

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE ***pag. 1***

- | | | |
|------|--|---------|
| 1.1 | Le proteine 14-3-3 | pag. 2 |
| 1.2 | Struttura delle proteine 14-3-3 | pag. 3 |
| 1.3 | Meccanismo d'interazione e sequenze bersaglio delle proteine 14-3-3 | pag. 5 |
| 1.4 | Ruoli funzionali delle proteine 14-3-3 nelle cellule animali | pag. 10 |
| 1.5 | Ruoli funzionali delle proteine 14-3-3 nelle cellule vegetali | pag. 13 |
| 1.6 | Le H ⁺ -ATPasi di membrana plasmatica (PM): struttura e funzioni | pag. 19 |
| 1.7 | Il dominio autoinibitorio carbossi-terminale | pag. 23 |
| 1.8 | Fusicoccina, proteine 14-3-3 e regolazione post-traduzionale dell'H ⁺ -ATPasi | pag. 26 |
| 1.9 | Le poliammine | pag. 32 |
| 1.10 | Struttura e metabolismo delle poliammine | pag. 32 |
| 1.11 | Il ruolo delle poliammine negli eucarioti superiori | pag. 36 |
| 1.12 | Il ruolo delle poliammine nelle piante | pag. 37 |
| 1.13 | Sugar sensing | pag. 40 |
| 1.14 | Aspetti biochimici dello sugar-sensing | pag. 44 |
| 1.15 | Aspetti genetici dello sugar-sensing | pag. 45 |
| 1.16 | Sugar Starvation | pag. 47 |

CAPITOLO 2: OBIETTIVO DEL LAVORO ***pag. 50***

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI ***pag. 53***

- | | | |
|-----|--|---------|
| 3.1 | Prodotti e reattivi chimici | pag. 54 |
| 3.2 | Peptidi, oligonucleotidi e anticorpi | pag. 55 |
| 3.3 | Ceppi e terreni di coltura per <i>Escherichia coli</i> | pag. 56 |
| 3.4 | Ceppi e terreni di coltura per <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | pag. 57 |
| 3.5 | Materiale vegetale e incubazioni <i>in vivo</i> | pag. 57 |
| 3.6 | Preparazione delle cellule competenti di <i>Escherichia coli</i> | pag. 58 |
| 3.7 | Trasformazione delle cellule competenti | pag. 58 |

3.8	Estrazione del DNA plasmidico da cellule di <i>Escherichia coli</i>	pag. 58
3.9	Elettroforesi in gel d'agarosio	pag. 59
3.10	Costruzione dei mutanti dell'isoforma GF14-6 di mais	pag. 59
3.11	Preparazione delle vescicole di plasmalemma	pag. 60
3.12	Preparazione delle membrane di lievito	pag. 61
3.13	Espressione delle proteine di fusione: crescita e lisi delle cellule, purificazione delle proteine fuse alla GST	pag. 62
3.14	Dosaggio delle proteine	pag. 63
3.15	Preparazione della proteina GF14-6 marcata radioattivamente	pag. 63
3.16	Overlay	pag. 64
3.17	Western blotting	pag. 64
3.18	Saggio di legame della proteina radioattiva GF14-6 ai peptidi	pag. 65
3.19	Saggio di attività fosfoidrolitica dell'H ⁺ -ATPasi	pag. 66

CAPITOLO 4: RISULTATI

pag.67

PARTE I: Ruolo delle poliammine nell'interazione delle 14-3-3 con l'H⁺-ATPasi.

4.1	Effetto, <i>in vivo</i> , delle poliammine sull'attività dell'H ⁺ -ATPasi	pag. 68
4.2	Effetto degli inibitori della sintesi delle poliammine	pag. 71
4.3	Effetto, <i>in vitro</i> , delle poliammine sull'attività dell'H ⁺ -ATPasi.	pag. 73
4.4	Effetto delle poliammine nell'interazione delle 14-3-3 con il C-terminale dell'H ⁺ -ATPasi	pag. 76
4.5	Il ruolo del C-terminale delle 14-3-3 nell'interazione con le poliammine.	pag. 77
4.6	Analisi dei residui della GF14-6 direttamente coinvolti nell'interazione con le poliammine.	pag. 81
4.7	Confronto tra Mg ²⁺ e poliammine nell'attivazione delle 14-3-3	pag. 84

PARTE II: Regolazione dell'H⁺-ATPasi mediata da una via di traduzione indotta da zuccheri

- 4.8 Effetto della carenza di glucosio sull'H⁺-ATPasi di plasmalemma pag. 87
- 4.9 Effetto degli zuccheri saccarosio e mannitolo sull'H⁺-ATPasi pag. 88
- 4.10 Altre osservazioni sulla carenza di glucosio e uso della cicloeximide pag. 89
- 4.11 Uso degli inibitori di fosfatasi pag. 91
- 4.12 Uso degli analoghi del glucosio pag. 93

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE ***pag. 97***

CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA ***pag. 103***

Summary

14-3-3 proteins are a family of dimeric proteins found in every eukaryotic organism. Humans have 7 distinct 14-3-3 genes — $\beta, \gamma, \epsilon, \eta, \sigma, \tau$ (also called θ), and δ (as well as a number of potential pseudogenes)—while yeast and plants have between 2 and 15 genes not all of which are expressed.

Also plant 14-3-3 structure has been solved. The 14-3-3s are dimeric, with each monomer consisting of nine α -helices in an antiparallel arrangement. The dimer interface is formed from both hydrophobic and salt-bridge interactions between conserved residues in helices αA , αC and αD , concealing a large surface area (over 2000 \AA^2) and creating a central channel where binding to peptide and protein ligands occurs. The extreme N-termini appear to protrude in random coils from the outer side of the dimer interface, and the C-terminal regions appear to form a moveable cap that might regulate the entry and exit from the central binding grooves.

Over 100 proteins bind to 14-3-3, including various protein kinases and phosphatases: proteins involved in cell cycle control and in transcriptional control of gene expression, metabolism, and apoptosis; cell surface receptors, ion channels, enzymes, molecules involved in membrane trafficking, viral proteins, cytoskeletal proteins, small G proteins and their regulators, and scaffolding molecules. In many but not all cases, binding to 14-3-3 depends on ligand Ser/Thrphosphorylation.

Determination of the phospho-dependent 14-3-3-binding sites on Raf, together with oriented peptide-library screening on all mammalian 14-3-3 proteins, revealed two optimal pSer/pThr-containing motifs—RSx[pS/pT]xP and Rxxx[pS/pT]xP—that are recognized by all 14-3-3 isotypes. [X denotes any amino acid; although for 14-3-3 proteins, certain amino acids are preferred even at these positions.]

14-3-3 proteins are known in plants as regulators of the proton pump H^+ -ATPase.

Plasma membrane H^+ -ATPases constitute a family of proton pumps driven by hydrolysis of ATP and are found exclusively in the plasma membrane of plants and fungi. Here their primary role is to provide an energy source for transport of nutrients into the cell. The plasma membrane H^+ -ATPase is an electrogenic enzyme. Its Activation causes a hyperpolarization of the PM and raises the ΔpH between the cytoplasm and the periplasm, thereby providing the driving force for transmembrane ion and metabolite transport.

The proton pump is composed of 10 transmembrane helices locating both the N- and C-termini at the cytoplasmic face of the plasma membrane. The

enzyme's C-terminus regulatory domain is an autoinhibitory domain that interacts directly with regulatory protein 14-3-3. As a result of this interaction, the H⁺-ATPase acquires an activated state characterized by an increase in V_{max}, an increased affinity for ATP, and a change in pH dependence with higher activity toward physiological pH. The site of interaction of 14-3-3 protein with the plant H⁺-ATPase has been mapped to the extreme C-terminal end of the pump. Binding has been shown to involve the three C-terminal residues (Y946TV in AHA2) and requires phosphorylation of the penultimate residue (Thr947 in AHA2).

The plant PM H⁺-ATPase seems to be regulated by all of the important factors controlling plant physiology: light, hormones, phytotoxins, and environmental stress. Although blue light activates the H⁺-ATPase in guard cells, it has been shown to inactivate plasma membrane H⁺-ATPase activity of pulvinar motor cells of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Different results have been obtained in solving how auxin activates the proton pump at the transcriptional level, but the fact that plant cells respond to auxin within minutes suggests that H⁺-ATPases are directly activated at the posttranslational level. Binding of fusicoccin, a diterpene glycoside, a phytotoxin produced by the fungus *Fusicoccum amygdale*, to the phosphorylated H⁺-ATPases ± 14-3-3 complex is thought to stabilize the H⁺-ATPases ± 14-3-3 interaction, thus leading to permanent activation of the proton pump.

The study carried out in this thesis has been divided in two parts: in the first one we investigated the possible role of the polyamines in modulating 14-3-3 association with the H⁺-ATPase.

Polyamines are organic molecules discovered in human semen by Antoni van Leewenhoek in 1678. They were considered as decomposition products of nitrogen containing organic compounds in animal organisms, but later proved to be important constituents ubiquitous to all pro- and eucaryotes, taking part in many biological processes. Polyamines common to all plant species are putrescine (diamine), spermidine (triamine), and spermine (tetraamine); they are distributed in all vegetative and reproductive plant organs like roots, stems, leaves, flowers and appear to be involved in a myriad of processes including the regulation of DNA replication, transcription of genes, cell division, organ development, fruit ripening, leaf senescence and tuber dormancy.

Since recently it has also been reported that polyamines can bind to 14-3-3 proteins stimulating their association to the nitrate reductase. In this study

the role of PAs in the interaction between 14-3-3 proteins and H⁺-ATPase has been analyzed by using different *in vitro* and *in vivo* experimental approaches it is shown that Spm can regulate the 14-3-3 activation of the proton pump.

In vivo incubation of maize roots with 0.2 mM Spm induces an increase of H⁺-ATPase activity. This effect is obtained, even though at a very lower level, with Spd and Put while Cdv is ineffective. This differential activity can be ascribed to the different number of amino and imino groups present in the different PAs. The Spm effect is detectable also in *in vitro* experiments where Spm was administered in membrane preparations. Here Spm is effective at micromolar concentrations. The stimulation is saturable at 0.2 mM Spm, suggesting that the effect occurs at concentrations that have physiological relevance.

The Spm stimulatory effect of H⁺-ATPase activity is confirmed by the ability of the tetra-amine to stimulate the direct interaction of 14-3-3 with H⁺-ATPase in the overlay assay .

The possible effect of endogenous PAs is investigated by using specific PI such as DFMO, CHA and MGBG. A small but reproducible reduction of the phosphohydrolytic activity is observed when maize roots are incubated with the inhibitors, thus suggesting a regulative role of the endogenous PAs.

The above data show that the Spm effect is due to the stimulation of 14-3-3-H⁺-ATPase interaction. This is corroborated by the estimation of the amount of 14-3-3 proteins associated to the plasma membrane after Spm treatment. The western blotting assay shows a significative increase of membrane-bound 14-3-3s in Spm membranes compared with control membranes and a decrease of the 14-3-3 levels in PI membranes.

The 14-3-3 interaction with H⁺-ATPase requires the phosphorylation of the a specific threonine residue located at the C terminus of the proton pump. The recombinant C-terminal domain of the MHA2 isoform of maize H⁺-ATPase, which is not phosphorylated, can however interact with the 14-3-3 protein but only in presence of physiological concentrations of FC. Interestingly the 14-3-3 interaction with the C terminus can occur also in presence of Spm. The other PAs Spd, Put and Cdv are, as expected, ineffective.

This new evidence suggests that Spm can induce the interaction between 14-3-3 and its target also in absence of C terminus phosphorylation and that, besides the positive charge, its chemical structure can allow the binding between 14-3-3 and its target. In fact, Mg²⁺, necessary for the interaction of 14-3-3 with the H⁺-ATPase, is not effective in the 14-3-3 binding to the unphosphorylated C-terminal domain. This evidence again indicates Spm as

a “specific” regulator of 14-3-3 interaction with its target and suggests that its doesn’t act as a simple organic cation.

In this respect, the comparison of Spm with Mg^{2+} effect indicates that Spm stimulates more than Mg^{2+} the interaction of GF14-6 with the H^+ -ATPase or with a peptide reproducing the 14-3-3 binding site of the H^+ -ATPase. The effect of the cation and PAs is the possible consequence of their binding to 14-3-3 proteins. It has been shown that both Mg^{2+} and Spm can bind to the recombinant Arabidopsis GF14 ω and induce a conformational change followed by an increase of surface hydrophobicity. Also the recombinant maize GF14-6 used in the present work can bind Spm: either Spm or Mg^{2+} addition to GF14-6 result in an increase in bis-ANS fluorescence.

In the second part of this thesis we analyzed a sugar-mediated regulation of plasma membrane H^+ -ATPase.

Sugars not only fuel cellular carbon and energy metabolism but also play pivotal roles as signaling molecules. However, recent evidence has shown that sugars can act as regulatory signals that control the expression of diverse genes involved in many processes in the plant life cycle. Plant hexokinase (HXK) has been shown to be involved in sugar sensing and signaling, and is proposed to be a dual-function enzyme with both catalytic and regulatory functions. In recent years, emerging evidence suggests a link between 14-3-3 proteins and sugar sensing pathways. In fact, it has been observed that glucose starvation activates a selective proteolytic process of 14-3-3-regulated proteins. Several cytosolic 14-3-3 targets, including nitrate reductase, sucrose-phosphate synthase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, were found to be selectively degraded in sugar-starved Arabidopsis cells. This finding prompted us to address the question as to whether the sugar sensing pathway could target the plasma membrane H^+ -ATPase. In this study, we analyzed the H^+ -ATPase activity as well as the 14-3-3 binding properties of maize roots subjected to sugar withdrawal or fed with various nonmetabolizable sucrose analogs. Reported data demonstrate that a sugar sensing pathway controls H^+ -ATPase activity through phosphorylation-dependent modulation of 14-3-3 binding.

The results clearly demonstrate that sugar depletion does not affect H^+ -ATPase levels but dramatically inhibits its catalytic activity, and that inhibition is due to a reduced ability of H^+ -ATPase to bind 14-3-3 proteins. 14-3-3 binding is known to be regulated under physiological conditions by phosphorylation of a threonine residue (Thr947 in the AHA2 H^+ -ATPase) in the extreme end of the C-terminal domain of H^+ -ATPase. Experiments with

OKA and MC demonstrate that sugar depletion inhibits 14-3-3 association with the H⁺-ATPase by reducing phosphorylation of the C-terminal 14-3-3 binding site. The involvement of a specific sugar sensing mechanism has been proven by means of non-metabolizable disaccharides. They are as effective as glucose in preserving H⁺-ATPase functionality, thereby demonstrating that the effect is not due to sugar metabolism but rather to sugar perception and signaling. This perception does not involve the main intracellular sugar sensor hexokinase, since it has been shown that palatinose is not membrane permeable. This hypothesis is also strengthened by the observation that 2-*D*-glucose, a glucose analog which triggers hexokinase-mediated signaling, is ineffective in our system (data not shown). In conclusion, our results demonstrate that sugar signalling regulates the H⁺-ATPase, the enzyme being maintained in an activated state by non-limiting sugar supply. This finding is of physiological relevance since it is known that non-limiting sugar conditions activate diverse cell carbohydrate-consuming functions, such as biosynthesis of polysaccharides and proteins, cell cycle, respiration and nitrogen assimilation, which are necessary to sustain the H⁺-ATPase-triggered cell growth. Our finding is also noteworthy since, despite H⁺-ATPase being highly regulated, only very few endogenous factors have so far been identified. The mechanism of sugar-induced activation of the H⁺-ATPase in maize root tips involves enzyme phosphorylation and the subsequent 14-3-3 binding, similar to the blue light-induced H⁺-ATPase activation in stomatal guard cells.

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Le proteine 14-3-3

Le proteine 14-3-3 costituiscono una famiglia eterogenea di proteine di circa 30 kDa, solubili, acide, con punto isoelettrico compreso tra 4 e 5, e in forma nativa presenti come dimeri (Boston et al., 1982; Yamaguchi et al., 1981). Furono estratte per la prima volta da Moore e Perez, nel 1967 (Moore e Perez, 1967), dal tessuto cerebrale di mammifero, ove costituiscono circa 1% delle proteine solubili totali.

Il loro nome deriva dalla combinazione del numero della frazione in cui eluivano in cromatografia su DEAE-cellulosa e dalla successiva posizione di migrazione in elettroforesi su gel di amido.

Solo nel 1987, grazie al lavoro di Ichimura e collaboratori, fu possibile attribuire alle 14-3-3 la prima funzione, come cofattori in grado di attivare la triptofano 3-mono-ossigenasi e la tirosina 5-mono-ossigenasi (Ichimura et al., 1987). Tale attivazione era dipendente dalla fosforilazione delle due proteine bersaglio da parte della CaMPK II (Proteina chinasi calcio-calmodulina dipendente). I medesimi autori riuscirono inoltre a separare da preparati di cervello bovino, mediante cromatografia HPLC in fase inversa, sette differenti isoforme di 14-3-3. In base al loro profilo di eluizione tali isoforme sono state nominate con le prime lettere dell'alfabeto greco: α , β , γ , δ , ϵ , ζ . La purificazione dell'isoforma η ha permesso la dimostrazione diretta *in vitro* dell'attivazione della triptofano idrossilasi da parte delle proteine 14-3-3 ed ha inoltre permesso il clonaggio del primo gene per le 14-3-3 (Ichimura et al., 1988). Oggi le 14-3-3 rappresentano una famiglia di proteine espresse in modo ubiquitario in tutti gli eucarioti (Aitken et al., 1992; Ferl, 1996) svolgendo ruoli fondamentali nella regolazione di numerosi processi cellulari come il ciclo cellulare (Roberts et al., 1997), l'apoptosi (Zha et al., 1996), l'esocitosi, nel "targeting" cellulare e, in generale, nel coordinamento di varie vie di trasduzione del segnale. Tutte queste funzioni sono riconducibili alla capacità delle 14-3-3 di interagire con proteine bersaglio agendo da adattatori, chaperoni, attivatori o repressori.

1.2 Struttura delle proteine 14-3-3

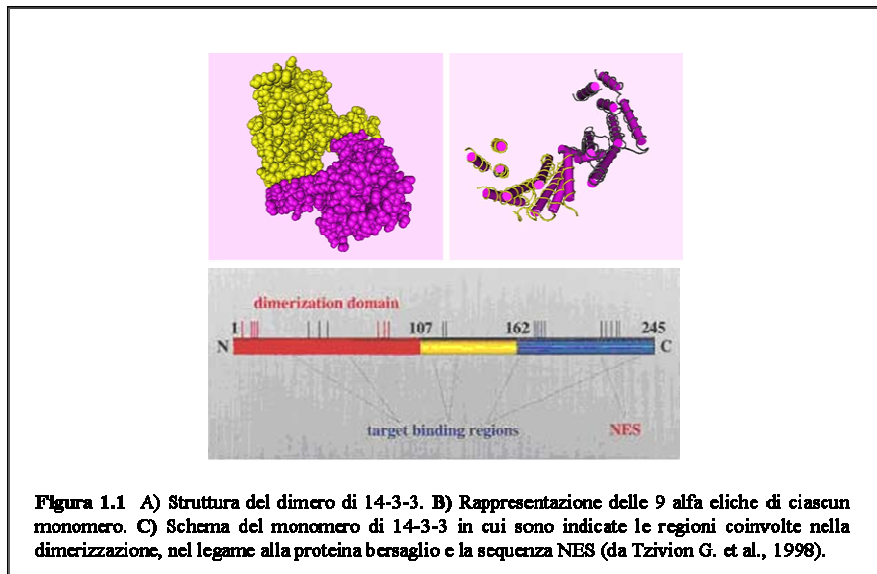
Le proteine 14-3-3 sono presenti in forma nativa come dimeri. Già nel 1987 Ichimura et al. avevano attribuito alle 14-3-3 un peso molecolare di 50 kDa. Successivamente era stato osservato che anche la cromatografia di esclusione per le proteine 14-3-3 dava un'apparente massa di circa 60 kDa (Toker et al., 1992). Tale natura dimerica è stata poi verificata sull'isoforma GF14 ω di *Arabidopsis*, mediante cromatografia di gel-filtrazione ad alta risoluzione ed esperimenti di cross-linking (Lu et al., 1994a). Jones et al. (1995) hanno dimostrato l'importanza dell'N-terminale nella dimerizzazione, osservando che un frammento N-terminale di 16 kDa esiste in soluzione come dimero e mutanti di delezione mancanti dei primi 26 amminoacidi perdono completamente la capacità di dimerizzare.

La struttura cristallografica, ottenuta su 2 isoforme animali ζ (Xiao et al., 1995) e τ (Liu et al., 1995), ha ulteriormente confermato la presenza di una struttura dimerica che, data l'elevata omologia tra le varie isoforme, viene considerata valida per tutte le 14-3-3.

Ciascun monomero consta di nove alfa eliche (α 1-9) organizzate in modo antiparallelo e separate da brevi tratti non strutturati. Nel suo complesso il monomero può essere distinto in due domini strutturali: il dominio N-terminale costituito dalle prime quattro eliche, ed il dominio C-terminale, formato dalle restanti eliche (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995).

I due monomeri risultano disposti in modo da formare una sorta di morsa. Essa presenta una faccia interna, ricca di residui conservati, coinvolta nel riconoscimento di molecole bersaglio, e una faccia esterna, ricca di residui variabili, che secondo alcuni autori sarebbe responsabile della specificità di tale riconoscimento. Nella faccia interna di ogni monomero è presente una cavità anfipatica di 25 Å, costituita da un gruppo di residui basici e polari (K49, R56, R60, K120, D124, Y128, R127) da una parte e da residui idrofobici (L172, L216, L220, L227) dalla parte opposta (Petosa et al., 1998; Yaffe et al., 1997).

I residui dell'interfaccia del dimero sono molto conservati e ciò suggerisce che isoforme differenti possano formare eterodimeri. Ciò è stato dimostrato sia in isoforme animali (Jones et al., 1995) che in isoforme di piante (Wu et al., 1997).



La possibilità di formare eterodimeri ha suggerito che tali proteine agiscano come “adapter protein” cioè proteine che, interagendo con bersagli differenti, ne favoriscono l’avvicinamento; sono da esempio le interazioni con le protein chinasi Raf-1 e Bcr. Tali proteine non sono in grado di interagire tra di loro se non in presenza di 14-3-3 e formare così un complesso ternario come è stato dimostrato in esperimenti di coeluizione e coimmunoprecipitazione (Jones et al., 1995; Wu et al., 1997).

Oltre alla regione di dimerizzazione, è stata caratterizzata, per la prima volta in Rad24, una delle due isoforme di 14-3-3 del lievito *S. pombe*, un’ipotetica sequenza per l’esportazione dal nucleo (Nuclear Export Signal, NES). Tale sequenza è localizzata sull’elica 9, corrispondente ai residui I217 e L221 della 14-3-3 ζ , e funzionerebbe come una sequenza di esporto per mediare l’esclusione dal nucleo di proteine bersaglio come ad esempio Cdc25, la protein fosfatasi chiave nella progressione del ciclo cellulare, mediante un’interazione simultaneamente con CRM1, il recettore per l’esportazione delle proteine dal nucleo (Lopez-Girona et al., 1999). Il lavoro di Rittinger e collaboratori ha effettivamente dimostrato *in vitro* l’interazione delle 14-3-3 con CRM1 (Rittinger et al., 1999). Inoltre mutazioni a carico della sequenza NES comportano l’accumulo di Rad24 nel nucleo, l’incapacità di interagire sia *in vivo* sia *in vitro* con Cdc25C (Zeng et al., 1999) e di segregare questa

nel citosol (Lopez-Girona et al., 1999). Simili mutazioni della 14-3-3 ϵ di *X. laevis* distruggono inoltre l'interazione con Cdc25C (Kumagai et al., 1998). Un confronto tra le sequenze delle 14-3-3 attualmente disponibili in banca dati ha evidenziato la presenza del NES in tutte le 14-3-3 (Rosenquist et al., 2000).

Per alcune 14-3-3 vegetali è stata anche evidenziata la capacità di legare Ca^{2+} , poliammine o ioni bivalenti. Un motivo EF di legame al Ca^{2+} (EF hand-like), simile a quello presente nella calmodulina, è stato identificato nella regione C-terminale, tra lelica 8 e la 9, dell'isoforma di *A. thaliana* GF14 ω . Tale isoforma si è dimostrata in grado di legare *in vitro* molecole di calcio radioattive (Lu et al., 1994b). Medesima proprietà è stata riscontrata anche per l'isoforma GF14 ψ , di cui sembrerebbe influenzare in modo negativo la capacità di dimerizzazione a causa di variazioni conformazionali (Abarca et al., 1999). Il motivo EF risulta coinvolto anche nel legame con gli ioni bivalenti o con le poliammine come dimostrato utilizzando mutanti puntiformi della regione C-terminale della 14-3-3 di *A. thaliana* GF14 ω (Athwal e Huber, 2002). Come per il Ca^{2+} , il legame al Mg^{2+} o alle poliammine spermina e spermidina, comporterebbe una modificazione della conformazione della 14-3-3 provocando una "apertura" della tasca anfipatica di legame ed una maggior affinità della proteina per il ligando (Athwal et al., 2000).

1.3 Meccanismo d'interazione e sequenze bersaglio delle proteine 14-3-3

Come accennato in precedenza, le proteine 14-3-3 sono in grado di interagire con un gran numero di bersagli tra loro molto diversi. A dispetto di tale eterogeneità devono necessariamente sussistere delle caratteristiche comuni alla base del riconoscimento tra 14-3-3 e ligando. La principale caratteristica fu riscontrata già nei primi studi d'interazione tra le 14-3-3 e la triptofano idrossilasi (Furukawa et al., 1993): era necessaria la fosforilazione della proteina bersaglio.

Ulteriori conferme vennero anche da studi successivi condotti in particolare sulla proteina chinasi Raf-1, in cui è stato dimostrato che la fosforilazione del residuo Ser259 era indispensabile per il legame con le proteine 14-3-3 (Michaud et al., 1995); proprio sulla base di tale interazione è stato possibile identificare una sequenza di legame consenso: **RSXpSXP**, dove pS

rappresenta una fosfoerina ed X un qualunque aminoacido (Muslin A.J. et al., 1996). Tale consenso è stato dedotto utilizzando un peptide sintetico di 15 aminoacidi, che riproduceva la regione di Raf-1 compresa tra gli aminoacidi 252 e 264 e contenente la sequenza RQRSTS₂₅₉TP. Solo la forma fosforilata del peptide era in grado di interagire *in vitro* con la 14-3-3 ζ con una Km apparente di 122 nM.

Successivamente l'analisi di una libreria orientata di peptidi, contenenti fosfoerine, ha permesso di definire due motivi consenso alternativi (Yaffe M.B. et al., 1997). Il modo 1, definito dalla sequenza **R(S/Ar)(+/Ar)pS(L/E/A/M)P** (dove pS è una fosfoerina, Ar un residuo aromatico e + un residuo basico), risulta strettamente correlato alla sequenza di legame di Raf-1. Il modo 2 presenta la sequenza **RX(Ar)(+)pS(L/E/A/M)P**. Sequenze analoghe ai motivi consenso descritti sono state ritrovate in numerose proteine che interagiscono con le 14-3-3, ed alcune di queste possiedono più di un sito di legame (Tabella 1.1).

A

<i>LIGANDO</i>	<i>SEQUENZA</i>
RSXp(S/T)XP (modo 1)	
Raf-1 (S/T protein chinasi)	RSTpSTP; RSApSEP
Bad (omologo di BCL-2)	RHSpSYP; RSRpSAP
Cdc25C (Y/T protein fosfatasi)	RSPpSMP
ASK1 (S/T protein chinasi)	RSIpSLP
Middle T antigen (oncoproteina)	RSHpSYP
KSR (S/T protein chinasi)	RSKpSHE, RTEpSVP
PTPH1 (Y protein fosfatasi)	RSLpSVE, RVDpSEP
IRS-1 (proteina d'ancoraggio)	RSKpSQS, HSRpSIP, KSVpSAP
Iip35 (proteina associata a MHC)	RSRpSCR
FKHRL1 (fattore di trascrizione)	RSCpTWP, RAVpSMD
Slob (proteina che lega canali K ⁺)	RSNpSAI, RSApSSE
RXXp(S/T)XXS	
Cbl (proteina adattatrice)	RHpSLPFS, RLGpSTFS
Keratin 18 (componente del citoscheletro)	RPVSSAApS
PKC μ (S/T protein chinasi)	RLpSNVpS, RTSpSAELpS
Altri motivi fosforilati	
Recettore IGF-I (Y protein chinasi)	pSVPLDPSApSpSpSLP

GP1b β (recettore per l'adesione)	RL p SLTDP
p53 (fattore di trascrizione)	KGQST p SRH
Motivi non fosforilati	
R18 (peptide sintetico)	WLDLE
Raf-1 (S/T protein chinasi)	Motivo ricco in cisteine
KSR (S/T protein chinasi)	Motivo ricco in cisteine

B

LIGANDO	SEQUENZA
RSXp(S/T)XP (modo 1)	
Nitrato reductasi	KKXpSTP
Subunità catalitica A dell'ATP sintasi vacuolare	RKVpSGP
Subunità β dell'ATP sintasi	RGVpSVP
AK1 (protein chinasi Ca ²⁺ dipendente)	RFLpSQP
Amido sintasi III	RYGpSIP
RXXXp(S/T)XS (modo 2)	
Lox-2 (13-lipossigenasi)	KPSDpSKP
Altri motivi fosforilati	
PM H ⁺ -ATPasi	YpTV

Tabella 1.1 Le proteine che interagiscono con le 14-3-3. In tabella sono riportate alcune proteine che interagiscono con le 14-3-3, negli organismi animali (**A**, da Fu H. et al., 2000) e nei vegetali (**B**, da Sehnke et al., 2002). A fianco a ciascuna proteina è riportata la/e sequenze di legame ed in corsivo il residuo fosforilato.

In Raf -1, ad esempio, sono presenti due siti contenenti la Ser-259 e la Ser-621; questi residui sono fosforilati *in vivo* e mediano l'interazione con il dimero di 14-3-3 (Morrison, 1995; Morrison et al., 1993). La possibilità delle 14-3-3 di legare contemporaneamente due siti sulla stessa molecola viene supportato anche da esperimenti *in vitro* (Yaffe et al., 1997). E' stato dimostrato, mediante co-cristallizzazione, che un peptide sintetico, contenente due motivi di legame fosforilati distanziati di 30 Å da uno spaziatore di acido poliamminoesanoico, è in grado di legarsi al dimero di 14-3-3 con elevata affinità e che ciascun sito fosforilato occupa una delle

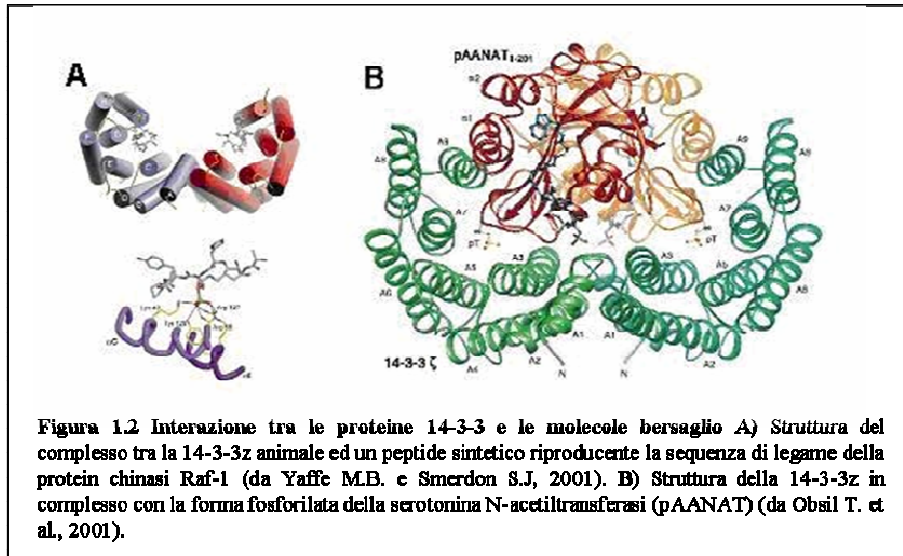
due tasche anfipatiche della proteina. La costante di dissociazione, misurata per questo complesso, risulta 30 volte inferiore a quella calcolata per il complesso con un analogo peptide fosforilato solo in uno dei due siti di legame. Un tale comportamento suggerisce quindi un effetto cooperativo nell'interazione.

Oltre ai due tipi di siti d'interazione descritti, studi effettuati sul proto oncogene Cbl e sulla pompa protonica di membrana plasmatica vegetale H⁺-ATPasi, hanno evidenziato l'esistenza di differenti motivi fosforilati. Per Cbl è stato individuato un motivo ricco in serine, RX₁₋₂SX₂₋₃S, dove X indica qualsiasi aminoacido e dove almeno una serina è fosforilata (Liu et al., 1997). Cbl contiene due di questi motivi come analogamente osservato per Raf-1. Per quanto concerne l'H⁺-ATPasi è stata invece identificata una sequenza minima di soli tre aminoacidi, YpTV, dove pT è una treonina fosforilata (Fulsgang et al., 1999; Svannelid et al., 1999). Di questa particolare interazione verrà discusso in seguito e sarà in parte oggetto di questa tesi di dottorato.

Negli ultimi tempi sono comunque emerse numerose evidenze che le proteine 14-3-3 sono in grado di interagire anche con sequenze non fosforilate. La protein chinasi Raf-1, oltre ai siti precedentemente descritti, contiene un terzo sito di legame per le 14-3-3, detto dominio ricco in cisteine (Cysteine-Rich-Domain) (Clark et al., 1997). Il CRD (residui 139-184), espresso in *E. coli* e quindi non fosforilato, *in vitro* può legare direttamente le 14-3-3, ma non è chiaro ancora il ruolo da esso svolto nell'interazione 14-3-3/Raf-1 (Winkler et al., 1998; McPhearson, et al 1999).

Altre proteine contengono domini di interazione non fosforilati come la glicoproteina GPIb α (Du et al., 1996), la ADP-ribosyl-transferasi ExoS (Masters et al., 1999) o la 5-fosfatasi, nel qual caso il sito di legame, RSESEE, ricorda il motivo di tipo 1, in cui la fosfoerina viene sostituita da un residuo carico di acido glutammico (Campbell et al., 1997). L'utilizzo inoltre della tecnica del "phage display" (esposizione di proteine o peptide su capsidi fagici) ha permesso di selezionare un peptide non fosforilato, denominato R18, con elevata affinità per le 14-3-3. Tale affinità dipende dalla sequenza WLDLE presente nella regione centrale del peptide (Wang et al., 1999).

La proteina 14-3-3 ζ animale è stata co-cristallizzata in complesso con diversi peptidi che riproducevano motivi di legame sia di tipo fosforilazione dipendente sia indipendente (Yaffe et al., 1997; Rittinger et al., 1999; Petosa et al., 1998) (figura 1.2).



In tali complessi entrambi i tipi di peptide si posizionano nella tasca anfipatica ed assumono una conformazione estesa. Un valido modello è stato ottenuto dall'analisi ad alta risoluzione, 2.6 Å, del complesso tra 14-3-3ζ e il peptide MARSHpSYPAKK, che riproduce la sequenza di legame dell'antigene "middle T" del virus del poliovirus (Yaffe et al., 1997). In tale complesso, la fosfoserina del peptide contatta la 14-3-3, da una parte, mediante ponti salini coi residui K49, R56 e R127 e, dall'altra, mediante legami idrogeno con il gruppo idrossile del residuo Y128. Tale risultato è in perfetto accordo con esperimenti di mutagenesi sito specifica in cui le sostituzioni K49E, R56E ed R127E, a carico dei residui polari della tasca anfipatica, abolivano drasticamente l'interazione della 14-3-3ζ con Raf-1 e Bcr (Zhang et al., 1997). In modo simile è stato anche dimostrato che le mutazioni Lys-56 e Val-185, presenti nella tasca anfipatica di ciascun monomero, sono cruciali per il legame della 14-3-3 vegetale alla sequenza fosforilata YpTV della pompa protonica H⁺-ATPasi (Visconti et al., 2003). Altri simili risultati sono stati ottenuti anche con mutazioni a carico della superficie idrofobica, quali V176D, L216D, L220D e L227D (Wang et al., 1998). È stato inoltre dimostrato che, anche per l'interazione tra la proteina proapoptotica Bad e la 14-3-3ζ, risultano fondamentali i residui K49 e V176, mutazioni dei quali ne aboliscono il legame (Yang et al., 2001).

Analogamente, nel complesso tra le 14-3-3ζ e il peptide R18, quest'ultimo assume una conformazione estesa all'interno della tasca anfipatica. La

sequenza WLDLE si posiziona nel sito di legame per la fosfoserina, con i due residui acidi, aspartico ed glutammico, prossimi ai residui basici della 14-3-3 e con le due leucine che prendono contatti con il lato idrofobico della proteina, compresi L172 e L220 (Petosa et al., 1998).

