



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di

AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

Tesi di laurea

*Effetto della radiazione UV-B sullo stato redox di molecole antiossidanti, in foglie di *A. thaliana*, wild-type e mutanti ggt1.*

Relatore :

Prof. Antonio Masi

Laureando:

Stefano Turato

Matricola n.

1007005

ANNO ACCADEMICO 2012- 2013

INDICE:

RIASSUNTO	5
SUMMARY	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Lo stress ossidativo	7
1.1.1 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)	7
1.1.2 Metabolismo Antiossidante	8
1.1.3 Enzimi antiossidanti	9
1.1.3.1 Superossido dismutasi (SOD)	9
1.1.3.2 Catalasi (CAT)	10
1.1.3.3 Ascorbato perossidasi (APox)	10
1.1.3.4 Glutazione perossidasi (GPox)	10
1.1.3.5 Glutazione reduttasi (GR)	11
1.1.4 Antiossidanti non enzimatici	12
1.1.4.1 α -tocoferolo	12
1.1.4.2 Flavonoidi	12
1.1.4.3 Carotenoidi	13
1.2 La radiazione UV-B	14
1.2.1 Effetti nell'ambiente	14
1.2.2 Effetti sulle piante	16
1.2.2.1 Effetti diretti	16
1.2.2.2 Effetti indiretti	17
1.2.2.3 La fotomorfogenesi	17
1.3 L'acido ascorbico	18
1.3.1 Caratteristiche chimiche	18
1.3.2 Biosintesi	19
1.3.3 Funzione antiossidante	20
1.3.4 Localizzazione e meccanismi di trasporto	21
1.4 Il glutatione	24
1.4.1 Caratteristiche chimiche	24
1.4.2 Biosintesi	25
1.4.3 Degradazione	26
1.4.3.1 Ciclo del γ -glutamile	27
1.4.4 Localizzazione e meccanismi di trasporto	28
1.4.5 Funzione antiossidante	31
1.4.5.1 Ciclo Ascorbato–Glutazione	31
1.5 La GGT (γ -glutamyl transferasi o γ -GT)	34
1.5.1 Caratteristiche biologiche e strutturali	34
1.5.2 La γ -GT vegetale	35
1.5.3 Localizzazione cellulare	36
1.5.4 Mutante <i>ggt1</i>	37
1.6 L'Apoplasto dei tessuti vegetali	39
1.6.1 Proprietà	39
1.6.2 L'apoplasto fogliare	40

2. OBIETTIVO	43
3. MATERIALI E METODI	45
3.1 Materiale vegetale	45
3.2 Trattamento con radiazione UV	45
3.3 Estrazione campioni fogliari	46
3.3.1 Estratto totale	46
3.3.2 Fluidi extracellulari	46
3.4 Determinazione di ascorbato ridotto e ossidato	47
3.4.1 Analisi spettrofotometrica di ascorbato ridotto	47
3.4.2 Analisi spettrofotometrica di deidroascorbato	48
3.5 Determinazione del contenuto di tioli con HPLC	49
3.5.1 Principio	49
3.5.2 Riduzione e derivatizzazione	50
3.5.3 Analisi cromatografica	50
3.6 Analisi statistica dei dati	51
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	53
4.1 Analisi del contenuto di Ascorbato	53
4.1.1 Variazione dei contenuti di ascorbato in base all'età delle piante	53
4.1.2 Contenuto di ascorbato nell'estratto totale	55
4.1.3 Contenuto di ascorbato nei fluidi extracellulari	56
4.2 Analisi del contenuto di Tioli	58
4.2.1 Cys in ECWF	58
4.2.2 Cys-Gly in ECWF	59
4.2.3 GSH in ECWF	60
4.2.4 Cys in estratto totale	61
4.2.5 Cys-Gly in estratto totale	62
4.2.6 GSH in estratto totale	63
5. CONCLUSIONE	65
6. BIBLIOGRAFIA	67
6.1 Siti internet consultati	79
6.2 Acronimi ed abbreviazioni testuali	79
ACKNOWLEDGEMENTS	80

RIASSUNTO

Recenti misurazioni del livello di ozono hanno dimostrato che lo strato di ozono nella stratosfera si è impoverito negli ultimi decenni a causa della contaminazione da clorofluorocarburi determinata dall'uomo. A conseguenza di ciò, la quantità di radiazione UV-B che raggiunge la superficie terrestre è aumentata costantemente. La radiazione UV-B rappresenta un rischio per le piante e gli altri organismi viventi. Questa radiazione danneggia il DNA, le proteine, e i lipidi delle membrane cellulari, stimolando la formazione di composti ossidanti come i R.O.S. (Specie Reattive dell'Ossigeno). Le piante che necessitano della luce solare per la fotosintesi sono quindi più soggette a tali rischi. Per far fronte a questo problema, le piante hanno messo a punto un meccanismo per proteggersi dalla radiazione UV-B. Questo meccanismo prevede l'uso di un sistema antiossidante composto da enzimi e altre molecole, tra le quali le più importanti sono l'ascorbato e il glutatione. Per studiare come queste molecole interagiscono con lo stress ossidativo indotto da radiazione UV-B, sono state utilizzate piante di genotipi diversi di *A. thaliana* ecotipo Columbia, wild-type e mutante *ggt1*, che potrebbero presentare diverse strategie di risposta allo stress. È stato verificato che i due genotipi a confronto sfruttano il glutatione in modo diverso per rispondere alla radiazione ossidante. Il WT tende a recuperare GSH ridotto dalla forma ossidata (GSSG) tramite la via degradativa della γ -GT apoplastica. Il mutante invece sembra usare un meccanismo che sfrutta la coniugazione del GSH con composti ossidati a formare GS-coniugati, la loro degradazione attraverso la γ -GT vacuolare e successiva sintesi di nuovo GSH nel citoplasma.

SUMMARY

Recent measurements of ozone levels have showed that the stratospheric ozone layer has been decreasing in the last decades as a result of contamination with chlorofluorocarbons made by humans. Due to this, the amount of UV-B radiation that reaches the earth's surface has steadily increased. The UV-B radiation is a risk for plants and other living organisms. This radiation causes damage to DNA, proteins, and lipids of cell's membranes, by stimulation of oxidizing compounds such as R.O.S. (Reactive Oxygen Species). Plants require sunlight for photosynthesis and are therefore more susceptible to these risks. To fix this problem, plants have developed a mechanism to protect themselves against UV-B radiation. This mechanism involves the use of an antioxidant system, composed of enzymes and other molecules, among which, the most important are ascorbate and glutathione. To study how these molecules interact with the oxidative stress induced by UV-B radiation, we have used plants of different genotypes of *A. thaliana* ecotype Columbia, wild-type and mutant *ggt1*, which might have different strategies to respond against oxidative stress. It has been verified that the two compared genotypes use glutathione pool in a different way to respond to the oxidant radiation. Wild-type plants recovered reduced GSH from the oxidized form (GSSG) by the degradation pathway using the apoplastic γ -GT, while the mutants seem to use a pathway involving conjugation of GSH with oxidized compounds, degradation of the GS-conjugate by vacuolar γ -GT form and re-synthesis of GSH in the cytoplasm.

