aliquota della reazione di ligasi (10 µl) e sono state selezionate colonie ricombinanti che mediante *colony check* con oligonucleotidi specifici, hanno permesso di verificare la presenza del vettore plasmidico.



Figura(xxx). Mappa del vettore di espressione pQE-30 in cui è stata clonata la sequenza codificante di GGT1.

2.14.2 Espressione e purificazione della proteina ricombinante GGT1

La proteina GGT1 è stata estratta e purificata da 1,5 litri di coltura batterica indotta con IPTG 1 mM a 37°C per 24 ore. La purificazione è stata realizzata tramite cromatografia di affinità utilizzando una resina Ni-NTA (Nichel- Acido Nitrilo Acetico; Amersham), seguendo il protocollo suggerito dal produttore.

Il pellet batterico è stato lisato in buffer contenente UREA 8M (pH 8) e incubato con la resina Ni-NTA. Quest'ultima è stata lavata con buffer contenente 30 mM imidazolo per eliminare le proteine aspecifiche. L'eluizione della proteina GGT1 è avvenuta utilizzando una soluzione di imidazolo 0.5 M. Le frazioni ottenute sono state analizzate tramite SDS-PAGE al 12%. Sono stati ottenuti circa 2 mg di proteina ricombinante utilizzata per la produzione di un anticorpo policlonale (Pimm Biotech, Milano, Italia).

2.15 Espressione e purificazione della proteina ricombinante UVR8 nella forma nativa

Per ottenere quantità sufficienti di proteina ricombinante UVR8 nella forma nativa, sono state utilizzate cellule di *E. coli* (M15) trasformate con il vettore di espressione pQE-31, indotte con IPTG 1 mM per 4 ore. Il vettore contenente il cDNA *full length* del gene *UVR8* di *A. thaliana* (At5g63860), già disponibile in laboratorio, presenta una coda di 6-istidine all'N-terminale che permette la successiva purificazione della proteina attraverso una cromatografia di affinità.

Il pellet batterico è stato risospeso in un buffer contenente 50 mM Tris pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, 0,8% TritonX-100, 0,4 % sodio desossicolato e lisato tramite sonicazione, centrifugato a 15000 g, a 4°C per 15 minuti. (per due volte).

Dopo centrifugazione, il pellet è stato risospeso in tampone A (NaH₂PO₄ 100 mM, 10 mM Tris, 8 M Urea, 5% β-mercaptoetanolo) e centrifugato di nuovamente come descritto precedentemente. La proteina ricombinante è stata purificata mediante IMAC cromatografia di affinità su una colonna HisTrap HP (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), pre-equilibrata con buffer A e montata su un sistema per la cromatografia liquida Akta Purifier (GE Healthcare).

Per l'eluizione, è stato utilizzato buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris pH 7.4, 0.2 M NaCl, 0.5 M imidazolo). Le frazioni di proteina purificata raccolte sono state analizzate tramite SDS-PAGE al 12%.

Per ottenere la proteina UVR8 correttamente rinaturata, le frazioni ottenute dalla cromatografia sono state raccolte sottoposte a dialisi in buffer redox contenente cisteina. Un'aliquota di proteina è stata, quindi, digerita con tripsina per la successiva analisi dei ponti disolfuro mediante spettrometria di massa.

2.16 Estrazione di proteine, separazione mediante SDS-PAGE e analisi *Western Blot*

Per il saggio di Co-IP o di *fishing for partners*, le proteine sono state estratte in condizioni native da piantine di *Arabidopsis* di 14 giorni con un tampone di estrazione contenente 1% NP40, PBS, 1mM PMSF e la miscela di inibitori di proteasi (Sigma-Aldrich, St. Luise, MO, USA). Le proteine sono state recuperate dopo centrifugazione per 15' a 4°C a 15000 g.

La concentrazione delle proteine totali è stata determinata con il metodo Bradford (BioRad Reagent Assay; BioRad).

Gli estratti di proteine totali (20 µg) sono stati risospesi nel buffer di caricamento Laemmli (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.2% blu di bromofenolo, 20% glicerolo, e 100 mM DTT), separate su un gel di SDS-poliacrilammide al 10% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Amersham) tramite elettroblotting. I filtri sono stati incubati con l'anticorpo primario anti-GGT1 (1:1000 in TBS) o anti-UVR8 (1:5000 in TBS). Il legame dell'anticorpo primario è stato rilevato tramite anticorpo secondario anti-rabbit (1:10000, Amersham). La presenza della proteina di interesse è stata visualizzata mediante la reazione di chemiluminescenza, utilizzando il reagente ECL (Enhanced ChemiLuminescent, Thermo-Scientific, Pierce) seguendo le istruzioni del produttore.

2.17 Immunoprecipitazione/Co-IP

L'anticorpo anti-UVR8, è stato legato covalentemente, tramite *cross-linking*, ad una resina di sefarosio derivatizzata con proteina A (Sigma, Saint Louis, MO, USA) Come controllo negativo sono state utilizzate le IgG di coniglio. Dopo l'incubazione di due ore per permettere il legame dell'anticorpo alla proteina A, il complesso proteina A-anti-UVR8 è stato incubato per due ore a temperatura ambiente nella soluzione di *cross-linking* (25 mM DMP in 0.2 M trietanolammina pH 8.2). Il DMP (dimetilpimelidato) è un agente che forma dei legami covalenti tra i gruppi amminici dell'anticorpo e della proteina A. In seguito, il complesso è stato lavato e incubato nella soluzione di *blocking* (0.1 M etanolammina pH 8.2) per 45 minuti, per bloccare i siti che non avevano reagito. Infine, la reazione è stata bloccata con una soluzione di glicina 0.1 M, pH 2.5. Dopo a successivi lavaggi con PBS1X, sono stati aggiunti estratti proteici di piantine in condizioni native e incubati per una notte a 4°C, così da favorire il legame della proteina d'interesse all'anticorpo. Le proteine sono state poi eluite dalla resina con il tampone Laemmli 2X, separate su gel di poliacrilammide-SDS e analizzate tramite spettrometria di massa o *western blotting* con anticorpi specifici per il saggio di Co-IP.

2.18 Saggio “fishing for partners”

Per identificare i putativi *partners* di UVR8, 200 µl di resina Ni-NTA sono stati incubati con 400 µg di proteina 6xHis-UVR8 r per 10 minuti a temperatura ambiente; 1 mg di estratto proteico totale, ottenuto in condizioni native da piantine di *A. thaliana wild type*, è stato incubato con la resina legante la proteina 6xHis-UVR8 per una notte a 4°C. Come controllo negativo 1 mg di estratto proteico è stato incubato con la sola resina. Le due aliquote di resina sono state lavate per 5 volte con un buffer salino a pH 7.4 (PBS) e le proteine eluite con 100 µl di *buffer* Laemli. I campioni sono stati analizzati tramite SDS-PAGE e le proteine colorate con Coomassie brilliant Blue (Biorad, Hercules, CA, USA).

2.19 Digestione proteolitica con tripsina

Le bande proteiche d'interesse sono state tagliate dal gel di poliacrilammide SDS (PAGE) lavate con H(NH₄)CO₃ (Ambic) 100 mM, con CH₃CN ed infine con una miscela Ambic:CH₃CN (1:1). Dopo l'aggiunta di una soluzione di ditiotreitolo (DTT) 10

mM, tranne per lo studio dei ponti disolfuro, e la miscela è stata incubata per 45 minuti a 54°C; dopo ripetuti lavaggi è stata aggiunta una soluzione di iodioacetammide 50mM per 30 minuti a temperatura ambiente. Le bande sono state nuovamente lavate e disidratate. Per la digestione proteolitica è stata utilizzata una soluzione di tripsina 0.0012 µg/µl disciolta in 10mM Ambic (*Proteomic grade*), e la miscela è stata incubata a 4 °C al fine di favorire la penetrazione dell'enzima tra le maglie del gel per 45 minuti. Dopo rimozione della soluzione non assorbita dal gel è stato aggiunto 10 mM di Ambic.e la reazione posta ad incubare a 37°C per 3h.

2.20 Analisi dei prodotti di digestione con tripsina mediante LC-MS/MS

I prodotti di digestione con la tripsina sono stati sottoposti ad analisi LC/MS/MS, utilizzando un sistema Q-TOF dotato di sorgente nano-spray ed analizzatore ibrido quadrupolo-tempo di volo, accoppiato ad un cromatografo capillare UPLC dotato di una colonna C18 nano *ATLANTIS*.

La separazione è stata condotta utilizzando H₂O + 0.1% CHOOH (eluente A) e CH₃CN + 0.1% CHOOH (eluente B), ed un gradiente lineare dal 10 al 45 % di B in 60 minuti, ad un flusso di 300 nl/min. Gli spettri sono stati ottenuti in modalità positiva, su di un range di *m/z* 500-1800.

Gli ioni di maggiore intensità sono stati automaticamente selezionati dal *software* dello strumento e sottoposti a frammentazione all'interno della cella di collisione (analisi "*dependent scan*"), producendo spettri MS/MS informativi sulla sequenza dei peptidi analizzati. L'intervallo di *m/z* analizzato in entrambe le modalità (MS ed MS/MS) è stato calibrato utilizzando gli ioni frammento del peptide Glu-Fib (scrivi nome per esteso). La correzione della calibrazione avviene in tempo reale utilizzando un sistema "Lock Mass" che inietta Glu-Fib in continuo durante l'analisi.

2.21 Analisi MASCOT

I risultati delle analisi di spettrometria di massa sono stati utilizzati per identificare le putative proteine partner. A tale scopo, i dati ottenuti stati convertiti in file pkl, ossia in liste di picchi contenenti i valori di tutti gli ioni significativi degli spettri e dei rispettivi frammenti. I file pkl sono stati inseriti nel motore di ricerca *Mascot Matrix Science*, che converte i dati di spettrometria di massa in sequenze primarie proteiche ed utilizza tali informazioni per identificare le proteine presenti. Il database utilizzato è stato *Swiss Prot*. Nella ricerca nel database, sono state considerate modifiche delle masse teoriche quali la carbossiamidometilazione delle cisteine e le modifiche post-traduzionali quali ossidazione e fosforilazione degli amminoacidi, con una tolleranza massima di 100 ppm. Dopo identificazione dei peptidi provenienti dal campione (resina Ni-NTA+6xHis-UVR8) e dal controllo negativo, i risultati ottenuti sono stati confrontati e tutti le proteine aspecifiche eliminate, ottenendo così una lista dei potenziali partners della proteina UVR8.

2.22 Analisi statistica

Il test *t Student* è stato utilizzato per valutare i livelli di significatività dei valori ottenuti dalle analisi fenotipiche e di qRT-PCR condotte sulle piante oggetto di questo studio.

Tabella 2.2 - Elenco degli oligonucleotidi utilizzati nel presente progetto di tesi

Numero	Gene	Sequenza 5' 3'	Funzione
1	GGT1-F	CACCATGGCTCTCAAGGCATTAGACTC	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
2	GGT1-R	TCACATTTTCGAATAACCAAAGTTAT	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
3	GGT1-RNoS	CATTTTCGAATAACCAAAGTTAT	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
4	UVR8-F	CACCATGGCGGAGGATATFGCTGCC	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
5	UVR8-R	TCAAATTCGTACACGCTTGACATCAG	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
6	UVR8-RNoS	AATTCGTACACGCTTGACATCAG	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
7	APX-F	CACCATGACGAACTACCCAAACC	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
8	APX-RNoS	AGCATCAGCAAACCCAAGCTCAGA	Clonaggio in pEntr-D-TOPO
9	RT-GGT1-F	ATATTTTAACTCTCCCCACTC	RT-PCR
10	RT-GGT1-R	TGGATACCCATCACGCCGTTG	RT-PCR
11	RT-ACT-F	AGGAAGTACAGTGTCTGGATCGG	RT-PCR
12	RT-ACT-R	AACGATTCCTGGACCTGCC	RT-PCR
13	RT-GGT1- F	GAAGTTCTGTTATAACGAGAAAC	qRT-PCR
14	RT-GGT1-R	AGAGACTGTGTGAAAAGATACAAG	qRT-PCR
15	RT-RD29B-F	GCGCACCAGTGTATGAATCCTC	qRT-PCR
16	RT-RD29B-R	TGTGGTCAGAAGACACGACAGG	qRT-PCR
17	RT-18S-F	AAACGGCTACCACATCCAAG	qRT-PCR
18	RT-18S-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	qRT-PCR
19	GGT1-Hind	CGGGATCCATGGCTCTCAAGGCATTAGACTA	Clonaggio in pQE30
20	GGT1-BamHI	CCCAAGCTTTCACATTTTCGAATAACCAAAGT	Clonaggio in pQE30
21	LP 2-GGT1	TCTGCTTCTTCTGCGTTTAGG	PCR DNA genomico
22	LB 2-GGT1	AAAAACGTCGTGTGCAATTTTC	PCR DNA genomico
23	LBb31	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	PCR DNA genomico

RISULTATI

3. Risultati

3. Identificazione di proteine che interagiscono con UVR8

Solo una piccola parte della proteina UVR8 monomerizza in risposta a UV-B e trasloca nel nucleo, dove agisce come attivatore trascrizionale. Inoltre, come precedentemente riportato, condizioni di stress osmotico (PEG, NaCl) sono associati ad un aumento della trascrizione e sintesi di UVR8 (Fasano *et al.*, 2014). La maggior parte della proteina (circa il 90%) risiede nel citoplasma, dove potrebbe svolgere funzioni aggiuntive interagendo con altre proteine citoplasmatiche (Kaiserli e Jenkins, 2007). Due approcci complementari sono stati condotti per identificare potenziali proteine che interagiscono con UVR8:

- a) Il *fishing for partners*, basato sull'uso della proteina UVR8 come esca, immobilizzata su una resina;
- b) immunoprecipitazione, con anticorpi specifici anti-UVR8.

Per il primo approccio, è stato necessario produrre quantità sufficienti di proteina UVR8 ricombinante, nella forma nativa.

3.1 Fishing for partners

3.1.1 Espressione e purificazione della proteina ricombinante UVR8

La proteina ricombinante UVR8, fusa al 5' a una coda di 6xHIS, è stata ottenuta mediante sovraespressione del cDNA *full-length*, inseriti nel vettore pQE31::UVR8, già disponibile presso il laboratorio, in cellule di *E.coli* M15.

Dopo induzione con IPTG, le proteine totali sono state estratte e la proteina di fusione 6xHIS-UVR8 purificata mediante cromatografia di affinità (Fig. 3.1 A). Le frazioni sono state analizzate mediante analisi SDS-PAGE (Fig. 3.1 B), che ha evidenziato la presenza di una proteina del peso molecolare atteso di circa 47 kDa, corrispondente alla proteina UVR8, come confermato da digestione enzimatica e successiva analisi MALDI-TOF (dati non riportati). La proteina UVR8 ricombinante è stata successivamente sottoposta a dialisi in tampone riducente contenente cisteina. Il corretto *refolding* della proteina UVR8 è stato verificato mediante identificazione dei ponti disolfuro della proteina ricombinante: l'analisi di spettrometria di massa (MALDI-TOF) ha permesso di evidenziare tre ponti disolfuro, tra le seguenti cisteine: C₃₇-C₇₄, C₁₂₇-C₁₃₂, C₃₁₇-C₃₃₅, e una cisteina libera C₂₃₁ che potrebbe essere coinvolta nell'interazione con altre proteine o nella formazione di dimeri (Fig. 3.1 C).