Recentemente è stata risolta da Obsil e collaboratori la struttura del complesso tra la 14-3-3 ζ e la serotonina N-acetiltransferasi, nella forma fosforilata (pAANAT), e a sua volta complessata con la CoA-S-acetil triptamina (Obsil et al., 2001). I complessi ottenuti erano costituiti da un dimero di 14-3-3 ed a ciascun monomero risultava legata una molecola di pAANAT. Come osservato per i complessi 14-3-3/peptide, la regione N-terminale di pAANAT, contenente la sequenza di legame RRHpT₃₁LPAN (dove pT è una fosfotreonina), adotta una conformazione estesa e si posiziona nella tasca anfipatica. A differenza dei peptidi contenenti pSer, la pThr della sequenza di legame contatta in più, mediante il proprio gruppo metilico, il gruppo metilico della Val-172 della 14-3-3. La 14-3-3 complessata con il ligando presenta, rispetto alla forma libera, un'apertura del canale centrale dovuto ad un allontanamento verso l'esterno dell'elica 8, come pure osservato per la 14-3-3 di *A. thaliana* GF14 ω in seguito a legame con Ca²⁺ o Mg²⁺ proprio nella regione di giunzione tra l'elica 8 e la 9 (Lu et al., 1994b; Athwal et al., 2000). Gli autori verificano inoltre che, in seguito al legame alle 14-3-3, la pAANAT subisce una modificazione conformazionale che la rende più attiva aumentando l'accessibilità del substrato al sito catalitico, assegnando quindi alla 14-3-3 una funzione di stimolo dell'attività dell'enzima (Obsil et al., 2001).

1.4 Ruoli funzionali delle proteine 14-3-3 nelle cellule animali

Numerosi sono i ruoli e le funzioni svolte dalle 14-3-3, ed in generale sono riconducibili a tre principali processi cellulari in cui le proteine 14-3-3 agiscono regolando l'attività enzimatica, l'interazione proteina-proteina, la localizzazione subcellulare:

a) *la trasduzione del segnale*. Il ruolo delle 14-3-3 in questo meccanismo è emerso fin dalla loro riscoperta negli anni '90 quali fattori regolatori dell'attività della protein chinasi C (PKC), una famiglia di serina/treonina chinasi attivate dal Ca²⁺ e dal diacil-glicerolo (DAG) e coinvolte in molti processi di trasduzione del segnale (Toker et al., 1990). Inizialmente fu

assegnato alle 14-3-3, isolate da estratti di cervello di pecora, un ruolo inibitorio dell'attività della PKC (Aitken et al., 1992, Robinson et al., 1994; Hausser et al., 1999). Altri autori hanno invece proposto per le proteine 14-3-3 un ruolo d'attivazione della PKC nei processi di esocitosi dipendenti da Ca^{2+} (Isobe et al., 1992). Le 14-3-3 sono anche in grado di stimolare l'interazione della PKC con la serina /treonina chinasi Raf-1, proteina che svolge un ruolo centrale nella trasmissione di stimoli indotti da fattori di crescita attraverso la via di trasduzione delle MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Morrison e Cutler, 1997). Le proteine 14-3-3 sono inoltre in grado di mediare l'interazione tra la forma attiva e associata alla membrana di Raf-1 con altre proteine quali: Bcr, KSR (kinase Suppressor of Ras), A20 (Vincenz e Dixit, 1996; Xing et al., 1997).

Le 14-3-3 interagiscono anche con altri elementi delle via delle MAPK. In particolare mediante il sistema del doppio ibrido le isoforme 14-3-3 ϵ e ζ sono state identificate come interattori delle proteina chinasi MEKK1, MEKK2 e MEKK3, ma non della MEKK4 (Mitogen-activated/Extracellular signal-regulated protein Kinase Kinase). L'interazione avviene con la porzione N-terminale delle chinasi ma non comporta alcuna alterazione dell'attività enzimatica assegnando quindi alle 14-3-3 un ruolo organizzativo, forse mediando l'interazione tra diverse proteine per organizzare grandi complessi di trasduzione del segnale (Fanger et al., 1998).

Le 14-3-3 sono in grado di legare anche gli elementi più a monte nella via di trasduzione del segnale: i recettori. In particolare è stata descritta l'interazione della 14-3-3 ζ con il recettore adrenergico α_2 (α_2 -AR), un recettore transmembrana che lega sia adrenalina che noradrenalina e media la risposta contrattile.

b) *la regolazione del ciclo cellulare*. Il controllo del ciclo cellulare, processo fondamentale per la vita di tutti gli organismi, si esplica attraverso dei "punti di sorveglianza" o "checkpoint". Le proteine 14-3-3 sembrano essere coinvolte nella transizione tra l'interfase e la fase M (mitotica). Questo processo è sotto il controllo della proteina fosfatasi Cdc25 la quale è in grado di attivare nel nucleo la proteina chinasi ciclinaB-dipendente, Cdc2. Peng e collaboratori hanno dimostrato che la fosforilazione della Ser-216 di Cdc25 crea un sito di legame per le 14-3-3 con la conseguente associazione delle due proteine; mutanti S216A perdono la capacità di interagire con le 14-3-3 (Peng et al., 1997). Quest'interazione è stata riportata anche per altri organismi come *X. laevis* o il lievito *S. pombe* (Kumagai et al., 1998.; Zeng

et al., 1998). Le 14-3-3 si sono dimostrate inoltre in grado di interagire con le proteina chinasi Chk1 e Wee1. Chk1 è responsabile della fosforilazione di Cdc25 sulla Ser-216 (Sanchez et al., 1997). Nel lievito *S. pombe*, entrambe le isoforme di 14-3-3, Rad24 e Rad25, legano Chk1 preferenzialmente nella forma fosforilata che si genera in risposta a segnali di danno al DNA (Chen et al., 1999). Wee1 è invece responsabile della stato di fosforilazione di Cdc2 e sia in topo che in *X. laevis* è stata dimostrata l'interazione della regione carbossi-terminale di Wee1 con le 14-3-3. (Honda et al., 1997; Lee et al., 2001). Seimiya (2000) e collaboratori hanno anche dimostrato che le 14-3-3 sono in grado di interagire con la subunità proteica della telomerasi umana (hTERT) un enzima chiave per la corretta replicazione dell'estremità dei cromosomi eucariotici. Secondo gli autori questa interazione non dipende da fosforilazione ma coinvolge una regione ad elica anfipatica con un caratteristico raggruppamento di serine e treonine nella porzione C-terminale di hTERT.

c) *l'apoptosi*. Tale processo richiede una complessa regolazione che risulta incentrata sulla famiglia di proteine Bcl-2 comprendente sia fattori pro-apoptotici (Bcl-xs, BAD, Bak e Bax) che anti-apoptotici (Bcl-2, MCL-1 e Bcl-xl). In particolare Bad, mediante il dominio BH3, è in grado di promuovere la morte cellulare legando e inibendo l'attività antiapoptotica delle proteine Bcl-2 e Bcl-xl (Zha et al., 1997). Nel 1996 Zha e collaboratori trovarono che le 14-3-3 erano in grado di interagire con BAD in modo dipendente da fosforilazione e tale interazione portava all'inattivazione del fattore apoptotico (Zha et al., 1996). Il legame delle 14-3-3 alla proteina BAD comporta il sequestro di quest'ultima nel citosol, e ciò ne impedisce la dimerizzazione con Bcl-2 e Bcl-xl le quali sono a loro volta localizzate sulla membrana mitocondriale (Zha et al., 1996).

Allo stesso modo di BAD, le 14-3-3 sono in grado di sequestrare nel citosol il fattore di trascrizione FKHRL1, coinvolto nell'attivazione di geni apoptotici, in seguito alla fosforilazione di questo da parte della proteina chinasi Akt1 (Brunet et al., 1999). Anche la proteina chinasi ASK1 (Apoptosis-Signal Regulated Kinase 1), che è un componente della via di trasduzione degli stimoli apoptotici, è in grado, in seguito a fosforilazione, di interagire con le 14-3-3 (Zhang et al., 1999).

1.5 Ruoli funzionali delle proteine 14-3-3 nelle cellule vegetali

Tra le funzioni meglio studiate delle 14-3-3 nelle piante vi è certamente la regolazione degli enzimi chiave del metabolismo primario, in particolare la nitrato reduttasi (NR), la saccarosio fosfato sintasi (SPS) e la glutamina sintasi (GS), la regolazione di fattori di trascrizione, la regolazione del “traffico” intracellulare delle proteine e non ultimo la regolazione dei flussi ionici (figura 1.3). Le piante assumono nitrato dall'esterno attraverso le cellule epidermiche e corticali della radice mediante un processo guidato da un gradiente protonico generato dall' H^+ -ATPasi. Nel citosol il nitrato è ridotto a nitrito da parte della nitrato reduttasi NADH-dipendente (Campbell, 1996). Il nitrito viene poi traslocato nei plastidi della foglia o della radice ove è ridotto ad ammonio da parte di una nitrito reduttasi. La nitrato reduttasi è un omodimero di 100 KDa ed ogni subunità è costituita da tre domini: uno lega la monopterina, il secondo lega il citocromo b5 ed il terzo la flavina. I domini sono collegati tra loro da una regione cardine importante nella regolazione dell'enzima stesso. (Hoff et al., 1992). L'espressione dell'enzima risulta influenzato da numerosi fattori, principalmente nitrato e luce. Inoltre l'attività della NR è controllata a livello post-traduzionale da una fosforilazione rapida e reversibile in condizioni di buio, ridotta CO_2 , stress osmotici o variazioni di pH (Huber et al., 1992). L'inattivazione della nitrato reduttasi avviene in due fasi. Nella prima fase la NR viene fosforilata nella regione spaziatrice I a livello di una serina (Ser534 per *A. thaliana* o Ser543 per spinacio) che risulta all'interno di un sito canonico di legame alle 14-3-3 (Bachmann et al., 1996a). Tale fosforilazione non è però sufficiente ad inibire l'attività enzimatica. Nella seconda fase il processo di inattivazione viene completato in seguito al legame, Mg^{2+} -dipendente, di NIP (NR Inhibitory Protein) alla pNR, alterando così la conformazione dell'enzima e bloccando il flusso di elettroni (Douglas et al., 1995; Bachmann et al., 1996b; Su et al., 1996). NIP è stata identificata come un membro della famiglia delle 14-3-3 (Bachmann et al. 1996c, Moorhead et al. 1996), anche se non è stato ancora chiarito se vi sia una specificità dell'isoforma. Esperimenti *in vitro* hanno però dimostrato che la forma fosforilata della NR può essere inibita dall'isoforma GF14 ω di *A. thaliana* (Bachmann et al., 1996c). Tre protein chinasi responsabili della fosforilazione della Ser-543 sono state isolate in spinacio, PKI, PKII e PKIII (Douglas et al., 1997). PKII si è rivelata essere una chinasi Ca^{2+} dipendente, una CDPK (Calmodulin-like Domain Protein Kinase) con elevata omologia

con la CDPK6 di *A. thaliana* (Douglas et al., 1998), mentre PKIII si è dimostrata una chinasi correlata a SNF-1, SnRK (Douglas et al., 1995). Ikeda e collaboratori hanno clonato una SnRK di grano, WPK4, in grado di fosforilare la NR e di promuovere il legame con le proteine 14-3-3 (Ikeda et al., 2000). Nel medesimo lavoro gli autori dimostrano mediante esperimenti di doppio ibrido che WPK4, in seguito ad autofosforilazione del dominio C-terminale, è essa stessa in grado di legare due nuove isoforme di 14-3-3 (TaWIN1 e 2), ma tale legame non altera l'attività catalitica dell'enzima. Camoni et al. hanno anche dimostrato *in vitro* l'interazione di CDK1 di *A. thaliana*, una CDPK, con le proteine 14-3-3. Il legame stimola l'attività chinasi e tale effetto è maggiore in presenza dell'isoforma GF14-6 (Camoni et al., 1998b).

Anche la forma citosolica della glutamina sintasi (GS) è risultata essere un bersaglio per le 14-3-3 (Moorhead et al., 1999; Finnemann, 2000). Questa isoforma è coinvolta nella mobilizzazione dell'azoto nelle foglie in senescenza. L'enzima risulta regolato a livello trascrizionale da fattori ambientali quali luce, stress e disponibilità d'azoto. La transizione tra luce e buio promuove la fosforilazione della GS ed il conseguente legame delle proteine 14-3-3, seguito dall'attivazione dell'enzima. Al buio l'attivazione della GS contrasta con l'inattivazione della NR e questa situazione risulta dipendente dal rapporto ATP/AMP.

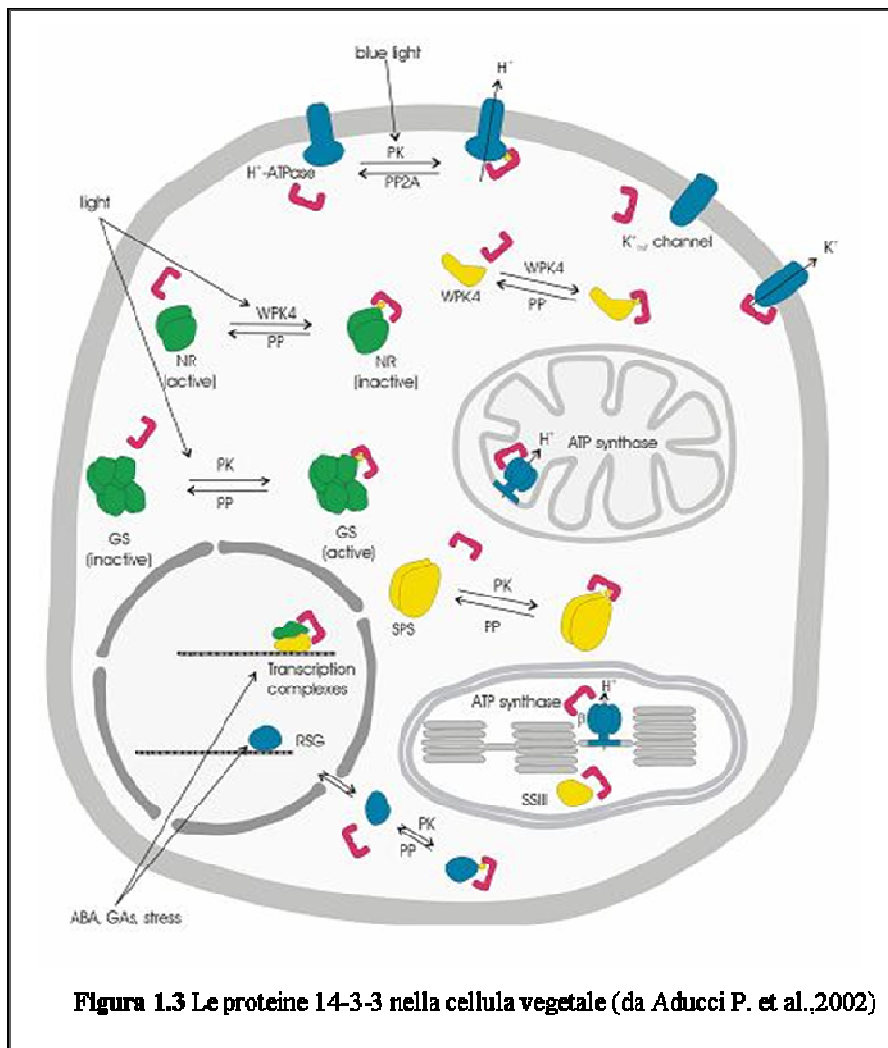


Figura 1.3 Le proteine 14-3-3 nella cellula vegetale (da Aducci P. et al.,2002)

Nelle foglie giovani il rapporto ATP/AMP è a favore dell'AMP in quanto l'ATP è richiesto per i processi biosintetici e, parallelamente, il livello di fosforilazione sia della GS che della NR è basso con una conseguente attivazione della NR e la disattivazione della GS. Invece nelle foglie in senescenza la fotosintesi decresce ed il rapporto ATP/AMP cresce assieme al livello di fosforilazione dei due enzimi. Questo inverte la situazione portando all'attivazione della GS (Finneman J. et al., 2000).

Il metabolismo del carbonio è un altro processo metabolico regolato dalle 14-3-3. Il carbonio fissato dalla fotosintesi viene convertito in saccarosio per poi essere esportato o conservato come amido, nei plastidi. Molti enzimi controllano la sintesi del saccarosio. La saccarosio-fosfato sintasi (SPS) è una proteina composta da un dimero di circa 120 kDa che catalizza la formazione del saccarosio-6-fosfato dal fruttosio-6-fosfato e dall'UDP-glucosio. Diverse evidenze dimostrano che la regolazione della SPS sia dipendente dalla fosforilazione di più residui di serina. (Huber et al., 1996).

La fosforilazione della serina 158 della SPS di spinacio sembra inattivare l'enzima in risposta alla variazione luce/buio, mentre la fosforilazione della serina 424 sembra attivare l'enzima in risposta a stress osmotici; infine la fosforilazione della serina 229 sembra essere coinvolta nel legame con le 14-3-3 che determina l'inattivazione dell'enzima (Toroser e Huber, 1997; Toroser et al., 1999).

Nell'ambito delle funzioni riscontrate solo nelle piante, si è osservata, sia in *Arabidopsis* che in mais, l'associazione delle 14-3-3 con il fattore trascrizionale GBF (G-box binding factor). Quest'ultimo si lega a sequenze specifiche, le cosiddette G-box, proprie di numerosi promotori inducibili. Utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro il complesso di trascrizione è stato possibile isolare e clonare numerose isoforme di *A.Thaliana* e di *mais*, che sono state denominate GF14 (G-box Factor 14-3-3 homolog) (de Vetten et al., 1992; Lu et al., 1992, 1994c). Ferl (1996) ha proposto che, dal momento che GBF è noto per essere fosforilato e poiché la fosforilazione aumenta il legame al DNA (Klimczack et al., 1992), l'interazione tra GBF e le 14-3-3 sia parte di un meccanismo di attivazione del complesso di trascrizione mediato da chinasi.

Di recente è stata anche osservata l'interazione delle 14-3-3 con i fattori di trascrizione VIVIPAROUS 1 (VP1) e con il fattore Em-binding protein 1 (EmBP1) coinvolti nell'espressione del gene dell'acido abscissico degli embrioni (Schultz et al., 1998). Il fattore EmBP1 contiene un dominio "leucine zipper". L'associazione con tale dominio sembra essere una caratteristica conservata per le 14-3-3. L'isoforma GF14 ω di *Arabidopsis* e

l'isoforma GF14-12 di *Z.mays* interagiscono con un dominio bZIP localizzato a monte del dominio PHD (Plant Homeo Domain) caratterizzante una classe di proteine contenenti omeodomini (Halbach et al., 2000)

La reale funzione delle 14-3-3 nel complesso di trascrizione non è ancora stata del tutto chiarita: esse non legano direttamente il DNA ma è stato ipotizzato che agiscano da mediatori nell'interazione tra fattori diversi favorendo l'assemblaggio del complesso di trascrizione (Lu et al., 1992). Di recente, è stato proposto che le proteine 14-3-3 possano regolare la trascrizione genica controllando la localizzazione intracellulare di fattori di trascrizione. RSG (Repression of Shoot Growth), un attivatore trascrizionale bZip coinvolto nella regolazione della sintesi delle gibberelline, è localizzato sia all'interno che all'esterno del nucleo. Il legame con le 14-3-3 ne regola negativamente l'attività trattenendolo nel citoplasma (Igarashi et al., 2001); meccanismo analogo a quello proposto nella regolazione della protein fosfatasi Cdc25 in cellule animali (Kumagai et al., 1998).

Un'altra caratteristica, attribuita recentemente alle 14-3-3, sembra essere il loro coinvolgimento nell'importazione delle proteine nel cloroplasto e nel mitocondrio. May e Soll (2000) hanno evidenziato l'esistenza di un sito fosforilato e riconosciuto dalle 14-3-3, a monte della sequenza segnale di proteine dirette al cloroplasto e al mitocondrio. Sorprendentemente di recente è stata anche evidenziata la presenza di 14-3-3 nel cloroplasto e nel mitocondrio, malgrado l'apparente assenza di alcun segnale di trasporto. Nel mitocondrio, in particolare, le 14-3-3 sono state riscontrate nella matrice e associate alla superficie interna delle membrane interne (Bunney et al., 2001). Inoltre, le 14-3-3 sono coinvolte nella regolazione della F₀F₁ ATP sintasi presente negli organelli appena citati (Bunney et al., 2001). La 14-3-3 si lega all'enzima, inibendolo, secondo un meccanismo dipendente dalla fosforilazione.

Le proteine 14-3-3 vegetali sembrano avere un ruolo importante anche nei processi di adattamento della pianta agli stress ambientali. In diversi casi è stato osservato infatti un incremento dell'espressione delle 14-3-3 in risposta a stimoli esterni. Jarillo et al., (1994) hanno dimostrato che in condizioni di bassa temperatura si ha l'induzione dell'espressione di due geni codificanti le 14-3-3 in fusto, foglie e fiori di *Arabidopsis*.

Anche l'ipossia stimola la sintesi di proteine 14-3-3 e in mais è stato verificato provocare l'aumento dell'isoforma GF14-12 (de Vetten e Ferl, 1995). Un comportamento differente si ha in seguito all'adattamento alle condizioni di stress salino; la salinità sembra regolare negativamente l'espressione delle 14-3-3, come dimostra la diminuzione dei livelli di

mRNA trascritto in cellule di tabacco pretrattate con NaCl (Chen et al., 1994).

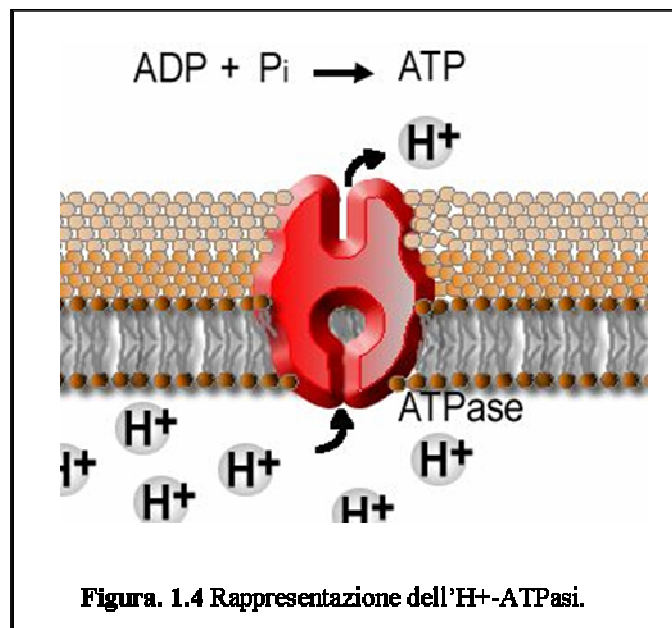
Le proteine 14-3-3 sembrano coinvolte anche in meccanismi di difesa della pianta da patogeni; mediante analisi di Northern blotting, alcuni autori hanno osservato il forte incremento dell'espressione di un gene delle 14-3-3 in foglie di orzo trattate *in vivo* con un fungo patogeno. Il reale ruolo delle 14-3-3 in tal caso non è ancora noto; è stato proposto che intervengano modulando l'attività di protein chinasi (Aitken et al., 1992).

Come osservato già per le cellule animali, le 14-3-3 svolgono la loro attività anche a livello della membrana plasmatica. Studi elettrofisiologici mediante esperimenti di patch-clamp in piante di tabacco che sovraesprimevano due isoforme di 14-3-3 di fava, vf1433a e vf1433b, hanno evidenziato un aumento della corrente in uscita di K^+ , suggerendo indirettamente un coinvolgimento delle 14-3-3 nel mediare l'attivazione dei canali del potassio a dipendenza di voltaggio (Saalbach et al., 1997). Anche l'aggiunta di 14-3-3 di pomodoro a protoplasti di pomodoro comporta un aumento della corrente in uscita di K^+ (Booij et al., 1999).

L'interazione meglio studiata però tra 14-3-3 e proteine della membrana plasmatica è certamente quella con l' H^+ -ATPasi.

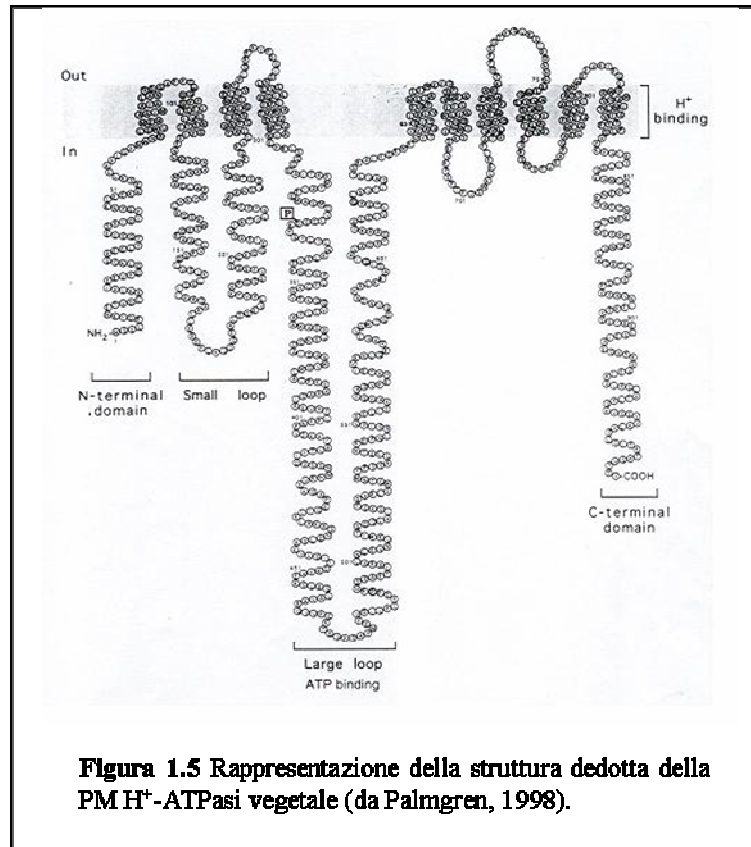
1.6 Le H^+ -ATPasi di membrana plasmatica (PM): struttura e funzioni

Tra le ATPasi di tipo P, l' H^+ -ATPasi di membrana plasmatica riveste un ruolo di primaria importanza nella nutrizione e nella crescita delle piante (Serrano, 1989; Palmgren, 1998). Con la sua basilare capacità di estrarre protoni (Fig. 1.4) essa è in grado di generare un potenziale elettrico ed un gradiente di pH attraverso la membrana plasmatica; proprio questo è il meccanismo con cui vengono mantenuti da un lato, valori di pH compatibili con le attività enzimatiche cellulari, e dall'altro, un gradiente elettrochimico costituente la forza guida per le attività delle principali proteine di trasporto.



Le H^+ -ATPasi sono state identificate sia a livello genico che biochimico in alghe, funghi e piante e mostrano tra loro un'elevata omologia, che ha permesso di identificare diversi motivi altamente conservati (Axelsen e Palmgren, 1998). Sono proteine integrali di membrana con un peso molecolare stimato di circa 100 kDa. Studi di predizione della struttura secondaria e diagrammi di idropatia hanno suggerito una struttura comune

con due principali domini idrofili e dieci segmenti transmembrana (figura 1.6). L'immagine cristallografica, ad una risoluzione di 8 Å, della PM H⁺-ATPasi del fungo *N. crassa* ha confermato la presenza di queste dieci regioni (M1-M10) le quali risultano connesse da una porzione citoplasmatica, che rappresenta la maggior parte dell'enzima, e da una piccola estensione sulla faccia extracellulare (Auer et al., 1998).



Il ciclo catalitico proposto per la PM H⁺-ATPasi si basa su modelli ottenuti su enzimi animali. Lo schema generale prevede due distinti stati conformazionali dell'enzima definiti E1 ed E2. Le due conformazioni avrebbero una differente affinità per il catione da trasportare e presenterebbero una diversa reattività nel sito di legame all'ATP, il quale può essere fosforilato dal fosfato γ dell'ATP nello stato E1 o dal Pi nello

stato E2 (MacLennan et al., 1997). Sia per lievito che per le piante sono stati evidenziati degli intermedi fosforilati della PM H^+ -ATPasi (Amory et al., 1980; Vara e Serrano, 1983). In generale l'ATP, sotto forma di Mg-ATP, ed il protone legano la forma E1, si forma un intermedio fosforilato ad alta energia e l'ADP viene rilasciato. A questo punto un cambio conformazionale converte la forma E1 in E2 con il rilascio del protone all'esterno. Infine il Pi viene rilasciato e l'enzima resta nello stato E2. Il passaggio limitante sarebbe proprio il ritorno da E2 ad E1, in quanto l'ortovanadato, che mima il Pi, è in grado di bloccare l'enzima nella forma E2 (Briskin et al., 1992).

L'energia generata dalla H^+ -ATPasi viene utilizzata per l'assunzione ed il flusso di ioni e metaboliti attraverso la membrana plasmatica. A livello della radice, nutrienti essenziali, come il nitrato ed il solfato, sono trasportati nella cellula contro un gradiente elettrochimico mediante l'accoppiamento del flusso di H^+ con simporti anionici (Tsay et al., 1993; Huang et al., 1996; Smith et al., 1995).

Il saccarosio, principale prodotto della fotosintesi, deve essere trasportato, a livello della foglia, al floema e ridistribuito a tutta la pianta. Il saccarosio viene quindi "caricato" negli elementi cribrosi. La concentrazione di zucchero negli elementi cribrosi è maggiore rispetto alle altre cellule ed il trasporto avviene quindi contro un gradiente di concentrazione. L'attiva estrusione, e quindi l'accumulo di protoni nell'apoplasto, da parte dell' H^+ -ATPasi delle cellule compagne e degli elementi cribrosi, genera la forza proton motrice utilizzata da un simporto H^+ /saccarosio (Sander e Slyman, 1989).

La H^+ -ATPasi è coinvolta anche nella regolazione del turgore cellulare. Questo è necessario per la crescita cellulare, la traslocazione nel floema, l'apertura degli stomi, come pure per i movimenti fiorali e fogliari. L'apertura e la chiusura degli stomi fogliari dipende dalle cellule di guardia. In queste, l'attività della pompa protonica porta all'iperpolarizzazione della membrana plasmatica e alla conseguente entrata di K^+ , mediante l'apertura dei canali di rettificazione e di simporti anionici per l'influsso di Cl^- . Come conseguenza si ha anche la produzione di acido malico, con funzione di contro-ione. L'aumento della concentrazione di soluti nella cellula richiama acqua che determina il rigonfiamento della cellula di guardia e l'apertura dello stoma (Schulz-Lessdorf et al., 1994).

Nella risposta a stress salini si è osservato un diretto coinvolgimento dell' H^+ -ATPasi. Il sodio è altamente tossico per i vegetali ed è in grado, rimpiazzando l' H^+ , di entrare nella cellula mediante un cotrasportatore H^+/K^+ . Per eliminare il Na^+ , la pianta marina *Zostera marina*, esprime ad alti

livelli, sulle membrane plasmatiche delle cellule dell'epidermide fogliare, una PM H^+ -ATPasi (ZHA1) la quale agisce in concerto con un antiporto H^+/Na^+ (Fukuhara et al., 1996).

Come diretta conseguenza dell'attività della pompa protonica vi è la regolazione del pH intracellulare. L'alcalinizzazione del citosol, che risulta dall'incremento dell'attività dell' H^+ -ATPasi, influenza l'attività di molte proteine. Ad esempio è stato osservato come, variazioni del pH citosolico, sono alla base dell'interruzione della dormienza dei semi (Espen et al., 1995). Nei funghi e nelle cellule animali, l'alcalinizzazione sembra essere richiesta per l'inizio della sintesi del DNA e per la divisione cellulare (Busa et al., 1982). Di contro, l'acidificazione del citosol e/o l'alcalinizzazione dello spazio extracellulare prendono parte alle risposte di difesa della pianta indotte da elicitatori prodotti da organismi patogeni (Felix e Boller, 1995; Granado et al., 1995). Inoltre eventi che portano all'acidificazione del citoplasma, risultano associati alla produzione di metaboliti secondari ad altre risposte di difesa.

Le variazioni del pH sembrano essere direttamente responsabili dei processi di crescita per distensione nelle piante, secondo quella che viene definita "teoria della crescita acida" (Rayle e Cleland, 1970). La crescita cellulare inizia con il "rilassamento" della parete, seguito dall'aumento di volume della cellula sotto la pressione di turgore ed infine con la sintesi e la compattazione di nuova parete. Il rilassamento della parete richiede acidificazione dell'apoplasto a valori di pH tra 3,5 e 4. Il pH acido attiva le espansine (McQueen-Mason et al., 1992), una famiglia di proteine in grado di indurre l'estensione della parete in condizioni di acidità, interferendo con la formazione di legami H tra le microfibrille di cellulosa (Cosgrove, 1993). Infine è stato proposto un ruolo dell' H^+ -ATPasi anche nello stabilire la polarità cellulare e nella crescita unidirezionale del tubo pollinico, delle radici e dei germogli (Palmgren, 1998). Un ruolo è stato indicato da Stenz e collaboratori per la risposta gravitropica delle radici, in quanto la pompa protonica risulta abbondantemente espressa nelle cellule della cuffia radicale (Stenz et al., 1993).

Le importanti funzioni svolte dall' H^+ -ATPasi di membrana plasmatica in numerosi processi fisiologici, suggeriscono che l'attività dell'enzima sia strettamente regolata sia trascrizionalmente che post-traduzionalmente. E' noto, infatti, che fattori come luce, stress idrico, ormoni, metaboliti prodotti da patogeni, hanno come bersaglio proprio l' H^+ -ATPasi. In particolare, la luce blu induce l'apertura degli stomi stimolando la pompa protonica delle cellule di guardia (Serrano, 1988); ma anche condizioni di stress salino

incrementano in molte, anche se non in tutte le piante, la quantità di mRNA dell'H⁺-ATPasi (Niu et al., 1995; Roldan et al., 1991).

Nelle piante anche la concentrazione di sale sembra regolare l'espressione dell'H⁺-ATPasi. Piante tolleranti a più elevate concentrazioni di sale, mostrano un livello di espressione superiore rispetto alle controparti non tolleranti (Roldan et al., 1991).

L'auxina (acido 3-indolacetico) è un ormone vegetale coinvolto in numerosi processi fisiologici, tra i quali l'accrescimento per allungamento di giovani germogli e coleptili e l'estrusione protonica (Kutschera, 1994). Non è chiaro però se l'effetto sia dovuto all'attivazione diretta dell'H⁺-ATPasi o ad un aumento dei livelli di espressione genica. Alcuni autori hanno evidenziato come tessuti che rispondono all'auxina non mostrano incremento di H⁺-ATPasi (Cho e Hong, 1995). Altri invece (Hager et al., 1991) avevano trovato un aumento di circa l'80% di H⁺-ATPasi in coleottili di mais, in seguito a trattamento con auxina. Come hanno fatto notare Frias et al. (1996), essa è in grado di aumentare l'espressione del solo gene MHA2 di mais nei soli coleottili; tale effetto si verifica esclusivamente al livello del floema, ed è rilevabile analizzando esclusivamente il tessuto vascolare.

Maggior peso però, nel regolare l'attività della H⁺-ATPasi, hanno tutta una serie di alterazioni a livello post-traduzionali che coinvolgono direttamente la regione carbossi terminale (C-terminale) dell'enzima.