1. INTRODUZIONE

1.1 Lo stress ossidativo

1.1.1 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Nelle piante lo stress ossidativo è il risultato di uno sbilanciamento nell'accumulo e nella rimozione all'interno dei tessuti vegetali, di composti ossidanti come i radicali liberi e le specie reattive dell'ossigeno. Queste specie reattive dell'ossigeno definite con l'acronimo R.O.S. (Reactive Oxygen Species) comprendono il perossido d'idrogeno (H_2O_2), l'anione superossido (O_2^-), il radicale ossidrile ($\bullet OH$) e altre molecole altamente ossidanti. Queste molecole e radicali hanno emivita variabile all'interno della cellula e nell'apoplasto vegetale, e tendono a colpire con la loro azione ossidante le varie componenti cellulari come per esempio i lipidi di membrana, le proteine, e gli acidi nucleici.

Il livello dei ROS nei tessuti vegetali aumenta durante condizioni di stress abiotici e biotici, come può essere quello causato da radiazioni ionizzanti (raggi UV, raggi X e raggi gamma), che portano ad un accumulo di H_2O_2 nei tessuti colpiti. Gli effetti più gravi dello stress dovuto a queste specie si riscontrano a carico dei lipidi che subiscono la perossidazione che determina l'aumento della permeabilità della membrana cellulare, delle proteine che subiscono l'ossidazione dei gruppi R laterali degli amminoacidi e presentano struttura e funzione biologica alterata, e degli acidi nucleici in quanto questi radicali liberi possono determinare mutazioni più o meno puntiformi e danneggiare macroscopicamente lo stesso DNA alterando la struttura chimica delle basi azotate.

Le interazioni tra ROS e gli acidi nucleici sono le più gravi, l'ossidazione del DNA ad esempio porta alla formazione di lesioni capaci di indurre mutazione genica, interrompere la trascrizione, e influenzare i modelli di regolazione genica riducendo la sintesi proteica (Britt, 1999; Cooke et al., 2003). Il danno ossidativo al DNA è quindi in grado di avere un profondo impatto sulla crescita e lo sviluppo cellulare, che può avere gravi conseguenze per l'intero organismo.

Le proteine cellulari possono essere ossidate mediante modificazione covalente, dall'azione di ROS o altri sottoprodotti dello stress ossidativo (Gill e Tuteja, 2010). Il carico di questa ossidazione e la sua irreversibilità determina un costo energetico elevato per la cellula per riparare le parti danneggiate (Moller et al., 2007).

Tuttavia l'ossidazione limitata di proteine contenenti zolfo, non è irreversibile, e queste possono essere ripristinate da specifici enzimi cellulari. È quindi possibile che certi

prodotti di ossidazione degli aminoacidi cisteina e metionina siano utilizzati come molecole segnale della presenza di ROS nei tessuti vegetali (Bigelow e Squier, 2011).

I danni alle membrane lipidiche tramite la perossidazione sono uno degli effetti più gravi prodotti dai ROS, in quanto non sono solo danni contro la compartimentalizzazione e la funzione cellulare, ma sono anche importanti per la propagazione dei radicali lipidici ($\text{ROO} \bullet$) che si formano, che possono andare a danneggiare gli altri componenti cellulari (Mano et al., 2009).

Se la perossidazione lipidica diventa diffusa, si traduce in diminuzione della fluidità della membrana, aumento della fuoriuscita di soluti, ed entrata di composti tossici attraverso di essa (Moller et al., 2007).

Ci sono molte fonti possibili di produzione di ROS nella pianta, tra le quali l'enzima NADPH ossidasi nella membrana cellulare, gli enzimi perossidasi e ammino ossidasi legati alla parete cellulare e il trasporto di elettroni nel cloroplasto, mitocondrio e perossisoma, oltre a reazioni innescate dall'attacco di microrganismi patogeni alla pianta che risponde con un "burst" ossidativo, implicato nella risposta ipersensibile (Lamb and Dixon, 1997).

Il sistema più comune di protezione nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno è quello che utilizza enzimi deputati alla conversione dei ROS in prodotti meno reattivi e tossici per la cellula. Se in passato questi ROS erano considerati solamente dannosi per le cellule, ora è riconosciuto che la regolazione redox che coinvolge i prodotti dello stress ossidativo è anche un fattore importante di modulazione delle attività cellulari (Allen and Tresini, 2000). L'accumulo di perossido d'idrogeno nei tessuti vegetali, funge infatti da molecola segnale per l'attivazione di molti geni della pianta, tra i quali quelli di difesa (Levine et al., 1994), quelli di morte cellulare programmata per dare risposta ipersensibile, e geni per la biogenesi dei perossisomi, importantissimi organelli dove vengono detossificate molecole tossiche (López Huertas et al., 2000).

1.1.2 Metabolismo Antiossidante

Durante il loro normale metabolismo le piante mantengono una produzione basale di ROS, che sono utilizzati in vari modi all'interno dei tessuti, tra i quali la trasmissione di elettroni nei percorsi di segnalazione degli stimoli e nella catena di trasporto degli elettroni durante la fotosintesi (Noctor e Foyer, 1998). Ciò si traduce in un equilibrio tra

le reazioni di ossidazione e riduzione all'interno della cellula vegetale, che può essere interrotto da condizioni di stress, che portano alla sovrapproduzione di ROS, oppure ad un'insufficienza di difese antiossidanti che si traduce in uno stato di stress ossidativo. Per assicurare il mantenimento dei livelli basali di ROS, necessari per il loro normale funzionamento, le piante hanno un sistema di antiossidanti enzimatici e non enzimatici che mantengono ai giusti livelli le quantità di ROS presenti nei tessuti. Il sistema di antiossidanti vegetali è caratterizzato da ridondanza e multifunzionalità delle molecole ed enzimi coinvolti, consentendo il mantenimento di un elevato grado di potere antiossidante, anche quando alcune componenti scarseggiano o non sono proprio presenti (Mittler, 2002;. Van Breusegem et al, 2008).

1.1.3 Enzimi antiossidanti

I principali enzimi antiossidanti presenti nei tessuti vegetali sono: superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), ascorbato perossidasi (APox), glutatione perossidasi (GPox), glutatione reduttasi (GR).

1.1.3.1 Superossido dismutasi (SOD)

La superossido dismutasi è uno dei più importanti e diffusi enzimi antiossidanti nelle cellule vegetali. Trovato nella maggior parte dei compartimenti cellulari, catalizza la reazione di dismutazione dello ione superossido (O_2^-) a perossido (H_2O_2) ed è quindi il primo enzima che viene utilizzato dalla cellula nella detossificazione dai ROS. La regolazione dell'attività della SOD è modulata da livelli crescenti di O_2^- , e un rapido aumento dell'attività SOD è registrata come risposta iniziale a diversi fattori di stress abiotici tra cui gli UV-B (Gill e Tuteja, 2010; Han et al ., 2009;. Selvakumar, 2008).

Il ruolo della SOD è quello di fornire una protezione immediata dagli effetti di stress ossidativo nel sito di produzione dei ROS, prima che altri meccanismi di difesa antiossidante vengano attivati. Il rapido aumento dell'attività della SOD in risposta allo stress ossidativo è quindi spesso un fenomeno transitorio. Si registra un'elevata attività nei cloroplasti solo nelle prime fasi di trattamento con agenti di stress ma poi i livelli ritornano ad essere normali, anche se lo stress continua ad essere applicato (Dawar et al, 1998).