Sono stati ottenuti circa 2,5 mg di proteina ricombinante UVR8, utilizzati per l'immobilizzazione su resina al Nichel e identificazione di putative proteine interattrici di UVR8 mediante la tecnica "fishing for partners".

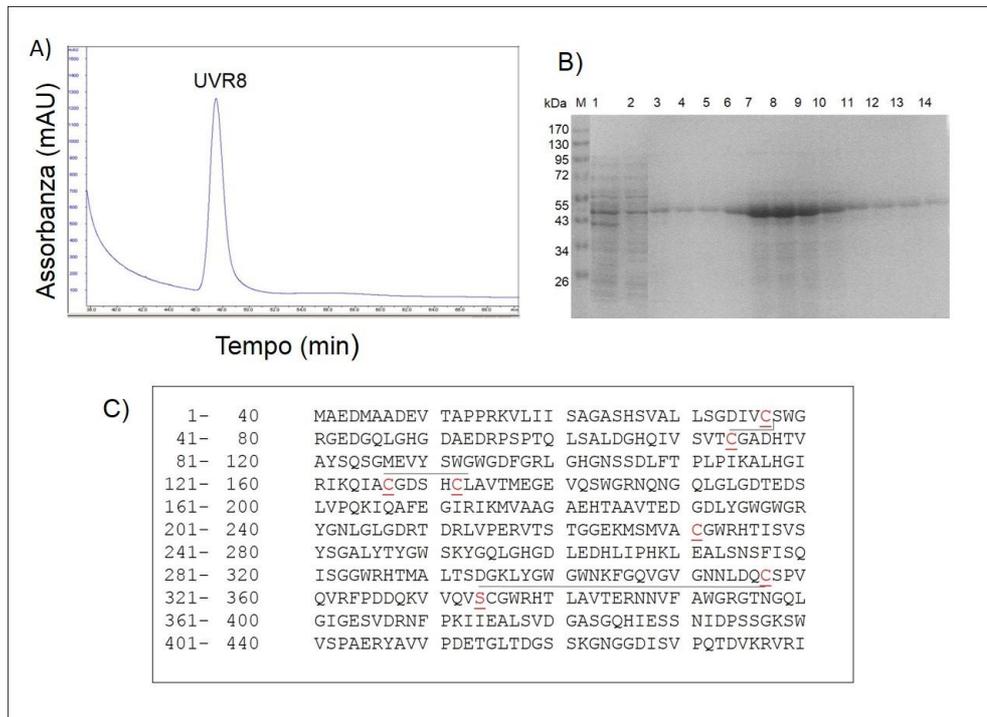


Figura 3.1 - Produzione e purificazione della proteina UVR8 ricombinante: A) Cromatogramma delle frazioni ottenute mediante FPLC-UV/Vis, dopo eluzione su colonne Ni-Nta **B) Analisi SDS-PAGE delle frazioni ottenute: M)** marker di peso molecolare; **1)** Estratto totale da cellule M15; **2)** Eluato non legato alla colonna; **3-14** frazioni della proteina eluita; **C) Analisi MALDI-TOF, con la sequenza aminoacidica della proteina UVR8 e identificazione delle cisteine coinvolte nei legami S-S.**

3.1.2 Identificazione di partner proteici della proteina UVR8

La proteina ricombinante 6xHIS-UVR8 rinaturata è stata legata alla resina Ni-Nta e, successivamente incubata con proteine totali, estratte in condizioni native, da piantine di *A. thaliana* di 14 giorni. Dopo successivi lavaggi, per allontanare possibili proteine legate in maniera aspecifica, le proteine immobilizzate sono state eluite con un buffer denaturante e l'eluato analizzato mediante SDS-PAGE (Fig. 3.2).

Dal confronto dei pattern elettroforetici delle frazioni eluite dalla resina che lega la proteina 6xHIS-UVR8 (Fig 3.2 linea 1) rispetto alla frazione eluita dal controllo, priva della proteina ricombinante (Fig. 3.2 linea 2), sono state identificate diverse proteine che si legano alla proteina UVR8.

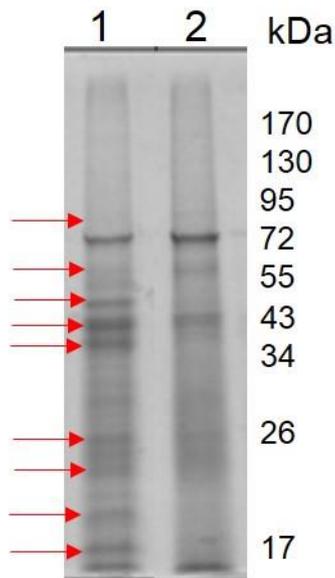


Figura 3.2 - Analisi SDS-PAGE del pool di proteine ottenute mediante cromatografia di affinità su colonne di resina Ni-Nta su cui è stata immobilizzata la proteina ricombinante UVR8 come esca, sulla quale sono state caricate proteine totali di piantine giovani di *A. thaliana* (14 giorni) e successiva eluzione con tampone contenente imidazolo 0,5 M (linea 1), a confronto con le proteine eluite dalla resina Ni-Nta in assenza della proteina ricombinante 6xHIS-UVR8 da piantine di *A. thaliana* (linea 2, controllo negativo).

Le bande contenenti queste proteine sono state prelevate, ridotte e alchilate e, successivamente, digerite con tripsina. Le miscele di peptidi risultanti sono stati analizzati mediante analisi LC-MS/MS e lo spettro dei peptidi ottenuti dalla digestione confrontato in banca dati attraverso il software "MASCOT" (<http://matrixscience.com>). In Tabella 3.1 è riportato l'elenco delle proteine identificate, putativi *partner* proteici di UVR8, coinvolte nel metabolismo energetico (Malato deidrogenasi, 64 kDa e glutammato deidrogenasi, 44 kDa), nella sintesi della metionina (metionina sintasi 3, 90 kDa), nella produzione di auxine (Nitrilasi 2, 37 kDa), nella risposta a stress ambientali (Beta glucosidasi, 59 kDa) o nello stress ossidativo (Ascorbato perossidasi, 25 kDa) e (CYP450, 62 kDa), coinvolto nei processi di detossificazione della cellula. E' noto che condizioni di stress ambientale sono associati a *burst* ossidativo e a produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle piante. Pertanto, è stato deciso di concentrare l'attenzione sull'ascorbato perossidasi 1 (APX 1), enzima con un ruolo chiave nella detossificazione di H₂O₂, molecola altamente tossica per la cellula vegetale (Isikawa and Shigeoka, 2008).

Tabella 3.1 - Elenco delle proteine identificate come putativi interattori della proteina UVR8, mediante la tecnica *fishing for partners*. E' indicata la percentuale di copertura dei peptidi analizzati mediante analisi LC-MS/MS

Proteina	PM (kDa)	Locus	Copertura %	Funzione
Ascorbato perossidasi	25	At1g07890	13	Omeostasi dei ROS (Koussevistzky <i>et al</i> , 2008)
Nitrilasi 2	37	At3g44300	9	Produzione di IAA e difesa dai patogeni (Sugawara <i>et al</i> , 2009)
Malato deidrogenasi	64	At5g11670	6	Metabolismo energetico; (Gerrard Wheeler <i>et al</i> , 2009)
Beta glucosidasi	59	At3g09260	38	Risposta delle piante a stress salini e da freddo; (Thorlby G <i>et al</i> , 2004)
Glutamato deidrogenasi	44	At5g07440	6	Metabolismo energetico (Fontaine <i>et al</i> , 2012)
Istone H26A	16	At5g59870	19	Struttura della cromatina (Yelagandula <i>et al</i> , 2014)
Metionina Sintasi 3	90	At5g20980	3	Sintesi Metionina della metionina nei cloroplasti (Less <i>et al</i> , 2008)
Citocromo P450 (CYP81D)	62	At2g23190	2	Processi di detossificazione della cellula (Ehltng <i>et al</i> , 2008)

3.1.3 Conferma *in vivo* dell'interazione tra UVR8 e APX

L'interazione tra le proteine UVR8 e APX 1 è stata confermata mediante:

- saggio di co-immunoprecipitazione da proteine totali estratte in condizioni native da giovani piantine, utilizzando l'anticorpo anti-UVR8 e l'anticorpo anti-APX;
- saggio BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*), mediante co-espressione delle proteine di fusione APX-nYFP e UVR8-cYFP in protoplasti di *N. tabacum* BY-2.

Co-immunoprecipitazione del complesso UVR8-APX

Allo scopo di confermare *in vivo* l'interazione tra le proteine UVR8 e APX, le proteine totali estratte da piantine di *A. thaliana Col-0* in condizioni native sono state incubate con l'anticorpo anti-UVR8 legato covalentemente alla proteina A. Successivamente, la proteina UVR8 e le proteine ad essa legate sono state separate dall'immunocomplesso (anti-UVR8-Proteina A), utilizzando un buffer denaturante. La presenza della proteina APX nell'immunoprecipitato è stata verificata mediante analisi *western blotting* con l'anticorpo anti-APX, che ha rilevato la presenza di una proteina di 25 kDa, corrispondente, verosimilmente, alla isoforma citoplasmatica di APX (cAPX), non presente nell'immunoprecipitato ottenuto dall'incubazione con IgG di coniglio (controllo negativo) (Fig 3.3).

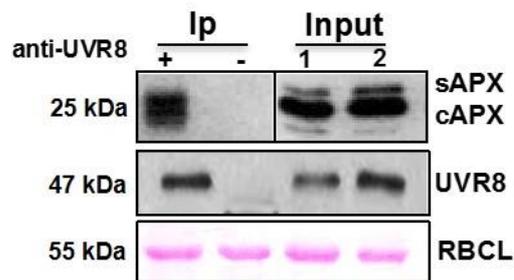


Figura 3.3 - Analisi western blotting, con l'anticorpo anti-APX, di estratti proteici ottenuti da piante di *A.thaliana col-0* di 14 giorni allevate su substrato MS in camera di crescita (16h luce-8h buio) e recuperati dopo incubazione con l'anticorpo anti-UVR8, (linea +) o con IgG di coniglio (linea -). Sono evidenziate la forma citosolica (cAPX, 25 kDa) e stromatica (sAPX) della proteina APX nell'immunoprecipitato ottenuto mediante immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-UVR8. **Input**, analisi *western blotting* delle proteine totali con l'anticorpo anti-APX (pannello superiore) o anti-UVR8 (pannello inferiore). La proteina Rubisco decarbossilasi (RBCL), rilevata tramite colorazione del filtro con *Ponceau* è stata utilizzata come controllo della quantità di proteine caricate su gel.

Saggio di complementazione bimolecolare della fluorescenza (BiFC) tra la proteina UVR8 e la proteina APX

L'interazione tra UVR8 e APX è stata anche confermata mediante saggio BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*).

Sono stati generati due vettori d'espressione in cui le sequenze codificanti dei geni UVR8 o APX sono state clonate a valle del frammento codificante l'N- o C-terminale della YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), in grado di emettere fluorescenza a 527 nm quando eccitata a 514 nm. I quattro vettori ottenuti (UVR8::nYFP, APX::cYFP, UVR8::YFP, APX::YFP) schematizzati nella figura 3.4, sono stati co-trasfettati, in diverse combinazioni, in protoplasti di cellule BY2 di tabacco e analizzati mediante microscopia a fluorescenza. Come controllo negativo, i vettori esprimenti le singole proteine di fusione (UVR8-cYFP e APX-nYFP) sono state co-trasfettate insieme ai loro complementari vuoti (pGWnY/pGWcY), mentre come controllo positivo sono stati trasfettati i vettori UVR8::YFP e APX::YFP contenente l'intera sequenza codificante la YFP.

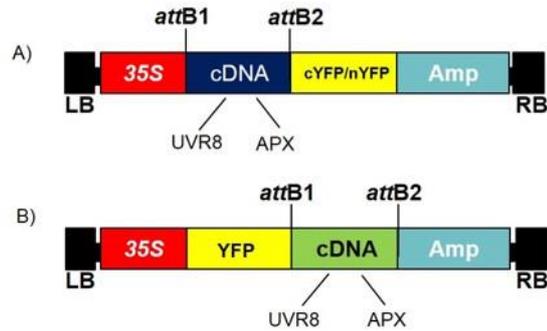


Figura 3.4 - Rappresentazione schematica dei vettori utilizzati per la co-espressione transiente di UVR8 e APX in protoplasti di cellule di *N. tabacum* BY-2. A) Plasmidi utilizzati per saggio BiFC contenenti la porzione N-terminale e C-terminale della YFP (pGWnY e pGWcY) B) plasmide utilizzato come controllo positivo contenente la YFP *full-length* (pUGW42-YFP). LB, *left border*; RB, *right border*; attb1 e attb2, sito di ricombinazione omologa.

Le proteine UVR8 e APX sono espresse principalmente nel citoplasma (controllo positivo, Fig. 5 a e b). La co-espressione dei vettori UVR8-cYFP e APX-nYFP (Fig. 3.5 c) in protoplasti di cellule di tabacco ha evidenziato un chiaro segnale di fluorescenza derivante dalla ricostituzione della proteina YFP (Fig. 3.5 c), localizzato principalmente nel citoplasma, confermando *in vivo* l'interazione tra la proteina UVR8 e la proteina APX. Nessun segnale di fluorescenza è stato rilevato in protoplasti co-trasformati con i vettori vuoti (controllo negativo, Fig. 3.5 d, e)

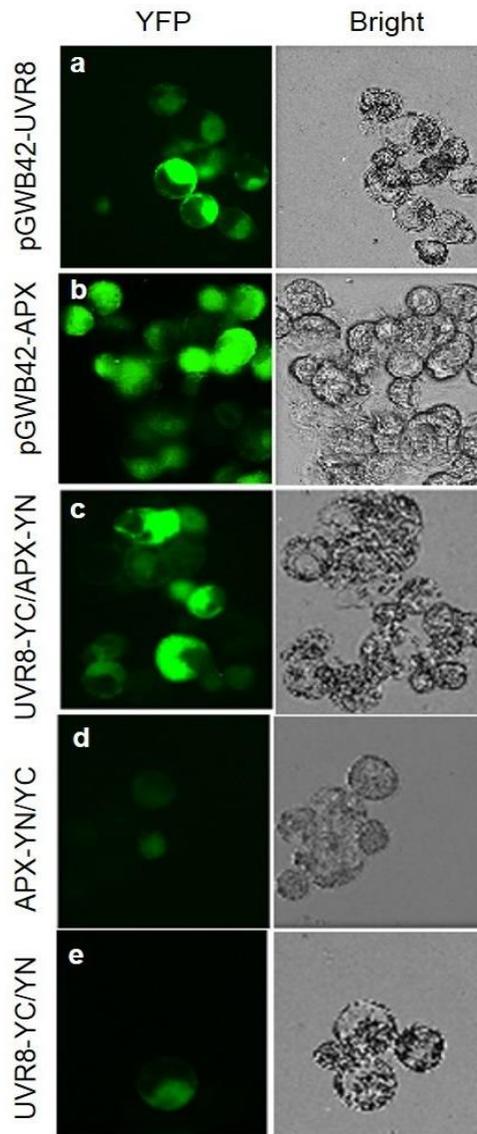


Figura 3.5 - Analisi di interazione *in vivo* tra le proteine UVR8-APX in protoplasti di *N. tabacum*, mediante saggio BIFC. Trasformazione con **a)** il vettore pGWB42-UVR8, contenente l'intera sequenza codificante di UVR8 fusa alla sequenza di YFP; **b)** il vettore pGWB42-APX, contenente l'intera sequenza codificante di APX fusa alla sequenza di YFP; **c)** co-espressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione UVR8-cYFP e APX nYFP; **d)** coespressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione APX-nYFP e il suo complementare vuoto; **e)** coespressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione UVR8-cYFP e il suo complementare vuoto. Nel pannello di destra sono mostrate le corrispondenti immagini in campo chiaro. Legenda: **YN** (pGWnY: plasmide esprime la porzioneterminale della YFP,) **YCe**(pGWcY: plasmide esprime la porzione C terminale della YFP).