1.7 Il dominio autoinibitorio carbossi-terminale

Sia nei funghi che nelle piante, numerosi studi hanno messo in risalto come la porzione citoplasmatica carbossi terminale della H⁺-ATPasi agisca come un dominio autoinibitorio. Le prime evidenze vennero da studi condotti sull'effetto del glucosio sull'attività della H⁺-ATPasi del lievito *S. cerevisiae*. Quando le cellule di lievito venivano incubate in presenza di glucosio, si osservava una rapida acidificazione del mezzo extracellulare (Serrano, 1983) ed un'iniziale alcalinizzazione del mezzo intracellulare. La H⁺-ATPasi presente in preparazioni di membrana ottenute da cellule pre-incubate con glucosio presentava una riduzione della K_m per l'ATP, un aumento della V_{max} e lo spostamento del pH ottimale verso valori più alcalini ed un'aumentata sensibilità al vanadato (Portillo et al., 1989). L'espressione di una H⁺-ATPasi priva degli ultimi 11 aminoacidi (Glu908-STOP), aveva come effetto un'analogia attivazione dell'enzima anche in cellule depivate del glucosio. Specifici residui presenti in questa regione, e che influenzano l'attività della pompa protonica, sono stati individuati in lievito. Questi

residui caratterizzano due siti regolatori: uno è definito dai residui Arg-909 e Thr-912, che determinano la variazione della V_{max} in seguito ad attivazione dell'enzima, l'altro è individuato dalla Ser-899 e dalla Glu-901 ed è necessario per le variazioni di K_m (Portillo et al., 1991; Portillo et al., 1991). Analogamente, nelle piante un coinvolgimento del dominio C-terminale nell'inibizione dell'attività enzimatica è stato suggerito sulla base di numerosi risultati ottenuti sia per via biochimica che mediante approcci genetici. La rimozione, selettiva e controllata, mediante trattamento con tripsina, di un frammento di 7-10 kDa dell'estremità C-terminale della H^+ -ATPasi di pianta, aveva come risultato un'aumentata idrolisi di ATP ed estrusione protonica (Palmgren et al., 1990 e 1991). Si aveva inoltre uno spostamento del pH ottimale da 6.5 a 7 ed un aumento dell'affinità dell'enzima per l'ATP (Rasi-Caldogno et al., 1993; Johansson et al., 1993; Lanfermeijer e Prins, 1994). Un analogo risultato si è ottenuto esprimendo in lievito mutanti per il gene dell'isoforma AHA2 di *A. thaliana*, deleti per la sequenza nucleotidica codificante gli ultimi 66, 77, 92 o 96 aminoacidi. Diversamente, mutanti di delezioni per gli ultimi 38, 51 o 61 aminoacidi non erano sufficienti a produrre un enzima attivato (Palmgren e Christensen, 1993; Regenberg e al., 1995). Studi successivi hanno dimostrato come non fossero necessarie grandi delezioni per attivare l'enzima, ma erano sufficienti mutazioni puntiformi. Le H^+ -ATPasi di pianta, espresse in lievito, sono in grado di sostituire parzialmente l'enzima endogeno PMA1. Ma quando le cellule di lievito, contenenti l'enzima di pianta, vengono lasciate crescere per lunghi periodi, in condizioni in cui non viene espressa l'ATPasi endogena, compaiono delle mutazioni nel gene vegetale in grado di supportare la crescita del lievito (Baunsgaard et al., 1996; Morsomme et al., 1996). In tal modo sono state individuate mutazioni a carico di 19 aminoacidi nella regione C-terminale dell'isoforma PMA2 di *N. plumbaginifolia* (Morsomme et al., 1998,2000) e di uno per AHA1 di *A. thaliana* (Baunsgaard et al., 1996) in grado di attivare l'enzima. Questi mutanti mostravano una cinetica simile a quelli ottenuti per delezione, enzimatica o genetica, dell' H^+ -ATPasi. Per PMA2 l'analisi della distribuzione delle mutazioni ha messo in evidenza un loro raggruppamento in due regioni (Ala-852-Lys-871 e Arg-879-Val-895) concentrate però nella prima metà del dominio carbossi terminale (Morsomme P. et al., 1998). Una sistematica sostituzione in alanina degli ultimi 87 residui dell'isoforma AHA2 di *A. thaliana*, e l'espressione di questi mutanti in *S. cerevisiae*, ha evidenziato 5 residui in grado di promuovere la crescita del lievito a pH 4, e

tre di queste mutazioni coincidevano con altrettante in PMA2 di tabacco (Axelsen et al., 1999).

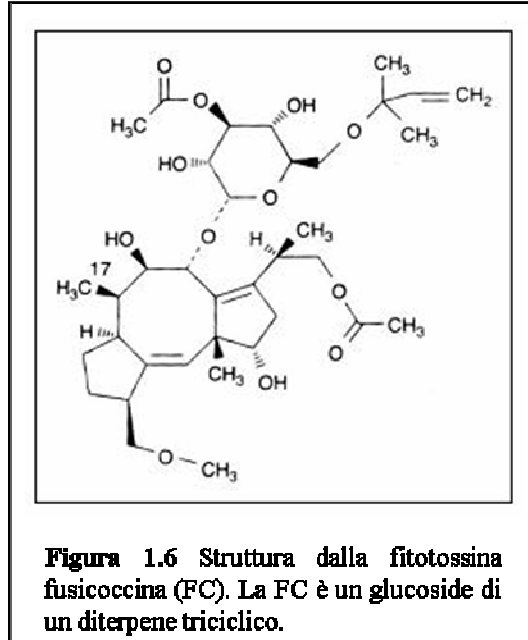
Come il dominio autoinibitorio agisca nel regolare l'attività enzimatica non è ancora chiaro. Due linee di evidenza suggeriscono che questo interagisca con il sito attivo dell'enzima. Nel lievito, mutazioni a livello del presunto sito di legame all'ATP sono in grado di sopprimere mutazioni del C-terminale che aboliscono l'attivazione dell'ATPasi (Portillo et al., 1991). Nelle piante, l'uso di un peptide di 32 aminoacidi, riprodotto la regione C-terminale di AHA2 di *A. thaliana* (Ala861-Gln888), inibiva l'ATPasi, attivata per trattamento con tripsina (Palmgren et al., 1991). Questi risultati suggeriscono un modello in cui, il dominio C-terminale interagisce, direttamente o indirettamente, con il dominio di legame all'ATP, limitando l'accesso al nucleotide, e con la regione che forma il canale protonico, bloccando il passaggio dell' H^+ (Portillo et al. 1989). Questo modello risulta simile a quello proposto per la Ca^{2+} -ATPasi di membrana plasmatica umana, hPMCA4, in cui la regione C-terminale interagisce con il sito attivo (Carafoli, 1992). Basandosi su questo modello e sui dati sperimentali, è lecito ipotizzare che eventi fisiologici, in grado di attivare la H^+ -ATPasi, debbano coinvolgere il dominio C-terminale ed eventualmente risultare in una modificazione conformazionale che allontani tale dominio dal sito catalitico.

1.8 Fusicoccina, proteine 14-3-3 e regolazione post-traduzionale dell'H⁺-ATPasi

In quest'ottica risultano di particolare importanza gli esperimenti di attivazione della H⁺-ATPasi per mezzo della fitotossina fusicoccina (FC) prodotta dal fungo *Fusicoccum amygdali*, patogeno delle piante del genere *Prunus*, come mandorlo e pesco. L'infezione del fungo induce avvizzimento delle foglie e la comparsa di zone necrotiche. In risposta all'infezione la pianta crea, nella zona colpita, delle barriere di sughero per arrestare l'invasione del fungo, ma segni dell'infezione si possono osservare anche in zone lontane dal punto di penetrazione del patogeno indicando come i responsabili dei sintomi siano dei metaboliti secondari. Nel 1964 Ballio e collaboratori isolarono la FC e fu così possibile determinarne la struttura (Ballio et al., 1964 e 1968). La FC è un glucoside di un diterpene triciclico, con un peso molecolare di 680 Da ed una formula grezza C₃₆H₅₆O₁₂ (fig. 1.6).

La tossina ha un ruolo diretto nell'infezione e si ritrova in grande quantità nelle zone infettate (Pini et al., 1979; Ballio et al., 1980) ed è la diretta responsabile della sintomatologia (Aducci et al., 1983). L'effetto della fusicoccina sembra mimare l'attività di alcuni ormoni ed è in grado di esercitare il suo effetto, non solo sulle specie del genere *Prunus*, ma anche su tutte le piante fino ad ora testate. I principali effetti della FC sono l'induzione dell'estruzione protonica, l'assunzione di potassio e l'iperpolarizzazione del potenziale elettrico di membrana (Marrè et al., 1974a e 1974b). Sulla base di questi fenomeni Marrè propose nel 1979 che la fusicoccina fosse coinvolta nell'attivazione della H⁺-ATPasi (Marrè, 1979). La prima prova a sostegno di questa ipotesi venne da esperimento *in vitro* utilizzando microsomi di ravanello (Rasi-Caldogno et al., 1985 e 1986). L'aggiunta di FC ai microsomi era in grado di stimolare l'idrolisi dell'ATP, la traslocazione protonica e l'iperpolarizzazione del potenziale di membrana. Lo stimolo da FC risulta rapido, entro il primo minuto, ed è saturabile a concentrazioni pari a 10⁻⁶-10⁻⁷ M (De Michelis et al., 1991). Maggiori informazioni, sugli effetti indotti dalla FC, sono state ottenute mediante lo studio di membrane plasmatiche preparate da piante trattate *in vivo* con la tossina (Schulz et al., 1990): membrane plasmatiche di piantine di avena, mostravano un aumento della V_{max} di idrolisi dell'ATP ma nessuna alterazione della K_m (Lanfermeijer e Prins, 1994), mentre vescicole di plasmalemma di ravanello o foglie di spinacio mostravano anche una diminuzione della K_m per l'ATP (Johansson et al., 1993). L'aggiunta di FC a

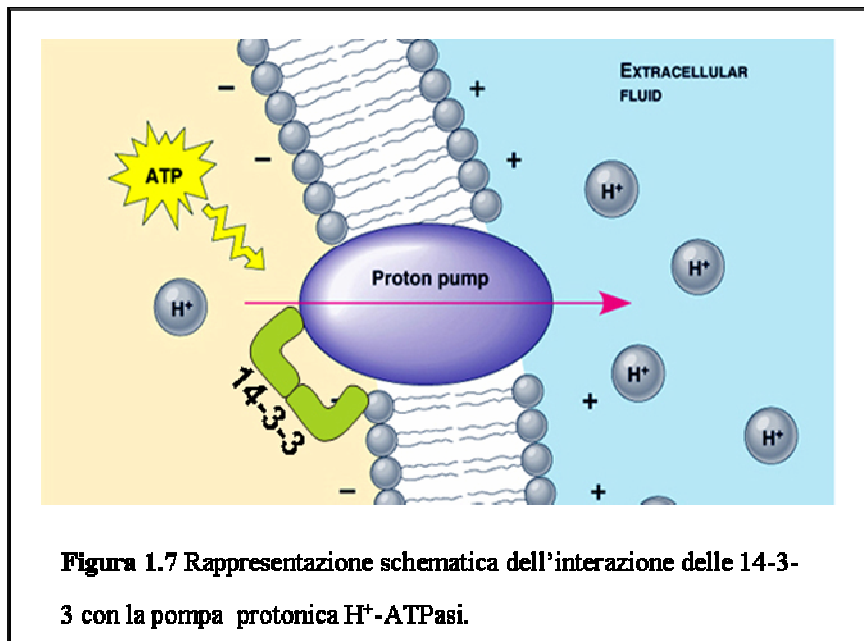
membrane plasmatiche trattate con tripsina non determina un'ulteriore attivazione dell'enzima (Johansson et al., 1993; Rasi-Caldogno et al., 1993).



L'interazione della FC con un recettore di membrana venne dimostrata per la prima volta nella frazione microsomale di coleottili di mais (Dohrmann et al., 1977), ed in seguito in tessuti e in piante diverse (Aducci et al., 1980; Aducci et al., 1993; de Boer et al., 1989; De Michelis et al., 1989). Agli inizi degli anni '90, grazie a metodiche cromatografiche diversi gruppi partendo da membrane plasmatiche o microsomi solubilizzati preparati da diverse piante trattate *in vivo* con FC, hanno ottenuto frazioni arricchite in due proteine con peso molecolare attorno ai 30 kDa (De Boer et al., 1989; Korthout et al., 1994; Oeking e Weiler, 1991; Aducci et al., 1993; Marra et al. 1994). Il sequenziamento di queste proteine ha rivelato la loro appartenenza alla famiglia delle proteine 14-3-3 (Marra et al., 1994; Korthout e De Boer, 1994; Oeking et al., 1994).

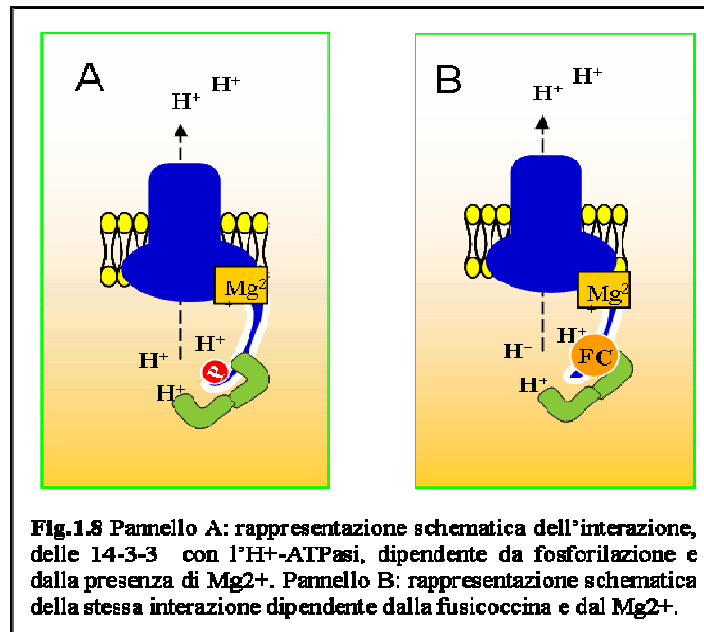
Diversi gruppi hanno dimostrato l'interazione diretta (figura 1.7) delle 14-3-3 col H^+ -ATPasi (Jahn et al., 1997; Oeking et al., 1997). È stato verificato che la H^+ -ATPasi copurifica con le proteine 14-3-3 in una forma attiva.

Mediante elettroforesi bidimensionale è stato inoltre osservato che, se purificate da tessuti trattati *in vivo* con FC, le due proteine risultano strettamente associate e che la rimozione proteolitica del dominio C-terminale della pompa protonica abolisce completamente tale interazione (Jahn et al., 1997; Oeking et al., 1997). Mediante il saggio di doppio ibrido in lievito, si è osservata l'associazione delle 14-3-3 con il solo dominio C-terminale isolato della H^+ -ATPasi, anche in assenza di FC (Jahn et al., 1997). L'interazione diretta tra 14-3-3 e il dominio C-terminale è stata dimostrata anche *in vitro*, con esperimenti di overlay, utilizzando il dominio C-terminale dell'isoforma di ATPasi di mais MHA2 espresso in *E. coli* come proteina di fusione alla GST.



In questo caso l'interazione si osservava solo in presenza della fitotossina (Fullone et al., 1998). Esperimenti di espressione eterologa del cDNA codificante per l'isoforma 14-3-3 di mais GF14-6 sia in *E. coli* che in lievito hanno dimostrato che la 14-3-3 da sola non è in grado di legare la fitotossina (Fullone et al., 1995; Visconti et al., 1996).

Studi di espressione dell'isoforma AHA2 di *A. thaliana* in *S. cerevisiae* hanno evidenziato come si crei il recettore per la FC solo se viene espressa la H⁺-ATPasi vegetale ed il numero di siti di legame per la FC aumenta con l'aggiunta di 14-3-3 esogene. (Baunsgaard et al., 1998). Al contrario, quando si aggiungono 14-3-3 a preparazioni di membrana di lievito in cui non sia espressa l'ATPasi di pianta, o in cui sia presente un mutante della AHA2 delecto degli ultimi 92 aminoacidi carbossi terminali, non si riscontra alcuna attività legante. Utilizzando lo stesso sistema di espressione eterologa e mutanti di delezione dell'H⁺-ATPasi è stato mappato, nel dominio C-terminale il sito minimo di interazione con le proteine 14-3-3 (Fulsgang et al., 1999). Tale sequenza è costituita dagli ultimi tre aminoacidi YT₉₄₇V per la AHA2 di *A. thaliana*. Questa sequenza differisce profondamente dai motivi canonici di legame alle 14-3-3 (tipo RSXpSXP). Inoltre richiede per il legame tra le 14-3-3 e la H⁺-ATPasi è richiesta la fosforilazione della penultima treonina.



Un peptide, riprodotto gli ultimi 16 aminoacidi del C-terminale, è in grado di legare le proteine 14-3-3 solo se fosforilato sulla Thr-947 (Fulsgang et al., 1999). Al medesimo risultato sono giunti anche Svennelid e collaboratori (Svennelid et al., 1999). Come atteso, la penultima treonina risulta conservata in tutte le H⁺-ATPasi vegetali fino ad ora caratterizzate, eccetto che nell'isoforma di mais MHA1, dove è sostituita da una prolina. A conferma, è stato osservato che l'isoforma di *N. plumbaginifolia* PMA2, espressa in lievito con una coda di sei istidine all'N-terminale, copurifica con le 14-3-3 di lievito. La pompa protonica così purificata risulta fosforilata a livello della penultima treonina (Thr955) e la defosforilazione *in vitro* comporta la perdita di interazione con le 14-3-3, anche in presenza di FC. Mutazioni T955A prevengono la complementazione dell'H⁺-ATPasi di lievito da parte di PMA2 di *N. plumbaginifolia* (Maudaux et al., 2000). L'importanza della fosforilazione della penultima treonina emerge anche dal confronto tra due isoforme di ATPasi di *N. plumbaginifolia*, PMA2 e PMA4 (Dambly e Boutry, 2000). Le due isoforme appartengono rispettivamente a due gruppi di PM H⁺-ATPasi, I e II, con caratteristiche enzimatiche diverse. Gli autori dimostrano che, quando espresse in lievito, PMA2 è maggiormente fosforilata sulla penultima treonina rispetto a PMA4, e questo è dovuto alla presenza in PMA2, in posizione -2 rispetto alla fosfotreonina, di un residuo di Serina che in PMA4 è sostituito da un'istidina. Mutazioni di PMA4 H953S portano ad un incremento della fosforilazione, del legame alle 14-3-3 e dell'attività dell'enzima (Dambly e Boutry, 2000).

Nel 2003 Würtele et al. hanno riportato la struttura cristallografica del complesso ternario di 14-3-3, fusicoccina e un fosfopeptide rappresentante il dominio C-terminale dell'H⁺-ATPasi. È stata così sottolineata l'importanza del residuo di valina, presente nel sito di interazione YTV della pompa protonica, nello stabilizzare il legame con la fusicoccina.

Già in passato, numerose evidenze avevano sottolineato l'importanza dello stato di fosforilazione dell'ATPasi nella sua regolazione. Nel 1998 Camoni e collaboratori hanno parzialmente purificato da membrane di radici di mais una protein chinasi, con caratteristiche riconducibili ad una CDPK (calcium-dependent protein kinase), in grado di fosforilare in modo specifico il dominio C-terminale dell'H⁺-ATPasi di mais MHA2 (Camoni et al., 1998a). Camoni e collaboratori hanno dimostrato come, il trattamento in vivo di radici di mais con acido okadaico (OA), un inibitori di proteina fosfatasi, comporti un aumento della quantità di 14-3-3 associate alla membrana e un incremento dell'attività enzimatica. Inoltre gli autori hanno purificato parzialmente, da radici di mais, una protein fosfatasi di tipo 2 (PP2A) in

grado di defosforilare *in vitro* la H⁺-ATPasi e di inibire l'interazione con le 14-3-3 (Camoni et al., 2000). In *V. faba* è stato dimostrato che, nell'apertura degli stomi, l'attivazione dell' H⁺-ATPasi nelle cellule di guardia indotta da luce blu è correlato alla fosforilazione del dominio C-terminale e ad una maggiore interazione con le 14-3-3 (Kinoshita e Shimazaki, 1999). Inoltre sempre in questo sistema, è emersa una specificità di legame tra la pompa protonica e specifiche isoforme di proteine 14-3-3. In particolare le isoforme vf14-3-3a e vf14-3-3b risultano altamente espresse nelle cellule di guardia, e vf14-3-3a mostra un profilo di espressione simile a quello della H⁺-ATPasi. Inoltre, l'analisi del profilo elettroforetico e l'identificazione dei frammenti di digestione con CNBr (bromuro di cianogeno) hanno chiaramente identificato vf14-3-3a come l'isoforma coinvolta nel legame alla H⁺-ATPasi di cellule di guardia (Emi et al., 2001).

Oltre alla fosforilazione, altri fattori fisiologici sembrano influenzare il legame delle 14-3-3 alla pompa protonica. Come dimostrato già per la nitrato reductasi (Athwal et al., 1998), il 5'-AMP risulta interferire negativamente con il legame tra la 14-3-3 e la H⁺-ATPasi (Camoni et al., 2001). Infatti, sia l'isoforma GF14 ω di *A. thaliana* che l'isoforma GF14-6 di mais, presentano un putativo sito di legame a nucleotidi tra l'elica 4 e 5. L' 5'-AMP potrebbe funzionare da secondo messaggero segnalando variazioni dello stato energetico della cellula. È infatti noto che, i livelli di questo nucleotide variano in risposta a vari stress, che hanno come effetto alterazioni dell'attività sia della NR che della H⁺-ATPasi (Camoni et al., 2001).

Nella regolazione dell'interazione dell'H⁺-ATPasi con la proteina 14-3-3, oltre la fosforilazione della pompa protonica, trova risalto anche lo stato di fosforilazione della stessa 14-3-3. Giacometti et al. (2004) hanno evidenziato come la fosforilazione del residuo tirosina 137, dell'isoforma GF14-6 di mais, porti ad una minor affinità della proteina per l'H⁺-ATPasi.

Recentemente è stato identificato, a livello dell'ansa citosolica che congiunge l'elica transmembrana 8 e la 9 della H⁺-ATPasi, un secondo sito putativo di legame alle 14-3-3, RSRS₇₇₆WSF nell'isoforma MHA2 di mais (Marra et al., 2000). Un fosfopeptide di 15 aminoacidi, contenente la sequenza e fosforilato sulla Ser-776, è risultato in grado di legare *in vitro* le 14-3-3 e di inibire il legame e la stimolazione di queste sull'H⁺-ATPasi, sia in presenza che in assenza di FC. Come osservato per altre proteine che legano le 14-3-3 (vedi Raf-1), la presenza di più siti di interazione potrebbe avere un ruolo importante nella regolazione dell'attività della proteina bersaglio (Marra et al., 2000).

1.9 Le poliammine

Le poliammine sono molecole organiche scoperte per la prima volta nel 1678 da Antoni van Leewenhoek nel liquido seminale umano. Dapprima considerate prodotti di decomposizione di composti organici oggi è riconosciuto loro un ruolo cruciale in numerosi ed importanti processi biologici sia procariotici che eucariotici (Smith, 1991).

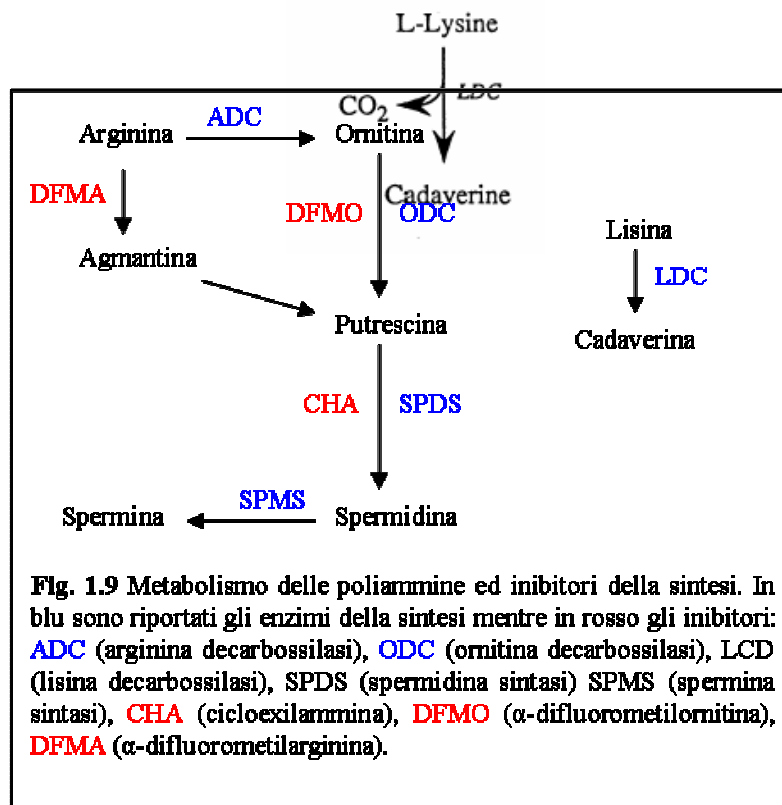
Le principali poliammine, Spermina, Spermidina, Putrescina e Cadaverina, sono piccole ammine alifatiche, cariche positivamente a pH fisiologico (Takeda et al., 1983). E' proprio questa caratteristica carica positiva a determinare i loro principali ruoli.

Putrescina:	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Spermidina:	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Spermina:	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Cadaverina:	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$

1.10 Struttura e metabolismo delle poliammine

Questi cationi organici sono sintetizzati, in mammiferi e fughi, seguendo un'unica via biosintetica. Dalla decarbossilazione dell'amminoacido ornitina e per mezzo dell'enzima ornitina decarbossilasi, si arriva alla formazione della molecola divalente putrescina (Tabor, 1984, Casero e Pegg 1993, Morgan, 1999). Le successive poliammine vengono sintetizzate per sequenziali addizioni di gruppi amminopropili alla putrescina. L'enzima spermidina sintasi porta alla formazione della spermidina e, successivamente, la spermina sintasi forma la spermina (Bey et al., 1987; Slocum, 1991a.). I gruppi amminopropilici provengono dalla decarbossilazione della S-adenosilmetionina per mezzo dell'enzima S-adenosilmetionina decarbossilasi, enzima coinvolto anche nella sintesi dell'etilene (Tiburcio et al., 1997; Kushad e Dumbroff, 1991).

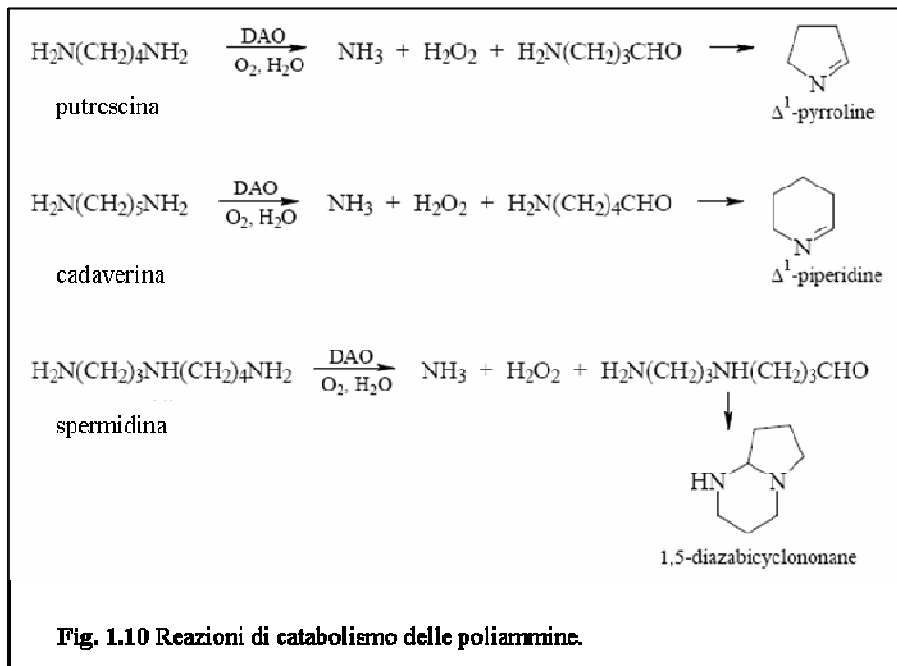
La cadaverina è l'unica poliammina ad essere sintetizzata a partire dalla lisina attraverso la lisina decarbossilasi (Schoofs et al., 1983).



Nelle piante, oltre questa via biosintetica, esiste un'altra via che porta alla formazione della putrescina. Il processo parte dalla decarbossilazione della L-arginina ad agmantina per mezzo dell'enzima arginino-decarbossilasi; le successive idrolisi, deaminazioni e decarbossilazione di quest'ultima portano alla formazione della putrescina per mezzo degli enzimi agmantina imminoidrosilasi e N-carbamoilputrescina amidoidrossilasi (Slocum, 1991). Per lungo tempo l'unico metodo per manipolare la concentrazione endogena di poliammine, e di sottolinearne così il significato fisiologico, è stato l'uso degli inibitori. L'ornitina decarbossilasi è inibita dall' α -difluorometilornitina (DFMO) (Metcalf, 1978). L'arginina decarbossilasi può essere inibita dall' α -difluorometilarginina (DFMA) (Kallio,1981). Il metilgliossal-bis-guanilidrazone (MGBG) è un potente inibitore della S-adenosilmetionil decarbossilasi (Pegg, 1987), mentre la spermidina è inibita dalla cicloexilammina (CHA) (Pegg, 1987).

Il pool intracellulare di poliammine libere non dipende solamente dalla loro via biosintetica, ma anche da molti altri processi: (1) la loro degradazione, (2) la quantità di poliammine coniugate, (3) il loro trasporto.

(1) La principale reazione di catabolismo è la deaminazione ossidativa catalizzata dalla diammina ossidasi (DAO) e dalle poliammina ossidasi (PAO). L'azione della diammina ossidasi sui gruppi amminici primari di putrescina, cadaverina, spermina e spermidina rilascia gruppi NH_3 e H_2O_2 mentre le amminoaldeidi derivanti da putrescina, cadaverina e spermidina, ciclizzano in modo spontaneo rispettivamente a Δ -pirrolina, Δ -piperidina ed 1,5-diazabicyclononano (Federico e Angelini 1991, Chol Ha et al., 1997).



L'azione della poliammina ossidasi, sui gruppi amminici di spermina e spermidina, produce invece 1,3-diamminopropano, H_2O_2 e le amminoaldeidi $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$, dalla spermidina, e $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ dalla spermina. Anche in questo caso i prodotti ciclizzano spontaneamente per formare rispettivamente Δ -pirrolina e 1,5-diazabicyclononano (Federico e Angelini 1991, Chol Ha et al, 1997).

Il catabolismo delle poliammine è solo un semplice processo di degradazione ma risulta essere legato al metabolismo stesso della pianta (Cona et al., 2006). L'enzima DAO, ad esempio, formando Δ -pirrolina e Δ -piperidina, è coinvolto nella biosintesi degli alcaloidi contenenti tali anelli (Smith e Wilshine, 1975). L'azione combinata di DAO e di altri enzimi porta la putrescina alla formazione di acido succinico, una via collegata al ciclo di Krebs (Flores e Filner, 1985). Infine le azioni combinate di DAO/PAO con le perossidasi presenti sulla parete cellulare vegetale contribuiscono al mantenimento della rigidità della parete stessa. (Iiyama et al., 1994).

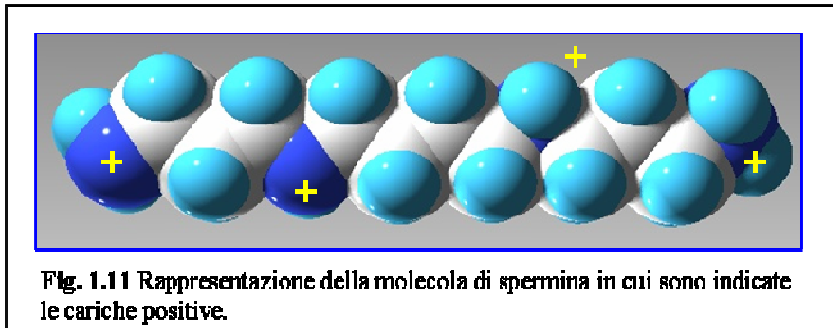
(2) Il termine di “poliammine coniugate” indica le poliammine legate covalentemente a composti di basso peso molecolare, come acidi fenolici, o a molecole più grandi come proteine (Waltes, 2003). Più specificatamente la classificazione in poliammine “libere” o “coniugate” dipende dalla loro differente solubilità rispettivamente in acido tricloroacetico o acido perclorico. Si conoscono tre tipi di poliammine coniugate: legate ad alcaloidi, ad acidi grassi e ad acidi idrossi-cinnamici (HCAAs) come il cumarico, ferulico e il caffeico (Smith, 1975, 1991).

(3) Il trasporto è forse il processo principale con cui la concentrazione di poliammine viene controllata (Seiler et al., 1996). Esso è innanzitutto dipendente dalla concentrazione stessa; se ad esempio viene inibita l'ornitina decarbossilasi, per supplire ad una diminuzione dei livelli di poliammine, viene incrementato il trasporto. Esso però, mentre sembra essere ben caratterizzato nei batteri, non lo è tanto nei mammiferi e nelle piante. In *Escherichia coli* sono descritti tre sistemi differenti: un trasportatore accoppiato all'ATPasi specifico per la putrescina, uno accoppiato all'ATPasi specifico per la spermidina e dei sistemi non accoppiati specifici per la putrescina (Seiler et al., 1996). Nei mammiferi i geni specifici per il trasporto non sono stati ancora identificati. Solo nelle cellule epiteliali degli alveoli, sono stati descritti due tipi di sistemi di trasporto sempre ATP dipendenti (Seiler et al., 1996). Nelle piante è stato descritto un trasporto bidirezionale ATP e Ca^{2+} dipendente (Bagni e Pistocchi, 1991). Il trasporto a lunga distanza è tutt'oggi in discussione anche se gli autori Bagni e Pistocchi (1991) hanno presentato diverse evidenze basate su numerosi sistemi: nelle mele la putrescina marcata viene traslocata dalle foglie al frutto e viceversa; nel mais e nel pomodoro la putrescina marcata viene seguita dalle radici fino ai coleoptili. Friedman et al.(1996) hanno anche dimostrato la presenza di poliammine nello xilema e nel floema.

1.11 Il ruolo delle poliammine negli eucarioti superiori

Gran parte dei ruoli delle poliammine sono dovuti alla loro caratteristica carica positiva che permette loro di legare molecole cariche negativamente. Ecco perché le ritroviamo coinvolte in numerosi processi come il controllo del ciclo cellulare, la proliferazione cellulare, il legame al DNA etc.

E' stato osservato che le diverse fasi del ciclo cellulare sono accompagnate da variazioni della concentrazione di poliammine endogene. (Satriano et al., 2001). Se a fibroblasti quiescenti, e quindi in fase G_0 , viene aggiunto del siero nel terreno di coltura, si osserva il passaggio prima nella fase S che culmina dopo 24 ore, seguita dalle fasi G2/M che culminano dopo 36 ore. In parallelo si è osservato un incremento dell'mRNA dell'ornitina decarbossilasi nelle prime 12 ore e poi un suo calo nelle rimanenti 48. Analogamente si comporta l'mRNA della SAMdecarbossilasi. L'mRNA dell'OAZ, la proteina che inibisce l'ornitina decarbossilasi, è invece minimo nelle prime 12 ore per poi incrementare nelle successive. (Betuzzi et al., 1999). E' noto che questa regolazione è indispensabile per il corretto funzionamento del ciclo cellulare. Anche l'importanza delle poliammine nella proliferazione cellulare è stata ben studiata (Betuzzi et al., 1999) E' stato infatti dimostrato il loro coinvolgimento nell'interazione con la fosfoproteina p53 che gioca un ruolo essenziale nella regolazione di geni coinvolti nella crescita e nella morte cellulare. (Li et al., 2001, Liang et al., 2004). Altre evidenze riguardano il legame diretto della spermidina al fattore di inizio eIF-5A il che è conformazionalmente modificato da tale legame (Tome et al., 1996).



Importante è anche il ruolo delle poliammine nello stabilizzare il DNA (Davidson et al., 1999) legandosi alle sue cariche negative.

E' stata anche sottolineata la loro capacità nel legare gli acidi nucleici come nel caso di OAZ: il trascritto di OAZ presenta 2 ORF e la presenza di poliammine produce uno shift di reading frame sul messaggero necessario per la corretta traduzione (Coffino, 2000).

Un accumulo eccessivo di poliammine favorisce l'apoptosi portando ad uno stress ossidativo causato da un aumento di perossido di idrogeno derivante dal loro catabolismo (Hoet e Nemery, 2000).

Le poliammine sono anche in grado di modulare l'attività di recettori come EGF (Johnson, McCormack, 1999). Inoltre, sempre a causa del loro carattere di policationi, le poliammine interagiscono con i fosfolipidi di membrana e giocano un ruolo cruciale nella regolazione degli enzimi legati a membrana (Moruzzi, 1993) E' stata dimostrata l'attivazione diretta di varie protein chinasi implicate nell'espressione di protoncogeni come myc, jun o fos (Johnson, McCormack, 1999) oltre all'interazione diretta con le proteine (Hoet e Nemery, 2000).

1.12 Il ruolo delle poliammine nelle piante

Le poliammine svolgono un ruolo cruciale anche nei meccanismi alla base della crescita e dello sviluppo della pianta; numerosi sono i dati che riconoscono il loro coinvolgimento in funzioni fisiologiche vegetali anche se ancora poco si sa riguardo il meccanismo molecolare (Smith, 1985; Evans e Mallberg, 1989; Bagni, 1989; Galston e Kaur-Sawhney, 1990). Esse si trovano distribuite in quasi tutti gli organi vegetativi e riproduttivi (radici, foglie, fiori, semi, tuberi, meristemi, xilema, floema e tessuti parenchimatici) (Evans e Malmberg 1989) localizzate principalmente nel vacuolo, nel nucleo, nei mitocondri, nei cloroplasti, nei ribosomi, nelle membrane (Slocum 1991b; Bagni e Pistocchi, 1991) e più recentemente anche nei tilacoidi di spinacio, associate al fotosistema II (Kotzabasis et al., 1993).

Come nelle cellule animali, anche in quelle vegetali le poliammine sono coinvolte nel ciclo cellulare. Il modello usato in tale ricerca è stato un organo che naturalmente è deficiente di poliammine, il tubero dormiente di *Helianthus tuberosum*. Lo stato di dormienza è caratterizzato da basse concentrazioni di poliammine, ormoni, DNA, RNA, proteine metaboliche e alti livelli di ABA. L'entrata in fase G1 del ciclo cellulare è accompagnata da un incremento della sintesi di poliammine, RNA e proteine. Si sono osservati due picchi massimi di poliammine: nella fase S e a metà della fase

di divisione cellulare. Gli inibitori della sintesi delle poliammine influenzano sia la replicazione del DNA che il ciclo cellulare. La dormienza del tubero viene inoltre interrotta dall'applicazione di poliammine (Serafini-Fracassini, 1991) Simili risultati sono stati ottenuti in cellule in coltura di *N.tabacum* (Pfosser, 1990).