1.1.3.2 Catalasi (CAT)

Gli enzimi della classe della catalasi si trovano in quasi tutte le cellule vegetali esposte a stress ossidativo (Gill e Tuteja, 2010). Questi enzimi sono comunemente localizzati nei perossisomi dove sono coinvolti nella risposta allo stress ossidativo catalizzando la conversione di H_2O_2 in acqua e ossigeno molecolare (O_2) (Noctor e Foyer, 1998). L'attività della catalasi varia in risposta ai diversi stress abiotici, e spesso viene ridotta dopo irradiazione prolungata con raggi UV-B (Selvakumar, 2008; Zancan et al, 2008). È stato però verificato che in frumento, l'applicazione di radiazione UV-B induce un aumento dell'attività di questo enzima, specialmente a temperature elevate e in combinazione con altri fattori di stress (Ambasht e Agrawal, 2003; Yang et al, 2007).

1.1.3.3 Ascorbato perossidasi (APox)

L'ascorbato perossidasi è un enzima antiossidante trovato negli organelli, nel citoplasma e anche nell'apoplasto delle cellule vegetali (Noctor e Foyer, 1998). Il suo ruolo è quello di detossificare per riduzione il perossido d'idrogeno, catalizzando il trasferimento di protoni da una molecola di acido ascorbico (AsA) definita donatore. L'attività della perossidasi viene aumentata durante l'esposizione ai raggi UV-B, infatti, l'incremento del contenuto di H_2O_2 nel tessuto vegetale risulta essere un segnale importante per amplificare la trascrizione dei geni che codificano per l'Apox (Garg e Manchanda, 2009; Pekker et al., 2002). L'up-regolazione dell'attività dell'Apox ad opera dei raggi UV-B è stata dimostrata anche in piante in cui l'attività della ascorbato perossidasi risulta limitata a causa di carenza di nutrienti (Zancan et al., 2008). Mentre alcuni studi suggeriscono che l'attività della Apox può risultare limitata in condizioni di stress ossidativo estremo (Jain et al., 2003), sembra probabile che la modulazione dell'attività dell'ascorbato perossidasi sia un effetto fondamentale nella risposta delle piante all'esposizione ai raggi UV-B.

1.1.3.4 Glutazione perossidasi (GPox)

La glutazione perossidasi è un enzima presente nelle membrane dei diversi organelli cellulari, cloroplasti, mitocondri e perossisomi, nonché nel citoplasma e nell'apoplasto (Noctor e Foyer, 1998). Analogamente alla ascorbato perossidasi, la GPox è responsabile della reazione di riduzione di H_2O_2 ad acqua, ma a differenza della precedente utilizza la forma ridotta del glutatione (GSH) come donatore di elettroni. Visto che la GPox opera a

valle della catena delle reazioni antiossidanti, l'aumento dell'attività della GPox è meno frequente in risposta a stress abiotici rispetto a quello che accade per altri enzimi antiossidanti (Dixon et al., 1998). Tuttavia, alcuni aumenti di attività della glutatione perossidasi derivanti dall'esposizione ai raggi UV-B sono stati registrati, nella soia (*Glycine max*) e nei cotiledoni di cetriolo (*Cucumis sativus*) (Jain et al., 2003; Xu et al., 2008), indicando un ruolo possibile per la GPox nella risposta allo stress da UV-B.

La biosintesi di GPox è indotta comunque dallo stress ossidativo, e la sovra-espressione di GPox è utilizzata per migliorare la tolleranza allo stress delle piante transgeniche (Gill e Tuteja, 2010).

1.1.3.5 Glutazione reduttasi (GR)

Anche se non è direttamente coinvolto nella detossificazione dei ROS, l'enzima glutatione reduttasi è una componente importante nel funzionamento dei sistemi antiossidanti delle piante. L'enzima GR catalizza la riduzione del glutatione dalla sua forma ossidata (GSSG) a quella ridotta (GSH), mediante trasferimento di protoni dal NAD(P)H. Questi elettroni sono utilizzati per rompere il ponte disolfuro tra le 2 molecole di glutatione nella forma dimerica ossidata e rigenerare i due gruppo -SH (Gill e Tuteja, 2010). Una attività insufficiente di questo enzima comporta l'ossidazione delle riserve di glutatione e una compromissione del funzionamento di enzimi che dipendono dal GSH, come la glutatione perossidasi, risultando in una ridotta capacità di detossificare il perossido d'idrogeno. Sebbene la glutatione reduttasi sia considerata importante nelle difese enzimatiche contro lo stress ossidativo, non tutti gli studi riportano un incremento di attività della GR dopo esposizione a fonti di stress (Noctor e Foyer, 1998). Tuttavia, un significativo aumento dell'attività della glutatione reduttasi insieme a quella della glutatione perossidasi sono stati registrati in piante di soia (*Glycine max*) esposte alla radiazione UV-B (Xu et al., 2008). Tali risultati suggeriscono che l'aumento dell'attività di questo enzima può essere una strategia utilizzata dalla pianta in condizioni di stress ossidativo estremo, condizioni in cui l'attività di altri enzimi antiossidanti risulta inibita.

1.1.4 Antiossidanti non enzimatici

I sistemi antiossidanti non enzimatici si basano su molecole chimiche come l'ascorbato, il glutatione, i tocoferoli, i flavonoidi e i carotenoidi, in grado di interagire con le molecole ossidanti o i prodotti dell'ossidazione e ripristinare il loro corretto stato redox.

1.1.4.1 α -tocoferolo

L' α -tocoferolo, è un antiossidante liposolubile coinvolto nella protezione delle membrane cellulari contro i danni ossidativi (Gill e Tuteja, 2010), appartenente alla classe di composti definiti come vitamine E. La sua capacità di proteggere contro lo stress ossidativo indotto da radiazioni UV-B è stata dimostrata in diversi esperimenti. Asportando le membrane dei tilacoidi di piante di spinaci (*Spinacia oleracea*) e trattandoli con α -tocoferolo esogeno, questi risultavano protetti dai danni associati all'esposizione ai raggi UV-B, esibendo un minor danno ossidativo rispetto ai controlli non trattati (DeLong e Steffen, 1998). Tuttavia la quantità di α -tocoferolo, diminuisce durante il periodo di esposizione alla radiazione UV-B. Diminuzioni simili nell'attività dell' α -tocoferolo sono state osservate in seguito ad esposizione ai raggi UV-B in altre piante, tra cui il mais (*Zea mays*) (Carletti et al., 2003) e nei cotiledoni di cetriolo (*Cucumis sativus*) (Jain et al., 2003), suggerendo che la vitamina E sia un componente meno importante nel metabolismo antiossidante durante lo stress ossidativo indotto da UV-B rispetto agli altri antiossidanti.

1.1.4.2 Flavonoidi

I flavonoidi rappresentano un'importante classe di molecole presenti nelle piante vascolari in più di 4000 forme diverse.

Queste sostanze vennero isolate nel 1930 da Albert Szent-Gyorgi, vincitore del premio nobel per la scoperta della vitamina C, che ne individuò le proprietà antiossidanti e il ruolo protettivo nei confronti dell'ascorbato e chiamò dunque il complesso di queste molecole "vitamina P"; tuttavia non essendo mai stata individuata una sindrome da carenza da flavonoidi il termine «vitamina» è da considerarsi inappropriato

Nelle piante i flavonoidi svolgono molte funzioni, conferiscono la colorazione ai petali, regolano la germinazione del polline, collaborano nella lotta contro i parassiti, permettono la fissazione dell'azoto, e risultano essere co-fattori per la regolazione enzimatica e l'azione antiossidante.