3.1.4. Analisi dei livelli dei ROS in piante sovraesprimenti o *knock-out* per il gene *UVR8*

La doppia conferma dell'interazione tra la proteina UVR8 e la proteina APX1, sia mediante co-immunoprecipitazione sia mediante saggio BiFC, insieme a precedenti risultati che hanno indicato un evidente coinvolgimento della proteina UVR8 nella risposta a stress osmotico (Fasano *et al.*, 2014), suggeriscono un putativo ruolo di tale interazione nel controllo dell'omeostasi cellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Pertanto, allo scopo di verificare questa ipotesi, piantine di *Arabidopsis* sovraesprimenti (35S-UVR8) o silenziate nel gene *UVR8* (*uvr8-6*) sono state trattate, per tempi diversi (1 e 24 h), con 200 mM di mannitolo o 150 mM di NaCl (Fig.3.6).

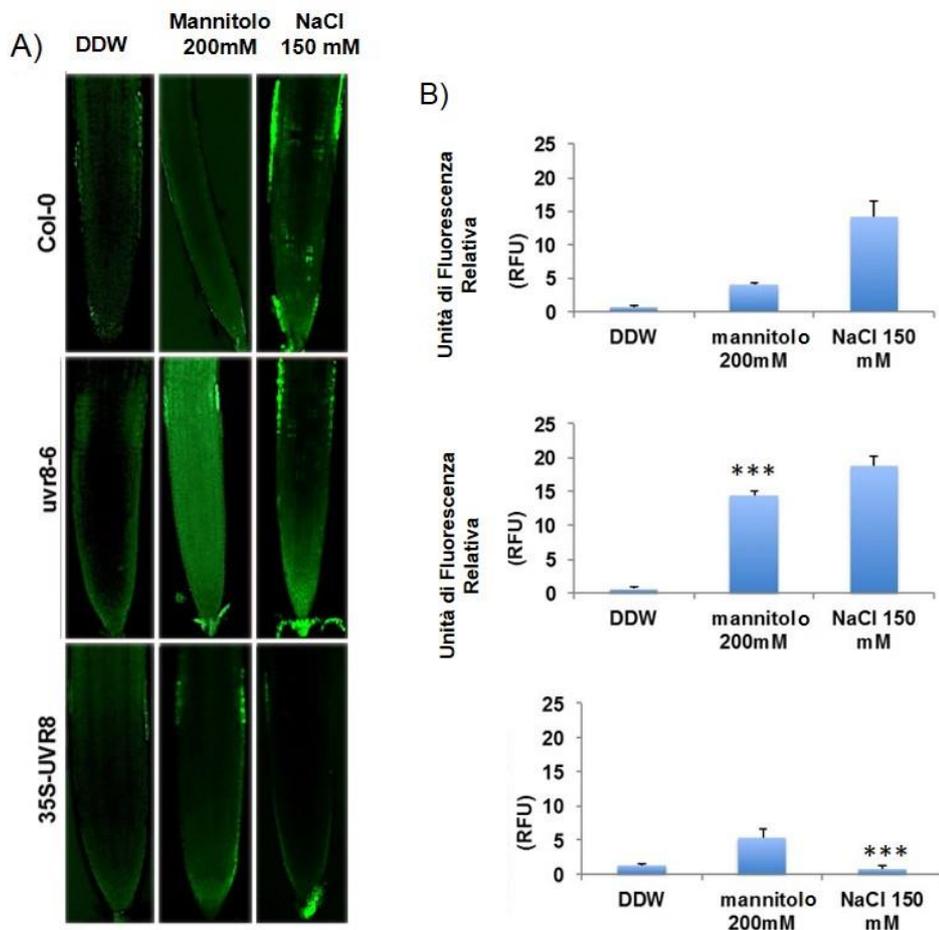


Figura 3.6 - Valutazione dei livelli di ROS in piantine di *Arabidopsis* mediante colorazione DCFH-DA di radici di piante di 7 giorni *wild type* (Col-0), mutante silenziato *uvr8-6* o linea sovraesprimente 35S-UVR8 in assenza di stress osmotico (DDW) o dopo trattamento di 1 h con 200 mM mannitolo o con 150 mM NaCl. A) Immagini al microscopio a fluorescenza; B) quantificazione del livello di fluorescenza. I valori riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti \pm SD ($p < 0,001$).

Il livello di ROS in piantine stressate, a confronto con piantine controllo, è stato determinato mediante colorazione delle radici con una soluzione di DCFH-DA (diclorofluoresceina diacetato), che, complessandosi con i ROS, emette fluorescenza (Fig. 3.6 A).

Come riportato in Fig 3.6 l'analisi quantitativa della fluorescenza emessa (Fig. 3.6 B) ha evidenziato un contenuto minore dei ROS in piante sovraesprimenti 35S-UVR8 in risposta sia al trattamento con mannitolo sia con NaCl rispetto alle piante controllo (Col-0) (Fig. 3.6 B). Al contrario, nei mutanti silenziati *uvr8-6* è stato determinato un contenuto dei ROS maggiore delle piante *wild type* (Col-0). Questi risultati forniscono una preliminare evidenza che l'interazione di UVR8 e APX, da noi evidenziata *in vivo*, possa contribuire ad una più attiva e/o rapida detossificazione dei ROS, tra cui anche l'H₂O₂, generati da stress osmotico in *Arabidopsis*.

3.2 Identificazione di putative proteine interattive di UVR8 mediante Immunoprecipitazione

Studi precedenti hanno evidenziato che piante che sovraesprimono UVR8 hanno un ridotto sviluppo vegetativo (minore diametro della rosetta, foglie più piccole, altezza inferiore), un fenotipo reminiscente della risposta SIMR (*Stress Induced Morphogenic Response*). E' stato utilizzato un approccio complementare al *fishing for partners* per identificare ulteriori proteine che interagiscono con la proteina UVR8, mediante immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-UVR8 di proteine totali native estratte da piante che sovraesprimono la proteina UVR8.

Mediante confronto dei pattern elettroforetici delle proteine immunoprecipitate da proteine totali estratte da piante 35S-UVR8 e da piante controllo (trasformate con il vettore vuoto), è stata identificata una proteina, con pm apparente di 53 kDa (Fig. 3.7). La banda contenente questa proteina è stata prelevata, ridotta e alchilata e, successivamente, digerita con tripsina. La miscela di peptidi risultante è stata analizzata mediante analisi LC-MS/MS e lo spettro dei peptidi ottenuti dalla digestione confrontato in banca dati attraverso il software "MASCOT" (<http://matrixscience.com>), che ha permesso di stabilire che la proteina corrisponde ad una glutammato-gliossilato ammino-transferasi (GGT1, locus Atg1g23310). E' interessante riportare che questo enzima è coinvolto, insieme con altri enzimi, nel complesso meccanismo di detossificazione del 2-fosfo-glicerato, che si forma per l'attività ossigenasica della Rubisco, in condizioni di eccesso di O₂, spesso associati a condizioni di stress idrico e salino (Foyer et al, 2009). Nelle varie fasi di detossificazione, il glicolato è detossificato nel perissoma, con formazione di H₂O₂, che è a sua volta detossificata da APX e da altri enzimi detossificanti. L'interazione *in vivo* tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1 è stata verificata mediante co-immunoprecipitazione e saggio BIFC.

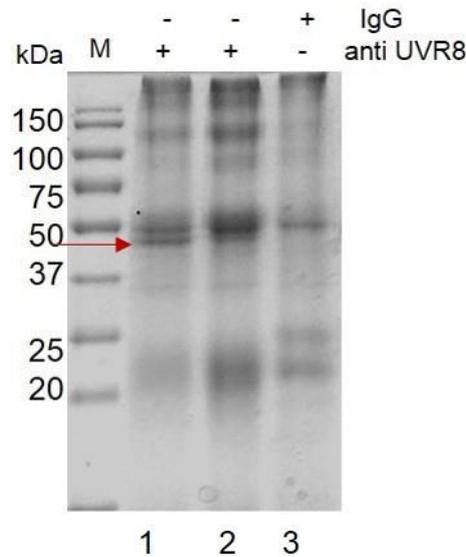


Figura 3.7 - Analisi SDS-PAGE delle proteine immunoprecipitate con l'anticorpo anti-UVR8 da proteine totali estratte in condizioni native da piante di Arabidopsis che sovraesprimono la proteina UVR8 (linea 1) o da piante controllo, trasformate con il vettore vuoto (linea 2). La freccia indica la banda che è stata prelevata e identificata come una glutammato - gliossilasi-ammino-tranferasi (GGT1), mediante spettrometria di massa.

3.2.1 Conferma dell'interazione tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1 mediante coimmunoprecipitazione

L'interazione *in vivo* tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1 è stata confermata mediante co-immunoprecipitazione e saggio BIFC.

Produzione dell'anticorpo anti-GGT1

Per il saggio di co-immunoprecipitazione, è stato necessario produrre un anticorpo anti-GGT1 specifico, non disponibile in commercio. Il cDNA *full-length* di GGT1 di *A. thaliana*, ottenuto mediante amplificazione dal vettore pLIC ottenuta da TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) è stato clonato nel vettore di espressione pQE30 (Qiagen, Valencia CA, USA), e la proteina ricombinante, espressa in cellule di *E. coli* M15, è stata purificata mediante cromatografia di affinità.

Sono state ottenute quantità di proteina ricombinante GGT1 (circa 2 mg), con peso molecolare atteso di circa 53 kDa, in forma purificata, come evidenziabile all'analisi SDS-PAGE delle frazioni eluite (Fig. 3.8), che è stata utilizzata per la produzione di anticorpi policlonali in coniglio (Primm Biotech, Italia).

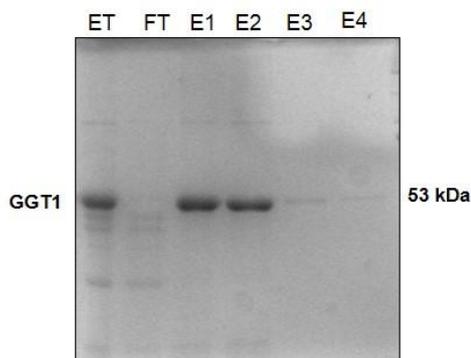


Figura 3.8 - Analisi SDS-PAGE delle frazioni eluite mediante cromatografia di affinità su colonne Ni-Nta delle proteine totali estratte da cellule di *E. coli* trasformate con il vettore di espressione pQE30:: 6xHis-GGT1, dopo induzione con IPTG (1 mM per 24 ore) della proteina ricombinante 6xHis-GGT1. **ET:** proteine totali; **FT:** eluato non legato; **E1-E4:** frazioni eluite con buffer contenete imidazolo 0,5 M.

Co-immunoprecipitazione del complesso UVR8 e GGT1

Proteine totali estratte in condizioni native da piantine di *A. thaliana* sovraesprimenti (35S-UVR8), cresciute su substrato MS, sono state incubate con l'anticorpo anti-UVR8, legato in maniera covalente alla proteina A. Successivamente, la proteina UVR8 e le proteine ad essa legate sono state separate dall'immunocomplesso (anti-UVR8-Proteina A) utilizzando un buffer denaturante. La presenza della proteina GGT1 nell'immunoprecipitato è stata verificata mediante analisi *western blotting* con l'anticorpo anti-GGT1, che ha rivelato la presenza di una proteina di circa 53 kDa, corrispondente, verosimilmente, alla proteina GGT1, non presente nell'immunoprecipitato ottenuto dall'incubazione con IgG di coniglio (controllo negativo), (Fig. 3.9).

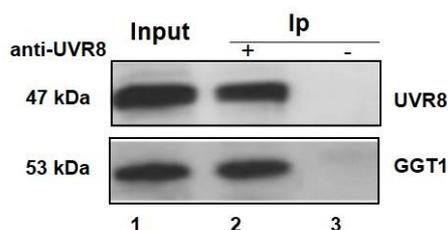


Figura 3.9 - Analisi *western blotting*, di estratti proteici ottenuti da piante di *A. thaliana* che sovraesprimono la proteina UVR8 allevate su substrato MS in camera di crescita (16h luce-8h buio) e recuperati dopo incubazione con l'anticorpo anti-UVR8 (linea 2) o IgG di coniglio (linea 3) Input (linea 1). E' evidenziata la proteina GGT1 nell'immunoprecipitato (Ip) con l'anticorpo anti-UVR8.

3.2.2 Saggio di complementazione bimolecolare della fluorescenza (BiFC) tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1

L'interazione tra UVR8 e GGT1 è stata ulteriormente confermata mediante saggio BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*), mediante coespressione transiente di entrambe le proteine in protoplasti di cellule di *N. tabacum* (BY-2).

Sono stati generati due vettori d'espressione in cui le sequenze codificanti dei geni UVR8 o GGT1 sono state clonate a monte del frammento codificante l'N- o C-terminale della YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), in grado di emettere fluorescenza a 527 nm quando eccitata a 514 nm. Sono stati ottenuti i vettori nYFP::UVR8, cYFP::UVR8, nYFP::GGT1, cYFP::GGT1, YFP::GGT1 e YFP::UVR8 schematizzati nella figura 3.10, che sono stati co-trasfettati, in diverse combinazioni, in protoplasti di cellule BY2 di tabacco e analizzati mediante microscopia a fluorescenza. Come controllo negativo, i vettori esprimenti le singole proteine di fusione (cYFP-UVR8/nYFP-GGT1) sono state co-trasfettate insieme ai loro complementari vuoti (pnYGW/pcYGW) mentre come controllo positivo sono stati trasfettati i vettori UVR8::YFP e GGT1::YFP contenente l'intera sequenza codificante la YFP.