In modo analogo è stato osservato un incremento di sintesi di poliammine anche durante la divisione cellulare che nelle piante avviene durante lo sviluppo embrionale e del fiore e nei tessuti meristemati. Anche in questi sistemi l'uso di inibitori interferisce con la divisione cellulare e l'uso di poliammine esogene supplisce a tale mancanza (Biasi et al. 1988; Egea-Cortines, 1991).

Galston e Kaur-Sawhney (1987) hanno osservato *in vivo* un declino dei livelli di poliammine e degli enzimi coinvolti nella loro biosintesi durante le fasi di senescenza. In precedenza le proprietà di antisenescenza delle poliammine erano state osservate nei protoplasti di avena in coltura (Brenneman and Galston, 1975). Anche in questi casi il meccanismo molecolare che ne è alla base è da ricercare nella loro natura policationica che contribuisce alla stabilizzazione delle membrane, all'interazione con gli acidi nucleici e con le proteine. In secondo luogo anche l'interferenza con la via biosintetica dell'etilene può spiegare il loro coinvolgimento nelle fasi di antisenescenza. Le poliammine infatti sembrano competere con l'etilene per un comune precursore, l'ACC (acido 1-amminociclopropencarbossilico) (Kaur-Sawhney and Galston, 1991).

Le poliammine trovano un ruolo anche nei fenomeni di risposta a stress abiotici come: bassi valori di pH, deficienze nutritive, variazioni osmotiche, basse temperature, alte concentrazioni di NH_4^+ , stress salini. In tutti questi casi è stato osservato un aumento dei livelli di putrescina. Pochi dati invece ci sono circa gli stress biotici. Si è osservato che foglie di frumento infettate con il fungo *Puccinia graminis* (Machatschke, 1990) oppure foglie di orzo infettate con *Puccinia hordei* (Greenland and Lewis, 1984) mostrano sempre aumento di putrescina. Nella maggior parte dei casi l'aumento dei livelli di putrescina è dovuta ad un aumento dell'attività dell'enzima ADC. La regolazione di tale enzima non è però ancora stata chiarita.

Alla luce di quanto esposto bisogna sottolineare che l'applicazione pratica di poliammine è ancora abbastanza circoscritta dalle limitate conoscenze riguardanti la loro biosintesi, il loro uptake, il loro trasporto, il loro reale meccanismo molecolare. Tuttavia numerosi studi sono stati condotti per mezzo di inibitori della loro sintesi: DFMO, DFMA, MGBG CHA (Slocum, 1991).

Recentemente è stato dimostrato che le poliammine rivestono un ruolo anche l'interazione delle 14-3-3 con la nitrato reduttasi di *Arabidopsis* (Athwal et al., 1998a; Athwal et al., 1998b; Athwal et al., 2002;). In particolare è stato visto che la tetrammina spermina è in grado di mimare lo ione divalente Mg^{2+} e promuovere così l'inibizione della nitrato reduttasi dipendente dalle 14-3-3. Come lo ione Mg^{2+} , infatti, la spermina lega 14-3-3 ed induce un cambiamento conformazionale che ne incrementa la superficie idrofobica (Athwal et al.,2002).

1.13 Sugar Sensing

Gli zuccheri sono composti essenziali per la sopravvivenza delle piante: svolgono un ruolo centrale nel metabolismo respiratorio e rappresentano il substrato per la sintesi di molecole più complesse, quali amido e cellulosa; inoltre essi forniscono i “blocchi strutturali” per la biosintesi di amminoacidi, di acidi grassi e di molti altri composti presenti nella pianta. Le prime ricerche condotte sulle cellule vegetali limitavano però agli zuccheri le sole funzioni di risorse sopracitate (Koch, 1996). Più recentemente si è invece compreso che gli zuccheri in aggiunta ai loro ruoli essenziali, sembra che si comportino in modo simile agli ormoni, come messaggeri primari della percezione (*sensing*) e trasduzione (*signaling*) del segnale (Rolland et al., 2002); in altre parole essi risultano coinvolti in vie di traduzione del segnale dette appunto “zucchero sensibili” (Sheen et al., 1999). In tutti gli organismi, sia procariotici che eucariotici, l’espressione genica sensibile ai carboidrati fa parte di un complesso sistema per rispondere alla scarsa disponibilità dei nutrienti. Specifici gruppi di geni rispondono in modo drastico ai cambiamenti ambientali che provocano una variazione delle risorse alimentari disponibili, permettendo di regolare la loro corretta distribuzione tra i tessuti e gli organi (Koch et al., 2000). Ad esempio in *Escherichia Coli*, l’organismo in cui meglio è compreso il meccanismo di “*glucose-sensing*” e “*glucose signaling*”, l’cAMP ed il suo recettore sono i principali geni repressi dal glucosio (Saier, 1991); nelle cellule di mammifero il glucosio stimola la sintesi di insulina (Nielsen et al., 1985; Efrat et al., 1991), la piruvato chinasi (Marie et al., 1993) e l’acetilcoenzima A (Brun et al., 1993).

Nelle piante, un’ampia varietà di geni sono regolati dagli zuccheri a livello trascrizionale includendo geni coinvolti nella fotosintesi, metabolismo del carbonio e dell’azoto, risposte a stress e metabolismo secondario. Poco ancora si sa circa l’effettivo meccanismo molecolare alla base di queste risposte (Rolland et al., 2002). In generale si è osservato che basse concentrazioni di zuccheri fanno aumentare la fotosintesi e la mobilizzazione delle riserve mentre l’abbondante presenza di zuccheri promuove la crescita e l’immagazzinamento di carboidrati (Koch, 1996).

Il saccarosio è la forma di zucchero maggiormente traslocata nelle piante e, per tale motivo, la più frequentemente studiata insieme al glucosio (Koch, 1996, Jang and Sheen, 1997; Gibson, 2004). Per tali zuccheri esistono due vie di trasduzione differenti. Ciò è stato evidenziato in casi, come nella repressione del gene coinvolto nella fotosintesi *cabZm5-cat*, in cui si è visto

che l'azione del glucosio può essere mimata da esosi come galattosio, fruttosio e mannosio ma non in maniera equivalente dal saccarosio (Jang and Sheen, 1997; Ehness et al., 1997).

La percezione degli zuccheri quindi, può essere definita come un'interazione, tra una molecola di zucchero ed un sensore proteico, in grado di generare nelle cellule una cascata di segnali e modulare così l'espressione di specifici geni. Per attivare le vie di trasduzione del segnale, innanzitutto gli zuccheri devono essere percepiti (Koch, 1996). Negli ultimi anni si sono accumulate evidenze sperimentali che fanno supporre, nei vegetali, l'esistenza di almeno tre distinte vie di percezione del segnale da zuccheri:

a) *Un sistema esoso chinasi dipendente, simile a quello dei lieviti ed animali.*

Uno dei processi più studiati di "sugar sensing" mediato dalle esochinasi è l'inibizione a feedback della fotosintesi: l'accumulo di carboidrati nelle foglie porta ad un'inibizione della fotosintesi e ad un concomitante decremento della proteina rubisco, di altri enzimi del ciclo di Calvin, e della clorofilla. Un importante meccanismo che sostiene tale feedback negativo è la repressione di molti geni fotosintetici conseguente l'accumulo di carboidrati. Una riduzione dei livelli di trascritti di RBCS (codificante la subunità minore della rubisco) è stata osservata anche in una sospensione cellulare di *Chenopodium rubrum*, quando coltivata in presenza di glucosio. Il metabolismo del glucosio è essenziale per la repressione: l'aggiunta di suoi analoghi non fosforilabili, come il 6-d-glucosio ed il 3-O-m-glucosio, non risulta infatti efficace. Jang e Sheen (1994) hanno utilizzato un sistema di espressione transiente di protoplasti di mais per monitorare gli effetti di una varietà di zuccheri analoghi al glucosio e di intermedi metabolici sull'attività di promotori di geni che codificano per enzimi fotosintetici. Essi hanno dimostrato che il glucosio ed altri esosi substrati delle esochinasi causano la repressione anche ad una bassa concentrazione (1-10 mM). L'analogo del glucosio 2-d-glucosio è un substrato per le esochinasi ma non viene ulteriormente metabolizzato, facendo così scartare l'ipotesi di un coinvolgimento della glicolisi o di altre vie metaboliche. Il mannoeptulosio, un inibitore delle esochinasi, è in grado di bloccare la repressione indotta dal 2-d-glucosio. Proprio sulla base di queste, e di altre numerose osservazioni, è stato proposto per le esochinasi un ruolo chiave nella percezione e nella trasduzione del segnale di repressione di geni fotosintetici.

b) Una via regolata da un sensore associato al trasportatore degli esosi.

Evidenze sperimentali circa la presenza di proteine trasportatrici di monosaccaridi con funzione di “signaling” derivano da esperimenti condotti con analoghi del glucosio che sono assorbiti dalle cellule, ma non fosforilati dalle esochinasi, come il 3-O-m-glucosio ed il 6-d-glucosio. In una coltura cellulare fotoautotrofa in sospensione di *Chenopodium rubrum*, l’aggiunta di glucosio o saccarosio induce l’espressione di geni codificanti per l’invertasi extracellulare e per la saccarosio sintasi; tale induzione può essere mimata dal 6-d-glucosio (Roitsch et al., 1995) suggerendo che il glucosio fosforilato rappresenti il segnale per l’espressione indotta da zuccheri di entrambi i geni. Questo tipo di “sugar sensing” sembra essere evolutivamente conservato, dal momento che è stato riportato anche per l’alga verde unicellulare *Clorella kessleri*. Questa alga è capace di crescere autotrofamente anche al buio su terreno contenente glucosio e l’attivazione, della crescita autotrofa mediante l’aggiunta di glucosio può essere mimato anche in questo caso dal 6-d-glucosio (Hilgarth et al., 1991).

c) Una via legata alla percezione specifica dei disaccaridi e mediata del trasportatore del saccarosio.

Numerose osservazioni suggeriscono che il saccarosio può essere percepito dalle piante come tale, cioè come molecola. L’induzione saccarosio-specifica dell’espressione genica è stata riportata per il promotore di diversi geni come rolC floema-specifico (Wenzler et al. 1989; Jefferson et al. 1990 Yokoyama et al. 1994). Dal momento che il saccarosio può essere prontamente idrolizzato a glucosio e fruttosio, è difficile stabilirne una funzione diretta. Di recente, è stato clonato un gene Leu zipper di *Arabidopsis*, ATB2, che è represso trascrizionalmente dal saccarosio a concentrazioni fisiologiche. Recentemente poi Loreti et al. (2000), hanno anche evidenziato come l’espressione dell’ α -amilasi in embrioni di orzo sia modulata in due distinti modi: una via glucosio dipendente ed una disaccaridi-dipendente.

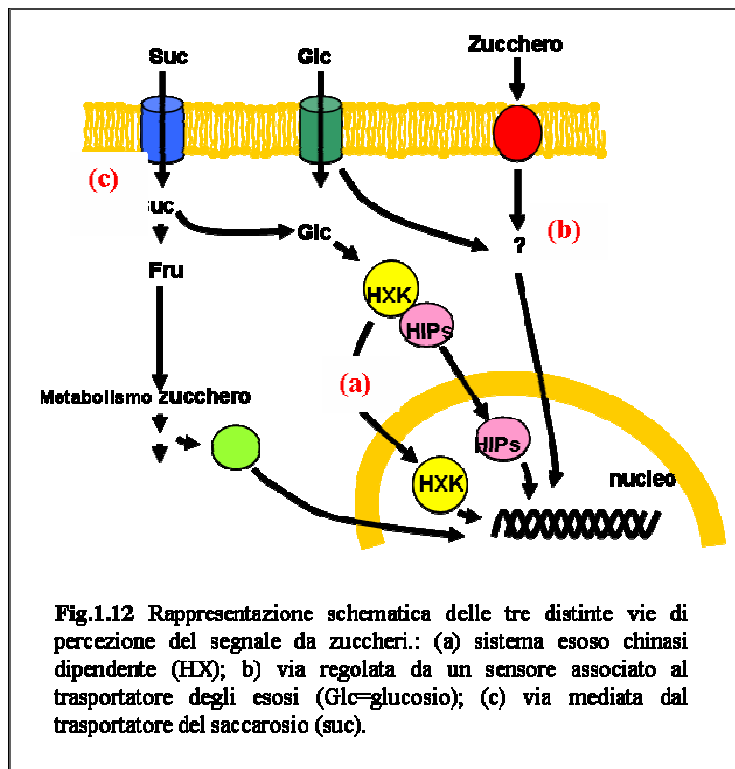


Fig.1.12 Rappresentazione schematica delle tre distinte vie di percezione del segnale da zuccheri.: (a) sistema esoso chinasi dipendente (HX); b) via regolata da un sensore associato al trasportatore degli esosi (Glc=glucosio); (c) via mediata dal trasportatore del saccarosio (suc).

1.14 Aspetti biochimici dello sugar-sensing

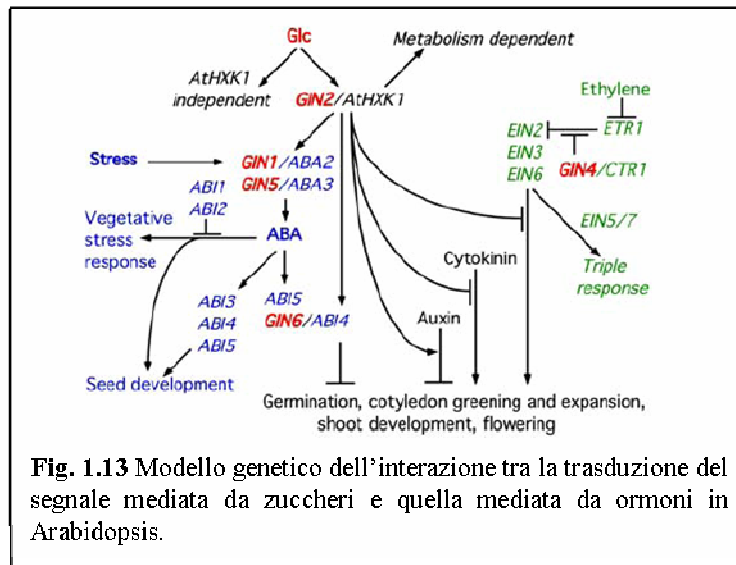
In contrasto con la situazione dei microrganismi, la maggior parte dei componenti delle cascate dello “*sugar signaling*” delle piante non sono stati ben caratterizzati (Rolland et al. 2002). Per indagarne i meccanismi di base sono stati effettuati numerosi esperimenti farmacologici, studi biochimici ed analogie ai sistemi di lieviti in sistemi di protoplasti di mais (Sheen et al. 1999). Uno dei più comuni meccanismi nella trasduzione del segnale è la fosforilazione e defosforilazione delle proteine; l’uso di specifici inibitori ha indicato il coinvolgimento di varie protein chinasi e fosfatasi nella trasduzione del segnale degli zuccheri (Rolland et al., 2002). Gli inibitori delle protein fosfatasi mimano la repressione da parte degli zuccheri dei promotori dei geni della fotosintesi (Sheen et al., 1999), risultato che correla con il ruolo nella repressione del glucosio (Ludin et al., 1998; Alms et al., 1999). Comunque, anche gli inibitori delle protein chinasi ad ampio spettro possono bloccare l’espressione dei geni fotosintesi, suggerendo un’interazione complessa delle protein chinasi e fosfatasi (Jang and Sheen, 1997). Una protein chinasi che gioca un ruolo nel controllo globale del metabolismo del carbonio delle piante è SnRK1 (protein chinasi 1), così chiamata per la sua omologia e similarità funzionale con la SnF1 di lievito (Halford et al., 2003). La SnF1 del lievito è stata descritta come uno dei componenti principale della percezioni della carenza di zucchero ed è richiesta per la “derepressione”, in mancanza di zucchero, di molti geni in precedenza repressi dal glucosio (Carlson, 1999; Dickinson, 1999). In particolare, SnF1 fosforila il repressore trascrizionale Mig1, causando la sua traslocazione al citoplasma e la derepressione di geni target (De Vit et al., 1997; Treitel et al., 1998). In più, SnF1 influenza direttamente il macchinario della trascrizione attraverso interazioni con il complesso mediatore dell’RNA polimerasi II e la fosforilazione degli istoni (Kuchin et al, 2000). Attraverso la “derepressione” di geni coinvolti nella conversione metabolica di fonti di carbonio alternative, SnF1 assicura sufficiente sintesi di ATP in lievito in assenza di glucosio (Rolland F. et al. 2002).

Negli anni recenti, analisi biochimiche e molecolari hanno rivelato l’esistenza di una grande famiglia di SnRK nelle piante, classificata nei sottogruppi SnRK1-2-3 sulla base di similarità di sequenza amminoacidica. Benché la caratterizzazione funzionale di queste proteine sia ancora ad un primo stadio, è stato proposto che esse agiscano come regolatori globali del metabolismo del carbonio nelle piante (Halford and Hardie, 1998).

1.15 Aspetti genetici dello sugar-sensing

Benché l'approccio biochimico abbia rivelato il coinvolgimento di proteine chinasi e fosfatasi nello "sugar signaling" delle piante, i target di queste molecole regolatrici e le loro funzioni fisiologiche restano elusive. Un approccio genetico, con l'uso di *Arabidopsis* come pianta modello, offre distinte strategie per analizzare i complessi meccanismi di percezione nelle piante (Rolland et al., 2002). Un potente metodo per caratterizzare le risposte delle piante agli zuccheri è quello di identificare, isolare ed analizzare i mutanti che sono difettivi in una o più risposte (Sheen et al., 1999; Smeeckens, 2000; Rook et al., 2001; Gibson, 2005). Tra i vari mutanti ricordiamo: "*Gin*" insensibile ad alti livelli di glucosio, "*sis*" insensibile ad alti livelli di saccarosio, "*gss*" ipersensibile al glucosio, "*sss*" ipersensibile al saccarosio. La maggior parte di questi mutanti sono stati identificati grazie a screen genetici basati sull'osservazione che mezzi di crescita con alti livelli di zucchero prevengono la costituzione di plantule. Ulteriori analisi fenotipiche di questi mutanti ipersensibili o insensibili agli zuccheri e il clonaggio molecolare dei loro geni corrispondenti stanno rilevando nuovi meccanismi della regolazione degli zuccheri. La loro caratterizzazione inoltre ha mostrato che molti di essi esibiscono difetti anche nel metabolismo dei fitormoni: ciò ha portato alla scoperta di interazioni dirette tra "signaling degli zuccheri e alcuni ormoni. Per esempio: il mutante *prl1* mostra un'augmentata sensibilità non solo agli zuccheri, ma anche all'acido abscissico, all'etilene, alle citochinine e alle auxine (Nèmeth K. et al., 1998). *Sis5* (Laby R.J. et al., 2000), *sun6* (Huijser C. et al., 2000) e *gin6* (Arenas-Huertero F. et al., 2000) sono allelici ad *abi4*; *sis4* (Laby R.J. et al., 2000) e *gin1* sono allelici ad *aba2*. L'acido abscissico e il glucosio possono agire nella stessa via, agendo l'uno o l'altro per primo: l'acido abscissico può agire attraverso una via di trasduzione del segnale che richiede ABI4, ma non ABI1, ABI2 o ABI3 per indurre l'espressione di un sensore del glucosio. Piante wild-type potrebbero produrre livelli relativamente bassi del sensore in risposta ad acido abscissico endogeno. Il glucosio endogeno potrebbe allora agire attraverso il sensore per causare bassi livelli di attivazione di una via che rallenta il primo sviluppo delle plantule. L'acido abscissico o il glucosio endogeno potrebbero allora portare ad una sovrastimolazione di questa via, inibendo fortemente il primo sviluppo delle plantule. Le piante che portano mutazioni in ABI4 dovrebbero essere

insensibili all'acido abscissico come risultato dell'incapacità di aumentare i livelli del sensore del glucosio in risposta all'acido abscissico. Queste piante, inoltre, dovrebbero essere insensibili al glucosio come risultato dei bassi livelli di sensore del glucosio prodotti in risposta all'acido abscissico endogeno.

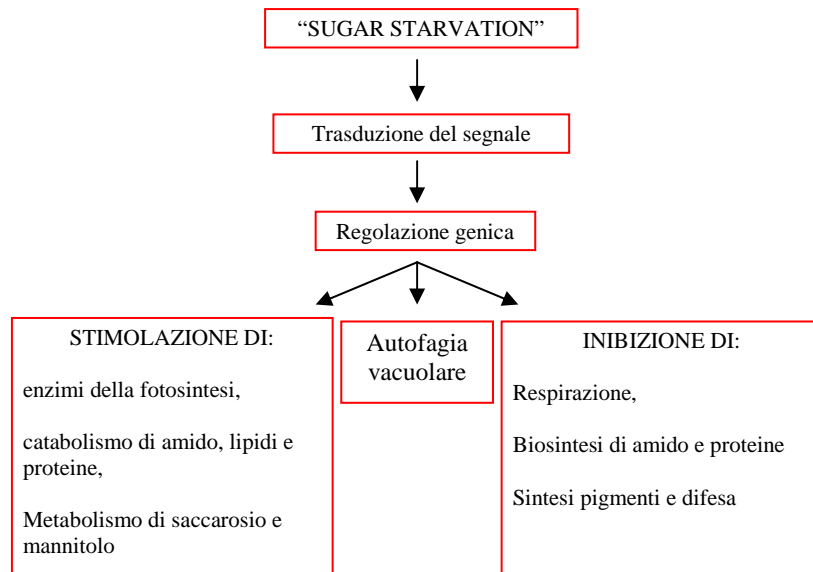


1. 16 Sugar Starvation

Da oltre vent'anni gli effetti della carenza da carboidrati è stata oggetto di studi condotti su diverse specie vegetali. Generalmente le piante sono considerate organismi autotrofi per il carbonio, tuttavia durante parte del loro ciclo vitale e negli organi non fotosintetici, come le radici, devono essere considerate eterotrofe (Su-May et al., 1999). Eventi comuni nella vita delle piante come la senescenza, l'attacco di microbi, insetti, erbivori o variazioni dell'intensità di luce o temperatura possono causare una diminuzione dell'efficienza della fotosintesi anche per lungo tempo; ciò comporta una notevole riduzione del "pool" di carboidrati disponibili per la cellula vegetale che è costretta a modificare i suoi normali processi metabolici.

Infatti una carenza da zuccheri prolungata provoca nella cellula dei vegetali i seguenti effetti:

- 1- l'arresto della crescita cellulare;
- 2- l'esaurimento del carbonio intracellulare e conseguente diminuzione della respirazione;
- 3- la degradazione di lipidi e proteine e la riduzione del quoziente respiratorio da 1 a 0,75;
- 4- un aumento del fosfato inorganico, della fosforilcolina e degli amminoacidi liberi ed una diminuzione dei nucleotidi e dell'attività degli enzimi coinvolti nella glicolisi;
- 5- la scomparsa di alcune ultrastrutture cellulari, come cloroplasti.



Il declino dell'attività metabolica risulta anche in un incremento dell'attività autofagica vacuolare (Journet E.P. et al. 1986, Chen M.H. et al., 1994). Poche ore dopo l'inizio della carenza di saccarosio il vacuolo comincia ad espandersi; prolungando il periodo di carenza il vacuolo raggiunge volumi estremamente grandi tanto da confinare il citoplasma e gli organelli lasciati fuori in piccole aree adiacenti la parete cellulare (Su-May et al., 1999). Studi condotti sulle radici di mais (Bronquisse et al., 1991) hanno mostrato come il livello di glucosio endogeno, che rappresenta il 50% del contenuto totale di carboidrati, decresca del 30% nelle prime 15-20 ore di carenza. Dopo questo tempo il livello di glucosio rimane costante fino ad 80 – 90 ore di carenza per poi decrescere fino a 0 dopo 120 ore. Dopo le prime 20 ore di carenza il pool di carboidrati non basta a sostenere la pianta ed inizia così la degradazione di proteine e lipidi. Anche l'attività degli enzimi del metabolismo degli zuccheri decresce ma non come il livello di glucosio endogeno: nelle prime 24 ore l'attività di questi enzimi diminuisce solo del 10% (Brounquisse et al., 1991; Brounquisse et al., 2006). La carenza da zuccheri si può quindi dividere in 4 fasi:

prime 20 ore: si verifica una riduzione del 30% del quoziente respiratorio ed una degradazione di zuccheri, proteine, lipidi e nucleotidi.

Dalle 20 alle 90 ore: la quantità di glucosio rimane costante ma la respirazione è sostenuta da substrati diversi dai carboidrati.

Dalle 90 alle 120 ore: il processo è irreversibile ed inizia la degradazione di alcuni tessuti come le membrane.

Oltre le 120 ore: inizio della morte cellulare.

È stato dimostrato come la carenza da zuccheri abbia un drammatico effetto sull'interazione delle proteine 14-3-3 con i loro bersagli. In cellule di *Arabidopsis*, la carenza da zuccheri porterebbe alla perdita del legame delle 14-3-3 con circa 30 proteine tra cui la nitrato reductasi, la gliceraldeide-3-fosfato, la saccarosio fosfato sintasi, la glutamil-tRNA sintasi (Cotelle et al., 2000). Ancora non è certo però se la perdita dell'interazione dipenda da modificazioni delle 14-3-3 che portino ad un abbassamento dell'affinità per le proteine bersaglio, oppure alla perdita della fosforilazione nel sito di interazione degli stessi "targets".

CAPITOLO 2

Obiettivo del lavoro

Le proteine 14-3-3 dagli anni '60, periodo della loro scoperta, ad oggi, non solo sono state riscontrate in tutti gli organismi eucariotici ma sono state attribuite loro delle funzioni chiave in numerosi processi vitali della cellula (Moore e Perez, 1967. Aitken et al., 1992; Ferl, 1996, Aducci et al., 2002). Tutte le 14-3-3 interagiscono con i loro targets in modo dipendente da fosforilazione, legando una sequenza consenso del tipo RSXp(S/T)XP o RXSXp(S/T)XP, dove p(S/T) sono una fosfoserina o una fosfotreonina (Yaffe et al., 1997). Studi più recenti hanno comunque evidenziato l'esistenza di sequenze consenso differenti sia nella sequenza aminoacidica, sia per l'assenza di un residuo fosforilato. L'interazione con la pompa protonica H⁺-ATPasi di membrana plasmatica vegetale rappresenta forse l'esempio più significativo. Si tratta della principale pompa protonica, presente sul plasmalemma, che fornisce, mediante estrusione attiva di protoni, la forza motrice per l'assunzione di ioni e nutrienti, la regolazione del pH citosolico, la crescita cellulare e l'osmoregolazione. Le 14-3-3 si legano all'H⁺-ATPasi in modo dipendente dalla fosforilazione per mezzo della sequenza YpTV, che costituisce gli ultimi tre aminoacidi della regione C-terminale dell'enzima. Un'altra caratteristica di questa interazione risiede nella capacità, anche in assenza di fosforilazione, di essere promossa e stabilizzata dalla fitotossina fusicoccina (FC) (Fulsgang et al., 1999; Svennelid et al., 1999).

Recentemente Athwal et al. (2000) hanno evidenziato anche un ruolo per le poliammine nell'ambito del sistema 14-3-3 ed enzima nitrato reductasi. In particolare, tali ammine risultano in grado di interagire con le 14-3-3 stimolandone così il legame e la conseguente inibizione della nitrato reductasi.

Nella prima parte di questa tesi, si è voluto approfondire un eventuale ruolo delle poliammine nel meccanismo molecolare che media l'associazione delle 14-3-3 all'H⁺-ATPasi. A tale scopo sono stati condotti saggi di attività enzimatica, per rilevare eventuali variazioni sia *in vitro* che *in vivo* dell'attività della pompa protonica in presenza di poliammine. Per questo tipo di indagine ci si è avvalsi anche dell'uso di inibitori della sintesi di poliammine. Per approfondire poi gli studi sulla diretta interazione delle poliammine con le 14-3-3 sono stati condotti esperimenti di overlay con l'intera H⁺-ATPasi, o con la sola regione C-terminale, in presenza e in assenza di poliammine. Infine, per individuare il sito di interazione presente sulle 14-3-3 sono stati creati dei mutanti sia puntiformi che di delezione della 14-3-3 ricombinante GF14-6 alterati nel dominio C-terminale ricco di

cariche negative e quindi presunto responsabile dell'interazione con le poliammine.

Nella seconda parte di questa tesi si è voluto analizzare l'effetto della carenza di zuccheri sull' H^+ -ATPasi. La "sugar starvation" è un fenomeno che si verifica spesso nella vita della pianta, essendo provocata da eventi in grado di alterare la normale attività fotosintetica, come variazioni climatiche o attacco di microrganismi. In tali condizioni viene modificata anche l'attività di molti enzimi: Cotelle et al. (2000) hanno dimostrato che numerosi enzimi regolati dalle 14-3-3, in condizioni di carenza da zuccheri, non solo perdono l'interazione con tali proteine, ma vengono sottoposti a degradazione. Si è così andati a verificare il destino della pompa protonica H^+ -ATPasi sottoposta a tale tipo di stress. Sono stati condotti saggi di attività fosfoidrolitica dopo incubazioni in vivo in condizioni di carenza da glucosio. In particolare si è verificato, mediante esperimenti di Western blotting e di overlay, se l'alterazione dell'attività della pompa dipendesse da una sua minor espressione o da una variazione dei livelli di proteine 14-3-3 ad esse associate. Inoltre, facendo uso di zuccheri non metabolizzabili si è voluto indagare se gli effetti indotti dalla carenza di glucosio fossero dovuti a shock osmotico, a un minor apporto di energia o all'attivazione/repressione di una via di trasduzione normalmente innescata da tale esoso. Una volta individuata l'esistenza di una via di trasduzione si è voluto anche chiarire se essa dipendesse dall'esochinasi o meno, se fossero coinvolte delle chinasi e se il processo fosse reversibile. Perciò sono stati condotti esperimenti in presenza di analoghi strutturali del glucosio, inibitori di protein chinasi ed inibitori di sintesi proteica.

CAPITOLO 3

Materiali e metodi

3.1 Prodotti e reattivi chimici

I seguenti prodotti e quelli per elettroforesi (analytical grade) sono della ditta Bio-Rad Laboratories (Hercules, California): poliossietilen-sorbitolmonolaurato (Tween 20), Coomassie brillant blue R-250, blu di bromofenolo, agarosio, soluzione di acrilammide/bisacrilammide 29:1, sodiododecilsolfato (SDS), ammonio persolfato (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TEMED), tris-idrossimetil-amminometano (Tris), glicina.

I seguenti prodotti sono della Sigma-Aldrich: fenilmetansulfonilfluoruro (PMSF) e gli altri inibitori di proteasi, acido 2-[N-Morfolin]etansolfonico (MES), acido 3-[N-Morfolin]propansolfonico (MOPS), acido N-[2-idrossietil]piperazin N'-[2-etansolfonico] (HEPES) e gli altri prodotti chimici. Dalla stessa ditta sono state acquistate anche il dominio catalitico della proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA), la sieralbumina bovina (BSA), la spermina, la spermidina, la cadaverina, la putrescina, le pellicole Polaroid 667.

Della Pierce (USA) sono: Triton X-100, il reattivo per il dosaggio delle proteine (Coomassie protein assay reagent).

I solventi, l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e l'acetato di potassio sono della Fluka Chemie (Svizzera), mentre i microelementi indicati nella tabella 3.1 sono stati acquistati dalla Merck (Germania).

Della Pharmacia Biosciences (Upssala, Svezia) sono: kit per la purificazione delle proteine di fusione alla glutatione S-trasferasi (GST) e la trombina. Dalla stessa ditta sono state acquistate le lastre autoradiografiche.

La membrana di nitrocellulosa per i saggi di far western blotting (overlay) è della Sartorius (Göttingen, Germany) e quella di polivinilidendifluoruro (PVDF) per l'immunoblotting è della Millipore Corporation (Bedford, MA).

I reagenti per i terreni di coltura e l'agar sono prodotti da Life Technologies.

Gli enzimi di restrizione e modificazione del DNA sono prodotti da Roche.

La fusicoccina è stata prodotta e purificata come descritto da Ballio et al. (1968).

Microelementi	Concentrazione
Ca(NO ₃) ₂	650 mM
KH ₂ PO ₄	250 mM
MgSO ₄	160 mM
NH ₄ NO ₃	750 mM
Fe EDTA	20 mM
KNO ₃	700 mM
ZnSO ₄	10 mM
H ₃ BO ₃	60 mM
MnSO ₄	22,5 mM
(NH ₄) ₆ MoO ₄	10 mM
CuSO ₄	25 mM

Tabella 3.1

3.2 Peptidi, oligonucleotidi e anticorpi

I seguenti peptidi sono stati sintetizzati da Neosystem (Strasbourg, Francia):

bL15V: biotynil-LKGLDIDTIQQNYTV

bL15Vp: biotynil-LKGLDIDTIQQNYpTV (dove pT è una fosfotreonina)

I seguenti oligonucleotidi sono stati prodotti dalla GENSET SA (Francia):

sono evidenziate in blu le mutazioni ed in rosso le basi sostituite per introdurre il sito SmaI per lo screening dei mutanti

D256-259A:

D256-259Aforw

5'GATTAGGGAGGCGCCCAAGCGGG**C**CTCGAGTG**C**GGG3'

D256-259Arev

5'CCC**G**CACTCGAG**G**CCCGCTTGGGCGCCTCCCTAATC3'

D240-E243-D244A:

D240-E243-D244AForw

5'GGACCTCTGCCATCTCGGCCGGCCCCCTGC3'

D240-E243-D244Arev

5'GCAGGGGCCGCCGAGATGGCAGAGGTCC3'

E247-E251A:

E247-E251Aforw

5'GGACCCTGCTGCAGAGATTAGGGCGGCGCCC3'

E247-E251Arev

5'GGGCGCCGCCCTAATCTCTGCAGCAGGGTCC3'

ΔC22:

ΔC22forw

5' CCTATGGACCTCTTAGATCCCGGGGGACCCTGC3'

ΔC22rev

5'CCAGGGTCCCCCGGGATCTAAGAGGTCCATAGG3'

I seguenti anticorpi sono stati acquistati dalla Biorad:

Anticorpi secondari di capra, coniugati alla perossidasi, diretti contro il frammento Fab degli anticorpi di topo (170-6516), usati 1/2000.

3.3 Ceppi e terreni di coltura per *Escherichia coli*

Per gli esperimenti di clonaggio è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* DH5a e per gli esperimenti di espressione il ceppo BL21(DE3). I ceppi vengono cresciuti in terreno LB (0,5% estratto di lievito, 1% bacto-triptone, 0.5% NaCl a pH 7.0 con l'aggiunta di 1,5% agar per le piastre) per tutti gli usi e in terreno SOB (0,25% estratto di lievito, 2% triptone, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl₂) per l'espressione delle proteine ricombinanti. Per la selezione dei ceppi viene utilizzato l'antibiotico ampicillina alla concentrazione di 100µg/ml.

3.4 Ceppi e terreni di coltura per *Saccharomyces cerevisiae*

Per l'espressione eterologa in lievito della PM H⁺-ATPasi AHA1 di *A. thaliana* è stato utilizzato il ceppo RS-72, contenente un plasmide in cui è clonato il cDNA codificante per la AHA1.

Per la crescita del lievito sono stati utilizzati i terreni SGAH (0,7% yeast nitrogen base, 0,2 mM adenina, 0,2 mM istidina, 2% galattosio, 50 mM Tris-succinato, pH 5.5) ed il terreno YPD (1 % estratto di lievito, 2% bacto-peptone, 2% glucosio). Il lievito viene cresciuto alla temperatura di 30°C.

3.5 Materiale vegetale e incubazioni *in vivo*

I semi di mais (*Zea mays* L. cv Corona) sono stati acquistati dalla Dekalb Monsanto (Mestre, Italia). I semi vengono idratati per una notte in acqua di rubinetto e fatti germogliare al buio, alla temperatura di 27°C in coltura idroponica. Per la preparazione delle vescicole di plasmalemma, le radici vengono recise dopo il 5° giorno di crescita al buio.

Gli apici radicali vengono incubati con FC (1µM), con le poliammine (0,2 mM) o con gli inibitori della sintesi di poliammine (0,5 mM) sotto vuoto per 1h in apposito tampone di incubazione pH 6.0 (0,33 M saccarosio, 10 mM acido tris-2-(N-morfolino)etanosulfonico).

Negli esperimenti di "sugar sensing" gli apici radicali vengono incubati per un periodo minimo di sei ore fino ad un massimo di 72 a 25 °C in un tampone costituito da: acqua sterile (39 ml), miscela di microelementi (vedi tabella 3.1), soluzione antibiotico-antimicotico (1:100) e, dove richiesto, uno zucchero (0,2 M). Per gli esperimenti della durata superiore alle 24 h, le radici vengono lavate, ogni 24 ore, in acqua sterile ed incubate in tampone fresco.