Dal punto di vista chimico i flavonoidi sono polifenoli caratterizzati da uno scheletro carbonioso comune, C6-C3-C6, chiamato 1,3-difenilpropano. Oltre ai due anelli aromatici, è presente un altro anello eterociclico dovuto ad un ponte con l'ossigeno. Il grado di ossidazione dell'anello centrale formato attraverso il ponte con l'Ossigeno determina la suddivisione dei flavonoidi in varie classi: Flavoni, Flavonoli, Flavononi, Flavonololi saturi, Catechine, Antocianine, Isoflavoni, Calconi, Auroni, Neoflavoni, tutti con una struttura dell'anello centrale differente.

I flavonoidi sono sintetizzati dall'enzima Calcolone Sintetasi a partire da tre molecole di Malonil CoA e una molecola di 4-Cumaroil CoA. Il Malonil CoA deriva dall'acetato tramite incorporazione di una molecola di CO₂ e forma il primo anello aromatico; il 4-Cumaroil CoA deriva invece dall'amminoacido L-fenilalanina ed attraverso una complessa via metabolica forma il secondo anello, andando ad originare il Calcolone, il primo polifenolo dal quale derivano tutti gli altri.

La biosintesi dei vari flavonoidi, oltre che dalla genetica della pianta e dal suo ciclo biologico, dipende anche da fattori biotici come la temperatura, la disponibilità di luce, la composizione del terreno, l'attacco da parte di parassiti.

L'accumulo di flavonoidi nei vacuoli delle cellule è molto importante, ed avviene dopo l'eventuale glicosilazione a carico del gruppo ossidrilico in posizione 3 dell'anello centrale e rappresenta l'ultima tappa della loro sintesi.

1.1.4.3 Carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti che svolgono un ruolo importante nella protezione delle piante contro i processi ossidativi. Il gruppo dei carotenoidi comprende una vasta gamma di composti dalla natura chimica diversa, ma tutti con un ruolo attivo nei confronti dei ROS, agendo come modulatori negativi (quencer) dello stress ossidativo.

I carotenoidi sono molecole costituite da una lunga catena di atomi di carbonio, circa 35-40 atomi e definita catena polienica, spesso terminante in un anello carbonioso. La struttura della catena permette di dividere i carotenoidi in due classi strutturali:

- le xantofille, costituite da catene contenenti atomi di ossigeno a cui vi appartengono importanti pigmenti come la luteina e la zeaxantina.
- i caroteni, costituiti invece da molecole carboniose prive di ossigeno a cui vi appartengono il licopene ed il carotene, contenuto il primo nel pomodoro e il

secondo (che dà il nome alla classe) nelle carote, responsabile del tipico colore arancione di questa radice.

Sono antiossidanti efficienti perché trasformano l'ossigeno singoletto, che si origina in condizioni di stress, in ossigeno molecolare non più tossico.

Nelle piante, i carotenoidi giocano un ruolo centrale nel processo di fotosintesi, infatti da una parte aumentano le tipologie di luce che può assorbire la pianta dallo spettro del visibile, rispetto a quelle assorbite dalle solo clorofille, e dall'altra proteggono il centro di reazione dall'ossidazione e dai composti tossici dell'ossigeno che si possono venire a creare in condizioni di squilibrio dell'apparato fotosintetico. I carotenoidi interagiscono sinergicamente con gli altri antiossidanti, inoltre l'azione congiunta di più carotenoidi è più efficace nella protezione rispetto all'effetto di singoli composti. Il loro meccanismo d'azione permette di convertire l'energia contenuta nei radicali dell'ossigeno in calore che viene smaltito dalla pianta attraverso la superficie fogliare.

1.2 La radiazione UV

1.2.1 Effetti nell'ambiente

La radiazione ultravioletta è una radiazione elettromagnetica, appartenente allo spettro elettromagnetico, con lunghezza d'onda immediatamente inferiore a quella della luce visibile, e immediatamente superiore a quella dei raggi X (Figura 1).

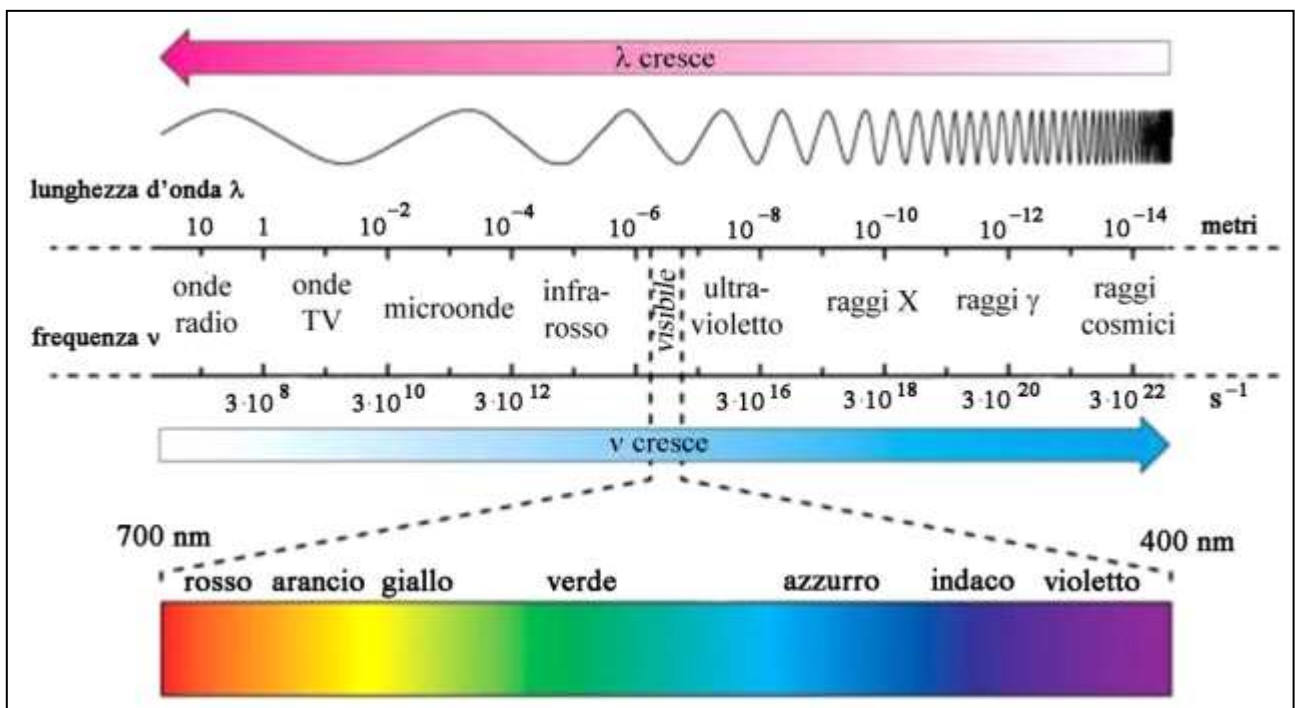


Figura 1: Spettro della radiazione elettromagnetica

Il nome significa appunto "oltre il violetto", perché il violetto è l'ultimo colore dello spettro del visibile percepito dall'uomo, cioè quello con la lunghezza d'onda più corta, ovvero tra i 380-450 nm. Rispetto alla radiazione visibile quella UV presenta frequenza maggiore e quindi risulta più energetica secondo l'equazione di Planck in cui l'energia di una radiazione è inversamente proporzionale alla sua lunghezza d'onda (λ).

La radiazione ultravioletta è suddivisa convenzionalmente in tre bande spettrali (Fig 2):

- UV-C (100-280 nm) : radiazione estremamente pericolosa per la vita a causa del suo alto contributo energetico.
- UV-B (280-315 nm): solo una piccola parte di UV-B provenienti dal Sole raggiunge la superficie terrestre. È la frazione più piccola dello spettro degli UV.
- UV-A (315-400 nm): è la radiazione non assorbita dall'atmosfera, responsabile dell'arrossamento ed invecchiamento della pelle.