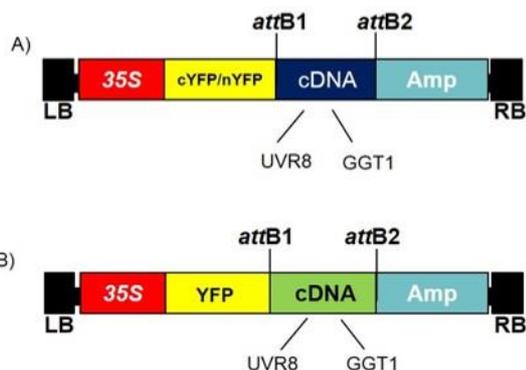


Figura 3.10 - Rappresentazione schematica dei costrutti utilizzati per l'espressione transiente di UVR8 e GGT1 in protoplasti di cellule di *N. tabacum* BY-2. A) Plasmidi utilizzati per saggio BiFC contenenti la porzione N-terminale e C-terminale della YFP. B) plasmide utilizzato per il controllo positivo contenente la YFP *full length*. LB, *left border*; RB, *right border*; attb1 e attb2, sito di ricombinazione omologa.

La co-espressione dei vettori nYFP-UVR8 e cYFP-GGT1 (Fig. 3.11 c) e la coespressione dei vettori nYFP-GGT1 e cYFP-UVR8 (Fig. 3.11 d) in protoplasti di cellule di tabacco ha evidenziato un chiaro segnale di fluorescenza derivante dalla ricostituzione della proteina YFP (Fig.3. 11c 3.11d), localizzato principalmente nel citoplasma, confermando *in vivo* l'interazione tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1. Nessun segnale di fluorescenza è stato rilevato in protoplasti co-trasformati con i vettori vuoti (controllo negativo, Fig. 3.11 e, f).

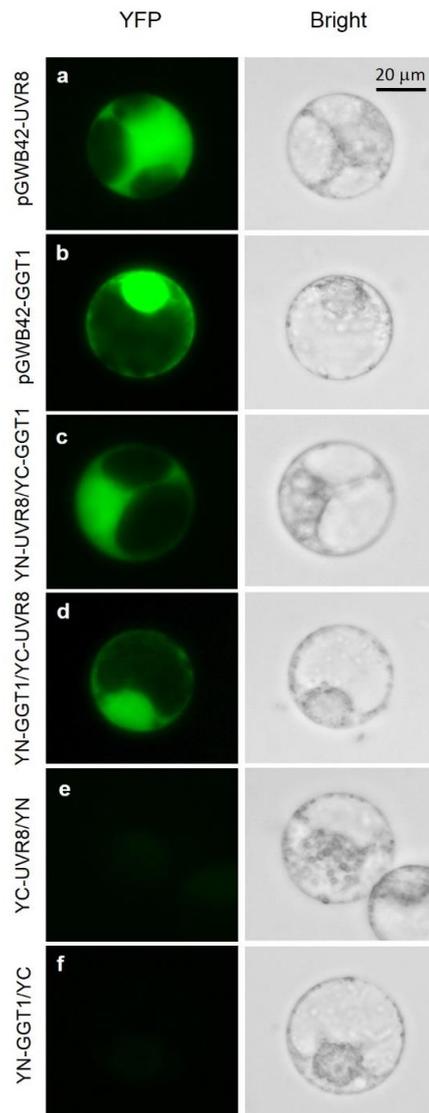


Figura 3.11 - Analisi di interazione *in vivo* tra le proteine UVR8-GGT1 in protoplasti di *N. tabacum*, mediante saggio BIFC. Trasformazione con **a)** il vettore pGWB42-UVR8, contenente l'intera sequenza codificante di UVR8 fusa alla sequenza di YFP; **b)** il vettore pGWB42-GGT1, contenente l'intera sequenza codificante di GGT1 fusa alla sequenza di YFP; **c)** co-espressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione nYFP-UVR8 e cYFP-GGT1; **d)** co-espressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione cYFP-GGT1 e nYFP-GGT1; **e)** coespressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione cYFP-UVR8 e il suo complementare vuoto; **e)** coespressione dei vettori contenenti le sequenze delle proteine di fusione nYFP-GGT1 e il suo complementare vuoto. Nel pannello di destra sono mostrate le corrispondenti immagini in campo chiaro. La barra di riferimento è di 20 µm.
 Legenda: **YN** (pnYGW: plasmide esprime la porzione N terminale della YFP)
YC (pcYGW: plasmide esprime la porzione C terminale della YFP).

3.3 Studio della funzione del gene *GGT1* nella risposta a stress salino in piante di *A. thaliana*

Allo scopo di approfondire il significato biologico dell'interazione tra le proteine UVR8 e *GGT1* è stato deciso di:

- interrogare banche di dati trascrittomici di piante di *A. thaliana* sottoposte a diversi tipi stress ambientali, disponibili pubblicamente;
- Condurre un'analisi funzionale della risposta a stress salino in piante del mutante silenziato per il gene *GGT1*.

3.3.1 Analisi in silico dell'espressione del gene *GGT1* in organi e tessuti di piante di *A. thaliana* e in risposta a condizioni di stress ambientali diversi

L'analisi trascrizionale in silico del gene *GGT1*, è stata effettuata consultando la risorsa on-line *Arabidopsis eFP Browser* (Winter *et al.*, 2007) (*electronic Fluorescent Pictograph*), <http://www.bar.utoronto.ca/>, che raggruppa i dati trascrittomici, attualmente disponibili, generati da analisi micro-array di *A. thaliana*. Come atteso, il gene *GGT1* è espresso principalmente in tessuti fotosintetizzanti, quali cotiledoni, foglie della rosetta e foglie adulte, che sono maggiormente soggetti a stress da eccesso di O₂ mentre non è espresso nelle radici (Fig. 3.12).

Inoltre, dall'analisi dei dati trascrittomici disponibili di piante di *A. thaliana* sottoposte a varie condizioni di stress abiotici e biotici, è risultato che l'espressione del gene *GGT1* è moderatamente attivata in risposta a stress salino, alte e basse temperature, e di stress da ferita (Fig. 3.13).

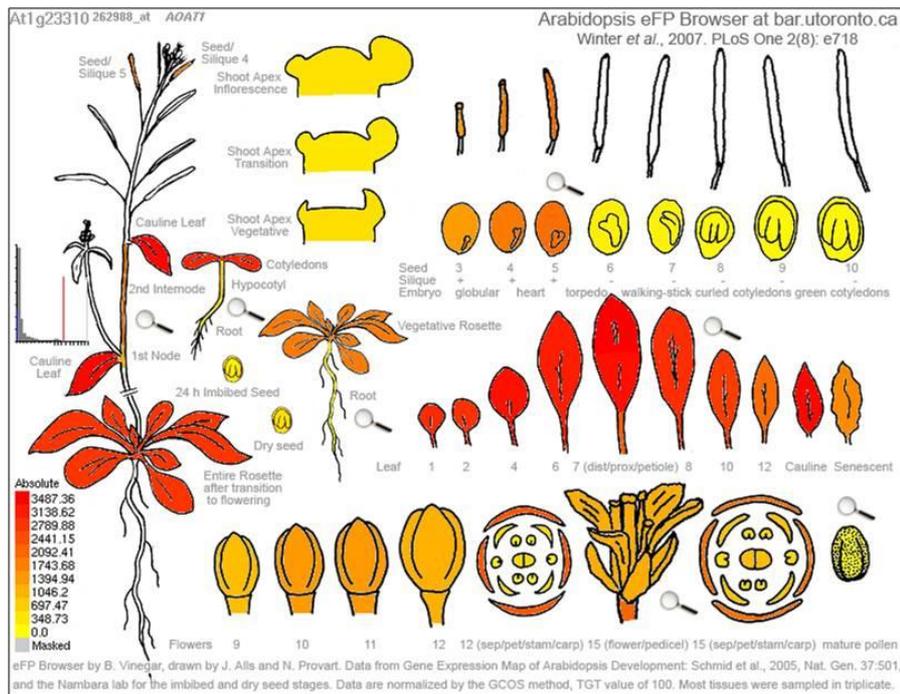


Figura 3.12 - Risultati dell'analisi dell'espressione del gene *GGT1* in vari tessuti e organi di piante di *A. thaliana*, ottenuti dall'interrogazione della banca di dati trascrittomici *Arabidopsis eFP Browser*, dal quale risulta che il gene *GGT1* è espresso principalmente in tessuti fotosintetizzanti.

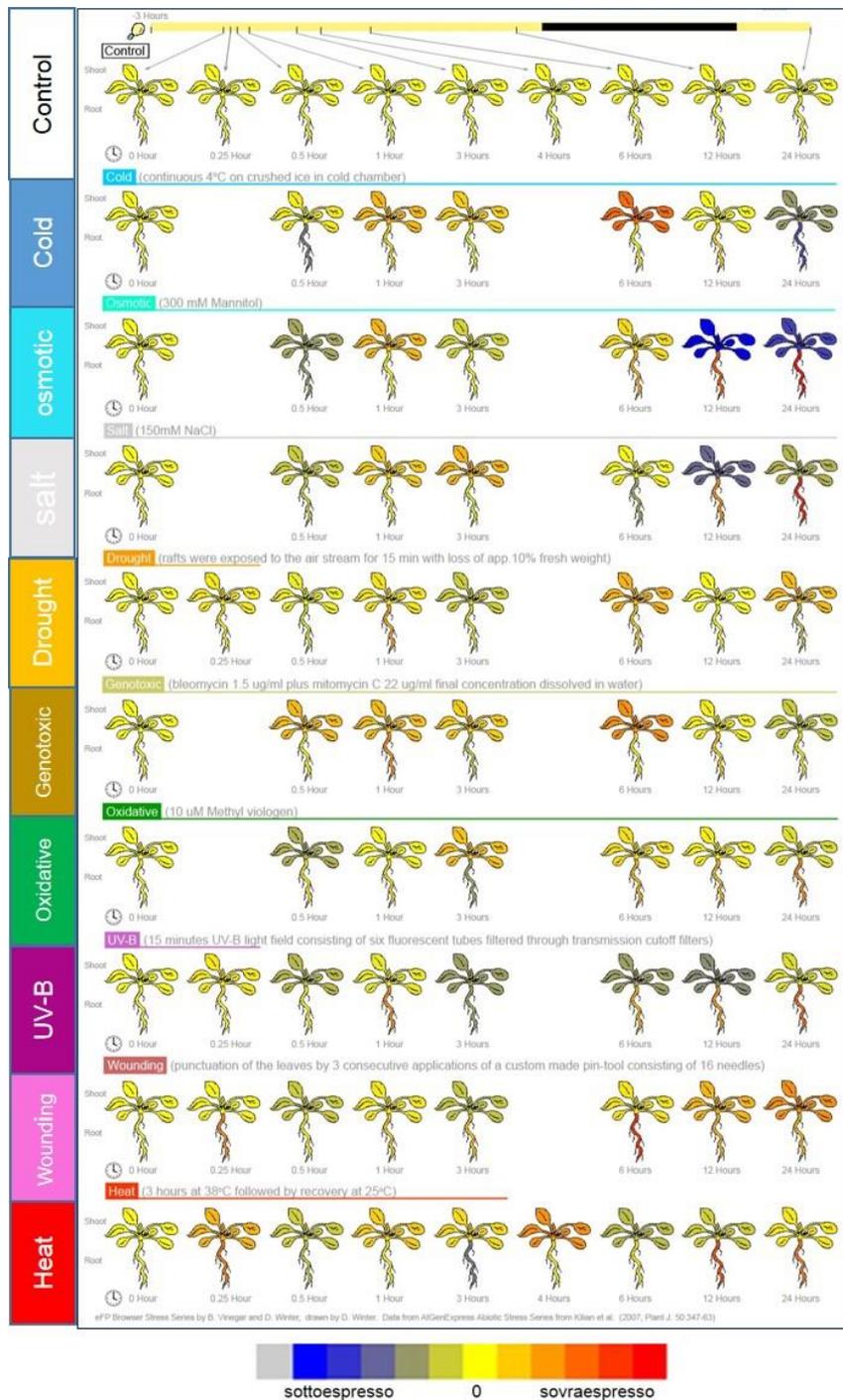


Figura 3.13 - Risultati dell'analisi dell'espressione del gene *GGT1* in piante di *A. thaliana*, sottoposte a diverse condizioni di stress ambientali di tipo abiotico, ottenuti dall'interrogazione della banca di dati trascrittomici *Arabidopsis efp Browser* (<http://www.bar.utoronto.ca/>)

3.3.2 Analisi funzionale della risposta a stress salino in piante della linea mutante *ggt1*

E' stata acquisita dalla collezione Salk di mutanti T-DNA-*tagged* la linea *SALK_64982C*, che presenta un'inserzione del T-DNA nel primo esone (Fig.3.14 A). Preliminarmente all'analisi funzionale, il mutante è stato caratterizzato per il livello di omozigosi dell'inserzione e per l'effettivo silenziamento del gene.

Caratterizzazione molecolare del mutante *ggt1*

La selezione delle linee omozigoti per l'inserzione T-DNA nel gene *GGT1* è stata effettuata mediante amplificazione PCR da DNA genomico (Fig.3.15 B), utilizzando la combinazione di oligonucleotidi (la sequenza è riportata nella Tabella 2.2 nella sezione *Materiali e Metodi*), indicata dal database *SIGNAL* (<http://signal.salk.edu/cgibin/tdnaexpress>).

Per verificare i livelli di espressione del gene *GGT1* le linee T-DNA omozigoti sono state ulteriormente analizzate mediante amplificazione RT-PCR da RNA totale estratto dalle diverse linee omozigoti per l'inserzione, che ha evidenziato che solo tre linee del mutante *Salk_64982C* analizzate sono effettivamente silenziate (Fig 3.14 C). Per le successive analisi è stata selezionata la linea 2.