Gli zuccheri utilizzati per le incubazioni sono: glucosio, saccarosio, mannitolo, 3-O-metil-glucosio (3-OMG), 2-deossi-glucosio (2-d-Glc), lattulosio, palatinosio.

Alcuni esperimenti prevedono l'uso di acido ocaidaico (0,1 µM), microcistina (0,5 µM) e cicloeximide (200 µM).

3.6 Preparazione delle cellule competenti di *Escherichia coli*

A tale scopo una singola colonia batterica, del ceppo DH5 α o BL21(DE3), viene fatta crescere in 10 ml di terreno ψ (20 g/l Bacto triptone, 5 g/l estratto di lievito, 4 g/l % MgSO₄-7H₂O, 10 mM KCl, pH 7.6), a 37°C per 16 ore. Successivamente, la coltura viene diluita 1/200 in 500 ml di terreno ψ e fatta crescere a 37°C fino ad una densità ottica a 600 nm (OD₆₀₀) pari a 0,5. Le cellule vengono quindi recuperate per centrifugazione (5 min. a 4000 rpm, a 4°C, in centrifuga J2-21 Beckman con rotore JA-10), risospese in 150 ml di tampone A sterile freddo contenente 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂, 15% glicerolo a pH 5.8 ed incubate in ghiaccio per 90 minuti. Le cellule vengono di nuovo centrifugate come prima descritto, risospese in 20 ml di tampone B sterile freddo contenente 10 mM MOPS-NaOH pH 7.0, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% glicerolo ed aliquotate (200 μ l) in provette e conservate a -80°C.

3.7 Trasformazione delle cellule competenti

Il DNA plasmidico viene aggiunto ad un'aliquota (200 μ l) di cellule competenti ed incubato in ghiaccio per 20 minuti. La miscela viene quindi sottoposta a shock termico a 42°C per 90 secondi, diluita con 800 μ l di terreno LB e lasciata crescere a 37°C per 45 minuti. La sospensione cellulare viene infine centrifugata a 10000 g per 1 minuto in centrifuga da banco, risospesa in 200 μ l di H₂O sterile e piastrata su terreno LB/agar contenente l'opportuno antibiotico per la selezione. I trasformanti vengono recuperati dopo 16 ore di crescita a 37°C.

3.8 Estrazione del DNA plasmidico da cellule di *Escherichia coli*

A questo scopo è stato utilizzato il kit di estrazione "Qiaprep spin miniprep" (Quiagen, Germany). 5 ml di coltura di *E. coli*, contenente il plasmide d'interesse, viene cresciuta 16 ore in agitazione a 37°C. Le cellule sono raccolte per centrifugazione (10 min. a 3000 rpm in centrifuga CS-6R Beckman con rotore GH-3.7) e trattate secondo il protocollo Quiagen.

3.9 Elettroforesi in gel d'agarosio

L'analisi dei campioni di DNA viene eseguita come descritto in Sambrook et al. (1989). Il gel, contenente concentrazioni di agarosio tra 0,7-1,2%, a

secondo delle dimensioni del DNA da analizzare, viene corso in tampone TAE (40 mM Tris, 20 mM acetato, 1 mM EDTA). I frammenti vengono visualizzati mediante esposizione del gel, contenente bromuro d'etidio alla concentrazione di 0,1 mg/ml, ad una lampada UV (365 nm).

3.10 Costruzione dei mutanti dell'isoforma GF14-6 di mais

Per la mutagenesi del residuo d'Aspartato e Glutammato è stato utilizzato il metodo del "quick change" (Stratagene, La Jolla CA, USA). La metodica si basa sulla PCR e sulla caratteristica del DNA di nuova sintesi di non presentare residui metilati. Utilizzando come template pochi nanogrammi (20 ng) di un plasmide pGEX-GF (pGEX-2TK contenente il cDNA della GF14-6 e due primer contenenti la mutazione desiderata, lunghi 30-40 basi, con una elevata T_m ($> 70^\circ\text{C}$) e antiparalleli, è possibile amplificare l'intero plasmide. Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati nel par. 3.2.

Il successivo trattamento della reazione con l'enzima di restrizione DpnI (Roche), che taglia solo specifiche sequenze metilate, permette di degradare selettivamente il plasmide template, il quale essendo stato estratto da un organismo vivente risulta metilato a livello delle citosine, lasciando integro il plasmide di nuova sintesi, non metilato e contenente la mutazione.

25 ng di vettore pGEX-GF sono stati mescolati con tampone di reazione (Stratagene), 100 μM dNTP, 200 nM di ciascun primer, 10 unità di Taq DNA polimerasi Pfu Turbo (Stratagene) in un volume finale di 50 μl . In parallelo viene condotta, come controllo, una reazione senza Taq.

Il programma di PCR utilizzato è il seguente:

un ciclo di 30 sec. a 95°C ; 18 cicli di: 30 sec. a 95°C , 1min. a 55°C , 8 min. a 68°C ; un ciclo di 5 min. a 68°C .

Ciascuna reazione viene quindi incubata 2 ore a 37°C con 10 unità di DpnI (Roche).

Venti μl di reazione sono stati utilizzati per trasformare un'aliquota ciascuno di cellule competenti DH5 α ed i trasformanti sono stati selezionati su terreno contenente ampicillina.

Due cloni sono stati sequenziati per verificare l'avvenuta introduzione della mutazione. Tutte le reazioni di sequenziamento del DNA sono state eseguite dalla ditta Genelab (Italia).

3.11 Preparazione delle vescicole di plasmalemma

Le vescicole di membrana plasmatica di radici di mais sono state preparate secondo la metodica di Serrano (1988) con alcune modifiche.

250 g di radici di piantine di mais, cresciute come descritto nel paragrafo 3.5, vengono recise e tagliate in piccoli pezzi ed omogenate in Waring Blendor con 250 ml di tampone di omogenizzazione freddo (25 mM MOPS-BTP pH 7.8, 250 mM saccarosio, 5 mM EDTA, 2 mM DTT (ditiotreitolo), 1 mM PMSF, 0.2% BSA). L'omogenato viene quindi filtrato e centrifugato a 7000 rpm per 20 min a 4°C in rotore JA-20 con una centrifuga Beckman J2-21. Il sovrantante viene recuperato ed ulteriormente centrifugato a 40000 rpm per 35 min. a 4°C in rotore 45 Ti in ultracentrifuga Beckman. Il sedimento ottenuto rappresenta la frazione microsomale.

Il plasmalemma è purificato mediante una ripartizione tra fasi polimeriche secondo la metodica di Larsson et al. (1984).

Il sistema di fasi è costituito da 6.3% Destrano T-500, 6.3% PEG-4000, 250 mM saccarosio, 5 mM KCl, 5 mM fosfato di potassio pH 7.8.

I microsomi vengono risospesi in 6 ml di 5 mM fosfato di potassio a pH 7.8 contenente 0.2 mM PMSF e mescolati con 42 ml di fase 7.2% Destrano T-500, 7.2% PEG-4000, 285 mM saccarosio, 5.7 mM KCl e 5 mM fosfato di potassio a pH 7.8 per ottenere una composizione della fase come descritta in precedenza. La miscela viene mescolata, per inversione, numerose volte e quindi, per favorire la separazione delle fasi, centrifugata a 2000 rpm per 10 min. in rotore GH-3.7 con una centrifuga Beckman CS-6R.

La fase superiore, arricchita in plasmalemma, viene recuperata, diluita 1:4 con tampone di diluizione (10 mM MOPS-BTP pH 7.0, 250 mM saccarosio, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.4 mM PMSF) e centrifugata a 45000 rpm in rotore 55Ti con ultracentrifuga Beckman per 45 min. a 4°C. Il sovrantante viene scartato ed il sedimento viene risospeso in tampone GTED 20 (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glicerolo), aliquotato e conservato a -80°C.

3.12 Preparazione delle membrane di lievito

Le cellule utilizzate appartengono al ceppo RS-72 di *S. cerevisiae*, trasformate con un vettore contenente il cDNA dell'isoforma di PM H⁺-ATPasi di *A. thaliana* AHA1. Una singola colonia di lievito viene cresciuta 24 ore a 30°C in 10 ml di terreno SGAH (vedi paragrafo 3.4) in agitatore orbitale. La coltura viene quindi diluita in 200 ml di terreno SGAH e lasciata crescere, nelle medesime condizioni, per ulteriori 48 ore. La coltura viene infine diluita in 1 l di terreno YPD (vedi par. 3.4) e cresciuta a 30°C per altre 24 ore. Il passaggio dal terreno minimo con galattosio al terreno massimo con glucosio permette l'espressione della pompa protonica vegetale. Le cellule, cresciute in tal modo, vengono recuperate per centrifugazione a 1600 g per 20 min. a 4°C in centrifuga Beckman (rotore JA-10) e quindi risospese in 24 ml di H₂O deionizzata fredda.

Le cellule di lievito vengono distrutte mediante omogenizzazione a freddo con palline di vetro. A tal fine vengono preparati 4 tubi da centrifuga contenenti ciascuno: 23 g di palline di vetro (0,45 mm), 1,7 ml di tampone di lisi (10 mM DTT, 5 mM ATP, 5 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl, a pH 7,5), inibitori di proteasi [PMSF, chimostatina, pepstatina, leupeptina ed un cocktail di inibitori per lievito (Sigma)] e 6 ml di sospensione cellulare. I tubi vengono quindi agitati in vortex per 1 min. e raffreddati in ghiaccio, ripetendo per 8 volte l'operazione. Il supernatante viene recuperato in seguito a centrifugazione a 4°C per 15 min. a 1600g. Si centrifuga quindi per 45 min. a 96000 g. Il sedimento ottenuto, rappresentante le membrane totali di lievito, viene quindi risospeso in 4 ml di tampone STEAD 10 (1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM ATP, 10% saccarosio, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5).

Per purificare il reticolo endoplasmatico viene utilizzato il metodo descritto da Villalba et al. (1992), mediante un gradiente discontinuo di saccarosio. Sul fondo di un tubo da centrifuga, per rotore a bracci basculanti, vengono depositati in successione: 4 ml di tampone STEAD 35 (come lo STEAD 10 ma con saccarosio 35%) e 4 ml di tampone STEAD 25 (contenente saccarosio 25%), facendo attenzione a non mescolare le due soluzioni ed operando a 4°C. Al gradiente vengono delicatamente aggiunti 2 ml della sospensione di membrane di lievito e si centrifuga a 4°C, per 4 ore, a 38000 rpm in ultracentrifuga Beckman (rotore SW41). Il reticolo viene recuperato, mediante una pipetta Pasteur, all'interfaccia tra le soluzioni al 25 e 35% di saccarosio, aliquotato e conservato a -80°C.

3.13 Espressione delle proteine di fusione: crescita e lisi delle cellule, purificazione delle proteine fuse alla GST

Il protocollo prevede la crescita delle cellule batteriche in condizioni che favoriscono la trascrizione e la traduzione delle proteine esogene. Le proteine di fusione, così ottenute e presenti nel lisato cellulare, possono essere recuperate mediante cromatografia d'affinità.

Nel nostro laboratorio era già presente, oltre al costrutto per l'espressione della 14-3-3 fusa alla GST, GST-GF14-6 (clone pGEX-GF), anche il costrutto per l'espressione degli ultimi 103 aminoacidi della regione C-terminale della PM H⁺-ATPasi di mais, MHA2, sempre fusi alla GST, GST-C-Term (clone pGEX-CT). In quest'ultimo caso la sequenza codificante è stata clonata nel vettore pGEX-2T (Amersham Biosciences).

La metodica di seguito riportata è stata quindi utilizzata per l'espressione della GST-GF14-6 e dei vari mutanti .

Una singola colonia viene inoculata in 10 ml di terreno SOB, contenente l'opportuno antibiotico, e lasciata crescere 16 h a 37°C in agitatore orbitale LabLine (USA). Successivamente, la coltura viene diluita in 500 ml di terreno SOB fresco e lasciata nuovamente crescere a 37°C fino a che non si sia raggiunta una OD₆₀₀ pari a 0.6. A questo punto la trascrizione del gene esogeno viene indotta per aggiunta di IPTG (isopropiltio-β-D-galattoside), un analogo del lattosio. Per la GST-GF14-6 ed i suoi mutanti viene aggiunto 0.5 mM IPTG e l'incubazione viene proseguita per altre 5 ore a 37°C. La coltura batterica viene quindi centrifugata a 5000 rpm per 15 min in rotore JA-10 ed il sedimento cellulare viene recuperato. Per tutti i costrutti fusi alla GST le cellule vengono risospese in 10 ml di PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.2) contenente 0.1 mg/ml di lisozima e conservato a -20°C. e proteine vengono purificate mediante cromatografia d'affinità con una resina di sefarosio coniugata al glutatione (glutatione sefarosio 4B). Ad 1 ml di lisato vengono aggiunti 250 μl di resina, pre-equilibrata in PBS, e la miscela viene incubata 30 min a temperatura ambiente per permettere il legame al glutatione. Si centrifuga quindi a 2000 rpm per 2 min. a 4°C e si elimina il sovrantante. La resina viene quindi ripetutamente lavata con 10 volumi (rispetto alla resina) di PBS.

Le proteine legate alla resina possono quindi essere recuperate eluendo la proteina di fusione mediante l'uso di glutatione. La resina viene incubata per 3 volte con 1 volume di 10 mM glutatione (Sigma) in 50 mM Tris-HCl pH 8. Le eluizioni riunite, vengono aggiunti inibitori di proteasi (1mM PMSF, 20

$\mu\text{g/ml}$ chimostatina, 50 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina) e conservate a -20°C . Per la lisi delle cellule si procede sonicando la sospensione 15 secondi, per 10 volte con intervalli di 30 secondi, ad ampiezza 10 μm , con un sonicatore Soniprep 150 (MSE Scientific Instrument, Crawley, Inghilterra). Si centrifuga poi il tutto a 15000 x g per 15 minuti. Il supernatante sar  conservato a -20°C .

3.14 Dosaggio delle proteine

La concentrazione proteica viene determinata con il metodo di Bradford (1976), utilizzando la soluzione di Coomassie Protein Assay (Pierce). La curva di taratura viene costruita utilizzando concentrazioni note di BSA (albumina serica bovina). Il metodo ha una sensibilit  compresa tra 0.25 e 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di proteina. La lettura della concentrazione si esegue mediante spettrofotometro Smart Spec 3000 (BioRad) ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

3.16 Preparazione della proteina GF14-6 marcata radioattivamente

La proteina GST-GF14-6 ricombinante, e le corrispondenti mutate, pu  essere fosforilata *in vitro* grazie alla presenza, nella regione di giunzione tra la GST e la 14-3-3, di un sito fosforilabile dalla proteina chinasi AMP-ciclico dipendente (PKA).

A tale scopo, 100 μl di lisato cellulare di *E. coli* (contenente circa 50 μg di proteina ricombinante) sono incubati con 60 μl di resina di glutatione sefarosio 4B come descritto in 3.25.2. Dopo 3 lavaggi con tampone PBS, la resina, su cui   immobilizzata la GST-GF14-6, viene incubata 30 min. a 30°C con 30 μl di tampone HMK (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) a cui vengono aggiunte 10 unit  della subunit  catalitica della PKA (Sigma) e 25 μCi di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (3000 Ci/mole, Amersham), secondo la metodica descritta da Kung e Bekesi (1986). La reazione viene bloccata con l'aggiunta di 5 mM EDTA e la resina, recuperata per centrifugazione a 2000 g per 2 min., viene lavata ripetutamente con PBS per allontanare il radioattivo non incorporato.

La proteina marcata viene recuperata mediante trattamento con 1 unit  di trombina in 100 μl di PBS.

La quantit  di radioattivo incorporato nella proteina cos  recuperata, viene valutata mediante conta allo scintillatore di una piccola quantita. Generalmente si ottiene una resa pari a 2×10^8 cpm/mg di proteina.

3.16 Overlay

Questa tecnica permette di studiare le interazioni proteina-proteina. I campioni da analizzare vengono separati in elettroforesi in gel di poliacrilammide contenente SDS (SDS-PAGE), trasferiti su filtro di nitrocellulosa e successivamente incubati con la proteina GF14-6 radioattiva. La metodica, con alcune modificazioni, si basa su quanto riportato in Fullone et al. (1998).

I campioni da analizzare vengono separati in SDS-PAGE come descritto in Laemmli (1970). Terminata la corsa, le proteine vengono trasferite su di una membrana di nitrocellulosa, pre-equilibrata in tampone di trasferimento (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.01% SDS pH 8.3), mediante l'apparecchio semi-dry (BioRad) applicando una corrente costante di 15 V per 1.5 ore. La membrana, su cui si sono trasferite le proteine, viene recuperata, lavata per 10 min. in tampone H-tween (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.04% tween 20) e bloccata 1 ora, a temperatura ambiente ed in agitazione, con tampone H-tween contenente latte al 5%. La membrana viene quindi incubata per 16-18 ore a 4°C in agitazione, con tampone H-tween/latte 3% con l'aggiunta di 600.000 cpm/ml di proteina GF14-6 radioattivamente marcata come descritto in 3.17. Il filtro viene infine lavato più volte con tampone H-Tween, asciugato ed esposto ad una lastra autoradiografica a -80°C.

3.17 Western blotting

Le proteine da analizzare vengono separate mediante SDS-PAGE e quindi trasferite su membrana di PVDF (polivinilidene-difluoruro). La membrana viene pre-attivata per 30 sec. con metanolo ed equilibrata in tampone di trasferimento (39 mM glicina, 48 mM tris, 1 mM SDS, 10% metanolo). Il trasferimento viene condotto come descritto in 3.18 eccetto per il tampone utilizzato. La membrana viene quindi lavata in tampone T-TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20) e poi bloccata per 1 ora in tampone T-TBS a cui è stato aggiunto latte scremato al 5%.

Si procede quindi all'incubazione per 1-2 ore con l'anticorpo primario, all'opportuna concentrazione (vedi par. 3.2), in tampone T-TBS/latte 3%. Si lava quindi ripetutamente con tampone T-TBS e si procede, se necessario, all'incubazione per 1 o 2 h con un anticorpo secondario (1:2000), diretto

contro il primo e coniugato all'enzima perossidasi. Dopo lavaggio con T-TBS è possibile verificare l'interazione antigene-anticorpo mediante una reazione colorimetrica. Infatti in presenza di H₂O₂ (Sigma) e di 5'-cloronaftolo (Sigma), la perossidasi forma un precipitato blu scuro che permette l'individuazione del complesso antigene-anticorpo.

3.18 Saggio di legame della proteina radioattiva GF14-6 ai peptidi

Gli studi di attività di legame tra la 14-3-3 ed i peptidi, bL15Vp e bL15V (vedi paragrafo 3.2) sono stati condotti dopo immobilizzazione degli stessi su resina di streptavidina-agarosio (Sigma). I peptidi risultano infatti coniugati, all'estremità N-terminale, ad una molecola di biotina, la quale si può legare saldamente, ma non covalentemente, alla streptavidina.

A tale scopo 0.4 nmoli di peptide vengono incubate con 30 µl di resina streptavidina-agarosio per 1 ora a temperatura ambiente. Il peptide non legato viene allontanato mediante lavaggio della resina con tampone H-tween. La resina viene quindi incubata 1 ora a temperatura ambiente con 200 µl di tampone H-tween, contenente 3 µg (200.000 cpm) di proteina GF14-6 radioattiva, o della corrispondente mutata, e dove indicato con 10 µM fusicoccina (FC).

La resina viene quindi recuperata per centrifugazione a 2000 g per 2 min., lavata ripetutamente con tampone H-tween ed infine lasciata asciugare. La radioattività legata alla resina viene misurata mediante conta allo scintillatore.

In parallelo vengono preparati campioni contenenti la resina a cui non è stato legato il peptide. La radioattività che resta legata alla resina rappresenta l'aspecifico e viene sottratta alla radioattività totale.

3.19 Saggio di attività fosfoidrolitica dell'H⁺-ATPasi

La metodica seguita è quella descritta da Serrano et al. (1988).

20µg di reticolo endoplasmatico di lievito (oppure 40 µg di membrane di mais, vengono pre-incubati in 50 µl di tampone I (5 mM MgSO₄, 50 mM KNO₃, 5 mM NaN₃, 0,2 mM ammonio molibdato, 50 mM Tris-MES, a pH 7,2) per 15 min in presenza di proteina GF14-6 e di 0,2 M di spermina. Come controllo una stessa quantità di reticolo (o di membrane) viene anche pre-incubato in assenza di spermina o di proteina GF14-6. Viene inoltre preparato un controllo contenente 0,2 mM vanadato di sodio, uno specifico inibitore delle ATPasi di tipo P.

A ciascuna reazione vengono quindi aggiunti 10 µl di 100 mM ATP ed il volume viene portato a 500 µl con tampone I. La miscela viene incubata 30 min. a 27°C e la reazione di idrolisi dell'ATP viene bloccata con l'aggiunta di 1 ml di reagente F (0,5% SDS, 2% ammonio molibdato, 2% acido solforico). Si aggiungono quindi 10 µl di acido ascorbico al 10% che induce la colorazione blu della miscela di reazione. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di fosfato rilasciato. Tale rilascio, viene quantificato mediante misure di assorbanza a 740 nm. Il corrispondente valore, in moli di fosfato idrolizzato, si ricava per interpolazione con una retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di fosfato di potassio. Al valore determinato viene sottratto quello misurato in presenza di vanadato, corrispondente ad attività fosfoidrolitiche differenti dalla H⁺-ATPasi. L'attività specifica viene espressa in moli di Pi/min/mg di proteina.

CAPITOLO 4

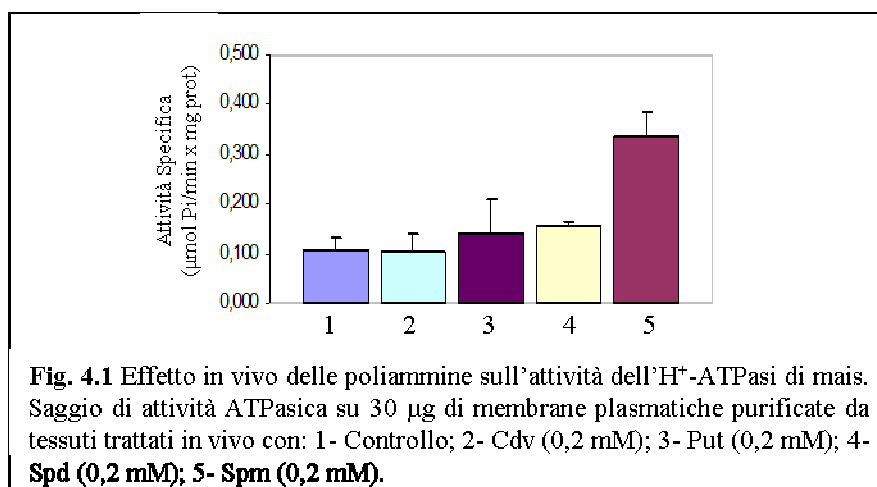
Risultati

PARTE I: Ruolo delle poliammine nell'interazione delle 14-3-3 con l'H⁺-ATPasi.

4.1 Effetto, *in vivo*, delle poliammine sull'attività dell'H⁺-ATPasi

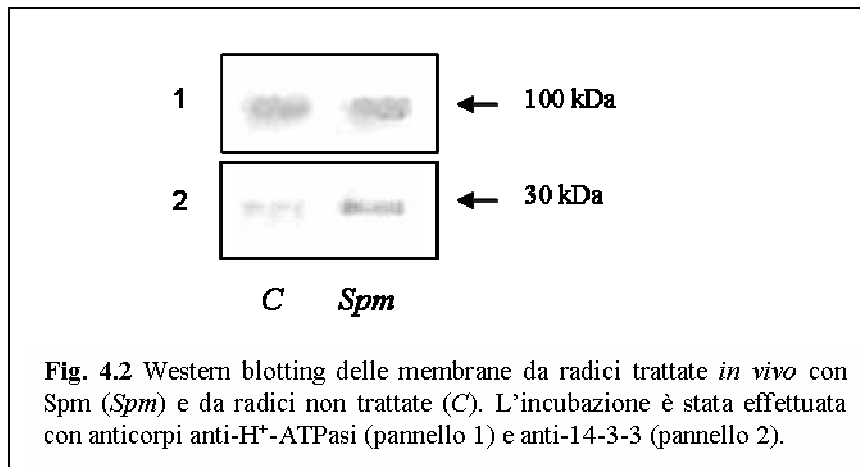
Studi recenti, condotti su varie specie vegetali come *Arabidopsis thaliana* o *Nicotiana plumbaginifolia*, hanno ben caratterizzato il ruolo regolativo delle poliammine nell'inibizione da parte delle proteine 14-3-3 dell'enzima bersaglio nitrato reductasi. (Athwal e Huber, 2002; Lillo et al., 2004). Sulla base di queste osservazioni, si è voluto indagare se le poliammine (PA) ricoprono un ruolo anche nell'interazione delle 14-3-3 con la pompa protonica H⁺-ATPasi di mais.

Per questo scopo si è proceduto con esperimenti *in vivo* volti a valutare l'eventuale variazione dell'attività fosfoidrolitica dell' H⁺-ATPasi in presenza delle principali poliammine Spermina (Spm), Spermidina (Spd), Cadaverina (Cdv) e Putrescina (Put). A tale scopo apici radicali di piantine di mais, cresciuto in coltura idroponica per 5 giorni al buio e a 24 °C, sono stati recisi in misura di circa 2 cm e incubati in apposito tampone (vedi par. 3.5) in presenza di 0,2 mM Spm, 0,2 mM Spd, 0,2 mM Put e 0,2 mM Cdv per 1 ora. Successivamente sono state purificate le membrane plasmatiche, secondo la metodica descritta nel par. 3.11.



I campioni ottenuti sono stati innanzitutto utilizzati in saggi di attività fosfoidrolitica secondo la metodica descritta nel par. 3.19. In fig. 4.1 è rappresentato, in istogramma, l'attività specifica dell' H^+ -ATPasi dei campioni: si può osservare come solo la Spm abbia un notevole effetto di incremento dell'attività della pompa protonica, circa il 200% rispetto alle membrane di controllo. La Spd attiva minimamente la pompa mentre Cdv e Put sono del tutto inattive. La differenza riportata da Spm, Spd, Cdv e Put può essere ricondotta al diverso numero di gruppi amminici ed imminici presenti nelle varie poliammine. Put e Cdv non stimolano affatto l'attività della pompa e ciò può attribuirsi all'assenza del gruppo amminico secondario; la presenza di due gruppi amminici primari e di due secondari, sulla Spm, potrebbe conferirgli la maggior attività, come del resto già riportato in altri sistemi (Athwal e Huber, 2002).

Per comprendere se l'aumento di attività, indotta dalla Spm, fosse dovuta ad una maggior quantità di H^+ -ATPasi presente sulle membrane plasmatiche, sono stati condotti esperimenti di Western Blotting sugli stessi campioni utilizzando anticorpi anti- H^+ -ATPasi. Dal risultato ottenuto e mostrato in fig. 4.2 pannello 1, non si osserva alcuna variazione significativa della quantità di H^+ -ATPasi espressa sulle membrane incubate con Spm rispetto il controllo delle radici non trattate.

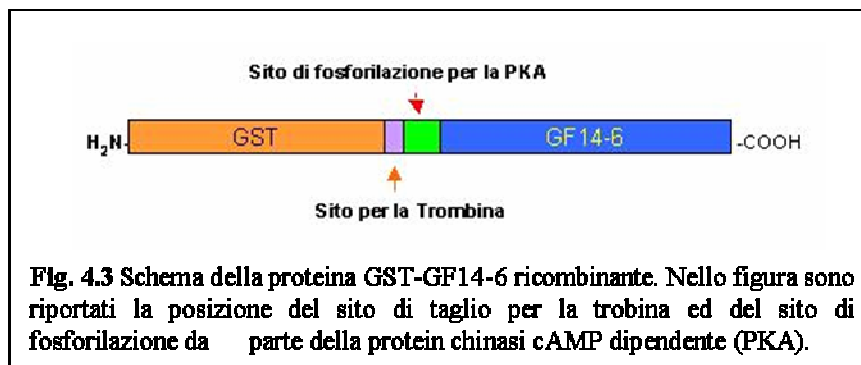


Per verificare se l'incremento di attività fosfoidrolitica fosse dovuto ad una maggiore attivazione della pompa protonica, sono stati valutati i livelli di proteine 14-3-3 associate alle stesse membrane, utilizzando anticorpi anti-14-3-3 ed in grado di riconoscere tutte le isoforme presenti nel mais.

Il pannello 2 della fig. 4.2 mostra che i livelli di 14-3-3 sono notevolmente più alti nelle membrane da radici trattate *in vivo* con Spm rispetto i livelli del controllo. Tale risultato suggerisce che la presenza di Spm aumenta la capacità delle 14-3-3 di interagire con la pompa protonica.

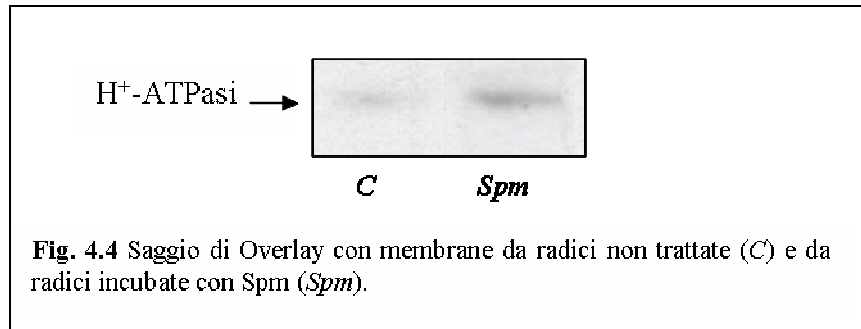
Un'ulteriore prova di quanto osservato si è ottenuta per mezzo del saggio di overlay, come descritto nel par. 3.16. La tecnica permette di saggiare l'interazione proteina-proteina.

Il saggio prevede che i campioni da analizzare vengano separati per elettroforesi in gel di di poliacrilammide/SDS (SDS-PAGE), trasferiti su membrana di nitrocellulosa ed incubati, invece che con un anticorpo, con la proteina d'interesse. L'interazione può essere rilevata mediante l'uso di una proteina marcata radioattivamente (Carr e Scott, 1992). La GF14-6 espressa come fusione alla GST, può essere facilmente marcata con ^{32}P . Infatti nella giunzione tra la GST e la proteina esogena è presente, oltre al sito per il taglio con la trombina, un sito di fosforilazione per la protein chinasi cAMP-dipendente (PKA) (fig. 4.3). Come descritto nel par. 3.15, la GST-GF14-6, legata alla resina di glutatione sefarosio, è stata marcate con [^{32}P]-ATP in presenza della subunità catalitica della PKA (Sigma), e quindi trattata con trombina per rimuovere la GST.



Gli esperimenti di overlay sono stati condotti come descritto nel par.3.18. Le proteine sono state separate in SDS-PAGE, trasferite su membrana di nitrocellulosa e poi incubate con la GF14-6 marcata con ^{32}P (500.000 cpm/ml di miscela di incubazione). L'interazione è stata infine rivelata mediante autoradiografia.

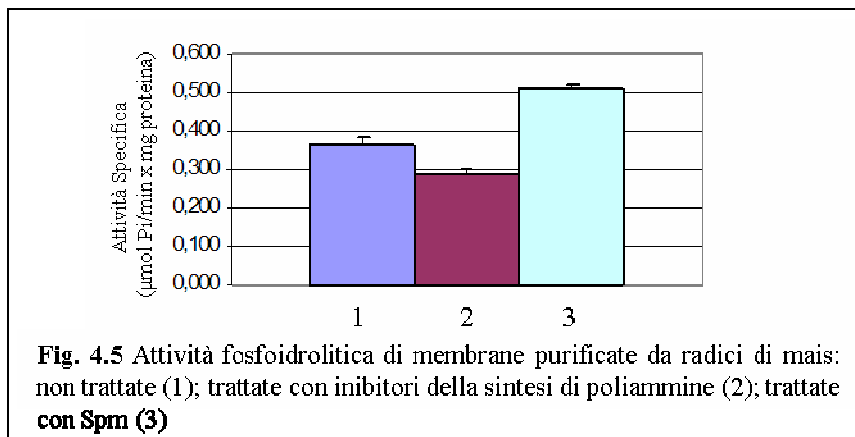
In fig. 4.4 è riportato il risultato del saggio. Come si può osservare la proteina GF14-6, usata come sonda, mostra una maggiore interazione con la pompa protonica nelle membrane ottenute da radici trattate con Spm.



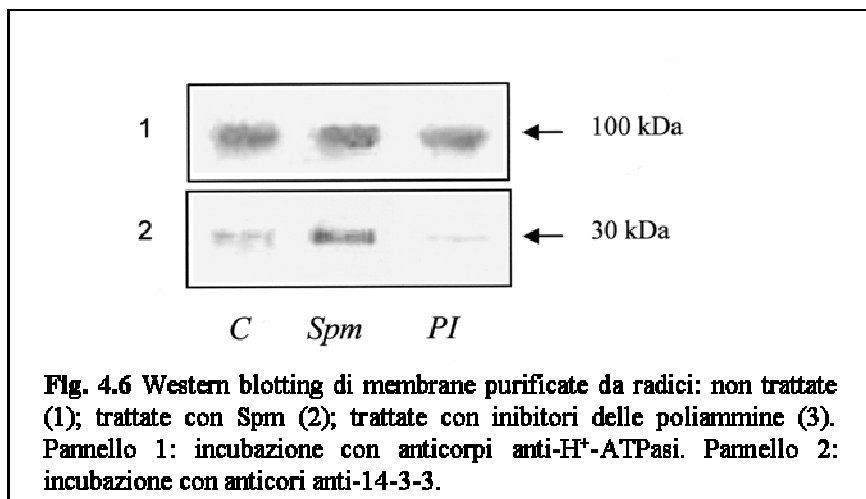
4.2 Effetto degli inibitori della sintesi delle poliammine

Per verificare un eventuale effetto delle poliammine endogene nell'interazione delle 14-3-3 con l'H⁺-ATPasi è stata fatto uso di inibitori della sintesi delle poliammine. Per lungo tempo l'uso degli inibitori è stato l'unico modo per variare la concentrazione endogena di poliammine (Metcalf et al, 1978; Kallio et al., 1981; Pegg et al., 1987) e proprio grazie ad essi sono stati scoperti i coinvolgimenti delle poliammine nei processi di crescita cellulare, rigenerazione ed embriogenesi. Per ottenere una inibizione completa, le radici di mais sono state incubate per circa un'ora con gli inibitori α -difluorometilornitina (DFMO), α -difluorometilarginina (DFMA) e cicloexilammina (CHA). Successivamente le membrane sono state purificate, come descritto nel par. 3.11, e con esse sono stati condotti saggi di attività fosfoidrolitica, western blotting ed overlay.

In figura 4.5 si può vedere che l'attività fosfoidrolitica della pompa protonica misurata sulle membrane purificate da radici di mais trattate con gli inibitori della sintesi delle poliammine è ridotta di circa il 20% rispetto le membrane di controllo non trattate. La diminuzione dell'attività, sebbene lieve, è stata riscontrata sempre nelle varie repliche della misura.

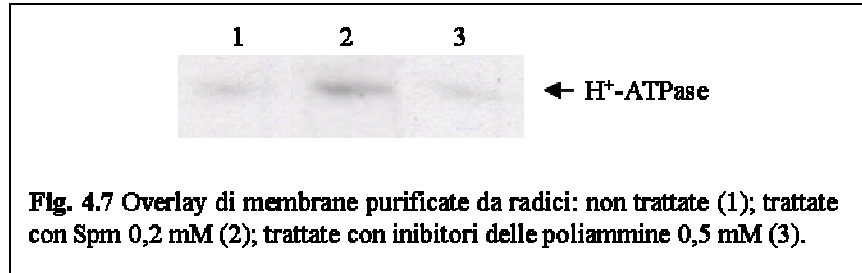


Il Western Blotting, condotto con anticorpi anti-14-3-3, riportato in figura 4.6, pannello 2, conferma il precedente esperimento: i livelli di proteine 14-3-3 associate a membrana trattata con inibitori (corsia 3) sono ridotti rispetto quelli delle membrane di controllo (corsia 1); i livelli di H^+ -ATPasi, misurati in un Western Blotting condotto con anticorpi anti-ATPasi, si mantengono uguali in tutti i campioni come mostrato in fig. 4.6, pannello 1.



La figura 4.7 riporta l'autoradiografia dell'overlay condotto come descritto nel par. 3.16. Anche in questo caso l'interazione delle 14-3-3 con le

membrane trattate con Spm (corsia 2) risulta aumentata rispetto l'interazione osservata sulle membrane non trattate (corsia 1). L'uso degli inibitori della sintesi di poliammine ha dimostrato che anche le PA endogene sono coinvolte nell'interazione tra le proteine 14-3-3 e la pompa protonica portando ad una maggior capacità di interazione delle 14-3-3 con l'H⁺-ATPasi.