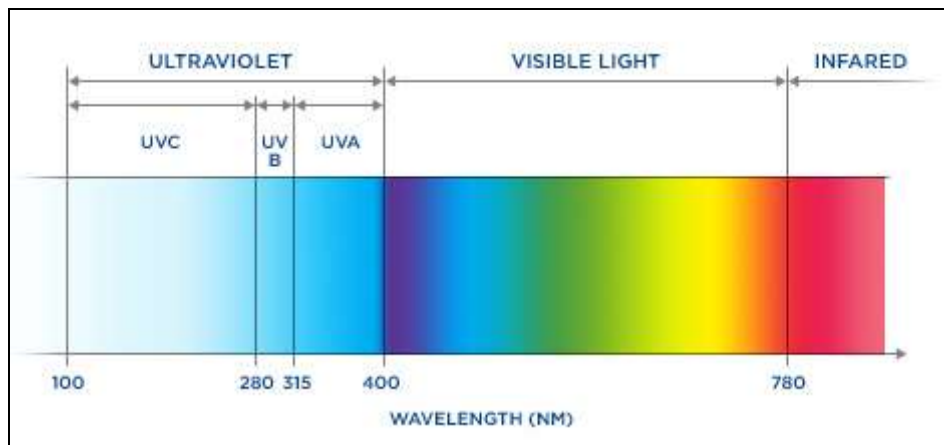


Figura 2: Spettro della radiazione ultravioletta

Il Sole emette luce ultravioletta in tutte e tre le bande UV-A, UV-B e UV-C, ma a causa dell'assorbimento da parte dell'ozono in atmosfera circa il 99% degli ultravioletti che arrivano sulla superficie terrestre sono UV-A. Infatti praticamente il 100% degli UV-C e il 95% degli UV-B è assorbito dall'atmosfera terrestre. La diminuzione continua dello strato di ozono nella stratosfera, a causa del rilascio di molecole alogenate inquinanti, come i clorofluorocarburi (CFCs), che, combinandosi con l'ozono portano alla sua degradazione. Questa contaminazione risulta quindi essere un pericolo per le piante, gli ecosistemi acquatici, gli animali e la salute umana. La creazione di "buchi" nello strato di ozono aumenta la percentuale di radiazione UV-B che arriva a colpire la superficie terrestre, e di conseguenza gli effetti citotossici, mutageni e carcinogeni di queste radiazioni (Longstreth et al., 1995). La pericolosità più alta della radiazione UV-B è

dovuta, ad un effetto sterilizzante che questa possiede per moltissime forme di vita, al danno per la pelle potendo innescare la formazione di melanomi e altri tumori e favorirne l'invecchiamento, e a danni che può recare alle componenti degli occhi.

Inoltre il problema del buco dell'ozono è strettamente collegato con quello dell'effetto serra, in quanto la gran quantità di radiazioni UV-B che raggiungono la superficie terrestre ma che vengono riflesse, sono poi intrappolate nell'atmosfera dalla presenza di gas inquinanti e determinano un aumento della temperatura, che porta al surriscaldamento globale e ai problemi ad esso connessi.

1.2.2 Effetti sulle piante

Gli studi sulle piante sottoposti a radiazioni UV-B vengono eseguiti in laboratorio su speciali celle climatiche provviste di lampade artificiali che emettono nella lunghezza d'onda dei raggi UV-B, oppure all'aperto utilizzando lampade che aumentano il livello di UV-B che colpisce le piante esposte alla normale radiazione solare (Caldwell, 1977; Tevini e Teramura, 1989; Musil, 1995; Musil, 1996). Possiamo comunque identificare effetti diretti e effetti indiretti, che le piante trattate con raggi UV-B subiscono.

1.2.2.1 Effetti diretti

Numerosi studi hanno dimostrato che le piante mostrano una sensibilità alla radiazione UV-B estremamente variabile (Musil et al., 2002). Le risposte più importanti riguardano l'accumulo di flavonoidi nelle foglie, cambiamenti di anatomia e morfologia fogliare e una ridotta crescita con una biomassa finale ridimensionata.

In particolare, la radiazione UV-B colpisce l'apparato fotosintetico della pianta, soprattutto il fotosistema II (Bornman, 1989) e l'enzima chiave del ciclo di Calvin, la 1,5 bisfosfato carbossilasi (RuBisCo). Il PS II è costituito da un eterodimero delle proteine D1 e D2 contenenti 4 molecole di clorofilla a. Queste proteine costituiscono i siti di ossidazione e riduzione delle molecole trasportatrici di elettroni durante la fase luce-dipendente della fotosintesi. Il turnover della proteina D1, risulta essere più rapido in piante che hanno subito il trattamento con raggi UV-B (Greenberg et al., 1989). Per quanto riguarda l'enzima RuBisCo, la sua attività in piante trattate con elevate quantità di radiazione UV-B, risulta diminuita (Strid et al., 1994) a causa dell'azione della radiazione sulle subunità che compongono l'enzima. Altri effetti fisiologici deleteri causati nelle piante dall'esposizione a radiazioni UV-B sono l'aumento dell'attività

respiratoria, la diminuzione dell'attività assorbente delle radici, e una chiusura stomatica alterata (Teramura et al., 1991; Quate et al., 1992) correlati comunque alla diminuzione della capacità fotosintetica globale.

L'azione diretta degli UV-B sulle piante è causata molto spesso da un'attività genica alterata dovuta a danni puntiformi a livello del DNA e di altri acidi nucleici (Britt, 1997), che possono quindi influenzare processi vitali importanti per la crescita e lo sviluppo vegetale. Di solito gli effetti diretti vengono osservati dopo brevi periodi (ore o pochi giorni) di irradiazione artificiale con lampade UV-B (Bornman and Sunby-Emmanuelsson, 1995).

1.2.2.2 Effetti indiretti

Gli effetti indiretti sono quelli mediati dai cambiamenti indotti dalla radiazione UV-B nell'ambiente in cui si trova la pianta, oppure che agiscono sulla pianta stessa ma che sono importanti nella relazione con altri organismi. Gli effetti indiretti sono quindi molto importanti, ma ancora poco prevedibili, e agiscono attraverso cambiamenti nella composizione chimica e nella crescita delle piante, attraverso variazioni dell'ambiente biotico e abiotico che le circonda (Caldwell et al., 1998). Gli effetti indiretti includono l'attività delle altre piante che competono con la pianta sotto considerazione, la mobilitazione dei nutrienti, e sulla presenza microrganismi simbiotici importanti per la pianta.

Diversamente dagli effetti diretti in cui le risposte si hanno in tempi abbastanza rapidi, lo studio degli effetti indiretti necessita lunghi periodi di tempo, in quanto il loro effetto è spesso lento e necessita di un accumulo di radiazioni nell'ecosistema.

1.2.2.3 Fotomorfogenesi

La fotomorfogenesi è il processo attraverso il quale la luce regola lo sviluppo della pianta (Kendrick et al., 1997). Alcuni dei processi vegetali che sono regolati dai segnali luminosi sono, la germinazione dei semi, l'espansione fogliare, l'allungamento dello stelo, l'induzione alla fioritura e la sintesi di pigmenti. Per quanto riguarda l'effetto della sola radiazione UV-B, i risultati che produce variano tra le specie e tra le diverse cultivar della stessa specie. In tutte le piante la radiazione instaura un'interazione competitiva con esse, alterando indirettamente il loro normale sviluppo, agendo principalmente sull'attività fotosintetica modulandone i pathway metabolici, denaturando enzimi

fotosintetici, limitando la funzione stomatica e la produzione di pigmenti negli organelli fotosintetizzanti (Baker et al., 1997).