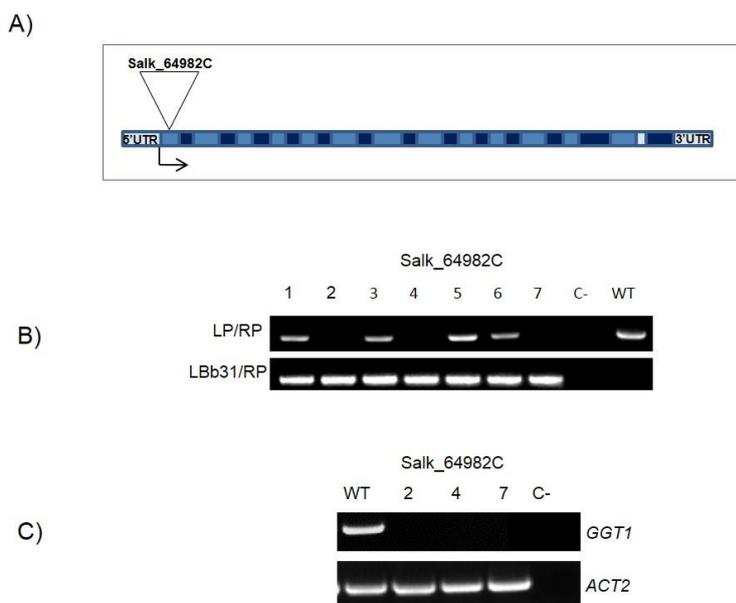
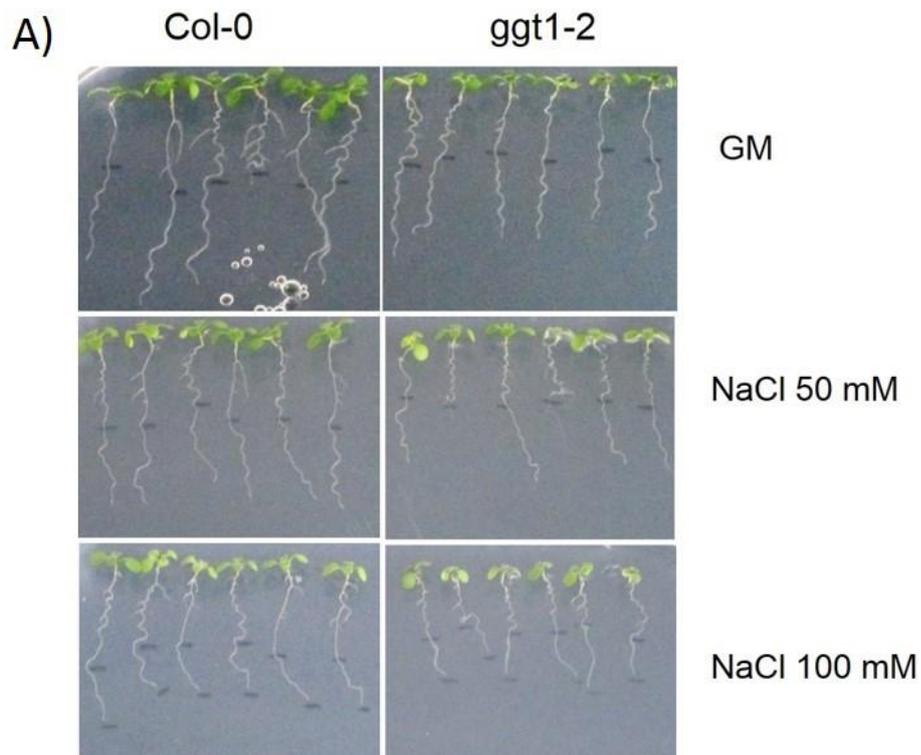


Figura 3.14 - Caratterizzazione della linea *Salk_64982C*, mutante inserzionale T-DNA nel gene *ggt1*.

A) Struttura del gene *GGT1*, con indicazione degli esoni (in azzurro), degli introni (in blu) e dell'inserzione del T-DNA nel gene *GGT1*. **B)** Amplificazione del gene *GGT1* mediante PCR da DNA genomico estratto dalla linea *Salk_64982C*, utilizzando gli oligonucleotidi, LP/RP specifici del gene o l'oligonucleotide LBb31 specifico per l'inserzione T-DNA. **C)** Livelli di espressione del gene *GGT1*, mediante amplificazione RT-PCR da RNA totale con oligonucleotidi specifici per *GGT1*, C⁻, controllo negativo.

Risposta a stress salino di piante knock-out per il gene GGT1

Per meglio caratterizzare il ruolo del gene *GGT1* nella tolleranza /sensibilità allo stress salino, piante della linea mutante *ggt1-2* e della linea *wild-type* Col-0 sono state allevate per 5 giorni su MS e poi trasferite su MS contenente 50 mM o 100 mM NaCl per 6 giorni. L'effetto dello stress salino è stato valutato mediante determinazione della lunghezza della radice primaria, eseguita tramite il *software* d'immagini *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Come osservabile nelle Fig. 3.15, la lunghezza delle radici del mutante è costitutivamente ridotta rispetto a quella di radici di piante wild type. Condizioni di stress salino di 50 mM hanno un effetto negativo sull'accrescimento della radice primaria sia nelle piantine wild type che nelle piantine del mutante *ggt1-2*, ma la riduzione è più elevata nel mutante *ggt1-2* (circa il 16%) rispetto alla riduzione osservata in piante della linea wild type. A concentrazioni più elevate di NaCl (100 mM) la differenza nell'allungamento della radice primaria è, invece, simile.



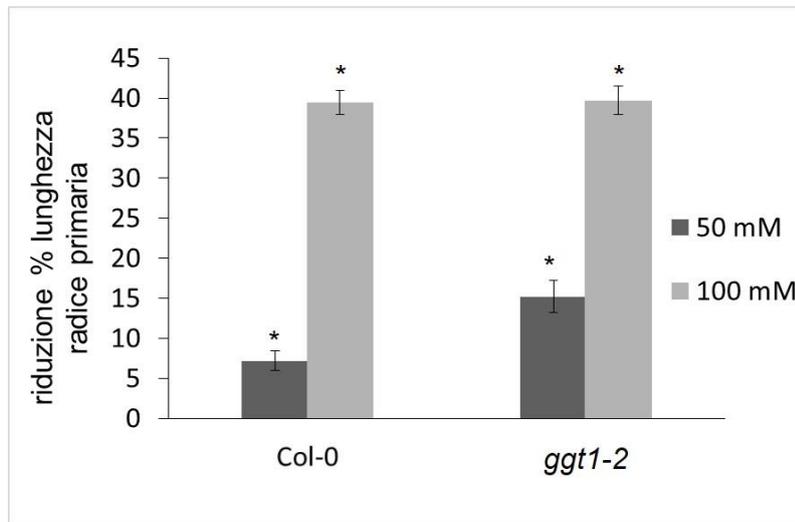


Figura 3.15 - Analisi fenotipica di radici di piante di *Arabidopsis thaliana* di 5 giorni trasferite per 6 giorni su terreno MS contenente diverse concentrazioni di NaCl (50 e 100 mM) in camera di crescita (16h luce-8h buio). (A) è riportata la riduzione percentuale della lunghezza della radice primaria di piante di *Arabidopsis Col-0* e silenziate per il gene *GGT1* cresciute su terreno MS ed in presenza di diverse concentrazioni di NaCl. Sono riportati i valori medi \pm SD di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0.05$) significativamente differenti rispetto a piantine *Col-0* non trattate (B).

Inoltre, è stata valutata anche l'effetto di diverse concentrazioni di NaCl sulla germinazione dei semi del mutante *ggt1-2* e del controllo (*wild type*). I risultati indicano chiaramente (Fig. 3.16) un effetto inibitorio maggiore in entrambi i trattamenti sulla germinazione dei semi del mutante *ggt1-2*, rispetto alle piante *wild type*.

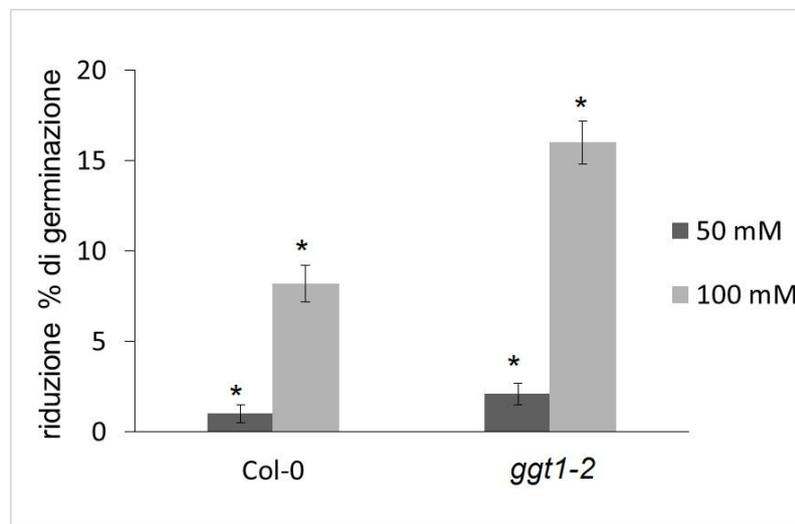
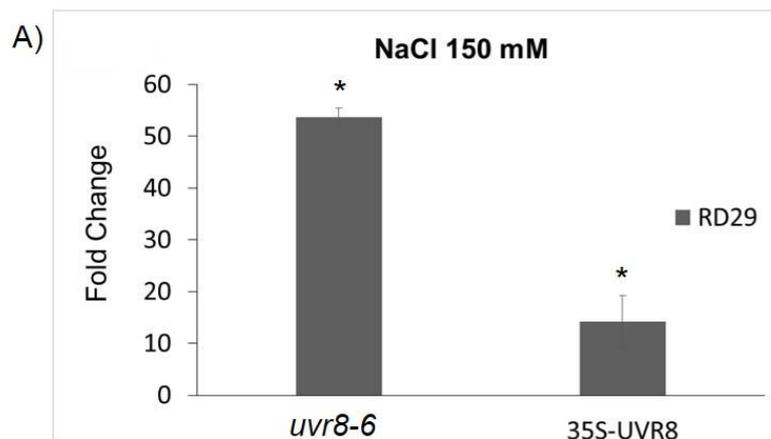


Figura 3.16 - Analisi di germinazione di mutanti *knock-out* per il gene *ggt1*. La germinazione è stata valutata in termine di espansione del cotiledone verde. I dati sono stati registrati dopo 7 gg di trattamento. Sono riportati i dati relativi alle medie \pm SD relative a tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0.05$) significativamente differenti rispetto a piantine *Col-0* non trattate.

3.3.3 Analisi dell'espressione del gene *GGT1* in piante *knock-out* o sovraesprimenti il gene *UVR8* in risposta a stress salino

Allo scopo di contribuire a una maggiore comprensione dell'interazione tra la proteina UVR8 e la proteina GGT1, da noi confermata *in vivo* mediante due diversi saggi di interazione, è stato analizzato il suo livello di espressione in risposta a stress salino nel mutante *knock-out* *uvr8-6*, in assenza della proteina UVR8, e in piante che sovraesprimono alti livelli della proteina UVR8 (piante 35S-UVR8). Piante *wild-type*, del mutante *knock-out* e della linea 35S-UVR8 sono state allevate *in vitro* per 14 giorni su MS, ed esposte a stress salino con NaCl 150 mM per 3 ore, dato che risultati dell'analisi trascrizionale ottenuti interrogando l'*Arabidopsis* *efp Browser*, hanno indicato il massimo livello di espressione del gene dopo 3 ore. È stata effettuata un'analisi preliminare dei livelli di trascrizione del gene RD29B (*Responsive to desiccation*), noto gene marcatore per la risposta a stress salino in piante di *Arabidopsis* (Zhu *et al.*, 2002). Da questa analisi è risultato che, almeno nelle condizioni di stress salino da noi utilizzate, la trascrizione del gene RD29 è molto attivata nelle piante della linea mutante *uvr8-6* (circa 50 volte, rispetto ai livelli di trascritto delle piante non trattate). (Fig. 3.17 A). Al contrario, in piante 35S-UVR8 che hanno alti livelli costitutivi della proteina UVR8, l'aumento dei livelli del trascritto del gene RD29B in risposta a stress salino è più contenuto (circa 14 volte, rispetto a piante controllo non trattate). Analogamente, in piante silenziante per il gene *UVR8* (Fig. 3.17 B) i livelli di trascritto del gene *GGT1* risultano aumentati ($p < 0.05$) di circa 1,5 volte rispetto alle piante controllo non trattate, mentre in piante con alti livelli della proteina UVR8 (piante sovraesprimenti), è stata evidenziata una lieve diminuzione del livello di trascrizione del gene *GGT1*, anche se non significativa (Fig. 3.17 B). Questi dati, forniscono una prima indicazione sull'effetto di livelli diversi della proteina UVR8 sul livello trascrizionale di queste due geni e, più in generale, nella risposta globale a stress salino in piante di *Arabidopsis*. Tuttavia, informazioni aggiuntive sul ruolo funzionale dell'interazione della proteina GGT1 con UVR8 potranno essere fornite dall'analisi sui livelli della proteina GGT1, mediante analisi *western blotting*, nella linea mutante *knock-out* e nella linea sovraesprimente.



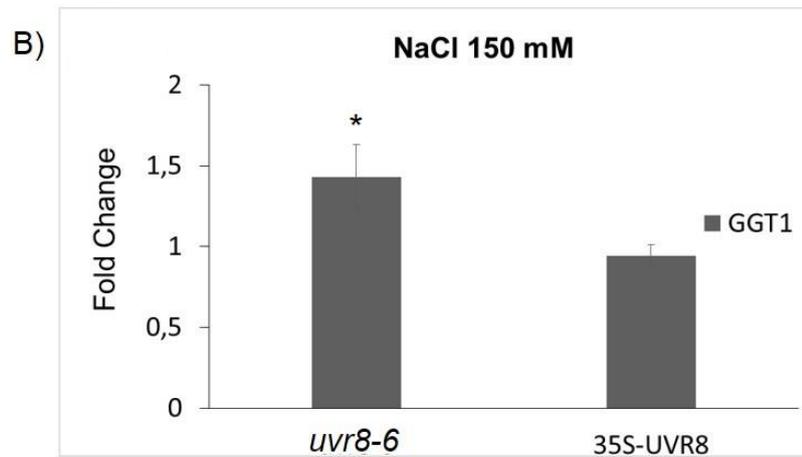


Figura 3.17 - Analisi del livello espressione, mediante qRT-PCR, del gene marcatore di stress salino RD29B (A) e del gene GGT1 (B) in piante silenziata (*uvr8-6*) e sovraesprimenti la proteina UVR8 (35S-UVR8) trattate con 150 mM NaCl per 3 ore, rispetto alle piante *wild-type* Col 0. Sono stati utilizzati oligonucleotidi per la retrotrascrizione del gene 18S come controllo interno per la normalizzazione). E' riportato l'aumento rispetto ai valori ottenuti nelle piante controllo Col-0 non trattate. Sono riportati i valori medi di \pm SD di tre repliche tecniche e due repliche biologiche (* $p < 0.05$).

DISCUSSIONE

4. Discussione

In ambienti naturali come in pieno campo, le piante sono soggette continuamente a stimoli ambientali multipli, spesso variabili e imprevedibili, che impongono una fine sinergia tra differenti vie metaboliche per coordinare risposte adeguate per la crescita e sviluppo della pianta.

Condizioni di carenza idrica, ad esempio, inducono nelle piante strategie adattative diverse che includono meccanismi fisiologici, biochimici e metabolici di risposta a stress osmotici, che si associano frequentemente a irradiazione elevata, e di UV (Gitz and Liu-Gitz, 2003). Il controllo fine di questi meccanismi è operato grazie a vari recettori, che innescano vie di trasduzione intracellulare degli stimoli spesso sovrapponibili. Pertanto, l'individuazione dei recettori coinvolti, degli interattori principali e dei punti nodali delle vie di segnalazione e di trasduzione sono tappe fondamentali per chiarire la complessa risposta globale delle piante a stimoli ambientali.