4.3 Effetto, in vitro, delle poliammine sull'attività dell'H⁺-ATPasi.

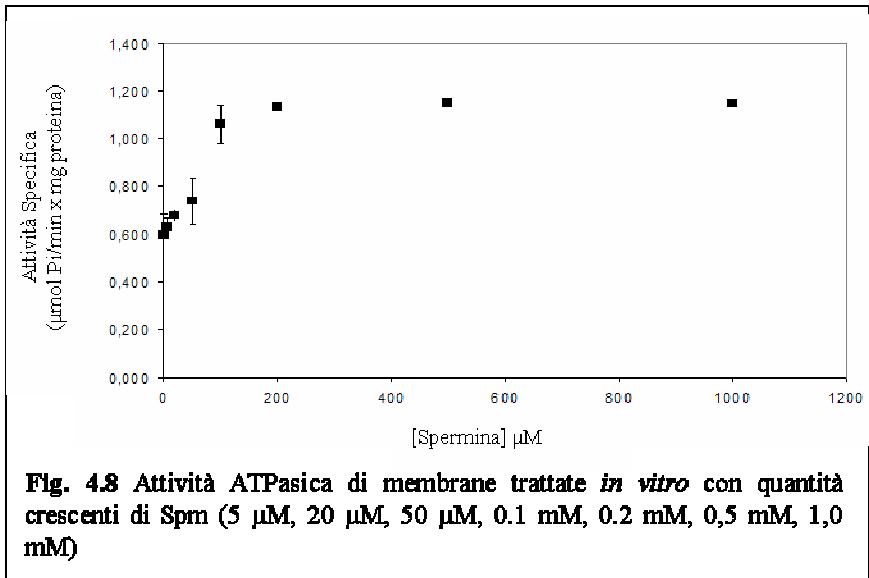
L'espressione dell'isoforma di PM H⁺-ATPasi di *A. thaliana* AHA1 in cellule del lievito *S. cerevisiae* rappresenta un ottimo sistema modello per poter studiare sia la funzionalità che la regolazione di questo enzima, costituendo un modello semplificato per riprodurre processi fisiologici che avvengono nelle cellule vegetali (Villalba et al., 1992; Palmgren e Christensen, 1993).

Il ceppo di lievito RS-72, trasformato, era già disponibile nel nostro laboratorio. Il ceppo contiene il frammento di DNA codificante per la pompa protonica inserito nel plasmide episomale Yep351 e posto sotto il controllo del promotore del gene *PMA1*, che codifica per la H⁺-ATPasi di lievito. In questo modo l'espressione del gene *AHA1* risulta fortemente indotta in presenza di glucosio nel terreno di coltura (Eraso e Gamcedo, 1987; Capieaux et al., 1989). Inoltre nel lievito, il gene cromosomale *PMA1* è stato posto sotto un promotore inducibile da galattosio (Cid et al., 1987). In questo modo, in presenza di galattosio, il ceppo di lievito esprime la *PMA1* e la H⁺-ATPasi vegetale, mentre in presenza di glucosio l'espressione di *PMA1* è soppressa e risulta espressa esclusivamente l'isoforma di H⁺-ATPasi vegetale (Villalba et al, 1992; Palmgren e Christensen, 1993 e 1994; Regemberg et

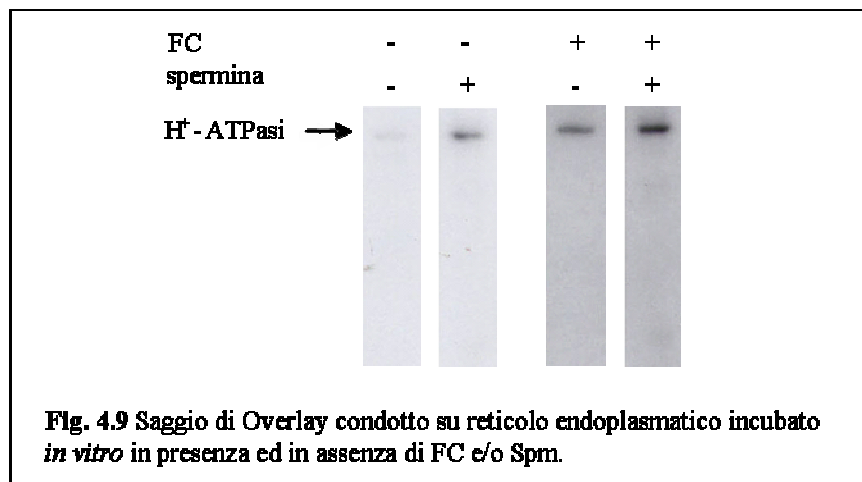
al., 1995; Baunsgaard et al., 1996). La pompa protonica viene espressa, in una forma per lo più inattiva, prevalentemente a livello del reticolo endoplasmatico, dove rappresenta circa il 40-50% delle proteine (Villalba et al., 1992).

Già in precedenza, nel nostro laboratorio, il sistema si è dimostrato molto utile per studiare *in vitro* l'effetto di stimolo delle proteine 14-3-3 sull'attività fosfoidrolitica della pompa protonica vegetale. La pompa protonica vegetale risultando espressa in forma inattiva e scarsamente fosforilata, condizione questa che la rende incapace di interagire direttamente con le 14-3-3, può essere stimolata in modo significativo e ben riproducibile solo in presenza della fitotossina fusicoccina (FC). Abbiamo quindi utilizzato questo sistema per verificare se l'isoforma della 14-3-3 GF14-6, stimolasse l'attività fosfoidrolitica della pompa protonica in presenza di Spm. A 20 µg di membrane, ottenute come descritto nel paragrafo 3.12, sono state aggiunte, oltre la GST-GF14-6, quantità crescenti di Spm (5 µM, 20 µM, 50 µM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0,5 mM, 1,0 mM) . La figura 4.8 mostra l'andamento della curva. La stimolazione della pompa è saturabile a 0,2 mM di Spm concentrazione paragonabile a quelle in grado di indurre gli effetti fisiologici come suggerito da Evans e Malberg (1989). Dal grafico si evince anche un valore S_{50} , pari alla metà della stimolazione massima, approssimativamente pari a 70 µM.

Lo stesso reticolo endoplasmatico è stato utilizzato in esperimenti di overlay in presenza o assenza di Spm e FC.



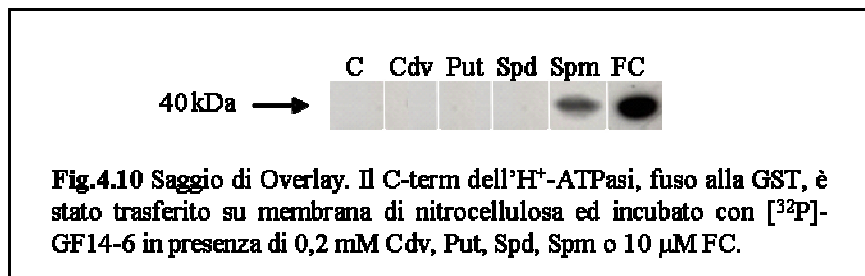
La figura 4.9 mostra l'overlay della GF-14-6 con la pompa protonica. Anche in questo caso l'aggiunta della Spm permette tale interazione in maniera simile alla FC. La contemporanea presenza di spm e FC sembra essere additiva, e ciò suggerisce un diverso meccanismo di azione.



4.4 Effetto delle poliammine nell'interazione delle 14-3-3 con il C-terminale dell'H⁺-ATPasi

È stato dimostrato che gli ultimi tre residui del dominio C-terminale della H⁺-ATPasi, YTV, sono direttamente coinvolti nel legame della pompa protonica con le proteine 14-3-3, in modo dipendente dalla fosforilazione della penultima treonina (Fulsgang et al., 1999; Svennelid et al., 1999). Dati ottenuti precedentemente nel nostro laboratorio, utilizzando gli ultimi 103 aminoacidi del dominio C-terminale dell'isoforma H⁺-ATPasi di mais, MHA2, espressi in *E. coli* come proteina di fusione alla GST (GST-CT), avevano dimostrato come, *in vitro*, l'interazione con la 14-3-3 potesse essere indotta, in modo indipendente dalla fosforilazione, dalla fitotossina FC (Fullone et al., 1998). Infatti in *E. coli*, privo di serina /treonina protein chinasi, la sequenza di legame alle 14-3-3 non può essere fosforilata e quindi l'interazione osservata con la GF14-6 ricombinante risultava necessariamente essere dipendente dalla FC.

Al fine di verificare se le poliammine fossero in grado di influenzare anche l'interazione con il solo C-terminale, sono stati condotti saggi di overlay utilizzando come bersaglio il dominio C-terminale della H⁺-ATPasi, espresso come proteina di fusione alla GST. La GST-C-Term, già disponibile nel nostro laboratorio, è stata espressa e purificata secondo quanto descritto nel par 3.13.



Il saggio è stato condotto come descritto in precedenza, utilizzando come bersaglio 3 µg di GST-C-Term e, dove previsto, con l'aggiunta di FC 10 µM o 0,2 mM Spm (o le altre poliammine) nel tampone d'incubazione.

In figura 4.10 è riportato il risultato del saggio. La banda relativa al C-terminale della pompa protonica (banda da 40 kDa) è visibile nel campione

con Spm, anche se meno evidente del campione trattato con FC. Le altre PA non sono in grado di indurre l'interazione tra 14-3-3 e H⁺-ATPasi.

Questo interessante risultato ha quindi mostrato la peculiare azione della spermina nel favorire l'interazione tra le 14-3-3 e l'H⁺-ATPasi. Sebbene con un diverso meccanismo rispetto alla FC, la Spm farebbe da "ponte" tra il C-terminale dell'H⁺-ATPasi e le 14-3-3 a differenza delle altre poliammine che risultano inattive, probabilmente a causa della loro inferiore lunghezza molecolare e del loro ridotto numero di cariche positive.

4.5 Il ruolo del C-terminale delle 14-3-3 nell'interazione con le poliammine.

Come già detto in precedenza, le poliammine sono molecole cariche positivamente ed il loro meccanismo molecolare è basato proprio sulla capacità di legarsi a bersagli di carica opposta.

Osservando la struttura e la distribuzione di cariche delle proteine 14-3-3 si può notare che la "zona" maggiormente ricca di cariche negative, e quindi quella potenzialmente coinvolta nell'interazione con le poliammine, coincide con la regione C-terminale ed in particolare con gli ultimi 22 aa. Nella fig. 4.11 vengono riportati i domini C-terminali di quattro isoforme di 14-3-3 dove si può vedere l'alta concentrazione di aminoacidi carichi negativamente.

GF14-6	DI SEDPAEE IREAPKRDSS EGQ
GF14 ω	DMQDDAADE IKEAAPKPT EEQQ
14-3-3 ζ	DTQG DEA EAG EGG EN
14-3-3 ϵ	DMQGDG EEQNKEALQ DVEDENQ

Fig.4.11 Allineamento dei domini C-terminale delle isoforme di 14-3-3: GF14-6, GF14 ω , 14-3-3 ζ , 14-3-3 ϵ .

Per verificare se effettivamente il sito di interazione delle poliammine risiedesse nel dominio C-terminale, è stato prodotto un mutante della GF14-6 delemo degli ultimi 22 aa. La delezione è stata prodotta, come descritto nel paragrafo 3.10, mediante la metodica del "quick change". Il plasmide contenente il cDNA di GF14-6 è stato replicato utilizzando due nucleotidi antiparalleli descritti nel par 3.2. Il successivo trattamento della miscela di reazione con l'enzima di restrizione DpnI permette il taglio selettivo del

plasmide stampo, contenente specifiche sequenze metilate riconosciute dalla endonucleasi, ma non del plasmide di nuova sintesi, che risulta non metilato. L'introduzione della mutazione è stata verificata mediante sequenziamento. Le proteina mutata è stata espressa in *E.coli* come proteine di fusione alla GST e purificate mediante cromatografia di affinità.

Lo schema del mutante $\Delta C22$ è riportato in fig. 4.12: il residuo Asp240 è stato mutato in codone di stop; a valle di questo è stato anche introdotto un sito di restrizione *SmaI* per facilitare lo screening dei cloni mutati.

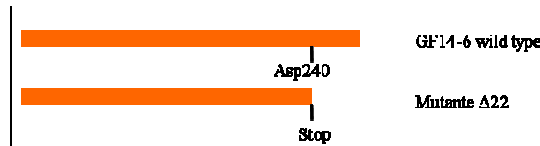
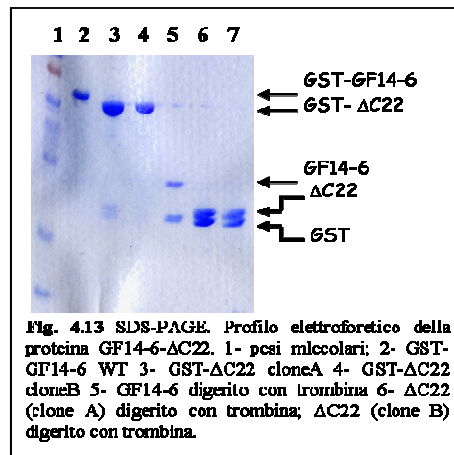


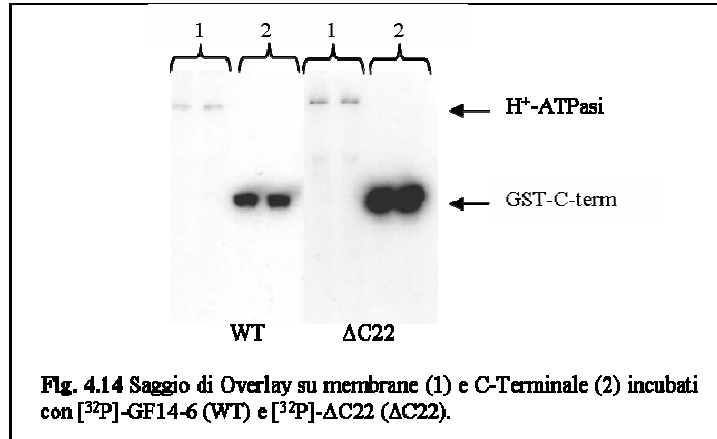
Fig. 4.12 Schema del mutante di delezione $\Delta C22$

La proteina mutata è stata espressa in *E.coli* come proteina di fusione alla GST. In fig. 4.13 è riportato il gel della proteina espressa.

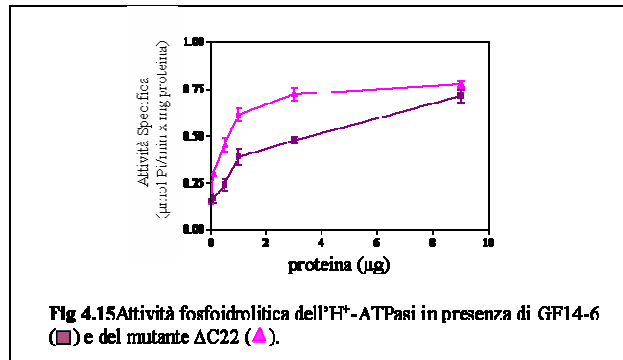


Il mutante $\Delta C22$ è stato saggio in esperimenti di overlay per analizzare la capacità di interazione con l' H^+ -ATPasi. In fig. 4.14 è riportata l'autoradiografia: in corsia 1 sono state caricate le membrane di mais ed in

corsia 2 il solo C-terminale. La sonda radioattiva è costituita nel caso del controllo (a sinistra) dalla [³²P]-GST-GF14-6 e nell'altro caso (a destra) dalla [³²P]-GST-GF14-6-ΔC22. Si evince che il mutante ΔC22 ha una capacità di interazione notevolmente maggiore rispetto la proteina GF14-6. Ciò risulta anche più evidente nell'interazione con il solo C-terminale della pompa protonica.



Anche il saggio di attività fosfoidrolitica della pompa protonica (figura 4.15) si è rivelato in accordo con i dati di interazione, dimostrando che il mutante ΔC22 stimola maggiormente l'attività dell'H⁺-ATPasi. Tale attività del mutante ΔC22 può ricondursi al ruolo autoinibitorio del C-terminale della proteina 14-3-3.



Si è voluto quindi verificare l'effetto della Spm sullo stesso mutante. Abbiamo così eseguito esperimenti di overlay con il $\Delta C22$ in presenza ed in assenza di 0,2 mM Spm.

L'autoradiografia riportata in figura 4.16 mostra che il mutante $\Delta C22$, pur interagendo meglio del WT con l' H^+ -ATPasi, non mostra differenze in presenza di Spm e continua a non essere in grado di interagire con il solo C-terminale della pompa protonica. Ciò dimostra che la regione C-terminale è coinvolta direttamente nell'interazione con la Spm.

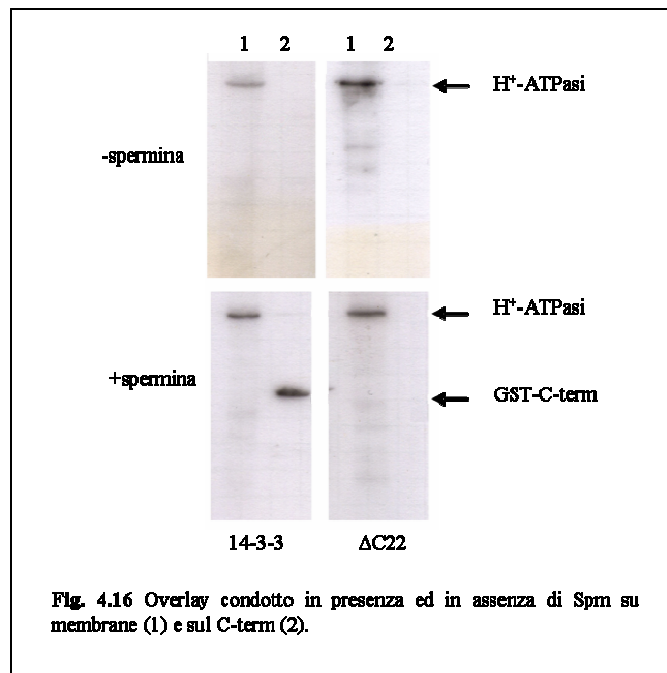
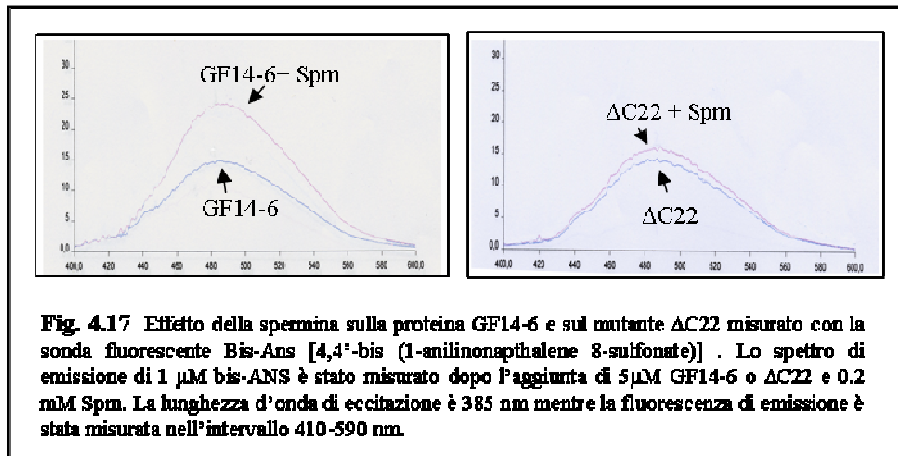


Fig. 4.16 Overlay condotto in presenza ed in assenza di Spm su membrane (1) e sul C-term (2).

Un'analisi più approfondita della caratteristica del mutante $\Delta C22$ e della diretta interazione poliammina/14-3-3 è stata effettuata mediante l'uso della sonda fluorescente bis-ANS [4,4-bis(1-anilininaphthalene 8-sulfonate)], sensibile all'idrofobicità dell'ambiente in cui si trova. Il risultato è mostrato in fig. 4.17. Il legame della poliammina alla GF14-6 è in grado di provocare un cambio conformazionale che porta all'esposizione di residui idrofobici. Tale effetto è rilevato dall'aumento dell'intensità della fluorescenza emessa dal bis-ANS ed è una chiara indicazione della diretta interazione della Spm con la proteina 14-3-3.

E' stato condotto lo stesso esperimento con il mutante $\Delta C22$. L'assenza di variazioni dell'intensità della fluorescenza emessa conferma che il mutante $\Delta C22$ non risente della presenza della Spm.



4.6 Analisi dei residui della GF14-6 direttamente coinvolti nell'interazione con le poliammine.

Come osservato nel precedente paragrafo, la delezione degli ultimi 22 aa del C-term della GF14-6 provoca l'abolizione della sensibilità alla Spm. Si sono quindi voluti analizzare i singoli residui direttamente coinvolti nel legame, osservando che, come accade in altri sistemi (Davidson et al., 1999, Coffino, 2000, Satriano et al., 2001), la caratteristica carica positiva delle poliammine permette loro di legare molecole cariche negativamente. Sono stati creati tre mutazioni puntiformi della GF14-6 in cui i residui di Asp e Glu sono stati convertiti in residui di Ala:

232-DNLTWTS**DIS**EDPA**EE**IRE**EA**PKR**DS**SE**GQ**

α) mutante D240A-E243A-D244A

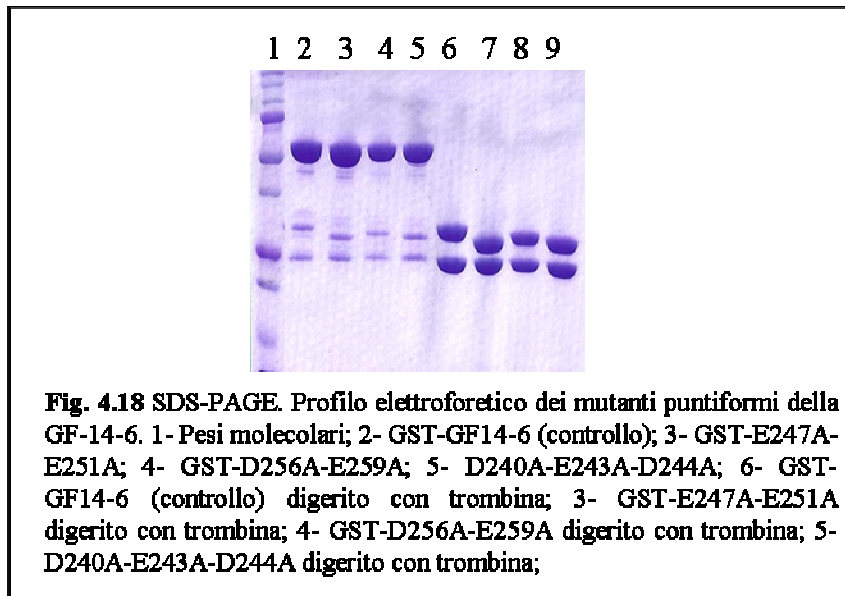
β) mutante E247A-E251A

γ) mutante D256A-E259A

Anche questi mutanti sono stati prodotti mediante la metodica del "quick change" come descritto nel par. 3.10. Le proteina mutate sono state espresse

in *E.coli* come proteine di fusione alla GST e purificate mediante cromatografia di affinità.

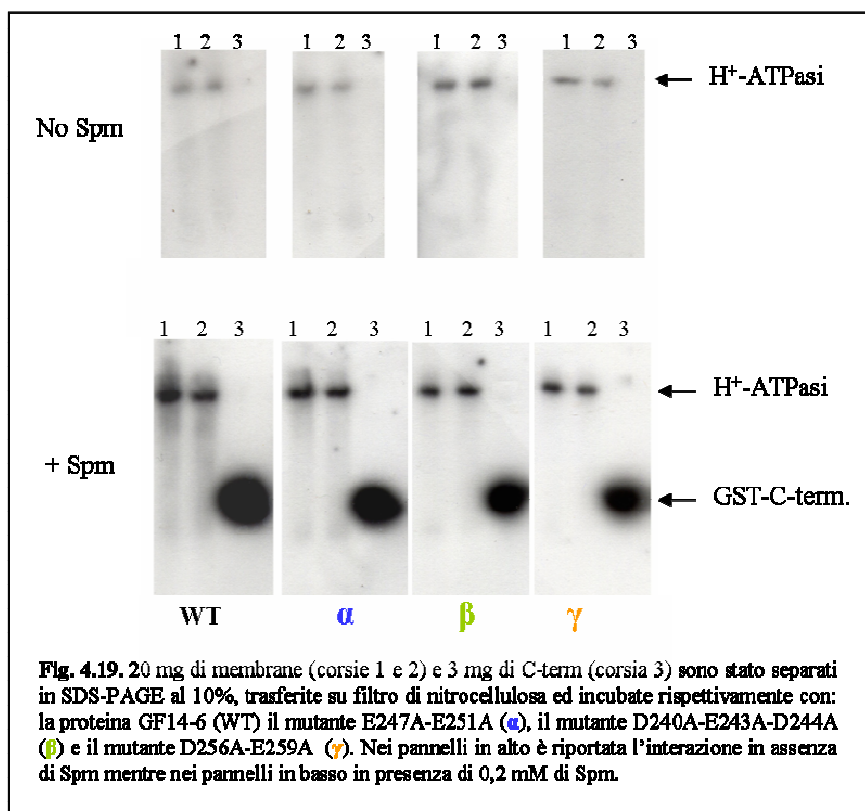
La fig. 4.18 riporta il profilo elettroforetico di tali mutanti.



Nelle corsie 2,3,4,5 sono stati caricati 10 μ l di ciascun campione fuso alla GST. Nelle corsie 6,7,8 e 9 invece sono caricati gli stessi campioni digeriti con trombina e quindi privi della GST. Il diverso profilo di corsa, ben evidente soprattutto tra i campioni digeriti, è dovuto alla diversa carica dei mutanti.

Al fine di verificare se tali mutazioni fossero in grado di influire sull'associazione tra la Spm e la proteina 14-3-3, sono stati condotti saggi di overlay utilizzando preparazioni di membrane plasmatiche di radici di mais contenenti l' H^+ -ATPasi purificata come descritto in 3.11. Trenta μ g di proteine di membrana plasmatica sono stati separati in SDS-PAGE al 10% e trasferiti su membrana di nitrocellulosa come descritto in 3.16. Come sonda sono state utilizzate alternativamente la GF14-6 o i mutanti, marcati con ^{32}P come precedentemente descritto.

La Fig. 4.19 riporta l'autoradiografia dell'overlay.

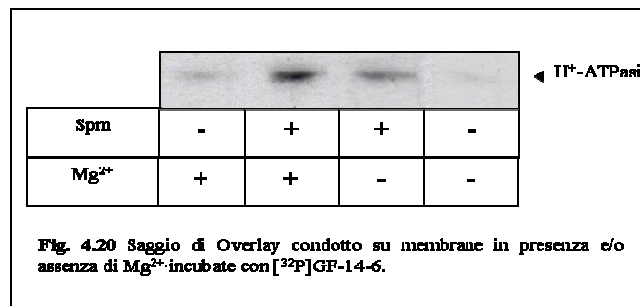


In assenza di spermina non c'è una sostanziale differenza nell'interazione dei mutanti con la pompa protonica, rispetto alla GF14-6. Al contrario l'effetto di stimolo della spermina è molto più evidente con la GF14-6 che con i mutanti, in particolare i mutanti β e γ . E' quindi probabile che i residui, D240, D243, D244, D256 e E259 siano direttamente coinvolti nel legame con la spermina.

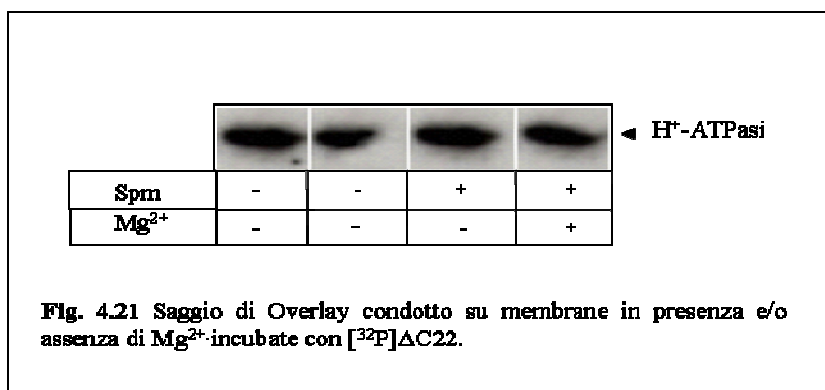
4.7 Confronto tra Mg^{2+} e poliammine nell'attivazione delle 14-3-3

Vari autori hanno osservato che spesso le poliammine, grazie alle loro caratteristiche strutturali ed elettrochimiche di policationi, possono essere sostituite ai cationi metallici nell'interazione con diversi target. Si è così voluto saggiare l'interazione con l' H^+ -ATPasi sia della GF14-6 sia della GF14-6- $\Delta C22$ mediante esperimenti di overlay condotti in presenza o in assenza (aggiunti o meno al tampone di incubazione) sia dello ione Mg^{2+} che di Spm.

La fig. 4.20 riporta il risultato ottenuto con la GF14-6: è già noto che il legame delle 14-3-3 alla pompa protonica è dipendente dalla presenza del Mg^{2+} (Fullone et al., 1998); la presenza della sola Spm ristabilisce l'interazione ed in maniera lievemente maggiore rispetto al solo catione. Un segnale ancora più forte si ha in presenza di entrambi.



La fig. 4.21 riporta il risultato ottenuto con il mutante GF14-6- $\Delta C22$: l'interazione con l' H^+ -ATPasi non è dipendente dalla presenza del Mg^{2+} né della Spm. La presenza di entrambi non altera il livello di interazione confermando quanto esposto in precedenza: il legame del catione e della Spm coinvolge il dominio C-term. La rimozione degli ultimi 22 amminoacidi rende il mutante insensibile alla presenza di Mg^{2+} e di Spm.

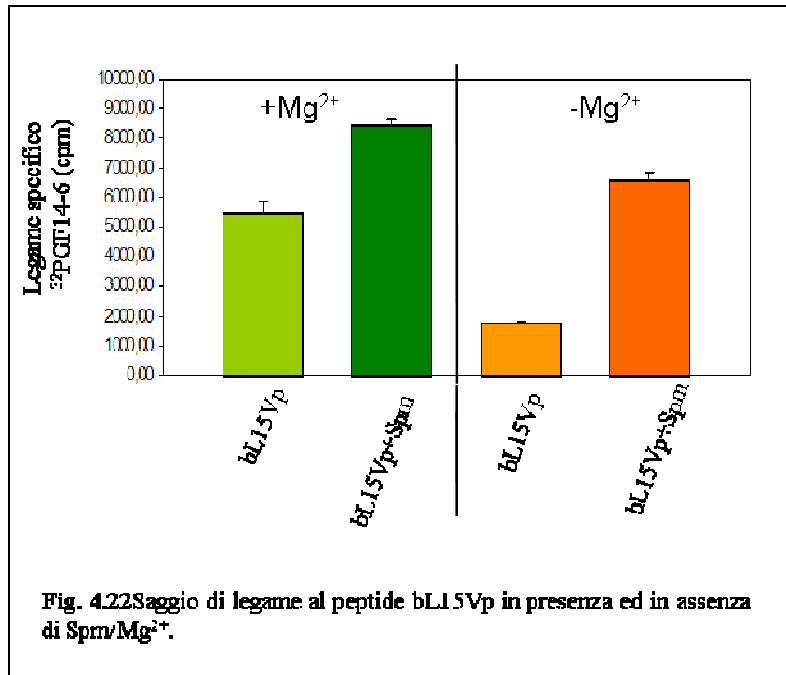


Questi risultati sono anche stati confermati da esperimenti di legame al peptide bL15Vp.

Dati precedenti avevano dimostrato che in saggi di legame *in vitro* un peptide sintetico, biotinil-LKGLDIDTIQQNYpTV (bL15Vp), riprodotto gli ultimi 15 aminoacidi dell'isoforma di H⁺-ATPasi di mais MHA2, è in grado di associarsi alla GF14-6. Il legame risultava inoltre fortemente indotto in presenza della fitotossina FC. Lo stesso non si osservava con l'analogo peptide non fosforilato (bL15V). Entrambe i fosfopeptidi sono coniugati, all'N-terminale, ad una molecola di biotina e sono stati così immobilizzati su di una resina di agarosio a cui è legata covalentemente la streptavidina.

I peptidi sono stati poi incubati con 3 µg (200.000 cpm) di ³²P-GF14-6, in presenza o no di Mg²⁺ e/o Spm, e dopo opportuni lavaggi, è stata misurata la radioattività associata alla resina, come descritto in 3.18.

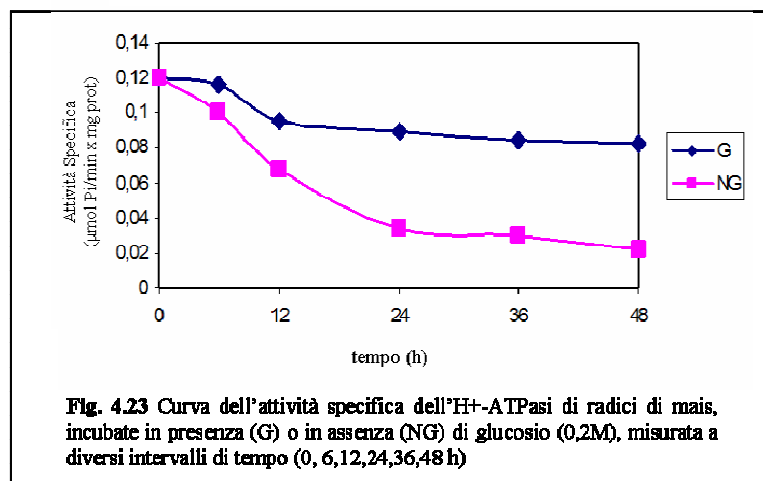
In figura 4.22 è riportato il grafico corrispondente al risultato del saggio. Come si può osservare, i dati ottenuti sono in accordo con i precedenti dati di overlay: la presenza di Spm stimola l'interazione della GF14-6 con il peptide e lo fa in maniera maggiore che in presenza del solo Mg²⁺. L'assenza di entrambi non permette invece l'interazione.



PARTE II. Regolazione dell' H^+ -ATPasi mediata da una via di trasduzione indotta da zuccheri

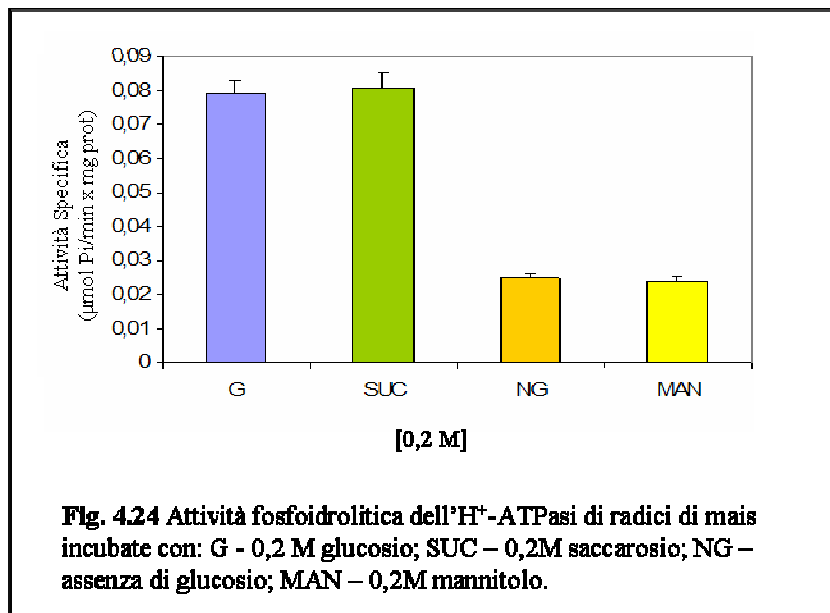
4.8 Effetto della carenza di glucosio sull' H^+ -ATPasi di plasmalemma

Recentemente è stato osservato da Cotelle et al. (2000) che anche le proteine 14-3-3 sono coinvolte in processi regolati dagli zuccheri; in particolare è stata dimostrata la perdita dell'interazione con diversi loro targets e la conseguente degradazione di quest'ultimi mediante una via di trasduzione del segnale esochinasi dipendente. Sulla base di ciò, si è voluto osservare l'effetto dell'assenza di zuccheri nel sistema 14-3-3/ H^+ -ATPasi. La prima analisi condotta è stato un saggio di attività fosfoidrolitica come riportato nel paragrafo 3.19. Apici di radici di mais di circa 5 mm sono stati incubati per diversi tempi (0h, 6h, 12h, 24h, 36h e 48 h) in apposito tampone (par. 3.5) in assenza e in presenza di glucosio (0,2 M). Successivamente sono state purificate le membrane plasmatiche, come descritto nel par. 3.11, e si è proceduto effettuando il saggio di attività. La fig 4.23 mostra come l'assenza di glucosio porti ad una marcata riduzione dell'attività fosfoidrolitica, che risulta ben visibile già dopo 12 ore di incubazione (circa 29%) e che raggiunge il massimo dopo 24 ore di incubazione (62%).