1.3 L'acido ascorbico

1.3.1 Caratteristiche chimiche

L'acido ascorbico, o Vitamina C è un antiossidante solubile in acqua che svolge un ruolo prevalentemente protettivo contro l'ossidazione delle componenti cellulari. Questa molecola è molto usata in medicina negli integratori vitaminici, e nell'industria alimentare come conservante in quanto mantiene i tessuti vegetali, e i derivati (succhi, polpa di verdure e altri) con colori vivi prevenendo l'ossidazione dei pigmenti. Sebbene la maggior parte dei mammiferi sia in grado di sintetizzare acido ascorbico, gli esseri umani non sono in grado di sintetizzarlo autonomamente, come risultato di una mutazione al gene codificante l'enzima mitocondriale L-galattone-1,4-lattone ossidasi, ovvero l'ultimo enzima della via biosintetica dell'acido ascorbico.

Anche se i sintomi associati alla deficienza di vitamina C, erano stati osservati e descritti già nel 1497 da Vasco da Gama tra il suo equipaggio durante il viaggio attorno la punta meridionale dell'Africa verso l'India, si è dovuto aspettare fino al 1747, anno in cui James Lind ha dimostrato che il consumo di frutta come gli agrumi poteva prevenire o curare i disturbi associati allo scorbuto, una malattia che tra i suoi sintomi comprende una anormale formazione del collagene, nei tessuti connettivo e osseo. Anche se, solo nel ventesimo secolo si è associata strettamente la funzione della vitamina C come fattore mancante nei casi di scorbuto. Negli animali, l'ascorbato è infatti coinvolto nella sintesi di carnitina e collagene, una componente importante della pelle, tessuto cicatriziale, tendini, legamenti e vasi sanguigni. Di conseguenza, l'ascorbato è essenziale per la riparazione e manutenzione di cartilagine, ossa e denti e durante la guarigione della ferita. È anche importante per aumentare l'assorbimento del ferro non-eme da alimenti a base vegetale.

Gli alimenti a base vegetale costituiscono perciò la principale fonte di vitamina C nella dieta umana, e la possibilità di aumentare il contenuto di ascorbato nelle piante può essere un modo per migliorare il loro valore nutrizionale. Questo campo d'applicazione sta godendo di una notevole attenzione negli ultimi anni, con numerosi progetti per l'aumento di biosintesi di ascorbato nei tessuti vegetali (Chen et al., 2003; Hancock and Viola, 2005).

1.3.2 Biosintesi

L'acido L-ascorbico è apparentemente una molecola ubiquitaria negli eucarioti. Funziona come un antiossidante, un cofattore enzimatico, e come precursore per la sintesi di ossalato e tartrato. Partecipa in un'ampia varietà di processi, tra i quali la fotosintesi, la fotoprotezione, la crescita della parete e l'espansione cellulare, la resistenza agli stress ambientali, la sintesi di etilene, gibberelline, antociani, e idrossiprolina. Anche se l'ascorbato ha più ruoli, e le piante forniscono la principale fonte di vitamina C nella dieta per gli esseri umani, molto poco si sa circa il suo metabolismo nei vegetali. Dopo le prime indagini sulla biosintesi di ascorbato nelle piante negli anni '60 (Loewus, 1963), sono passati altri 35 anni prima che venisse proposta una via biosintetica definitiva (Wheeler et al., 1998). Questa prevede la presenza di L-galattone-1,4-lattone come molecola precursore dell'acido ascorbico. È stato verificato infatti che fornendo dall'esterno il L-galattone-1,4-lattone la pianta aumentava drasticamente la concentrazione di ascorbato nei tessuti (Smirnoff e Pallanca, 1996). Inoltre se questo L-galattone-1,4-lattone è marcato si può tracciare e verificare come viene convertito rapidamente e completamente ad ascorbato (Baig et al., 1970). La via biosintetica che prevede la presenza di questo precursore è la via biosintetica del GDP-Mannosio/L-Galattosio (Figura 3).

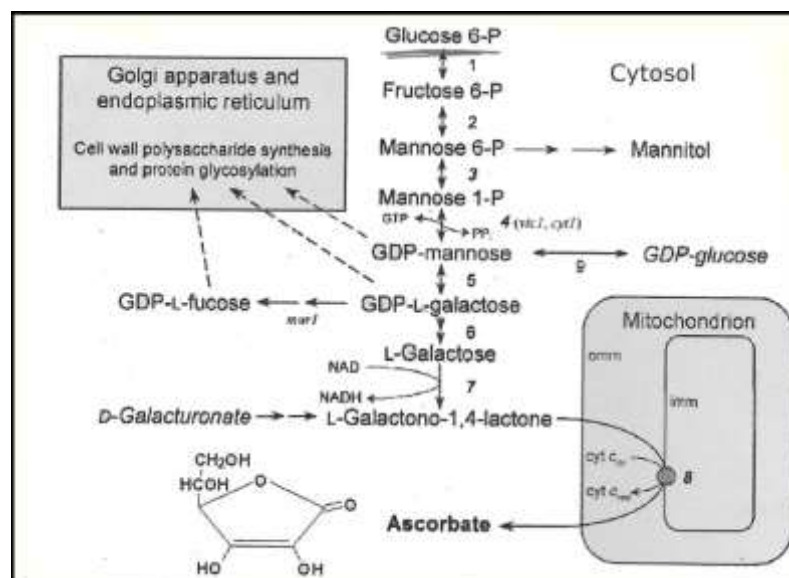


Figura 3: Pathway biosintetico della vitamina C nelle piante (Wheeler and Smirnoff, 1998)

A partire da Glucosio-6P o Fruttosio-6P provenienti dalla glicolisi si ha la conversione in Mannosio-6P. Questo viene attivato in GDP-mannosio che è interconvertibile in GDP-L-galattosio attraverso l'enzima GDP-D-mannose-3,5-epimerasi (5). L'enzima chiave nel citoplasma è comunque la L-galattosio deidrogenasi (7), che catalizza l'ossidazione dell'L-galattosio in L-galattone-1,4-lattone. A questo punto un altro enzima, la L-galattone-1,4-lattone deidrogenasi (8), ossida questo composto ad L-ascorbato. Questo enzima è localizzato sulla membrana interna del mitocondrio e utilizza il citocromo C come accettore di elettroni. Sebbene le fasi iniziali del meccanismo siano situate nel citosol, l'ossidazione di L-galattone-1, 4-lattone necessita dei mitocondri e ciò suggerisce come ci sia un'integrazione tra la sintesi dell'ascorbato, il metabolismo energetico e lo stato redox della cellula.