La proteina UVR8, recentemente identificata come il recettore dei raggi UV-B, è un regolatore dei numerosi effetti pleiotropici indotti da radiazioni di tipo UV-B nelle piante; questa proteina è stata ed è correntemente studiata per il suo ruolo nelle risposte programmate fotomorfogeniche associate agli UV-B (Brown *et al.*, 2005). Tuttavia, studi più recenti indicano il suo coinvolgimento in altri tipi di risposte oltre a quella UV-B: la sincronizzazione del ritmo circadiano, attraverso l'interazione con COP1 in una via che diverge da quella fotomorfogenica poiché non coinvolge HY5/HYH (Feher *et al.*, 2011); l'adattamento agli eccessi di radiazione, tramite l'induzione dell'espressione di fotoliasi, PHR1 e UVR3 (Britt., 2004); la tolleranza a stress osmotici, attraverso la regolazione dell'accumulo di flavonoidi (Fasano *et al.*, 2014).

La proteina UVR8, nella forma dimerica, ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica: in risposta a basse dosi di UV-B, monomerizza e trasloca nel nucleo, dove agisce come regolatore trascrizionale di geni della fotomorfogenesi, in combinazione con altre proteine regolatorie (Robson *et al.*, 2014). Tuttavia, la maggior parte della proteina UVR8 rimane nel citoplasma (circa il 90%) (Kaiserli and Jenkins, 2007) facendo ipotizzare un suo ruolo in altri meccanismi cellulari di risposta a stimoli ambientali. Tra l'altro, è stato dimostrato dal gruppo di ricerca dove è stato svolto questo progetto di tesi, che la trascrizione del gene *UVR8* è attivata da stress osmotico e salino (Fasano *et al.*, 2014), confermata anche da dati trascrittomici presente *on-line* (<http://www.bar.utoronto.ca/>).

Queste evidenze sperimentali hanno spinto a intraprendere studi volti all'identificazione di altri putativi interattori della proteina UVR8, oltre quelli già identificati mediante lo studio di mutanti, come nel caso di COP1 (Favory *et al.*, 2009), proprio per stabilire un potenziale ruolo funzionale alla presente predominante della proteina UVR8 nel citoplasma.

In questo progetto di ricerca, proteine che interagiscono putativamente con la proteina UVR8 sono state identificate con due approcci complementari: un approccio proteomico di *fishing for partners* (Fritz and Green, 1992), in cui una versione ricombinante di UVR8, nella forma nativa, è stata ancorata ad una matrice e incubata con proteine totali estratte da giovani piantine di *Arabidopsis*, e mediante immunoprecipitazione mediante un anticorpo specifico anti-UVR8 per l'individuazione di putativi interattori proteici. Sono state così identificate diverse proteine, due delle quali sono state ulteriormente caratterizzate per il loro noto ruolo nei meccanismi di risposta a stress ossidativo: l'Ascorbato perossidasi 1, uno degli enzimi di regolazione dell'omeostasi delle specie reattive dell'ossigeno, che si formano in

seguito a stress ossidativo (Maruta *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2013), e una Glissilasi amminotranferasi 1, coinvolta nel meccanismo di detossificazione del 2-fosfoglicolato, molecola tossica generata nella fotorespirazione (Liepman and Olsen, 2003).

4. La risposta allo stress ossidativo UV-B e UVR8 mediata

La maggior parte degli studi sulla proteina UVR8 ha riguardato il suo ruolo di regolatore della risposta fotomorfogenica UV-B mediata (Robson *et al.*, 2014 e referenze incluse), che permette e regola la sopravvivenza e la crescita della pianta in condizioni di luce naturale (Morales *et al.*, 2012). Tuttavia, i processi UVR8-mediati includono anche i sistemi di difesa antiossidanti e l'accumulo di sostanze fenoliche (Jansen *et al.*, 2009; Hideg *et al.*, 2013). Tuttavia, il ruolo della proteina UVR8 in questi processi rimane ancora poco conosciuto, soprattutto a livello molecolare.

Il coinvolgimento del fotorecettore della luce UV-B nella risposta allo stress ossidativo è noto soprattutto attraverso studi a livello trascrizionale. Infatti, dai dati ottenuti da analisi *microarray* di piante *wild type* o silenziate nel gene *UVR8* ed esposte a dosi di UV-B non dannose, è emerso che UVR8 regola l'espressione di numerosi geni che codificano enzimi del metabolismo anti-ossidativo, come la superossido dismutasi (SOD), l'ascorbato perossidasi (APX), la glutazione S-transferasi e la glutazione perossidasi, come pure geni della via biosintetica degli isoprenoidi, dei composti fenolici e della piridossina, importanti per la rimozione dei ROS (O_3 , H_2O_2 , O_2 , etc.) (Hideg *et al.*, 2013). Inoltre, il dato interessante che emerge da questi studi, è che l'espressione della maggior parte dei geni sopra citati non è regolata direttamente dai ROS, ma piuttosto in maniera specifica da UVR8 e dalle proteine regolatorie a valle di UVR8, come COP1 e HY5 (Brown *et al.*, 2008; Favory *et al.*, 2009). Pertanto è stato ipotizzato che dosi non dannose di UV-B possano determinare un "eu-stress", ossia l'attivazione di geni chiave coinvolti nella risposta generale allo stress ossidativo e nella biosintesi di composti con attività antiossidante, che predispongono la pianta verso uno stato di "pre-allerta" utile per la sopravvivenza delle piante in condizioni ambientali ancora più proibitive di crescita e sviluppo (ad es. in presenza di dosi dannose di UV-B o altri tipi di stress ambientale).

Recenti studi (Hectors *et al.*, 2007) riportano che geni codificanti diverse glutaredossine, sono sotto-espressi in piante *wild type* esposte per 12 giorni a dosi basse croniche di UV-B (12 giorni di $0.564 \text{ kJm}^{-2}\text{d}^{-1}$). Al contrario, dosi maggiori di UV-B, ma per periodi brevi, inducono la trascrizione degli stessi geni (Ulm *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005). Inoltre, i livelli di trascritto del gene *PDX1.3*, che codifica un enzima coinvolto nella biosintesi di vitamina B6, con forte attività antiossidante (Titiz *et al.*, 2006), risultano aumentati in risposta all'esposizione a basse (Broschè *et al.*, 2003) o alte (Ulm *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005) dosi di UV-B per brevi periodi, mentre dosi basse croniche di UV-B (12 giorni) non hanno nessun effetto. Collettivamente, questi risultati indicano che diverse intensità e/o durata di luce UV-B regolano finemente l'espressione dei geni coinvolti nel sistema cellulare anti-ossidativo ed è ipotizzabile che la proteina UVR8 possa avere un ruolo in questa regolazione.

4.1 Interazione *in vivo* della proteina UVR8 con la proteina APX

La proteina APX1 citoplasmatica è una delle proteine identificate mediante *fishing for partners* come putativo interattore della proteina UVR8. Questa interazione è stata confermata, sia mediante Co-IP sia mediante saggio BiFC. In particolare, l'analisi BiFC ha permesso anche di stabilire che il complesso UVR8-APX ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica.

Il principale sistema detossificante di alte concentrazioni intracellulare di H₂O₂ nella cellula vegetale è il ciclo ascorbato-glutatione, nel quale l'enzima APX ha un ruolo predominante nel catalizzare la conversione di H₂O₂ in H₂O, usando ascorbato come specifico donatore di elettroni. Diverse isoforme della APX sono presenti in compartimenti cellulari distinti, quali cloroplasto, mitocondrio, perossisomi e citosol. L'espressione dei diversi geni APX è regolata da stress di tipo biotico e abiotico, ma anche durante le diverse fasi di sviluppo della pianta, indicando un ruolo predominante di questa classe di geni nei meccanismi di detossificazione dell'H₂O₂. Infatti, mutanti per i geni APX mostrano evidenti alterazioni nello sviluppo, nella fisiologia dello stress e nel metabolismo antiossidante. L'importanza degli enzimi APX non è limitata solo ai cloroplasti, ma hanno un ruolo importante come enzimi detossificanti anche nel citosol, nei mitocondri e nei perossisomi (Asada, 1992, 1999; Mittler *et al.*, 2004; Noctor and Foyer, 1998; Shigeoka *et al.*, 2002). Gli enzimi detossificanti di ROS sono stati approfonditamente studiati nelle piante e i risultati ottenuti hanno indicato che in risposta a stress ambientali, l'attività delle APX aumenta, in linea generale, insieme a quella di altri enzimi detossificanti, quali superossido-dismutasi (SOD), catalasi (CAT) o GSH reduttasi (Shigeoka *et al.*, 2002). Infatti, l'espressione dei geni APX aumenta in risposta a deficit idrico ed eccesso di NaCl, alta irradianza, basse ed alte temperature, attacchi di fitopatogeni, a trattamenti di H₂O₂ e ABA (Zhang *et al.*, 1997; Yoshimura *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2003; Fryer *et al.*, 2003; Menezes-Benavente *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2010; Bonifacio *et al.*, 2011). Inoltre, l'espressione di geni APX è stadio- e sviluppo-dipendente (Agrawal *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2006). È noto che l'enzima APX1 ha un ruolo chiave nell'omeostasi dei ROS ed è coinvolto nei meccanismi di difesa della pianta a stress ossidativo generato da diversi tipi di stress biotici e abiotici (Maruta *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2013).

L'interazione *in vivo* tra la proteina UVR8 e la proteina APX1 suggerisce che UVR8, interagendo con la proteina APX1, possa esercitare un controllo sull'omeostasi cellulare dei ROS. L'analisi delle radici di piantine trattate con NaCl e mannitolo per breve termine (1 ora), hanno evidenziato che in risposta a stress salino le piante sovra-esprimenti UVR8 hanno un minore accumulo di ROS rispetto alle piante controllo, mentre, nei mutanti *uvr8-6* i livelli dei ROS sono maggiori. Questi risultati fisiologici suggeriscono che livelli diversi della proteina UVR8 regolano in maniera differenziale l'omeostasi cellulare dei ROS, soprattutto a breve termine, evidenziando un *cross-talk* tra via di segnalazione e di risposta tra UV-B e stress osmotico. C'è da dire, inoltre, che risultati precedenti hanno dimostrato che piante che sovra-esprimono UVR8, allevate in presenza di basse dosi di UV, hanno nelle radici un contenuto di flavonoidi, composti con elevata attività antiossidante (Hernandez *et al.*, 2009) di circa cinquanta volte maggiore rispetto alle piante controllo (Fasano *et al.*, 2014). Pertanto, è ipotizzabile che la proteina UVR8 possa innescare un meccanismo globale di controllo intracellulare del livello di ROS, attraverso una risposta simultanea di aumento del livello del contenuto di flavonoidi ad azione antiossidante accoppiato ad una modificazione dell'attività enzimatica della APX1. Ulteriori esperimenti, come la valutazione dell'attività dell'enzima APX1 in risposta a stress osmotico in piante silenziate e sovraesprimenti UVR8 o della stabilità della proteina APX, sono necessari per chiarire il significato biologico dell'interazione UVR8-APX1 e il ruolo di UVR8 nella risposta a stress ossidativo e nella regolazione dell'omeostasi dei ROS.

4.2 La proteina UVR8 interagisce *in vivo* anche con la proteina GGT1

In questo esperimento, le proteine totali da immunoprecipitare con l'anticorpo anti-UVR8 sono state estratte da piante che sovra-esprimono UVR8 e non da piante *wild-type*. Il razionale alla base di questo esperimento si basa su precedenti risultati da noi ottenuti sull'aumento significativo dei livelli dell'espressione del gene *UVR8* indotta da stress osmotico e stress salino in piantine *wild type* di *A. thaliana* (Fasano *et al.* 2014) e sull'analisi funzionale di "*gain and loss of function*" in piante senso e antisenso di *A. thaliana* per il gene *UVR8*. In particolare, le piante che sovraesprimono UVR8 hanno un ridotto sviluppo vegetativo (minore diametro della rosetta, foglie più piccole, altezza inferiore), mentre le piante silenziate, sono caratterizzate da una maggiore crescita e, producono un numero maggiore di silique e di semi (Fasano *et al.*, 2009 e 2010), fenotipo riminiscente della risposta SIMR (***Stress Induced Morphogenic Response***). La risposta SIMR è comunemente indotta nelle piante in condizioni di stress abiotici diversi ed è associata ad un fenotipo che ha un valore adattativo per contrastare gli effetti negativi di condizioni di stress altrimenti proibitivi per la crescita e sviluppo della pianta. Questi adattamenti includono riduzione della divisione/espansione cellulare, riduzione dello sviluppo vegetativo, aumento della crescita laterale, sintesi di metaboliti secondari che contrastano i danni dello stress ossidativo associato, e altre modificazione morfologiche, fisiologiche e molecolari (Potters *et al.*, 2007 e 2009; Fasano *et al.*, 2014). I ROS in combinazione con l'auxina sembrano contribuire a questo fine riarrangiamento del programma di sviluppo della pianta, al fine di ottimizzare la *performace* delle piante in condizioni di stress acuto e/o cronico (Blomster *et al.*, 2011).

Sulla base di queste evidenze sperimentali, è stato deciso di comprendere meglio il ruolo della proteina UVR8 nella risposta a stress osmotico, analizzando le possibili interazioni tra UVR8 e altre proteine in piante da noi generate per un alto contenuto costitutivo della proteina UVR8, quali le piante 35S-UVR8.

Mediante un esperimento di immunoprecipitazione con proteine estratte da piante che sovra-esprimono UVR8 è stata identificata la proteina GGT1 come putativa proteina che interagisce con la proteina UVR8. Esperimenti di Co-IP e BIFC hanno successivamente confermato questa interazione *in vivo*.

L'enzima GGT1 ha un ruolo centrale nel *pathway* fotorespiratorio: GGT1 è una amminotransferasi di classe I che agisce nei perossisomi. Dati riportati in letteratura dimostrano che mutanti nel gene *GGT1* hanno un maggiore contenuto in H₂O₂ alla luce (Versulues *et al.*, 2007), confermando il ruolo consolidato di GGT1 nella fotorespirazione dei perossisomi (Liepman and Olsen 2003). E' noto che in condizioni di stress idrico, si ha una limitazione della fotosintesi dovuta ad una minore diffusione della CO₂ nel mesofillo fogliare e, quindi, una riduzione del livello di CO₂ nei cloroplasti dove è presente l'enzima Rubisco. All'aumentare delle temperature e in situazioni di carenza idrica, si ha una maggiore solubilità per l'O₂ favorendo la reazione di fotorespirazione rispetto a quella di fotosintesi (Keys, 1999; Von Caemmerer, 2000). La maggior quantità di H₂O₂, prodotte durante la fotorespirazione, portano di conseguenza ad una produzione di ROS, tossici per la cellula, generando uno stress ossidativo, caratterizzato da perossidazione dei lipidi di membrana, ossidazione delle proteine, inibizione enzimatica, danni a carico del DNA ed RNA (Vinocur and Altman, 2005).