4.9 Effetto degli zuccheri saccarosio e mannitolo sull'H⁺-ATPasi

Per escludere che la riduzione dell'attività della pompa protonica fosse dovuta ad uno stress osmotico subito dalle radici in assenza di glucosio, si è eseguito lo stesso esperimento in presenza ed in assenza di 0,2M mannitolo, uno zucchero non metabolizzabile ed incapace di attivare le vie di trasduzione del segnale dipendenti da zuccheri (Loreti et al., 2000). Come controllo positivo è stato utilizzato 0,2 M saccarosio, uno zucchero che, una volta entrato nella cellula, viene idrolizzato in glucosio e fruttosio, producendo così gli stessi effetti del glucosio.

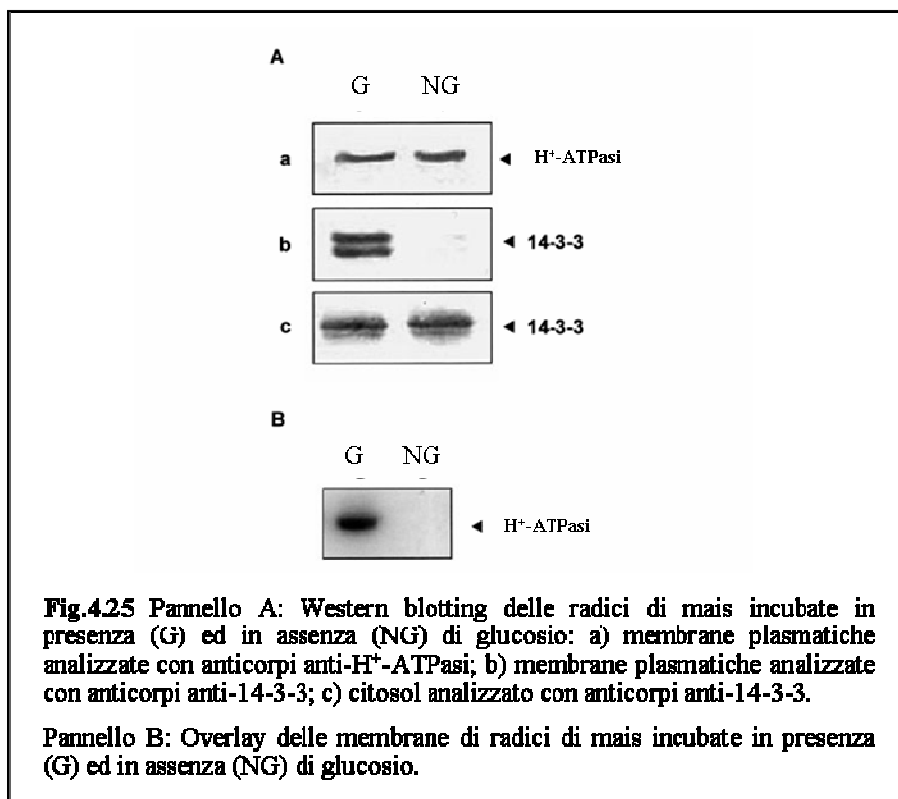


I risultati in fig.4.24 mostrano che l'attività fosfoidrolitica delle membrane plasmatiche, purificate da radici incubate con mannitolo (MAN), è paragonabile a quella delle radici incubate in condizioni di carenza di glucosio, ad esclusione quindi del fatto che si potesse trattare di stress osmotico.

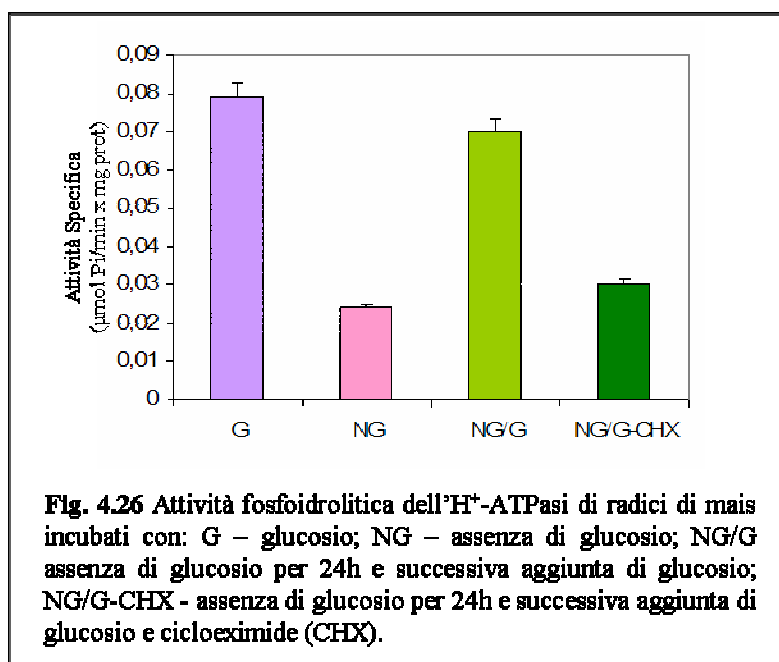
4.10 Altre osservazioni sulla carenza di glucosio e uso della cicloeximide

Gli effetti osservati sull' H^+ -ATPasi in condizione di carenza di glucosio, potrebbero essere il risultato sia di una riduzione dei livelli enzimatici sia di una inibizione dell'attività dell'enzima stesso. Per verificarne l'ipotesi sono stati analizzati i livelli di enzima mediante Western Blotting, come descritto nel par. 3.17, utilizzando anticorpi diretti contro il dominio C-terminale della pompa protonica. Come mostrato in fig.4.25 pannello A, a), non viene osservata nessuna variazione significativa della quantità di H^+ -ATPasi dopo 24 h di incubazione degli apici radicali in presenza e in assenza di glucosio. Ciò indica che la pompa non subisce alcuna degradazione in condizione di carenza di zuccheri e ciò risulterebbe anche in contrasto con quanto osservato in precedenza da Cotelle et al. (2000).

Sempre mediante Western Blotting si sono volute osservare le eventuali variazioni di livelli delle proteine 14-3-3 associate alla membrana plasmatica e presenti nel citosol. La fig 4.25 pannello A, b) mostra una notevole diminuzione dei livelli di 14-3-3 associate a membrane purificate da apici radicali sottoposti a carenza di glucosio. L'effetto non è dovuto alla riduzione complessiva dei livelli di 14-3-3 poiché nel citosol non si osserva la stessa variazione (fig 4.25 pannello A, c)). La carenza di zucchero quindi, sembrerebbe causare l'inibizione dell'attività dell' H^+ -ATPasi riducendo esclusivamente i livelli di proteine 14-3-3 associate a membrana. Per confermare tale ipotesi è stato condotto un saggio di overlay, come descritto nel par. 3.16, su membrane purificate da apici radicali sottoposti a carenza di glucosio e su membrane di controllo. L'autoradiografia riportata in fig 4.25 pannello B dimostra che, negli apici radicali sottoposti a carenza di glucosio, le proteine 14-3-3 perdono completamente la capacità di interagire con l' H^+ -ATPasi.



In letteratura è noto che i processi osservati durante la carenza di glucosio sono reversibili entro le prime 72 ore (Koch, 1996). Per verificare se anche l'attività dell'H⁺-ATPasi potesse essere in qualche modo ripristinata, sono stati incubati gli apici radicali in assenza di glucosio per 24 ore, e successivamente trasferiti in tampone contenente 0,2 M glucosio per 24 ore. I risultati ottenuti sono riportati in fig 4.26. L'effetto della mancanza di glucosio sull'attività della pompa protonica risulta reversibile; il campione NG/G recupera circa il 90% dell'attività fosfoidrolitica. Nello stesso esperimento si è anche osservato che il contemporaneo trattamento di apici radicali, in precedenza sottoposti a 24 h di mancanza di glucosio, con 200 μM cicloeximide (inibitore della sintesi proteica) e con Glu non porta al ripristino della condizione iniziale. Questi risultati, indicano che l'effetto non sia dovuto al metabolismo del glucosio, quanto ad un preciso segnale dello stesso zucchero che coinvolga la sintesi proteica.



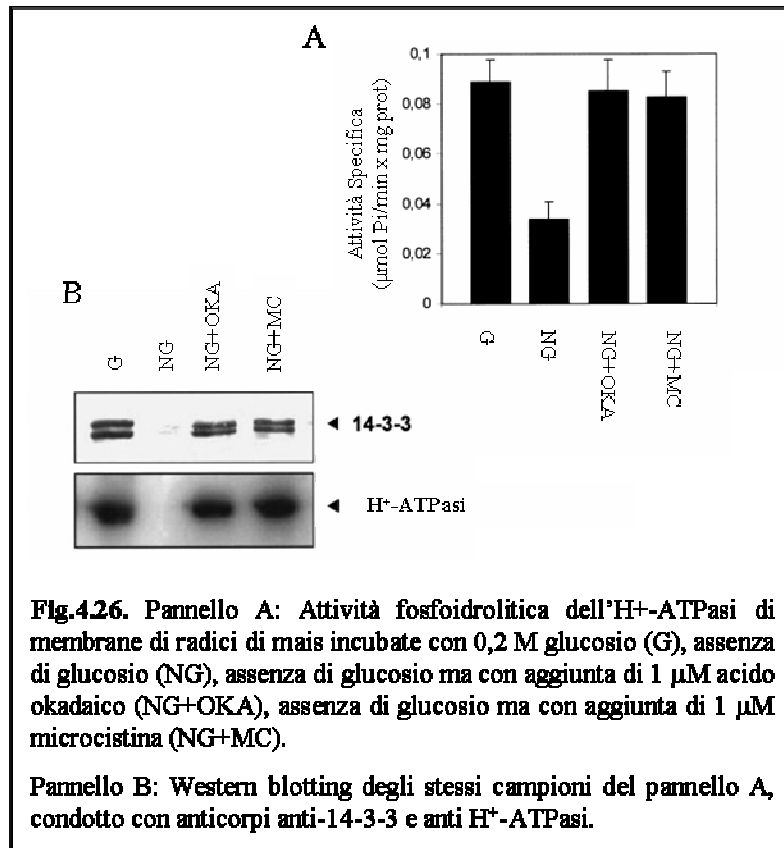
Nelle cellule vegetali infatti le vie di trasduzione del segnale regolate da zuccheri portano in genere ad una attivazione/repressione di alcuni geni specifici e di conseguenza all'attivazione/repressione della sintesi proteica. Il glucosio sembra avere un'attività regolatoria promuovendo la sintesi di proteine in grado di attivare, in modo diretto o indiretto, l' H^+ -ATPasi di plasmalemma.

4.11 Uso degli inibitori di fosfatasi

Com già detto precedentemente, è noto che le 14-3-3, legando l' H^+ -ATPasi, riconoscono una treonina fosforilata posta nel dominio C-terminale della pompa protonica (Fuglsang et al.,1999; Svennelid et al.,1999). Si è così ipotizzato che, la perdita di tale interazione dovuta alla carenza di glucosio, fosse legata alla defosforilazione del residuo di treonina da parte delle protein fosfatasi.

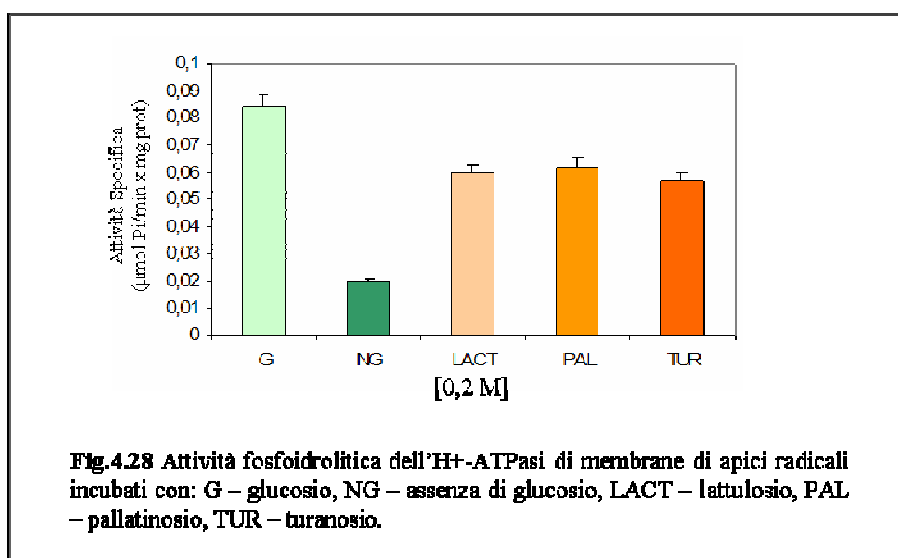
Per verificare questa ipotesi si è fatto uso di inibitori di fosfatasi; 1 μ M OKA (acido okadaico) e 1 μ M MC (microcistina) sono stati aggiunti al

tampone degli apici radicali posti precedentemente in assenza di glucosio. Sono poi stati effettuati esperimenti di Western blotting e saggi di attività fosfoidrolitica. La fig.4.27 mostra i risultati ottenuti: entrambi i trattamenti contrastano l'effetto inibitorio della carenza di glucosio; l'attività ATPasica rimane invariata (fig 4.27 A) e non si osservano variazioni nei livelli di H⁺-ATPasi, tanto meno di quelli delle 14-3-3 (fig. 4.27 B). La carenza di glucosio quindi, inibisce l'associazione delle 14-3-3 all'H⁺-ATPasi riducendo i livelli di fosforilazione sul C-terminale della pompa protonica, sito di legame per le 14-3-3.



4.12 Uso degli analoghi del glucosio

Per comprendere meglio i fenomeni specifici alla base della risposta alla carenza di zuccheri, sono stati utilizzati alcuni analoghi del saccarosio: palatinosio o glucosio- α -1,6-fruttosio, lattulosio o glucosio- β -1,4-fruttosio e turanosio o glucosio- α -1,3-fruttosio. Tali zuccheri non sono metabolizzati dalle cellule vegetali, ma sono in grado di attivare le vie di trasduzione del segnale del glucosio (Koch, 1996; Loreti et al., 2000). Sono così stati incubati gli apici radicali a tempi differenti con 0,2 M di ciascuno zucchero. Gli effetti dei disaccaridi sull'associazione 14-3-3/ H^+ -ATPasi, sono simili a quelli del glucosio solo dopo brevi periodi di trattamento (fino a 6 h di incubazione). Per periodi più lunghi di incubazione, l'attività della pompa protonica non è più conservata. La fig.4.28 riporta in istogramma l'attività fosfoidrolitica dell' H^+ -ATPasi di apici radicali incubati con i diversi zuccheri analoghi del saccarosio. Si evince che gli analoghi sono in grado di mantenere elevata l'attività della pompa protonica, in maniera paragonabile al glucosio.



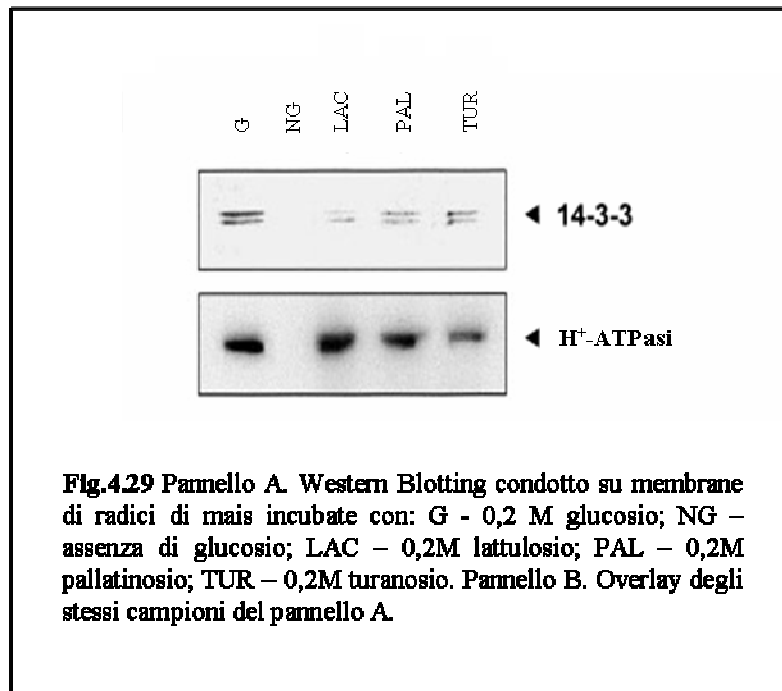


Fig.4.29 Pannello A. Western Blotting condotto su membrane di radici di mais incubate con: G - 0,2 M glucosio; NG - assenza di glucosio; LAC - 0,2M lattulosio; PAL - 0,2M pallatinosio; TUR - 0,2M turanosio. Pannello B. Overlay degli stessi campioni del pannello A.

Il Western blotting, condotto sugli stessi campioni e mostrato in fig.4.29, mostra che i livelli di 14-3-3 associati a membrana risultano comunque comparabili tra loro. Anche il saggio di overlay rileva che le 14-3-3 continuano a legare la pompa protonica in maniera equiparabile al controllo. Ciò dimostra quindi che l'effetto del glucosio sull'attività della pompa protonica non è dovuto al metabolismo dello zucchero ma proprio ad un meccanismo di percezione e di trasduzione del segnale attivato dal glucosio stesso.

Il palatinosio è anche stato testato per la sua abilità nel ripristinare l'attività della pompa protonica su apici radicali sottoposti per 24 h a carenza di glucosio. Quello che si nota in tabella 4.1 è che il palatinosio ristabilisce l'attività originaria della pompa protonica ma in maniera meno efficiente del glucosio. L'effetto dei due zuccheri inoltre non risulta additivo suggerendo che essi condividano lo stesso meccanismo di attivazione. Il palatinosio non è uno zucchero in grado di attraversare la membrana (Bouteau et al., 1999), pertanto la sua percezione non coinvolge l'esochinasi, maggior sensore intracellulare.

Tabella 4.1

	Attività fosfoidrolitica H ⁺ -ATPasi ($\mu\text{mol P} \times \text{min}^{-1}\text{mg proteina}^{-1}$)
NG/G	0.072 \pm 0.005
NG/PAL	0.062 \pm 0.003
NG/G+PAL	0.071 \pm 0.007

Questo dato è anche confermato da esperimenti condotti, e mostrati in fig 4.30, con la zucchero 2-D-glucosio. Tale zucchero viene fosforilato dall'esochinasi ma non può essere ulteriormente metabolizzato dalla cellula. Il 2-D-glucosio non riesce a produrre gli stessi effetti del glucosio sulla pompa protonica in quanto nei campioni trattati in vivo con 0,2 M di 2-d-Glu si verifica una diminuzione dell'attività della pompa di circa il 45%. Anche in questo caso la perdita di attività è correlata con l'incapacità delle proteine 14-3-3 di legarsi all'H⁺-ATPasi, come mostrato nell'autoradiografia in fig 4.31. In conclusione quindi si può ribadire che la via utilizzata dagli zuccheri per regolare l'attività dell'H⁺-ATPasi è esochinasi-indipendente.

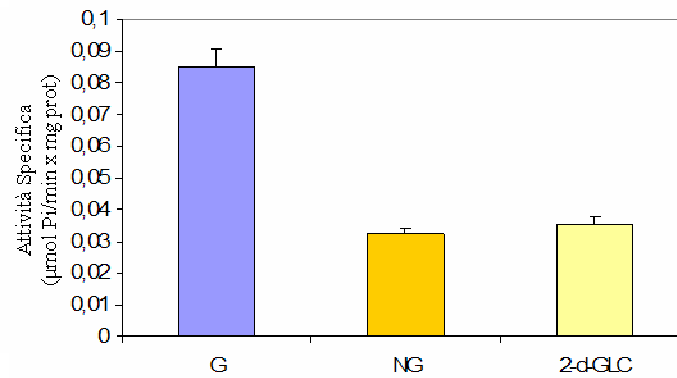


Fig. 4.30 Attività fosfoidrolitica dell'H⁺-ATPasi di membrane di apici radicali incubati con: G – 0,2 M glucosio; NG – assenza di glucosio; 2-d-Glc - 0,2 M 2-d-glucosio



Fig.4.31 Saggio di Overlay condotto su membrane di mais trattate in vivo con 1- glucosio; 2-assenza di glucosio; 3- 2-d-glucosio.

CAPITOLO 5

Discussione

Le proteine 14-3-3 sono molecole chiave nella regolazione di processi fondamentali, quali il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale, l'apoptosi, la trascrizione genica, tanto nelle cellule animali che in quelle vegetali. In particolare nelle piante svolgono ruoli peculiari regolando l'attività di numerosi enzimi coinvolti nel metabolismo primario come: la nitrato reductasi, la saccarosio fosfato sintasi, la glutammina sintasi e l' H^+ -ATPasi di membrana plasmatica (Fu et al., 2000; van Hemert et al., 2001; Aducci et al., 2002). Esse svolgono il loro compito associandosi alle proteine bersaglio mediante il riconoscimento di specifiche sequenze, in genere fosforilate su residui di serina o di treonina. Una particolare sequenza di interazione è rappresentata dagli ultimi tre residui YTV del C-terminale della pompa protonica di plasmalemma H^+ -ATPasi. Quest'ultima è in grado di generare un gradiente elettrochimico di protoni che non solo è essenziale per la regolazione dell'omeostasi cellulare ma diviene la forza motrice per numerosi processi fisiologici (Palmgren MG., 1998; Morsomme e Boutry, 2000).

Recentemente, vari studi condotti su specie vegetali, come *Arabidopsis thaliana* o *Nicotiana glauca*, hanno ben caratterizzato il ruolo regolativo delle poliammine nell'inibizione, da parte delle proteine 14-3-3, dell'enzima bersaglio nitrato reductasi (Athwal e Huber, 2002; Lillo et al., 2004). Sulla base di quanto osservato si è deciso di analizzare il ruolo delle poliammine nell'ambito dell'interazione delle proteine 14-3-3 con l' H^+ -ATPasi.

Inizialmente, mediante esperimenti condotti *in vivo*, è stato osservato che la tetrammina Spm è in grado di regolare le 14-3-3 nell'attivazione della pompa protonica. In particolare, sono state condotte incubazioni di radici di mais con ciascuna delle quattro principali poliammine: Spm, Spd, Put e Cdv. È stato rilevato un incremento dell'attività dell' H^+ -ATPasi, rispetto al controllo, solo in presenza di Spm. Le altre poliammine non sono attive anche se la Spd non risulta completamente inefficace. L'effetto riscontrato sia mediante saggi di attività fosfo-idrolitica che mediante saggi di overlay, non è dovuto alla degradazione dell' H^+ -ATPasi, i cui livelli analizzati mediante western blotting rimangono invariati, bensì è dovuto alla maggior capacità delle 14-3-3 in presenza di Spm di associarsi alle membrane.

La differente attività, riscontrata con le varie poliammine utilizzate, può essere ricondotta al differente numero di ammino ed immino gruppi presenti in queste molecole: Put e Cdv non stimolano l'attività della pompa e ciò può attribuirsi all'assenza del gruppo amminico secondario; la Spm possiede due

gruppi amminici primari e due secondari che potrebbero conferirgli maggiore attività.

Tale peculiare funzione svolta dalla Spm è stata dimostrata anche in esperimenti condotti *in vitro* in cui la poliammina viene aggiunta a preparazioni di membrane plasmatiche incubate con la GF14-6 ricombinante. Anche in questi esperimenti è emerso evidente lo stimolo da parte della sola Spm rispetto le altre utilizzate che sono risultate inefficaci. L'effetto della Spm sulla pompa protonica è stato ulteriormente confermato dall'abilità della tetrammina di stimolare la diretta interazione delle 14-3-3 con l'H⁺-ATPasi in saggi di overlay. La conferma della diretta interazione è stata inoltre ottenuta facendo uso della sonda fluorescente bis-ANS [4,4-bis(1-anilininaphthalene 8-sulfonate)], sensibile all'idrofobicità dell'ambiente in cui si trova. Il legame della poliammina alla GF14-6 provoca un cambio conformazionale che porta all'esposizione di residui idrofobici. Tale effetto è rilevato dall'aumento dell'intensità della fluorescenza emessa dal bis-ANS ed è una chiara indicazione della diretta interazione della Spm con la proteina 14-3-3.

Procedendo con un'analisi delle concentrazioni di Spm in grado di stimolare l'attività della pompa protonica, si è riscontrato l'andamento di una curva a plateau con un massimo di stimolo a 0,2 mM e un S₅₀ (la concentrazione in grado di produrre la metà della stimolazione massima) pari a 70,0 μM. Ciò indica che l'effetto avuto si riscontra a concentrazioni fisiologiche.

Il possibile ruolo endogeno delle poliammine è stato quindi analizzato mediante l'uso di inibitori della sintesi delle poliammine. Numerosi studi sono stati condotti nel corso degli anni, per mezzo degli inibitori: DFMO, DFMA, MGBG e CHA (Slocum, 1991) che, come si vede in fig. 1.11, bloccano la sintesi in maniera specifica e a vari livelli. Le membrane purificate da radici di mais incubate con tali inibitori hanno mostrato una lieve, ma sempre riproducibile, riduzione dell'attività fosfoidrolitica dell'H⁺-ATPasi e questo ha portato a dedurre un ruolo fisiologico delle poliammine nell'interazione 14-3-3/pompa protonica.

Dati ottenuti precedentemente nel nostro laboratorio, utilizzando gli ultimi 103 aminoacidi del dominio C-terminale dell'isoforma H⁺-ATPasi di mais, avevano dimostrato come, *in vitro*, l'interazione con la 14-3-3 potesse essere indotta, in modo indipendente dalla fosforilazione, dalla fitotossina FC (Fullone et al., 1998).

Un risultato nuovo ed interessante è stato ottenuto analizzando l'interazione del C-terminale con le 14-3-3 in presenza di Spm. Anche in questo caso la poliammina è in grado di favorire l'interazione in maniera paragonabile alla

presenza di FC. Il modello ipotizzato vede la Spm fungere da “ponte” tra la proteina e il C-terminale, cosa che le altre poliammine non sono in grado di fare, probabilmente a causa della loro inferiore lunghezza molecolare e del loro ridotto numero di cariche positive.

L’interazione delle poliammine con le 14-3-3, nell’inibizione della nitrato reductasi, è stato comparato da Athwal et al. (2000) con quello del catione Mg^{2+} , riscontrando la possibilità da parte della Spm di mimare la presenza del Mg^{2+} . Un’analisi comparativa tra il ruolo della Spm e il Mg^{2+} , nel sistema 14-3-3/ H^+ -ATPasi, è stata condotta mediante overlay e mediante saggi di legami a peptidi. I risultati ottenuti hanno suggerito un differente meccanismo di azione: la Spm sembra stimolare in maniera maggiore l’interazione delle 14-3-3 con l’ H^+ -ATPasi rispetto al Mg^{2+} mentre la presenza di entrambi non sembra essere additiva.

Infine si è voluto studiare il sito di interazione della Spm sulla 14-3-3. A tal fine sono stati creati dei mutanti di delezione e puntiformi e ne sono state analizzate le capacità di interazione. Le poliammine come spesso osservato, sono molecole cariche positivamente ed esplicano la loro funzione proprio grazie a questa caratteristica. Si è così supposto che esse potessero interagire con le 14-3-3 tramite un dominio ricco in cariche negative. Dall’osservazione della struttura della 14-3-3, è ben visibile che una “zona” maggiormente ricca di residui carichi negativamente corrisponde agli ultimi 20 residui del C-terminale. Si è così deciso di creare un mutante delecto degli ultimi 20 aa. Analizzandolo in overlay si è riscontrato una maggior capacità di interazione con la pompa protonica, rispetto alla proteina “wild type”.

La spiegazione del fatto che il mutante $\Delta C22$ sia in grado di interagire con l’ H^+ -ATPasi in maniera migliore della proteina “wild type”, è stata ricondotta alla funzione autoinibitoria che avrebbe il C-terminale della proteina stessa. Tale dominio infatti, si trova normalmente ripiegato nella cavità anfipatica della 14-3-3 e ne impedisce l’interazione con il bersaglio. La delezione degli ultimi 22 aa rimuove il blocco autoinibitorio e permette al mutante $\Delta C22$ di legarsi all’ H^+ -ATPasi più facilmente rispetto alla 14-3-3 “wild type”.

Il mutante $\Delta C22$ perde completamente la capacità di interazione con la Spm a dimostrazione del fatto che questa interagisce proprio con tale dominio. Un’analisi più approfondita è stata condotta mediante la creazione di mutanti puntiformi in cui le cariche negative sono state sostituite da residui di alanina. I risultati hanno confermato il coinvolgimento di tali residui suggerendo però la necessità di un particolare “folding” assunto dalla 14-3-3, indispensabile per la corretta interazione.

Nella seconda parte di questa tesi sono stati analizzati nuovi fattori in grado di influenzare l'attività dell' H^+ -ATPasi: gli zuccheri. E' già noto che in condizioni di carenza di zuccheri, si verificano notevoli cambiamenti dei processi fisiologici come la riduzione dell'attività enzimatica, l'arresto della crescita cellulare, l'inizio del catabolismo dei lipidi e di molte altre proteine (Su-May et al., 1999).

Agli zuccheri è stato da sempre attribuito il ruolo di substrato metabolico. Solo recentemente è stato visto come essi possano ricoprire anche il ruolo di molecole segnale, attraverso la regolazione di vie di trasduzione zucchero-dipendenti (Koch, 2000).

La prima indicazione che gli zuccheri potessero in qualche modo regolare l'attività della pompa protonica è emersa dal lavoro di Cotelle et al. (2000) dal quale si evinceva che, in condizioni di carenza di glucosio, si ha la selettiva degradazione proteolitica di alcuni enzimi regolati dalle 14-3-3. Sulla base di questi risultati si è cercato di comprendere gli effetti della carenza di glucosio sull' H^+ -ATPasi di plasmalemma.

Innanzitutto si è dimostrato che, in assenza di glucosio, la pompa protonica subisce un'inattivazione. Tale effetto non risulta causato dalla degradazione proteolitica dell' H^+ -ATPasi in quanto i suoi livelli, misurati in saggi di western blotting, rimangono costanti. I livelli di proteine 14-3-3 invece subiscono una diminuzione rivelando una minor capacità da parte di quest'ultime di associarsi all' H^+ -ATPasi in condizioni di carenza di zuccheri.

L'ipotesi che la riduzione dell'attività dell' H^+ -ATPasi fosse dovuta piuttosto a shock osmotico, è stata scartata eseguendo lo stesso esperimento in presenza di mannitolo, zucchero incapace di attivare le vie di trasduzione. I risultati ottenuti in questo caso sono paragonabili a quelli ottenuti in condizione di assenza di glucosio.

Mediante l'uso di lattulosio, zucchero non metabolizzabile dalla cellula vegetale ma in grado di attivare le vie di trasduzione zucchero-dipendenti, si è compreso che l'effetto sull' H^+ -ATPasi dovuto a carenza di glucosio dipende dall'attivazione/repressione di una via di trasduzione generalmente indotta dal glucosio e non da un minor apporto di energia. Mediante l'uso dell'analogo strutturale del glucosio, 2-d-glucosio, fosforilabile dall'esochinasi, si è inoltre compreso che la via di trasduzione utilizzata per regolare l' H^+ -ATPasi è quella esochinasi-indipendente.

E' stato dimostrato che, in assenza di glucosio, l' H^+ -ATPasi subisce una defosforilazione. Usando infatti degli inibitori delle protein fosfatasi, come

acido ocaidaico e microcistina, aggiunti al tampone degli apici radicali posti precedentemente in assenza di glucosio, non si ottiene l'inibizione di attività della pompa.

In conclusione quindi è possibile dire che in condizioni di carenza da zuccheri, l' H^+ -ATPasi di plasmalemma subisce un'inattivazione dovuta ad una ridotta associazione con le proteine 14-3-3. Il dominio C-terminale della pompa protonica subisce infatti una defosforilazione che impedisce l'associazione con le 14-3-3. Più in particolare è stata dimostrata l'esistenza di una via di trasduzione zucchero-dipendente in grado di regolare l'attività dell' H^+ -ATPasi. Tale via, che risulta essere esochinasi indipendente, prevede il coinvolgimento di uno o più geni che determinerebbero lo stato di attivazione/repressione delle protein fosfatasi. Non è comunque esclusa la possibilità di una regolazione dell'enzima dovuta all'induzione di un'altra via di trasduzione indiretta o mediante la partecipazione di altre proteine regolatrici. La comprensione del meccanismo molecolare alla base delle risposte alla carenza di zuccheri è di fondamentale importanza soprattutto in per la produzione di piante ad elevata tolleranza a questo tipo di stress.

CAPITOLO 6

Bibliografia

Abarca D., Madueno F., Martínez-Zapater J.M., Salinas J. (1999). Dimerization of Arabidopsis 14-3-3 proteins: structural requirements within the N-terminal domain and effect of calcium. *FEBS Lett* **462**: 377-382.

Aducci P., Ballio A., Federico R., Marra M., Graniti A. and Frisullo S. (1983). Traslocazione della fusicoccina in piante di mandorlo con infezioni di *Fusicoccum amygdali* Del. *Phytopathologia Mediterranea* **22**: 100-102.

Aducci P., Ballio A., Fogliano V., Fullone M.R., Marra M. and Proietti N. (1993). Purification and photoaffinity labelling of fusicoccin receptors from corn. *European Journal of Biochemistry* **214**: 339-345.

Aducci P., Camoni L., Marra M., Visconti S. (2002) From cytosol to organelles: 14-3-3 proteins as multifunctional regulators of plant cell. *IUBMB Life* **53**: 49-55.

Aducci P., Crosetti G., Federico R., Ballio A. (1980). Fusicoccin receptors. Evidence for endogenous ligand. *Planta* **148**: 208-210.

Aitken A., Collinge D.B., van Heusden G.P.H., Isobe T., Roseboom P.H., Rosenfeld G. and Soll J. (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eucaryotic proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 498-501.

Amory A., Foury F., and Goffeau A. (1980) The purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* forms a phosphorylated intermediate. *J Biol Chem* **255**: 9353-7.

Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J., Leon P. (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* **14(16)**: 2085-96.

Athwal G.S., Huber J.L., Huber S.C. (1998) Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an amp-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol.* **118**: 1041-8.

Athwal G.S., Lombardo CR., Huber JL., Masters SC., Fu H., Huber SC. (2000) Modulation of 14-3-3 protein interactions with target polypeptides by physical and metabolic effectors. *Plant Cell Physiol.* **41**: 523-33.

Athwal G.S., Huber SC. (2002) Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *Plant J.* **29**: 119-29.

Auer M., Scarborough GA., Kuhlbrandt W. (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature* **392**: 840-43.

Axelsen K.B., Palmgren MG. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol.* **46**: 84-101.

Axelsen K.B., Venema K., Jahn T., Baunsgaard L., Palmgren M.G. (1999) Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase AHA2: mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry* **38**: 7227-34.

Bachmann M., Shiraishi N., Campbell W.H., Yoo B.C., Harmon A.C. and Huber S.C. (1996a). Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell* **8**: 505-517.

Bachmann M., Huber J.L., Liao P., Gage D.A., Huber S.C. (1996b). The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Letters* **387**: 127-131.

Bachmann M., Huber J.L., Athwal G.S., Wu K., Ferl R.J. and Huber S.C. (1996c). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf of nitrate reductase in an specific isoform manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Letters* **398**: 26-30.

Bagni, N., (1989). Polyamines in plant growth and development. *The Physiology and Biochemistry of Polyamines*, vol. II. Eds. U. Bachrach and Y. Heimer, CRC Press, Boca Raton, 107–120.

Bagni N., Pistocchi R., (1991). Uptake and transport of polyamines and inhibitors of polyamine metabolism in plants. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Eds. R. Slocum and H. Flores, CRC Press, Boca Raton, 105–120.

Ballio A., Carilli A., Santurbano B., Tuttobello L. (1968a). Produzione di fusicoccina in scala pilota. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità Roma* **4**: 317-332.

Baunsgaard L., Venema K., Axelsen K., Villalba J.M., Welling A., Wollenweber B. and Palmgren M.G. (1996). Modified plant plasma membrane H⁺-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. *Plant Journal* **10**: 451-458.

Baunsgaard L., Fuglsang A.T., Jahn T., Korthout H.A.A.J., de Boer A.H. and Palmgren M.G. (1998). The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H⁺-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *Plant Journal* **13**: 661-671.

Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, et al. (1999), Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* **446(1)**: 18–22.

Bey P., Danzin C., Jung M., (1987) Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis, P.P. McCann, A. Pegg, A. Sjoerdsma (Eds.), *Inhibition of Polyamine Metabolism*, Academic Press, San Diego, CA, , pp. 1–31.

Biasi R., Bagni N., Costa G., (1988). Endogenous polyamines in apple and their relationship to fruit set and fruit growth. *Physiol. Plant.*, **73**: 201–205.

Booij P.P., Roberts M.R., Vogelzang S.A., Kraayenhof R., De Boer A.H. (1999) 14-3-3 proteins double the number of outward-rectifying K⁺ channels available for activation in tomato cells. *Plant J.* **20**: 673-83.

Boston P., Jackson P., Thompson R. (1982) Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. *J. Neurochem.* **38**: 1475-82.