1.3.3 Funzione antiossidante

Le funzioni svolte dall'ascorbato nel metabolismo antiossidante possono essere divise in: un'azione diretta nella detossificazione dei ROS agendo come riducente (Garg e Manchanda, 2009) e una azione indiretta essendo il substrato per l'azione dell'enzima ascorbato per ossidasi (APox) nei confronti del H_2O_2 . L'ascorbato nelle cellule vegetali può quindi presentare una ampia gamma di stati di ossidazione che gli permettono di funzionare come donatore di elettroni a composti ossidati. La forma ridotta dell'acido ascorbico (AsA) è quella che ha maggiore attività antiossidante. La sua ossidazione parziale, spesso catalizzata dall'azione dell'APox, provoca la formazione di monodeidroascorbato (MDHA) o semideidroascorbato. In questo caso un singolo protone viene donato da una molecola di AsA ad un composto ROS, e quindi la molecola di MDA presenta solo un gruppo ossidrilico ossidato (Figura 4). Per riacquistare la capacità antiossidante totale, il MDHA deve essere rigenerato ad AsA attraverso uno dei due percorsi possibili. Nei cloroplasti, la ferredossina dal fotosistema I può catalizzare la riduzione della MDHA ad AsA cedendo ad esso gli elettroni che trasporta. Al di fuori dei cloroplasti, il MDHA viene ridotto mediante l'azione di un enzima speciale, la monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR), che provoca la sua riduzione utilizzando NAD(P)H come substrato donatore di elettroni (Mittler, 2002). Se il MDHA non viene ridotto ad AsA, avviene una reazione che converte rapidamente 2 molecole di MDHA, in una di ASA e una di deidroascorbato (DHA). Il DHA non può essere ulteriormente ossidato e deve essere rigenerato ad ascorbato ridotto che torna disponibile nel metabolismo antiossidante. Questo risultato è ottenuto attraverso l'azione dell'enzima

deidroascorbato reduttasi (DHAR) che nel ciclo dell'ascorbato-glutatione, utilizzando glutatione ridotto come substrato, riduce il DHA a AsA.

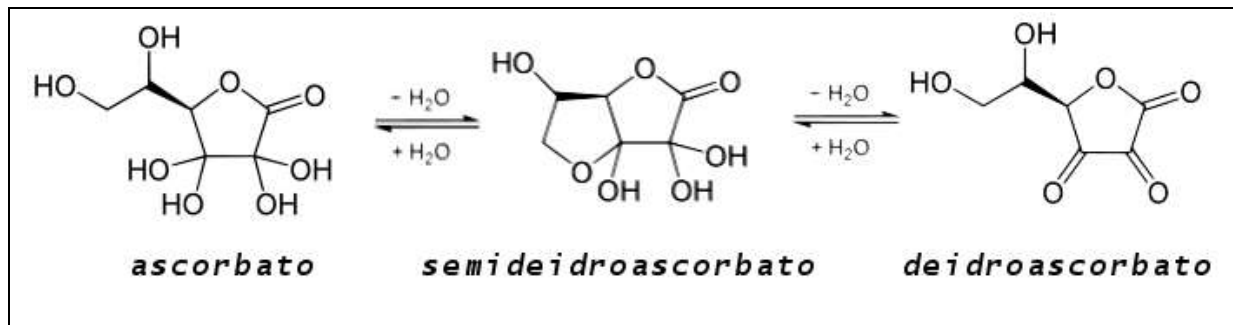


Figura 4: Formule di struttura dello stato redox dell'ascorbato (<http://www.wikipedia.org>)

L'ascorbato è accumulato in risposta a diversi stress abiotici (Gill e Tuteja, 2010) e la sua azione per la difesa contro lo stress ossidativo indotto dai raggi UV-B, risulta essere molto importante (Gao e Zhang, 2008). I mutanti VTC1 di *Arabidopsis thaliana* carenti nella biosintesi di acido ascorbico, esposti a quantità elevate di radiazioni UV-B mostrano un contenuto di clorofilla diminuito, una diminuzione della massima efficienza del PSII, un aumento della perossidazione lipidica e livelli di perossido d'idrogeno (H_2O_2) più alti rispetto a piante WT, indicando dunque nei mutanti una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo. L'AsA è anche un cofattore nella biosintesi dell'enzima Violaxantina de-epossidasi, responsabile di una reazione nel ciclo delle xantofille, importante meccanismo antiossidante. La sua mancanza induce quindi una ridotta dissipazione termica dei fotoni in eccesso assorbiti dalle antenne dei centri di reazione dei fotosistemi, la sovrapproduzione di ROS e quindi un maggiore stress ossidativo per la pianta (Gao e Zhang, 2008).

1.3.4 Localizzazione e meccanismi di trasporto

L'Ascorbato è presente in tutti i tessuti cellulari, tranne nei semi secchi (Arrigoni et al, 1992). Accade infatti che l'ascorbato si ossidi durante la fase di maturazione e disidratazione del seme e non può quindi essere rigenerato quando l'acqua contenuta diventa troppo bassa per il funzionamento del ciclo ascorbato-glutatione. Durante la germinazione in piantine di pisello, la sintesi e l'accumulo di ascorbato negli assi embrionali, inizia circa 20 ore dopo l'imbibizione (Pallanca e Smirnoff, 1999). Il trasporto a lunga distanza di ascorbato o DHA avviene nello xilema.

È stato dimostrato infatti che alimentando le radici con ascorbato marcato (^{14}C -ascorbato), l'ascorbato presente nelle radici veniva trasferito per via xilematica nei tessuti fogliari (Mozafar e Oertli, 1993). Nulla si sa circa il trasporto floematico, ma ascorbato e DHA sarebbero relativamente instabili al pH elevato del floema, preferendo pH più acidi come quello intracellulare. L'Ascorbato è presente comunque in tutti i compartimenti subcellulari, compreso l'apoplasto (parete cellulare), cloroplasti, citosol, vacuoli, mitocondri e perossisomi (Jimenez et al., 1997) e l'ascorbato apoplastico risulta avere un ruolo importante nel controllo della crescita cellulare (Pallanca e Smirnoff, 1996). L'alta concentrazione in alcuni tipi di frutta potrebbe derivare dalla compartimentazione e dalla stabilizzazione dell'ascorbato in vacuoli acidi.

Il passaggio finale della biosintesi dell'ascorbato avviene nella membrana interna mitocondriale, pertanto, dal sito di sintesi poi deve essere trasportato agli altri organelli. Ci sono dei trasportatori per consentire l'uscita dai mitocondri, e l'entrata e l'uscita dai cloroplasti, microcorpi, vacuolo e dalla membrana cellulare. Il sistema di trasporto di ascorbato più noto nelle piante è localizzato appunto sulla membrana plasmatica. È stato caratterizzato un trasportatore antiporto a vescicole (Horemans et al., 1996). Questo ha una forte affinità per il DHA più che per l'ascorbato ridotto. L'assorbimento di DHA è stimolato precaricando le vescicole con ascorbato, confermando che questo agisce come uno scambiatore AsA/DHA. Inoltre l'affinità per il DHA è compresa nell'intervallo di concentrazione atteso nell'apoplasto (Smirnoff, 1996), pertanto, il trasportatore potrebbe fornire un meccanismo per rimuovere DHA dall'apoplasto e sostituirlo con ascorbato in caso di forte presenza di ossidanti. A differenza dei sistemi di trasporto dei mammiferi, in cui il trasportatore di glucosio "GLUTI" permette anche il trasporto di DHA per diffusione facilitata (Welch et al., 1995), questo vettore non trasporta anche il glucosio.

Oltre ai trasportatori di ascorbato attraverso la membrana plasmatica, è stato identificato un sistema ascorbato-dipendente che facilita il trasporto degli elettroni attraverso la membrana plasmatica tramite un citocromo b (Horemans et al., 1996). Il MDHA apoplastico è ridotto ad ascorbato dal citocromo b e gli elettroni vengono donati al citocromo b sul lato citosolico della membrana cellulare, dove avviene invece l'ossidazione dell'ascorbato citosolico a MDHA. Il risultante MDHA citosolico è invece ridotto da una MDHA reduttasi associata alla membrana plasmatica. Due molecole di MonoDeidroAscorbato (MDHA) apoplastico, il primo prodotto dell'ossidazione

dell'ascorbato, si associano e vengono trasformate in una molecola di DHA e una di ascorbato ridotto che possono rientrare nella cellula attraverso lo scambiatore AsA/DHA (Bolwell, 1999; Figura 5).