La fotorespirazione è un *pathway* coordinato tra almeno tre organelli nelle cellule vegetali: cloroplasti, perossisomi e mitocondri; il riciclo del fosfoglicolato prodotto dall'azione ossigenasica della Rubisco, in fosfoglicerato, richiede l'intervento di

diversi enzimi tra cui una glutammato gliossilasi amminotransferasi perossisomiale, necessaria per permettere l'attività continua del ciclo C₂ (Husic *et al.*,1987) Come già riportato in precedenza in piante esposte a stress ambientali, la generazione di specie reattive dell'ossigeno è una delle risposte più immediate. Come meccanismo protettivo e di sopravvivenza, le piante cercano di ridurre l'accumulo di ROS, attraverso meccanismi di detossificazione. Studi recenti stanno dimostrando che la fotorespirazione è una risposta difensiva importante nelle piante per prevenire l'accumulo di ROS. Infatti, le reazioni fotorespiratorie possono dissipare l'eccesso di equivalenti riducenti e di energia direttamente (usando ATP, NAD(P)H e ferrodossina ridotta) o indirettamente. L'H₂O₂ è un prodotto collaterale della via fotorespiratoria, che può agire come molecola mediatrice di una via di segnalazione, ma che può causare danni cellulari irreversibili. Pertanto, si può ipotizzare un ruolo della fotorespirazione nel riaggiustamento dell'omeostasi redox e nel mitigare i danni di stress ossidativo nelle piante in condizioni di carenza idrica, eccesso di sale, bassa disponibilità di CO₂ o basse temperature (Voss *et al.*,2013)

Questi dati supportano la possibilità che l'interazione tra UVR8 e GGT1 da noi evidenziata *in vivo* possa contribuire almeno in parte a regolare il processo di detossificazione della H₂O₂ nella cellula vegetale durante eventi di maggiore stress ambientale, attraverso un controllo di uno step importante della fotorespirazione.

Allo scopo di meglio comprendere il ruolo funzionale dell'interazione UVR8-GGT1, è stato deciso di studiare se livelli intracellulari diversi della proteina UVR8, osservati da noi in risposta a stress osmotici, possano influenzare i livelli di trascrizione del gene GGT1. Per questa analisi, sono state utilizzate piante sovra-esprimenti la proteina UVR8 e piante del mutante *knock-out* inserzionale *uvr8-6*. Analisi trascrizionali, mediante qRT-PCR del gene *GGT1* in piante silenziatae hanno evidenziato che la trascrizione di *GGT1* è significativamente aumentata in assenza della proteina UVR8, mentre alte quantità della proteina UVR8 hanno un effetto opposto.

Inoltre, esperimenti condotti in piantine del mutante *ggt1* in risposta a stress salino, hanno evidenziato differenze significative tra piante silenziatae per *GGT1* e piante controllo: le radici di piante silenziatae per *GGT1* hanno una percentuale di allungamento ridotto rispetto alle piante *wild type*, risultando, quindi, più sensibili allo stress salino. Questi risultati sono analoghi a quelli riportati da Versulus *et al* (2007), che hanno dimostrato che in risposta stress osmotico e salino le piante del mutante *ggt1* hanno un contenuto ridotto di ABA, particolarmente accentuato in risposta stress da PEG; questo è coerente con la minore espressione del gene *NCED*, coinvolto nella biosintesi dell'ABA suggerendo che il gene *ggt1-1* possa influenzare la risposta della regolazione nella sintesi dell'ABA. Gli effetti di *ggt1-1* sul ridotto accumulo di ABA insieme alle osservazioni che alterazioni nel metabolismo dei ROS influenza il metabolismo dell'ABA (Pastori *et al.*,2003; Rossel *et al.*,2006), che ABA può regolare l'espressione dei geni relativi al metabolismo dei ROS (Fryer *et al.*.,2003; Milla *et al*; 2003); e che lo stato dei ROS influenza l'accumulo di ABA indotto da stress (Hu *et al.*, 2005; Mittler and Blumwald, 2015) indicano l'esistenza di un chiaro *cross-talk* tra questi due vie di segnalazione in risposta a condizioni di stress ambientali nelle piante.

Il contributo del processo fotorespiratorio nei meccanismi difensivi di risposta a stress ambientali, in particolare nei confronti di *burst* ossidativi ad essi associati, è stato anche dimostrato in piante mutanti per il gene serina idrossimetil transferasi I (SHMT1), un altro enzima coinvolto nelle reazioni del ciclo C₂ del fosfoglicolato. (Moreno *et al*, 2005). Le piante *shmt1-1* mostrano una formazione spontanea di lesioni clorotiche e necrotiche e anche riduzione delle dimensioni e sviluppo rispetto alle piante *wild type* e hanno una maggiore suscettibilità a stress abiotici e una più rapida risposta di morte cellulare indotta da patogeni, soprattutto in condizioni di luce

elevata. Questi dati indicano che il gene *stmt*, ma presumibilmente anche altri geni che codificano enzimi che agiscono nel ciclo fotorespiratorio, come GGT1, possa svolgere un ruolo critico nel controllo del danno cellulare provocato da stress abiotici come stress salino, alto irraggiamento luminoso, supportando l'idea che la fotorespirazione fa parte di un meccanismo dissipatore delle piante per minimizzare la produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) nel cloroplasto e ridurre il danno ossidativo (Noctor *et al.*, 2002; Wingler *et al.*, 2000).

Tuttavia questi dati, pur aprendo uno scenario complesso di interazione tra vie di segnalazione diverse di risposta a stress ambientali, che hanno come base comune un *burst* ossidativo, non chiariscono il significato biologico dell'interazione tra GGT1 e UVR8 chiaramente dimostrata *in vivo*.

Analisi più approfondite sono necessarie per stabilire se l'interazione possa in qualche modo influenzare la stabilità della proteina GGT1, attraverso analisi western blotting, associati a studi con inibitori della via degradativa proteasoma-mediata, anche sulla base di precedenti studi che hanno dimostrato che UVR8 si complessa con COP1 (una E3-ubiquitina ligasi) e invia alla degradazione via proteasoma regolatori negativi della via UV-B dipendente. Sarebbe interessante stabilire se la proteina UVR8 possa reclutare GGT1 e attraverso questo legame stabilizzarla o inviarla alla degradazione proteolitica, ma anche valutare la sua attività enzimatica, in risposta a condizioni di stress ossidativo diretto e/o generato da stress osmotico.

CONCLUSIONI

5. Conclusioni

Il presente progetto ha avuto come obiettivo l'identificazione di putative proteine che interagiscono con la proteina UVR8, noto come fotorecettore degli UV-B, partendo dall'osservazione che la maggior parte di questa proteina è localizzata come dimero nel citoplasma, e che solo una piccola frazione (circa il 10%) trasloca nel nucleo in presenza di UV-B.

I principali risultati ottenuti sono di seguito riassunti:

1. Utilizzando approcci complementari di proteomica e di immunoprecipitazione, sono state identificate diverse potenziali proteine che interagiscono con la proteina UVR8; in particolare, la nostra attenzione è stata focalizzata sulla proteina APX1 e la proteina GGT1, per il loro noto ruolo in meccanismi di detossificazione dell' H_2O_2 , specie reattiva dell'ossigeno che si accumula nella cellula vegetale in seguito a diverse condizioni ambientali associate a stress ossidativo:
2. L'interazione tra APX1 e UVR8 e di UVR8 con GGT1 sono state confermate *in vivo*, mediante due differenti saggi di BiFC e co-immunoprecipitazione;
3. Mediante un'analisi funzionale, è stato evidenziato che livelli diversi della proteina UVR8 sono associati ad un diverso livello di ROS, in risposta a condizioni di stress osmotico, suggerendo un possibile funzione associata all'interazione tra le proteine UVR8 e la proteina APX1.
4. È stata condotta un'analisi d'espressione del gene marcatore dello stress osmotico *RD29* e del gene *GGT1* in piante *knock-out* o sovraespressanti il gene *UVR8* in risposta a stress salino, che hanno fornito una prima indicazione sull'effetto di livelli diversi della proteina UVR8 sul livello trascrizionale di questi due geni e più in generale, nella risposta globale a stress salino in piante di *Arabidopsis*.

Analisi più approfondite sono necessarie per stabilire se l'interazione di UVR8 possa in qualche modo influenzare la stabilità della proteina APX o della proteina GGT1, attraverso lo studio della loro attività enzimatica, analisi *western blotting*, associati a studi con inibitori della via degradativa proteasoma-mediata, anche sulla base di precedenti studi che hanno dimostrato che UVR8 si complessa con COP1 (una E3-ubiquitina ligasi) e invia alla degradazione via proteasoma regolatori negativi della via UV-B dipendente (Huang X *et al*, 2013). Sarebbe interessante stabilire se la proteina UVR8 possa reclutare APX o GGT1 e attraverso questo legame stabilizzarle o inviarle alla degradazione proteolitica, in risposta a condizioni di stress ossidativo diretto e/o generato da stress osmotico.

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

Adem GD, Roy SJ, Zhou M, Bowman JP and Shabala S, **(2014)**. Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley.
BMC Plant Biology 14,113.

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M, **(2012)**. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance.
Plant Science 196, 67-76.

Agrawal GK, Jwa NS, Iwahashi H, and Rakwal R, **(2003)**. Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling.
Gene 322, 93-103.

Ahlfors R, Lang S, Overmyer K, Jaspers P, Brosche M, Tauriainen A, Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M, et al **(2004)**. Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses.
Plant Cell 16, 1925–1937.

Asada K. **(1992)**. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants.
Physiologia Plantarum 85, 235–241.

Asada K. **(1999)**. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons.
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50,601–640.

Bartels D, and Sunkar R, **(2005)**. Drought and salt tolerance in plants.
Critical Reviews in Plant Sciences 24, 23–58.

Betsche T **(1983)**. Aminotransfer from alanine and glutamate to glycine and serine during photorespiration in oat leaves.
Plant Physiology 71, 961–965.

Blomster T, Saloja J, Sipari N, Brosche M, Ahlfors R, Keina M, Overmyer K, Kangasja J, **(2011)**. Apoplastic Reactive Oxygen Species Transiently Decrease Auxin Signaling and Cause Stress-Induced Morphogenic Response in Arabidopsis.
Plant Physiology 157, 1866-1883.

Boccalandro HE, Mazza CA, Mazzella MA, Casal JJ, and Ballaré CL, **(2001)**. Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*.
Plant Physiology 126, 780–788.

Bonifacio A, Martins MO, Ribeiro CW, Fontenele AV, Carvalho FE, Margis-Pinheiro M, Silveira JA **(2011)**. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant Cell Environment* 34, 1705-1722.

Britt AB, **(2004)**. Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynthesis Research* 81, 105–112.

Brosché M, Strid A, **(2003)**. Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum* 117, 1-10.

Brown BA, Jenkins GI, **(2008)**. UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiology* 146, 576-588.

Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI, **(2005)**. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* (102), 18225-18230.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL **(2000)**. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, a cura di **(2003)**. *Biochimica e biologia molecolare delle piante* Zanichelli Editore

Casati P, Walbot V, **(2004)**. Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biology* doi:10.1186/gb-2004-5-3-r16.

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham, N, Inzé D, Sandberg G, and Casero PJ, **(2001)**. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13, 843–852.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues M L, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, and Pinheiro C, **(2002)**. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 907–916.

Chang C-C, Huang AHC, **(1981)**. Metabolism of glycolate in isolated spinach leaf peroxisomes: kinetics of glyoxylate, oxalate, carbon dioxide, and glycine formation. *Plant Physiology* 67, 1003-1006.

Chavez MM, Olivera MM **(2004)**. Mechanism underlying plant resilience to water deficit: prospect for water saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55, 2365-2384.

Chen M, Chory J, and Fankhauser C, **(2004)**. Light signal transduction in higher plants.

Annual Review of Genetics 38, 87–117.

Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, Kelly SM, Hothorn M, Smith BO, Hitomi K, Jenkins GI, Getzoff ED, **(2012)**. Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science* 335(6075), 1492–1496.

Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, Gafni Y, Gelvin SB, Tzfira T, **(2006)**. Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation *in planta*.

Journal of Molecular Biology 362, 1120–1131.

Citovsky V, Gafni Y, Tzfir T, **(2008)**. Localizing protein–protein interactions by bimolecular fluorescence complementation *in planta*.

Methods 45, 196–206.

Claeys H, and Inzé D, **(2013)**. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions.

Plant Physiology 162, 1768–1779.

Cloix C, Kaiserli E, Heilmann M, Baxter KJ, Brown BA, O'Hara A, Smith OB, Christie JM, Jenkins GI, **(2012)**. C-terminal region of the UV-B photoreceptor UVR8 initiates signaling through interaction with the COP1 protein.

Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA 109(40), 16366-16370.

Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, and Shinozaki K, **(2011)**. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective.

BMC Plant Biology 11, 163.

Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutescio C, de Murcia G, Kazmaier M. **(2001)**. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 954–963.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, and Basra SMA, **(2009)**. Plant drought stress: effects, mechanisms and management.

Agronomy for Sustainable Development 29, 185–212.

Fasano R, Gonzalez N, Tosco A, Dal Piaz F, Docimo T, Serrano R, Grillo S, Leone A, Inzé D, **(2014)**. Role of Arabidopsis UV RESISTANCE LOCUS 8 in plant growth reduction under osmotic stress and low levels of UV-B.

Molecular Plant 7 (5), 773-791.

Fasano R, Ruggiero P, Vaccaro MC, Docimo T, Grillo S, Leone A, **(2010)**. The UVR8 gene orchestrates phenotypic plasticity of *A. thaliana* plants under environmental stress. *LIV SIGA Annual Congress Matera, 27-30 September*. ISBN 978-88-904570-0-5.

Fasano R, Grillo S, Leone A, **(2009)**. Ectopic expression of the UVR8 gene mimics stress-induced changes in plant architecture in *A. thaliana*.

LIII SIGA Annual Congress Torino, 16-19 September. ISBN 978-88-900622-9-2

Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravec A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, Seidlitz HK, Nagy F, Ulm R, **(2009)**. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*.

Embo Journal 28, 591-601.

Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei E, Hajdu A, Binkert M, Davis SJ, Schäfer E, Ulm R, Nagy F, **(2011)**. Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS 8-controlled UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*.

Plant Journal 67, 37-48.

Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H **(2002)**. Effect of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations.

Functional Plant Biology 29, 461-471.

Fontaine, J. X., Tercé-Laforgue, T., Armengaud, P., Clément, G., Renou, J. P., Pelletier, S., Catterou, M., Azzopardi, M., Gibon, Y., Lea, P. J., Hirel, B., Dubois, F **(2012)**. Characterization of a NADH-Dependent Glutamate Dehydrogenase Mutant of *Arabidopsis* Demonstrates the Key Role of this Enzyme in Root Carbon and Nitrogen Metabolism .

Plant Cell doi/10.1105/tpc.112.103689.

Fritz C, Green M, **(1992)**. Fishing for partners.

Current Biology 2(8), 403-5.

Frohnmeier H, and Staiger D, **(2003)**. Ultraviolet-B radiation mediated responses in plants: balancing damage and protection.

Plant Physiology 133, 1420–1428.

Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR, **(2003)**. Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves.