Bouteau F, Dellis O, Bousquet U, Rona JP. (1999) Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea*. *Bioelectrochem Bioenerg.* **48(1)**: 135-9.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry* **72**: 248-254.

Brenneman, F., Galston A., (1975). Experiments on the cultivation of protoplasts and calli of agriculturally important plants. I. Oat (*Avena sativa* L.). *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168**: 453-471.

Briskin D.P., Basu S. and Ho I. (1992). Studies on the reaction mechanism and transport function of P-type ATPase associated with the plant plasma membrane. In "*Transport and Receptor*

Brouquisse R., James F., Raymond P., and Pradet A. (1991) Study of Glucose Starvation in Excised Maize Root Tips. *Plant Physiol.* **96(2)**: 619-626.

Brouquisse, R., Evrard, A., Rolin, D., Raymond, P., and Roby, C. (2001). Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips: Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. *Plant Physiol.* **125**, 1485-1498.

Brouquisse R., Rolin D., Cortès S., M. Gaudillère, Evrard A., C. Roby (2006). A metabolic study of the regulation of proteolysis by sugars in maize root tips: effects of glycerol and dihydroxyacetone. *Planta*

Brun, T., Roche, E., Kim, K.-H., and Prentik, M. (1993). Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene expression in a pancreatic pcell line (INS-I). *J. Biol. Chem.* **268**: 18905-18911 *Proteins of Plant Membranes*". Cooke D.T. and Clarkson D.T. eds., Plenum Press, New York; 13-24.

Brunet A., Bonni A., Zigmund MJ., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-68.

Bunney T.D., van Walraven H.S., de Boer A.H. (2001) 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4249-54.

Busa W.B., Crowe J.H., Matson J.B. (1982) Intracellular pH and metabolic status of dormant and developing *Artemya* embryos. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 711-718

Camoni L., Fullone M.R., Marra M., Aducci P. (1998a). The plasma membrane H⁺-ATPase from maize roots is phosphorylated in the C-terminal domain by a calcium-dependent protein kinase. *Physiologia Plantarum* **104**, 549-555.

Camoni L., Harper J.F. and Palmgren M.G. (1998b). 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Letters* **430**, 381-384.

Camoni L., Iori V., Marra M., and Aducci P. (2000). Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 9919-9923.

Camoni L., Visconti S., Marra M., Aducci P. (2001) 5'-monophosphate inhibits the association of 14-3-3 proteins with the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **276**: 31709-12

Campbell W.H. (1996). Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiology* **111**: 355-361.

Campbell J.K., Gurung R., Romero S., Speed C.J., Andrews R.K., Berndt MC., Mitchell CA. (1997) Activation of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase by 14-3-3zeta. *Biochemistry* **36**, 15363-70.

Capieaux E., Vignais ML., Sentenac A., Goffeau A. (1989) The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J Biol Chem.* **264**: 7437-46.

Carafoli E. (1992) The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem.* **267**, 2115-8.

Carr D.W., Scott J.D. (1992) Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci.* **17**, 246-9.

Casero R.A., Pegg A.E. (1993) The turning point in polyamine metabolism. *FASEB J.* **7**: 653-661.

Chen M.H., Liu L.F., Chen Y.R., Wu H.K., Yu S.M. (1994) Expression of α -amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells are coordinately regulated by sugar nutrient. *Plant J* **6**: 625–636.

Chen L., Liu TH., Walworth NC. (1999) Association of Chk1 with 14-3-3 proteins is stimulated by DNA damage. *Genes Dev.* **13**, 675-85.

Cho H.T. and Hong Y.N. (1995). Effect of IAA on synthesis and activity of the plasma membrane H^+ -ATPase of sunflower hypocotyls, in relation to IAA-induced cell elongation and H^+ excretion. *Journal of Plant Physiology* **145**: 717-725.

Cid A., Perona R., Serrano R. (1987) Replacement of the promoter of the yeast plasma membrane ATPase gene by a galactose-dependent promoter and its physiological consequences. *Curr Genet.* **12**, 105-110.

Chol Ha H., Woster P.M., Yager J., Casero R. (1997) The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11557-11562.

Clark G.J., Drugan J.K., Rossman K.L., Carpenter J.W., Rogers-Graham K., Fu H., Der C.J. and Campbell S.L. (1997). 14-3-3 ζ negatively regulates Raf-1 activity by interactions with the Raf-1 Cysteine-rich domain. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20990-20993.

Coffino P. (2000) Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97(9)**:4421–3.

Cona A., Rea G., Angelici R., Federico R., Tavladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science Issue, 2* , 80-88

Cosgrove D.J. (1993). How do plant cell walls extend? *Plant Physiology* **102**: 1-6.

Cotelle V., Meek S. E.M., Provan F., Milne F., Morrice N., and MacKintosh C. (2000) 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J.* **19(12)**: 2869–2876.

Dambly S., Boutry M. Related (2001) The two major plant plasma membrane H⁺-ATPases display different regulatory properties. *J Biol Chem.* **276**, 7017-22.

Davidson N.E, Hahm H.A., McCloskey D.E., Woster P.M., Casero R.A. (1999) Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment. *Endocr Relat Cancer*; **6(1)**: 69–73.

de Boer A.H., Watson B.A. and Cleland R.E. (1989). Purification and identification of the fusicoccin-binding protein from oat root plasma membrane. *Plant Physiology* **89**, 250-259.

De Michelis M.I., Pugliarello M.C. and Rasi-Caldogno F. (1989). Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. I. Characteristics and intracellular localization of the fusicoccin receptor in microsomes from radish seedlings. *Plant Physiology* **90**, 133-139.

De Michelis M.I., Rasi-Caldogno F., Pugliarello M.C. and Olivari C. (1991). Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. II. Stimulation of H⁺-ATPase in a plasma membrane fraction purified by phase-partitioning. *Botanica Acta* **104**, 265-271.

de Vetten N.C., Lu G. and Ferl R.J. (1992). A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins. *Plant Cell* **4**: 1295-1307.

de Vetten N.C. and Ferl R.J. (1995). Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant Journal* **7**: 589-601.

Dohrmann U., Hertel R., Pesci P., Cocucci S.M., Marrè E., Randazzo G. and Ballio A. (1977). Localization of "in vitro" binding of the fungal fusicoccin to plasma-membrane-rich fractions from corn coleoptiles. *Plant Science Letters* **9**, 291-299.

Douglas P., Morrice N. and MacKintosh C. (1995). Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *FEBS Letters* **377**, 113-117.

Douglas P., Pigaglio E., Ferrer A., Halfords NG, MacKintosh C. (1997) Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are required by reversible phosphorylation and/or Ca²⁺ ions. *Biochem J.* **325** , 101-9.

Douglas P., Moorhead G., Hong Y., Morrice N., MacKintosh C. (1998) Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta* **206**, 435-42.

Du X., Fox J.E. and Pei S. (1996). Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib α . *Journal of Biological Chemistry* **271**, 7362-7367.

Efrat S., Surana, M., and Fleisher, N. (1991). Glucose induces insulin gene transcription in a murine pancreatic pcell line. *J. Biol. Chem.* **266**, (11): 141-1 1143.

Egea-Cortines, M., Y. Mizrahi, 1991. Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Eds. R. Slocum and H. Flores, CRC Press, Boca Raton, 143–158.

Ehness R., Ecker M., Godt D.E., Roitsch T. (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell*, **9**: 1825-1841.

Emi T., Kinoshita T., Shimazaki Ki K. (2001) Specific Binding of vf14-3-3a Isoform to the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Response to Blue Light and Fusicoccin in Guard Cells of Broad Bean. *Plant Physiol.* **125**: 1115-25.

Eraso P., Gancedo C. (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **244**, 187-192.

Espen L., Morgutti S., Alisi C., Pirovano L., Ragg E., Cocucci SM. (1995) Germination and pH of intracellular compartments in seeds of *Phacelia tanacetifolia*. *Phys. Plant.* **93**: 577-583.

Evans P., Malmberg R., (1989). Do polyamines have roles in plant development? *Ann. Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 235–269.

Fanger G.R., Widmann C., Porter A.C., Sather S., Johnson G.L. and Vaillancourt R.R. (1998). 14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases. *Journal of Biological Chemistry* . **273**: 3476-3483.

Federico, R., Angelini R., (1991). Polyamine catabolism in plants. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Eds. R. Slocum and H. Flores*, CRC Press, Boca Raton, 41–56.

Felix G., Boller T. (1995) Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *Plant J.* **7**, 381-389

Ferl R.J. (1996). 14-3-3 proteins and signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 49-73.

Finnemann J., Schjoerring JK. (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J.* **24**, 171-81.

Flores, H., Filner P., (1985). Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Eds. K. Neumann, W. Barz and E. Reinhard, Springer, Berlin, 174–185.

Frias I., Caldeira M.T., Pérez-Castiñeira J.R., Navarro-Aviño J.P., Culiañez-Maciá F.A., Kuppinger O., Stransky H., Pagés M., Hager A. and Serrano R. (1996). A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* **8**: 1533-1544.

Friedman R., Levin N., Altman A., (1986). Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant. Physiol.*, **82**: 1154–1157.

Fu H, Subramanian RR, Masters SC. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**: 617-47.

Fuglsang A.T. , Visconti S. , Drumm K. , Jahn T. , Stensballe A. , Mattei B. , Jensen O.N. , Aducci P. , Palmgren M.G. (1999) . Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H⁺-ATPase AHA2 Involves the Three C-terminal residue Tyr⁹⁴⁶ – Thr- Val and Requires Phosphorylation of Thr⁹⁴⁷. *The Journal of Biological Chemistry.* **274**: 36774-36780.

Fukuhara T., Pak JY., Ohwaki Y., Tsujimura H., Nitta T. (1996) Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H(+)-ATPase in a seagrass. *Plant Physiol.* **110**: 35-42.

Fullone M.R., Visconti S., Fogliano V., Marra M., Nasta D. and Aducci P. (1995). Fusicoccin receptors: biochemical characterization of the 30 kDa protein and its expression in *E. coli*. *Giornale Botanico Italiano* **129**: 1060.

Fullone M.R., Visconti S., Marra M., Fogliano V., Aducci P. (1998) Fusicoccin effect on the in vitro interaction between plant 14-3-3 proteins and plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **273**: 7698-702.

Furukawa H., Ikuta N., Omata S., Yamauchi T., Isobe T. and Ichimura T. (1993). Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **194**: 144-149

Galston, A., Kaur-Sawhney R., (1987). Polyamines and senescence in plants. *Plant Senescence: its Biochemistry and Physiology*. Eds. W. Thompson, E. Nothnagel and R.Huffaker, Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD, 167–181.

Galston A., Kaur-Sawhney R., (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.*, **94**: 406–410.

Gibson S.I. (2004) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot* **55(395)**:253-64.

Gibson S.I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol.* **8(1)**:93-102.

Granado J., Felix G., Boller T. (1995) Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiol.* **107**, 485-490.

Greenland A., Lewis D., (1984). Amines in barley leaves infected by brown rust and their possible relevance to formation of "green islands". *New Phytol.*, **96**: 283–291.

Hager A., Debus G., Hegel H.G., Stransky H. and Serrano R. (1991). Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a higher-turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* **185**, 527-537.

Hausser A., Storz P., Link G., Stoll H., Liu YC., Altman A., Pfizenmaier K., Johannes FJ. (1999) Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J Biol Chem.* **274**, 9258-64.

Hoet P.H, Nemery B. (2000), Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278(3)**: 417–33.

Hoff T., Stummann B.M. and Henningsen K.W. (1992). Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiolgia Plantarum* **84**: 616-624.

Honda R., Ohba Y., Yasuda H. (1997) 14-3-3 zeta protein binds to the carboxyl half of mouse weel kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **230**: 262-5.

Huang N.C., Chang C.S., Crawford N.M. and Tsay Y.F. (1996). CH11 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* **8**: 2183-2191

Huber J.L., Huber S.C., Campbell W.H. and Redinbaugh M.G. (1992). Reversible light/dark regulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysic* **296**: 58-65.

Huber S.C. and Huber J.L. (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 431-444.

Huijser C., Kortstee A., Pego J., Weisbeek P., Wisman E., Smeekens S. (2000) The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.***23(5)**:577-85.

Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Yamauchi T. and Fujisawa H. (1987). Brain 14-3-3 protein that activates tryptophan 5-mono-oxygenase and tyrosine 3-mono-oxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Letters* **219**: 79-82.

Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Takahashi N., Araki K., Kuwano R. and Takahashi Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for a brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**, 7084-7088.

Igarashi D., Ishida S., Fukazawa J., Takahashi Y. (2001) 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant Cell.* **13**: 2483-97.

Iiyama K., Lam T., Stone B. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Phytochem.*, **104**: 315–320.

Ikeda Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. (2000) Specific binding of a 14-3-3 protein to autophosphorylated WPK4, an SNF1-related wheat protein kinase, and to WPK4-phosphorylated nitrate reductase. *J Biol Chem.* **275**, 41528.

Isobe T., Hiyane Y., Ichimura T., Okuyama T., Takahashi N., Nakajo S. and Nakaya K. (1992). Activation of protein kinase C by the 14-3-3

proteins homologous with Exo1 protein that stimulates calcium-dependent exocytosis. *FEBS Letters* **308**, 121-124.

Jahn T., Fuglsang A.T., Olsson A., Brüntrup I.M., Collinge D.B., Volkmann D., Sommarin M., Palmgren M.G and Larsson C. (1997). The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* **9**, 1805-1814.

Jang J.C. and Sheen J. (1994) Sugar Sensing in Higher Plants. *The Plant Cell* **6**: 1665-1679.

Jang J.C., Sheen J. (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Science*, **2**:208-214.

Jarillo J.A., Capel J., Leyva A., Martinez-Zapater J.M. and Salinas J. (1994). Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology* **25**: 693-704.

Journet E.P., Bligny R., Douce R. (1986) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J Biol Chem* **261**: 3193– 3199

Johnson L.R., McCormack S.A. (1999) Healing of gastrointestinal mucosa: involvement of polyamines. *News Physiol Sci*; **14**:12–7.

Johansson F., Sommarin M. and Larsson C. (1993). Fusaric acid activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* **5**, 321-325

Johansson F., Sommarin M. and Larsson C. (1994). Rapid purification of the plasma membrane H⁺-ATPase in its non-activated form using FPLC. *Physiologia Plantarum* **92**, 389-396.

Jones D.H.A., Ley S. and Aitken A. (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers *in vivo* and *in vitro*: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters* **368**, 55-58.

Kallio A., McCann P., Bey P., (1981) DLa(Difluoromethyl) arginine: a potent enzyme activated irreversible inhibitor of bacterial arginine decarboxylase, *Biochemistry*, **20**: 3163–3166.

Kane P.M., Stevens T.H. (1992) Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* **24**, 383-93.

Kaur-Sawhney, R., Galston A., (1991). Physiological and biochemical studies on the antisenescence properties of polyamines in plants. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Eds. R. Slocum and H. Flores, CRC Press, Boca Raton, 201–211.

Kinoshita T., Shimazaki K. (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* **18**: 5548-58.

Klimczack L.I., Schindler U. and Cashmore A.R. (1992). DNA binding activity of the *Arabidopsis* G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell* **6**: 1681-1692.

Koch KE (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **47**:509-540.

Koch K.E., Ying Z., Wu Y., Avigne W.T. (2000) Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *J Exp Bot.* **51**:417-27.

Korthout H.A.A.J. and de Boer A.H. (1994). A fusicoccin-binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *Plant Cell* **6**, 1681-1692.

Korthout H.A.A.J., Van der Hoeven P., Wagner M.J., Van Hunnik E. and de Boer A.H. (1994). Purification of the fusicoccin-binding protein from oat root plasma membrane by affinity chromatography with biotinylated fusicoccin. *Plant Physiology* **105**, 1281-1288.

Kotzabasis K. et al. (1993) Polyamines in the photosynthetic apparatus, *Photosynth.Res.* **38**, 83-88.

Kumagai A., Yalowec P.S. and Dunphy W.C. (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 345-354.

Kushad M.M., Dumbroff E.B., (1991) Metabolic and physiological relationships between the polyamine and ethylene biosynthetic pathways, in: *R.D. Slocum, H.E. Flores (Eds.), The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 78–89.

Kutschera U. (1994). The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytology* **126**: 549-569.

Laby R.J, Kincaid M.S., Kim D., Gibson S.I., (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* **23(5)**: 587-96.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lanfermeijer F.C. and Prins H.B.A. (1994). Modulation of H⁺-ATPase activity by fusicoccin in plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) roots. A comparison of modulation by fusicoccin, trypsin and lysophosphatidylcholine. *Plant Physiology* **104**, 1277-1285.

Larsson C., Kjellbom P., Widell S. and Lundborg T. (1984). Sideness of plant plasma membrane vesicles purified by partition in aqueous two-phase system. *FEBS Letters* **171**, 271-276.

Lee J., Kumagai A., Dunphy W.G. (2001) Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell.* **12**: 551-63.

Li L., Rao JN., Guo X., Liu L., Santora R., Bass BL. (2001) Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*; **281(3)**:C941–53.

Liang M., Ekblad E., Hellstrand P., Nilsson B.O. (2004) Polyamine synthesis inhibition attenuates vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Res* **41(2)**: 141–7.

Lillo C., Meyer C., Lea U.S., Provan F., Oltedal S. (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. **55(401)**:1275-82.

Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R., Fu H. and Liddington R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**, 191-194.

Liu Y.C., Liu Y., Elly C., Yoshida H., Lipkowitz S. and Altman A. (1997) Serine phosphorylation of Cb1 induced by phorbol ester enhances its association with 14-3-3s in T cells via a novel serine rich 14-3-3-binding motif. *J. Biol. Chem.* **272**, 14591-14595.

Lopez-Girona A., Furnari B., Mondesert O., Russell P. (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172-5.

Loreti E., Alpi A., and Perata P. (2000). Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of α -amylase in barley embryos. *Plant Physiol.* **123**: 939–948.

Lu G., DeLisle A., de Vetten N.C. and Ferl R.J. (1992). Brain proteins in plants: an *Arabidopsis* homolog to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 11490-11494.

Lu G. de Vetten N.C., Sehke P.C., Isobe T., Ichimura T., Fu H., van Heusden G.P.H. and Ferl R.J. (1994a). A single *Arabidopsis* GF14 isoform possesses biochemical characteristics of diverse 14-3-3 homologues. *Plant Molecular Biology* **25**: 659-667.

Lu G., Sehne P.C. and Ferl R.J. (1994b). Phosphorylation and calcium binding properties of an *Arabidopsis* GF14 brain protein homolog. *Plant Cell* **6**: 501-510.

Lu G., Rooney M.F. and Ferl R.J. (1994c). Five cDNA encoding *Arabidopsis* GF14 proteins. *Plant Physiology* **105**: 1459-1460.

Machatschke, S., Kamrowski C., Moerschbacher B., Reisener HJ. (1990). Polyamine levels in stem rust infected wheat leaves and effects of alfa-difluoromethylornithine on fungal infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **36**: 451–459.

MacLennan D.H., Rice W.J., Green N.M. (1997) The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem.* **272**: 28815-8.

Marie S., Guerra D., M.J., Miquerol L., Kahn A., and Iynedjian, P.B. (1993). The pyruvate kinase gene as a model for studies of glucose-dependent regulation of gene expression in the endocrine pancreatic p-cell type. *J. Biol. Chem.* **268**: 23881-23890.

Markiewicz E., Wilczynski G., Rzepecki R., Kulma A. and Szopa J. (1996). The 14-3-3 protein binds to the nuclear matrix endonuclease and has a possible function in the control of plant senescence. *Cellular and Molecular Biology Letters* **1**: 391-415.

Marra M., Fullone M.R., Fogliano V., Masi S., Pen J. and Aducci P. (1994). The 30 kD protein present in purified fusicoccin receptor preparation is a 14-3-3-like protein. *Plant Physiology* **106**: 1497-1603.

Marra M., Olivari C., Visconti S., Albumi C., Aducci P., De Michelis M.I. (2000) A phosphopeptide corresponding to the cytosolic stretch connecting transmembrane segments 8 and 9 of the plasma membrane H^{+} -ATPase binds 14-3-3 proteins and inhibits fusicoccin-induced activation of the H^{+} -ATPase. *Plant Biol.* **2**: 11-16

Marrè E. (1979). Fusicoccin: a tool in plant physiology. *Annual Review of Plant Physiology* **30**: 273-288.

Marrè E., Lado P., Rasi-Caldogno F., Colombo R. and Michelis M.I. (1974a). Evidence for coupling of proton extrusion to K^{+} uptake in pea internode segments treated with fusicoccin or auxin. *Plant Science Letters* **3**, 365-379.

Marrè E., Colombo R., Lado P. and Rasi-Caldogno F. (1974b). Correlation between proton extrusion and stimulation of cell enlargement. Effects of fusicoccin and cytokinins on leaf fragments and isolated cotyledons. *Plant Science Letters* **2**, 139-150.

Masters S.C., Pederson K.j., Zhang L., Barbieri J.T., Fu H. (1999) Interaction of 14-3-3 proteins with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem.* **38**, 5216-21

Maudoux O., Batoko H., Oecking C., Gevaert K., Vandekerckhove J., Boutry M., Morsomme P. (2000) A plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. *J Biol Chem.* **275**, 17762-70.

May T., Soll J. (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell.* **12**: 53-64

McPherson RA., Harding A., Roy S., Lane A., Hancock JF. (1999) Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene* **18**, 3862-9

McQueen-Mason S., Durachko D.M. and Cosgrove D.J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433.

Metcalf B.W., Bey P., Danzin C., Jung M.J., Casara P., Vever JP. (1978) Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase by substrate and product analogues, *J. Am. Chem. Soc.* **100**: 2251–2253.

Michaud N.R., Fabian J.R., Mathes K.D. and Morrison D.K. (1995). 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 5409-5418.

Moore P.V. and Perez V.J. (1967). Physiological and biochemical aspects of nervous integration. In "*Simposium on physiological and biochemical aspects of nervous integration*". Carlos F.D. ed., Woods Hole, Prentice Hall; 343-359.

Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A. and MacKintosh C. (1996). Phosphorylated nitrate reductase from spinach

leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Current Biology* **6**: 1104-1113.

Moorhead G., Douglas P., Cotelle V., Harthill J., Morrice N., Meek S., Deiting U., Stitt M., Scarabel M., Aitken A., MacKintosh C. (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* **18**: 1-12.

Morgan D.M.L. (1999) Polyamines: an overview. *Mol Biotechnol.* **11**: 229-250.

Morrison D.K., Heidecker G., Rapp UR., Copeland TD. (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J. Biol Chem.* **268**, 17309-16.

Morrison D.K. (1995) Mechanisms regulating Raf-1 activity in signal transduction pathways. *Mol Reprod Dev.* **42**, 507-14.

Morrison D.K., Cutler R.E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 174-9.

Morsomme P., de Kerchove d'Exaerde A., De Meester S., Thinès D., Goffeau A. and Boutry M. (1996). Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H⁺ pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO Journal* **15**: 5513-5526.

Morsomme P., Dambly S., Maudoux O., Boutry M. (1998) Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem.* **273**: 34837-42.

Morsomme P., Boutry M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1465**: 1-16.

Moruzzi M.S, Marverti G., Piccinini G., Frassinetti C., Monti M.G.. (1993) Effect of spermine on membrane-associated and membrane-inserted forms of protein kinase C. *Mol Cell Biochem*; **124(1)**:1-9.

Muslin A.J., Tanner J.W., Allen P.M. and Shaw A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-897.

Nelson N. (1992). Structural conservation and functional diversity of V-ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **24**: 407-414.

Nemeth K., Salchert K., Putnoky P., Bhalerao R., Koncz-Kalman Z., Stankovic-Stangeland B., Bako L., Mathur J., Okresz L., Stabel S., Geigenberger P., Stitt M., Redei G.P., Schell J., Koncz C. (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis *Genes Dev* **12(19)**: 3059-73.

Nielsen, D.A., Welsh, M., Casadaban, M.J., and Steiner, D.F. (1985). Control of insulin gene expression in pancreatic p-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J. Biol. Chem.* **260**: 13585-13589.

Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M. and Pardo J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* **109**: 735-742.

Obsil T., Ghirlando R., Klein DC., Ganguly S., Dyda F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**: 257-67.

Oecking C. and Weiler E.W. (1991). Characterization and purification of fusicoccin-binding complex from plasma membrane of *Commelina communis*. *European Journal of Biochemistry* **199**: 685-689.

Oecking C., Eckerson C. and Weiler E.W. (1994). The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Letters* **352**: 163-166.

Oecking C., Piotrowski M., Hagemeyer J. and Hagemann K. (1997). Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *Plant Journal* **12**: 441-453.

Palmgren M.G. and Christensen G. (1993). Complementation *in situ* of plant plasma membrane H⁺-ATPase gene *pma1* by an H⁺-ATPase gene from a heterologous species. *FEBS Letters* **317**: 216-222.

Palmgren M.G. and Christensen G. (1994). Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 3027-3033.

Palmgren M.G., Larsson C. and Sommarin M. (1990). Proteolytic activation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal fragment. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 13423-13426.

Palmgren M.G., Sommarin M., Serrano R. and Larsson C. (1991). Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 20470-20475.

Palmgren M.G. (1998). Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Advances in Botanical Research* **28**: 1-70.

Pegg AE., Williams-Asham HG., (1987) Pharmacologic interference with enzymes of polyamine biosynthesis and of 5%-methylthioadenosine metabolism, in: P.P. McCann, A. Pegg, A. Sjoerdsma (Eds.), *Inhibition of Polyamine Metabolism: Biological Significance and Basis for New Therapies*, Academic Press, San Diego, CA, , pp. 79-106

Peng C., Graves PR., Thoma RS., Wu Z., Shaw AS., Piwnica-Worms H. (1997) Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science* **277**:1501-5

Petosa, C., Masters, S.C., Bankston, L.A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. and Liddington, R.C. (1998) 14-3-3~ binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J. Biol. Chem.* **273**, 16305-16310.

Pfossen M., Konigshoffer H., Kandeler R., (1990). Free, conjugated and bound polyamines during the cell cycle of synchronized cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.*, **136**: 574-579.

Pini C., Vicari G., Ballio A., Federico R., Evidente A. and Randazzo G. (1979). Antibodies specific for fusicoccin. *Plant Science Letters* **16**: 343-353.

Portillo F., Larrinoa I.F. and Serrano R. (1989). Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Letters* **247**: 381-385.

Portillo F., Eraso P., Serrano R. (1991) Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS letters* **287**, 71-74.

Rasi-Caldogno F. and Pugliarello M.C. (1985). Fusicoccin stimulates the H⁺-ATPase of plasmalemma in isolated membrane vesicles from radish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **133**: 280-285.

Rasi-Caldogno F., De Michelis M.I., Pugliarello M.C. and Marrè E. (1986). H⁺-pumping driven by the plasma membrane ATPase in membrane vesicles from radish: stimulation by fusicoccin. *Plant Physiology* **82**: 121-125.

Rasi-Caldogno F., Pugliarello M., Olivari C. and De Michelis M.I. (1993). Controlled proteolysis mimics the effect of fusicoccin on the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology* **103**: 391-398.

Rayle DL., Cleland RE. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solution. *Plant Physiol.* **142**: 312-318

Regenberg B., Villalba J.M., Lanfermeijer F.C. and Palmgren M.G. (1995). C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁺-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell* **7**, 1655-1666.

Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley LC., Smerdon S.J., Gamblin S.J., Yaffe M.B. (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell.* **4**, 153-66.

Roberts RL., Mosch HU., Fink GR. (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**, 1055-65.

Robinson K., Jones D., Patel Y., Martin H., Madrazo J., Martin S., Howell S., Elmore M., Finnen M.J. and Aitken A. (1994). Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. *Biochemical Journal* **1**, 853-861.

Roitsch T., Bittner M., Godt D.E. (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol* **108(1)**: 285-94.

Roldán M., Donaire J.P., Pardo J.M. and Serrano R. (1991). Regulation of root plasma membrane proton-ATPase in sunflower seedlings. *Plant Science* **79**: 163-172.

Rolland F., Moore B., Sheen J. (2002) Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell* **14**: 185-202.

Rook F., Corke F., Card R., Munz G., Smith C., Bevan M.W. (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J.* **26(4)**: 421-33.

Rosenquist M., Sehnke P., Ferl R.J., Sommarin M., Larsson C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J Mol Evol.* **51**, 446-58.

Saalbach G., Schwerdel M., Natura G., Buschmann P., Christov V. and Dahse I. (1997). Over-expression of plant 14-3-3 proteins in tobacco: enhancement of the plasmalemma K⁺ conductance of mesophyll cells. *FEBS Letters* **413**: 294-298.

Saier, MH. (1991) A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *New Biol.* **3**, 1137-1147

Sambrook J., Fritsh E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press.

Sanchez Y., Wong C., Thoma RS., Richman R., Wu Z., Piwnica-Worms H., Elledge SJ. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-501.

Sanders D. and Slyman C. (1989). Transport at the plasma membrane of plant cells. In "*Plant Membrane Transport, the Current*

Satriano J., Isume M., Casero R.A., Thomson S.C., Blantz R.C. (2001) Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(1): 329–34.

Schaller G.E. and Sussman M.R. (1988). Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase of oat roots by calcium-stimulated protein kinase. *Planta* **173**: 509-518.

Schoofs, G., Teichman S., Hartmann T., Wink M., (1983). Lysine decarboxylase in plants and its integration in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochem.*, **22**: 65–69.

Schulz S., Oelgemöller E. and Weiler E.W. (1990). Fusicoccin action in cell suspension culture of *Corydalis sempervirens*. *Planta* **183**: 83-91.

Schultz T.F., Medina J., Hill A., Quatrano R.S. (1998) 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the Em promoter and interact with VP1 and EmBP1. *Plant Cell* **10**: 837-47.

Schultz-Lessdorf B., Dietrich P., Marten I., Lohse G., Busch H. and Hedrich R. (1994). Coordination of plasma membrane ion channels during stomatal movement. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **48**, 99-112.

Sehnke P.C., Rosenquist M., Alsterfjord M., DeLille J., Sommarin M., Larsson C., Ferl R.J. (2002) Evolution and isoform specificity of plant 14-3-3 proteins. *Plant Mol Biol.* **50**: 1011-8.

Seiler N., Delcros J.G, Moulinoux J.P. (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* **28(8)**, 843–61.

Seimiya H., Sawada H., Muramatsu Y., Shimizu M., Ohko K., Yamane K., Tsuruo T. (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J.* **19**: 2652-61.

Serafini-Fracassini, D., (1991). Cell cycle-dependent changes in plant polyamine metabolism. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Eds. R. Slocum and H.Flores, CRC Press, 159–173.

Serrano R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters* **156**, 11-14.

Serrano R. (1988). H⁺-ATPase from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods of Enzymology* **157**, 533-544.

Serrano R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 61-94.

Sheen J., Zhou L. and Jang J.C. (1999) Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 410–418.

Slocum R.D., (1991a) Polyamine biosynthesis in plants, R.D. Slocum, H.E. Flores (Eds.), *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, , pp. 23–40.

Slocum, R.D., (1991b). Tissue and subcellular localization of polyamines and enzymes of polyamine metabolism. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Eds. R. Slocum and H. Flores, CRC Press, Boca Raton, 93–103.

Smeekens S. (2000) Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1(3)**:230-4.

Smith F.W., Ealing P.M., Hawkesford M.J. and Clarkson D.T. (1995). Plant members of sulphate transporters reveal functional subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 9373-9377.

Smith T., (1975) Recent advances in the biochemistry of plant amines, *Phytochemistry* 14865–890.

Smith T., Wilshire G., (1975). Distribution of cadaverine and other amines in higher plants. *Phytochem.*, **14**, 2341–2346.

Smith T., (1985). Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**: 117–143.

Smith T., (1991). A historical perspective on research in plant polyamine biology. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Eds. R. Slocum and H. Flores, *CRC Press, Boca Raton*, 1–22.

Stenz H.G., Heumann H.G. and Weisenseel M.H. (1993). High concentration of plasma membrane H⁺-ATPase in root caps of *Lepidium sativum* L. *Naturwissenschaften* **80**: 317-319.

Su W., Huber S. and Crawford N.M. (1996). Identification *in vitro* of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of *Arabidopsis* nitrate reductase. *Plant Cell* **8**: 519-527.

Su-May Yu (1999) Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation. *Plant Physiology*, **121**: 687–693.

Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oecking, C. and Sommarin, M. (1999) Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* **11**: 2379-2391.

Tabor C.V., (1984) Polyamines. *Annu.Rev. Biochem.* **53**: 749-790

Takeda Y., Samejima K., Nagano K., Watanabe M., Sugeta H., Kyogoku Y., (1983) Determination of protonation sites in thermospermine and in other polyamines by ¹⁵N and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Eur.J. Biochem.* **130**: 383–386.

Tiburcio A.F., Altabella T., Borrell A., Masgrau C., (1997) Polyamine metabolism and its regulation, *Physiol. Plant.* **100**: 664–674.

Toker A., Ellis C.A., Sellers L.A., and Aitken A. (1990). Protein kinase C inhibitor protein. *Journal of Biochemistry* **191**, 421-429.

Toker A., Sellers L.A., Amess B., Patel Y., Harris A. and Aitken A. (1992). Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor KCIP/14-3-3 from sheep brain. *European Journal of Biochemistry* **206**: 453-461.

Tome M.E, Gerner E.W. (1996) Hypusine modification in eukaryotic initiation factor 5A in rodent cells selected for resistance to growth inhibition by ornithine decarboxylase-inhibiting drugs. *Biochem J*, **320**: 55–60.

Torozer D., Huber S.C. (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol.* **114**: 947-55.

Torozer D., McMichael R., Krause KP., Kurreck J., Sonnewald U., Stitt M., Huber S.C. (1999) Site-directed mutagenesis of serine 158 demonstrates its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. *Plant J.* **17**, 407-13.

Tsay YF., Schroeder JI., Feldmann KA., Crawford NM. (1993) The herbicide sensitive gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705-713.

Van Hemert MJ, Steensma HY, Van Heusden GP. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays*. **23** (10): 936-46.

Vara F. and Serrano R. (1983). Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 5334-5336.

Villalba J.M., Palmgren M.G., Berberian G.E., Ferguson C. and Serrano R. (1992). Functional expression of plant plasma membrane H⁺-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 12341-12349.

Vincenz C., Dixit V.M. (1996). 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem* **271**: 20029-20034.

Visconti S., Fullone M.R., Marra M., Morandini P., Perfetti R., Vergani P. e Aducci P. (1996). Espressione in *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* della principale isoforma delle proteine 14-3-3 presente nelle preparazioni di recettore della fusicoccina. *Petria* **6**: 280-281.

Visconti S., Camoni L., Fullone M.R., Lalle M., Marra M., Aducci P. (2003) Mutational analysis of the interaction between 14-3-3 proteins and plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **278**: 8172-8.

Waltes D.R. (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **1**: 97-107

Wang H., Zhang L., Liddington R., Fu H. (1998) Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3zeta disrupt its interaction with Raf-1 kinase. *J Biol Chem.* **273**: 16297-304.

Wang B., Yang H., Liu YC., Jelinek T., Zhang L, Ruoslahti E., Fu H. (1999) Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry* **38**: 12499-504.

Winkler D.G., Cutler RE. Jr., Drugan JK., Campbell S., Morrison DK., Cooper JA. (1998) Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity. *J. Biol. Chem.* **273**: 21578-84.

Wu K., Lu G., Sehne P. and Ferl R.J. (1997). The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **339**: 2-8.

Xiao B., Smerdon S.J., Jones DA., Dodson G.G., Soneji Y., Aitken A. and Gamblin S. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**: 188-191.

Xing H., Kornfeld K., Muslin AJ. (1997) The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol.* **7**: 294-300.

- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gambin, S.J., Smerdon, S.J. and Cantley, L.C.** (1997) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971.
- Yaffe M.B, Smerdon S.J.** (2001) PhosphoSerine/threonine binding domains: you can't pSERious? *Structure* **9(3)**: 33-8.
- Yang H., Masters SC., Wang H., Fu H.** (2001) The proapoptotic protein Bad binds the amphipathic groove of 14-3-3zeta. *Biochim Biophys Acta* **1547**, 313-9.
- Yamaguchi T., Nagata H., Fujisawa H.** (1981) A new activator protein that activates tryptophan 5 monooxygenase and tyrosine monooxygenase in the presence of Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase: purification and characterization. *Journal of Biological chemistry.* **256**, 5404-5409.
- Zeng Y., Forbes KC., Wu Z., Moreno S., Piwnica-Worms H., Enoch T.** (1998) Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* **395**, 507-10.
- Zeng Y., Piwnica-Worms H.** (1999) DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol.* **19**, 7410-7419.
- Zha J., Harada H., Osipov K., Jockel J, Waksman G., Korsmeyer SJ.** (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.* **272**, 24101-4.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. and Korsmeyer S.** (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L. *Cell* **87**, 619-628.
- Zhang L., Wang H., Liu D., Liddington R. and Fu H.** (1997). Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3ζ through a common site involving lysine 49. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 13717-13724.

Zhang L., Chen J., Fu H. (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**: 8511-8515.