Plant Journal 33, 691-705.

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, **(2006)**. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks.

Current Opinion in Plant Biology 9, 436–442.

Fukai S, and Cooper M, **(1995)**. Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice.

Field Crops Research 40, 67–86.

Gerrard Wheeler MC, Arias CL, Maurino VG, Andreo CS and Drincovich MF, **(2009)**. Identification of domain involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzymes.
FEBS Journal 276, 5665-5677.

Gitz DC, Liu-Gitz L, **(2003)**. How do UV photomorphogenic responses confer water stress tolerance?
Photochemistry and Photobiology 78, 529–534.

Hectors K, Prinsen E, DE Coen W, Kansen MAK, Guisesz Y, **(2007)**. *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms.
New Phytologist 175, 255-270.

Hectors K, Jacques E, Prinsen E, Guisez Y, Verbelen JP, Jansen MAK, and Vissenberg, K. **(2010)**. UV radiation reduces epidermal cell expansion in leaves of *Arabidopsis thaliana*.
Journal of Experimental Botany 61, 4339–4349.

Hectors K, van Oevelen S, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MAK, **(2012)**. - The phytohormone auxin is a component of the regulatory system that controls UV-mediated accumulation of flavonoids and UV-induced morphogenesis.
Physiologia Plantarum 145, 594-603.

Hernández I, Alegre L, van Breusegem F, Munné-Bosch S, **(2009)**. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?
Trends Plant Science 14, 125-32.

Heuer B, and Nadle A, **(1995)**. Growth and development of potatoes under salinity and water deficit.
Australian Journal of Agricultural Research 46, 1477–1486.

Hideg E, Jansen MAK, Strid A, **(2013)**. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates?
Trends in Plant Science 18 (2) 107-115.

Hu CD, Chinenov Y, Kerpolla TK, **(2002)**. Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation.
Molecular Cell 9(4), 789-798.

Huang X, Ouyang X, Yang P, Sun Lau O, Chen L, Wei N, Wang Deng X **(2013)**. Conversion from CUL4-based COP1–SPA E3 apparatus to UVR8–COP1–SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B
Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA 110 (41) 16669–16674

Hu JF, Li GF, Gao ZH, Chen L, Ren HB, Jia WS, **(2005)**. Regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation by apoplastic ascorbic acid in maize seedlings.
Journal of Integrative Plant Biology 47,1335-1344.

- Husic DW, Husic DH, Tolbert NE, Black CC, **(1987)**. The oxidative photosynthetic carbon cycle or C₂ cycle.
Plant Sciences 5(1), 45-100.
- Ishikawa T, Shigeoka S, **(2008)**. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 72, 1143-1154.
- Jansen MAK **(2002)**. Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses.
Physiologia Plantarum 116, 423–429.
- Jenkins GI, **(2009)**. Signal transduction in responses to UV-B radiation.
Annual Review of Plant Biology 60, 407–431.
- Jenkins GI, **(2014)**. The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology.
Plant Cell 26(1),21-37.
- Kaiserli E, and Jenkins GI, **(2007)**. UV-B promotes rapid nuclear translocation of the Arabidopsis UV-B-specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus.
Plant Cell 19, 2662-2673.
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C, **(2010)**. Light-regulated plant growth and development.
Current Topics in Development Biology 91, 29–66.
- Keys AJ, **(1999)**. Biochemistry of photorespiration and the consequences for plant performance. In: *Plant Carbohydrate Biochemistry* (eds J.A. Bryant, M.M. Burrell & N.J. Kruger), pp. 147–161. BIOS Scientific, Oxford, UK.
- Kim BC, Tennessen DJ, and Last RL **(1998)**. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Journal 15, 667–674.
- Kisaki T, Tolbert NE **(1969)**. Glycolate and glyoxylate metabolism by isolated peroxisomes or chloroplasts.
Plant Physiology 44, 242–250.
- Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, and Last RL, **(2002)**. *Arabidopsis UVR8* regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human *regulator of chromatin condensation 1*.
Plant Physiology 130,234–243.
- Laubinger S. et al. **(2004)**. The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in Arabidopsis.
Plant Cell 16, 2293–2306.
- Lavy M, Bloch D, Hazak O, Gutman I, Poraty L, Sorek N, Sternberg H, Yalovsky S **(2007)**. A novel ROP/RAC effector links cell polarity, rootmeristem maintenance, and vesicle trafficking.
Current Biololy 17, 947–9.

- Lea PJ, Leegood RC, **(1999)**. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Chichester, UK: Wiley
- Less, Hadar, Galili, Gad, **(2008)**. Principal transcriptional programs regulating plant amino Acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiology* 147, 313-330.
- Liang Z, Huang AHC, **(1983)** Metabolism of glycolate and glyoxylate in intact spinach leaf peroxisomes. *Plant Physiology* 73, 147–152.
- Liao H, Rubio G, Yan X, Cao A, Brown K.M, and Lynch JP, **(2001)**. Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. *Plant Soil* 232, 69–79.
- Liepmann AH, Olsen LJ, **(2001)**. Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 25, 487–498.
- Liepmann AH, Olsen LJ, **(2003)**. Alanine aminotransferase Homologs catalyze the Glutamate: glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131, 215-227.
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C, **(2011)**. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Science* 16, 684–691.
- Livak KJ, and Schmittgen TD, **(2001)**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Mackerness SAH, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B, **(1999)**. Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment* 22, 1413-1423.
- Maruta T, Noshi M, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S, **(2012)**. H₂O₂- triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *Journal of Biological Chemistry* 287 (15), 11717-11729.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B, **(2005)**. The *Arabidopsis* Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *American Society of Plant Biologists* 138, 1083-1096.

Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CLA, Margis- Pinheiro M, **(2004)**. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.)
Plant Science 166,323-331.

Mhamdi A, Queaval G, Chaouch S, Vnderawera S, Breusegem FV, Noctor G. **(2010)**. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models.
Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/erq282

Milla MAR, Maurer A, Huete AR, Gustafson JP, **(2003)**. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways.
Plant Journal 36, 602–615.

Mittler R, **(2002)**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.
Trends in Plant Science 7, 405–410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F, **(2004)**. Reactive oxygen gene network of plants.
Trends in Plant Science 9, 490–498.

Mittler R, and Blumwald E, **(2015)**. The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation.
The Plant Cell doi/10.1105/tpc.114.133090.

Monti M, Orrù S, Pagnozzi D, Pucci P, **(2005)**. Interaction proteomics.
Biosciences Report 25 (1/2), 45.

Morales LO, Brosché M, Vainonen J, Jenkins GI, Wargent JJ, Sipari N, Strid A, Lindfors AV, Tegelberg R, Aphalo PJ, **(2012)**. Multiple roles for UV RESISTANCE LOCUS 8 in regulating gene expression and metabolite accumulation in *Arabidopsis* under solar UV radiation.
Plant Physiology 38(5), 856-66.

Moreno JI, Martin R, Castresana C, **(2005)**. *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress.
Plant Journal 41, 451–463.

Noctor G, Foyer CH. **(1998)**. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control.
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49, 249–279.

Noctor G, Veljovik-Jovanovik S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH, **(2002)**. Drought and oxidative load in the leaves of C3 Contribution of mitochondrial metabolism to photosynthesis plants: a predominant role for photorespiration?
Annals of Botany 89, 841–850.

Ogren WL, **(1984)**. Photorespiration: pathways, regulation, and modification.
Annual Review of Plant Physiology 35, 415–442

- Oravecz A, Baumann A, Máté Z, Brzezinska A, Molinier J, Oakeley EJ, Ádám E, Schäfer E, Nagy F, and Ulm R. **(2006)**. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1975–1990.
- Orrù S, Caputo I, D'Amato A, Ruoppolo M, and Esposito C, **(2003)**. Proteomics identification of Acyl-acceptor and Acyl-donor substrates for transglutaminase in a human intestinal epithelial cell line. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31766–31773.
- Orrù S, Aspesi A, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F., Ruoppolo M, Santoro C, Dianzani I, **(2007)**. Analysis of the ribosomal protein s19 interactome. *Molecular & Cellular Proteomics* 6(3), 382-93.
- Osmond B, Badger M, Maxwell K, Bjorkman O, Leegood R **(1997)**. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2, 119-121.
- Osterlund MT, Christian S, Hardtke NW, Deng XW et al., **(2000)**. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405, 462–466.
- Pardo JM, **(2010)**. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 185–196.
- Pastor V, Luna E, Mauch-Mani B, Ton J, Flors V, **(2013)**. Primed plants do not forget. *Environmental Experimental Botany* 94, 46–56.
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH, **(2003)**. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15, 939-951.
- Paul ND, Gwynn-Jones D, **(2003)**. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 48-55.
- Pawson, T. and Scott, J. D. **(1997)**. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075–2080.
- Peer, W.A., and Murphy, A.S. **(2007)**. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Science* 12, 556–563.
- Petrášek J, Friml J, **(2009)**. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675-2688.

- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK, **(2007)**. Stress-induced morphogenic response: growing out of trouble?
Trends in Plant Science 12, 98-105.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MK, **(2009)**. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways.
Plant, Cell and Environment 32, 158-169.
- Price AH, Tomos AD, and Virk DS, **(1997)**. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.): a hydroponic screen.
Theoretical and Applied Genetics 95, 132–142.
- Racchi ML, **(2013)**. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp.
Antioxidants 2, 340-369.
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R, **(2011)**. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein.
Science 332 103–106.
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JDG, **(2007)**. Pathological hormone imbalances.
Current Opinion in Plant Biology 10, 372–379.
- Robson TM, Klem K, Urban O, Jansen MAK, **(2014)**. Re-interpreting plant morphological responses to UV-B radiation.
Plant, Cell and Environment 38(5), 856-66.
- Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JA, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis- Pinheiro M, **(2010)**. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice.
Phytochemistry 71, 548-558.
- Rossel JB, Walter PB, Hendrickson L, Chow WS, Poole A, Mullineaux PM, Pogson BJ, **(2006)**. A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance.
Plant, Cell and Environment 29, 269–281.
- Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, and Xi Deng XW **(2003)** The COP1–SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity.
Genes & Development 17,2642–2647.
- Shai K, Nobuhiro S, Huntington S, Armijo L, Wei S, Cortes D, Shulaev V, Mittler R **(2008)** Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of Arabidopsis thaliana to stress combination.
Journal of Biological Chemistry 283 (49), 34197-34203.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert, HJ, and Nguyen, HT **(2004)**. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics.

Journal of Experimental Botany 55, 2343–2351.

Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, WangXL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP, **(2006)**. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor.
Nature 443,823–826.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. **(2002)**. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes.
Journal of Experimental Botany 53, 1305–1319.

Shinkle JR, Atkins AK, Humphrey EE, Rodgers CW, Wheeler SL, Barnes PW, **(2004)**. Growth and morphological responses to different UV wavebands in cucumber (*Cucumis sativum*) and other dicotyledonous seedlings.
Physiologia Plantarum 120, 240–248.

Skirycz A, and Inzé D, **(2010)**. More from less: plant growth under limited water. *Curr. Current Opinion in Biotechnology* 21, 197–203.

Somerville CR, Ogren WL, **(1980)**. Photorespiration mutants of *Arabidopsisthaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity.
Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA. 77, 2684–2687.

Specht, JE, Chase K, Macrander M, Graef GL, Chung J, Markwell, JP, Germann M, Orf JH, and Lark KG, **(2001)**. Soybean response to water: a QTL analysis of drought tolerance.
Crop Science 41, 493–509.

Suesslin C, and Frohnmeyer H. **(2003)**. An *Arabidopsis* mutant defective in UV-B light-mediated responses.
Plant Journal 33, 591–601.

Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H, **(2009)**. Biochemical analyses of indole- 3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*.
Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA. 106, 5430-5435.

Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvão VC, Margis R, Margis-Pinheiro M, **(2006)**. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments.
Planta 224,300-314.

Teotia S and Lamb RS, **(2009)**. The paralogous genes RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 and SIMILAR TO RCD ONE 1 have partially redundant functions during *Arabidopsis* development.
Plant Physiology 151, 180-198.

Teotia S, and Lamb RS, **(2010)**. RCD1 and SRO1 are necessary to maintain meristematic fate in *Arabidopsis thaliana*.
Journal of Experimental Botany 62(3) 1271–1284.

Thorlby G, Fourrier N, Warren G (2004). The sensitive to freezing 2 gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a beta-glucosidase. *Plant Cell* 16, 2192-2203.

Titiz O, Tambasco-Studart M, Warzych E, Apel K, Amrhein N, Laloi C, Fitzpatrick TB, (2006). PDX1 is essential for vitamin B6 biosynthesis, development and stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 6, 933-946.

Ulm R, Baumann A, Oravec A, Mátè Z, Adam E, Oakeley EJ, Schäfer E, Nagy F, (2004). Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 101, 1397-1402.

Ulm R, and Nagy F, (2005). Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 477–482.

Vainonene JP, Jaspers P, Wrzaczek M, Lamminm Aki A, Reddy RA, Vaahtera L, Broschè M, Kangasjarvi J, (2012). DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* 442, 573–581.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, and Zhu J K, (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* 45, 523–539.

Verslues PE, Kim YS, Zhu J-K, (2007). Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis glutamate: glyoxylate aminotransferase* mutant. *Plant Molecular Biology*. 64, 205-217.

Vinocur B, Altman A, (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* (16), 123-132.

Von Caemmerer S, (2000). *Biochemical Models of Leaf Photosynthesis*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS, (2013). Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* 15, 713-722.

Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, et al (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* 40, 428–438.

Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U, and Schmölling, T. **(2010)**. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22, 3905–3920.

Widholm JM, **(1972)**. The use fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47(4), 89-94.

Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC, **(2000)**. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 355, 1517–1529.

Winkel-Shirley B, **(2002)**. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 218-23.

Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P, Deng H, Wang J, Deng X, Shi Y, **(2012)**. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484, 214–9.

Wu M, Grahn E, Eriksson LA, Strid A, **(2011)**. Computational Evidence for the Role of *Arabidopsis thaliana* UVR8 as UV-B Photoreceptor and Identification of Its Chromophore Amino Acids. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51(6), 1287–1295.

Wu QS, Xia RX, and Zou YN **(2008)**. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology* 44, 122–128.

Yelagandula, R., Stroud, H., Holec, S., Zhou, K., Feng, S., Zhong, X., Muthurajan, U. M., Nie, X., Kawashima, T., Groth, M., Luger, K., Jacobsen, S. E., Berger, F **(2014)**. The Histone Variant H2A.W Defines Heterochromatin and Promotes Chromatin Condensation in *Arabidopsis*. *Cell* 58(1), 98-109.

Yi, C. and Deng, X.W. **(2005)**. (COP1) from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biology* 15, 618–625.

Yu C, Liang Z, Huang AHC **(1984)**. Glyoxylate transamination in intact leaf peroxisomes. *Plant Physiology* 75, 7–12.

Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S, **(2000)**. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123, 223-234.

Zhang H, Wang J, Allen RD, Nickel U, Goodman HM. **(1997)**. Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology* 34, 967–971.