Questo fornisce un altro meccanismo, oltre allo scambiatore AsA/DHA, per mantenere la riserva di ascorbato nella parete cellulare in uno stato ridotto, ma potrebbe anche essere associato ai meccanismi di regolazione della crescita cellulare modulati dall'ascorbato. La parete cellulare, infatti, apparentemente manca degli enzimi del ciclo ascorbato-glutatione, che contribuiscono a ridurre MDHA e DHA ad ascorbato.

La concentrazione di ascorbato nel cloroplasto può raggiungere valori di almeno 20 mM. All'interno del cloroplasto, dal 10 al 20% dell' ascorbato è localizzato nel lume tilacoidale (Mano et al., 1997), dove agisce come un co-fattore per l'enzima Violaxantina depossidasi.

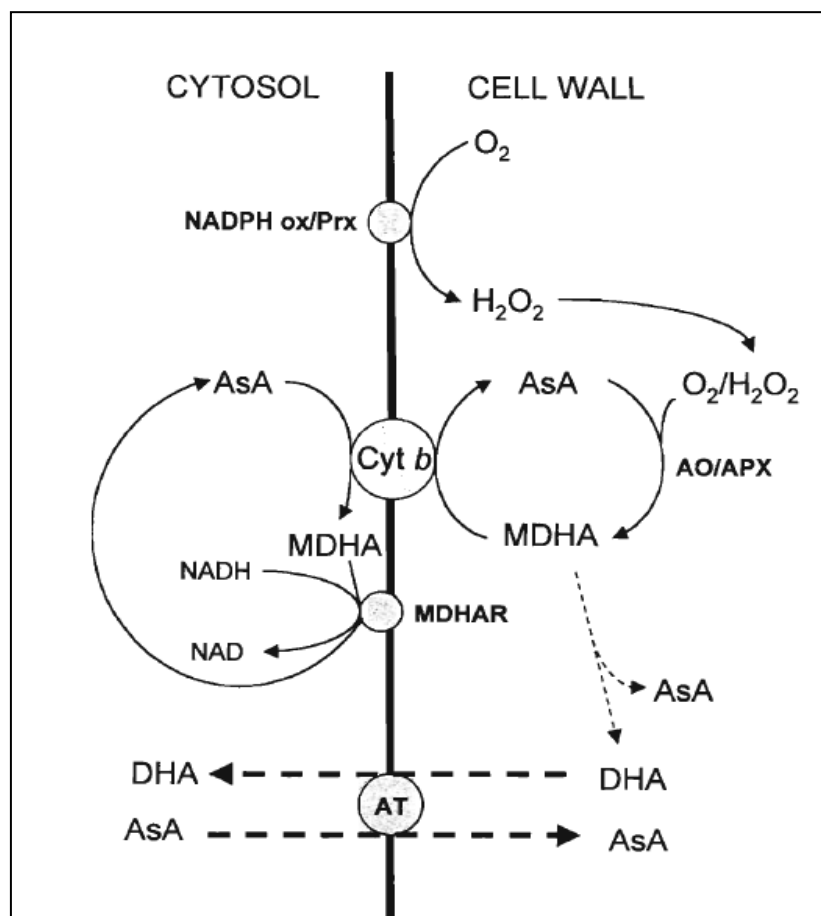


Figura 5: Meccanismi di trasporto dell'ascorbato (Bolwell, 1999)

1.4 Il glutatione

1.4.1 Caratteristiche chimiche

Il glutatione (GSH) è una molecola non proteica composta da tre amminoacidi, cisteina, acido glutammico e glicina legati assieme. Dal punto di vista chimico è dunque un tripeptide, in cui la cisteina e la glicina sono legate assieme da un normale legame α -peptidico, mentre il glutammato è legato alla cisteina attraverso un legame γ -peptidico tra il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato ed il gruppo amminico della cisteina (Figura 6). La molecola in questo modo presenta il gruppo sulfidrilico della cisteina libero di subire l'ossidazione e di formare un dimero con un'altra molecola di glutatione ossidato, identificato con l'acronimo GSSG, legandosi attraverso ponte di zolfo (Figura 7).

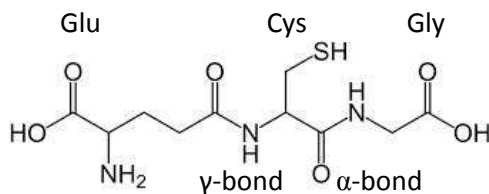


Figura 6: Formula di struttura del glutatione ridotto (GSH) (<http://www.wikipedia.org>)

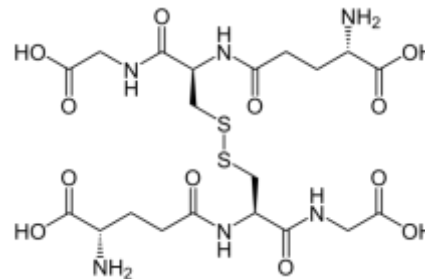


Figura 7: Formula di struttura del dimero di glutatione ossidato (GSSG) (<http://www.wikipedia.org>)

Nelle piante il glutatione svolge un ruolo importante nella regolazione del metabolismo cellulare, incluso l'accumulo e il trasporto a lunga distanza dello zolfo ridotto, la tolleranza a stress abiotici e biotici, la detossificazione di xenobiotici come erbicidi e pesticidi, metalli pesanti e altri inquinanti presenti nell'ambiente (Foyer and Rennenberg, 2000; May et al., 1998). In generale il glutatione svolge una funzione fondamentale nella protezione dei danni ossidativi che si originano nei tessuti vegetali in seguito a stress esterni, in particolare perché attiva specificatamente la trascrizione di due geni: *pal* che codifica per l'enzima fenilalanina ammonio liasi e *chs* che codifica per l'enzima chalcone sintasi importantissimi nella sintesi dei flavonoidi.

L'azione diretta del glutatione nei confronti di composti ossidanti o ossidati avviene grazie alla reazione di ossido-riduzione che subisce il gruppo tiolico (-SH) presente nella cisteina, che funge da agente riducente. Il suo stato redox è quindi l'alternarsi della forma ridotta (GSH) e di quella ossidata dimerica (GSSG), e il rapporto tra le due forme è un indicatore fondamentale per definire lo stato redox della cellula (Schafer FQ. and Buettner Gr., 2001).

La concentrazione del glutathione nei tessuti vegetali, tenendo conto sia dell'ambiente interno alle cellule che degli spazi intercellulari (apoplasto) è la risultante di un numero elevato di processi e interazioni. Questi processi includono l'assimilazione di zolfo e azoto che forniscono i precursori metabolici del glutathione, la regolazione dei meccanismi di biosintesi e degradazione, l'entrata e l'uscita di glutathione da floema e xilema, e il suo turnover cellulare per la produzione di glutathione derivati (Rennenberg, 1997).

1.4.2 Biosintesi

Il glutathione anche se è un tripeptide, ovvero una molecola costituita da 3 amminoacidi, non è di natura proteica, quindi non viene sintetizzato dai ribosomi tramite la traduzione di mRNA derivati da geni, ma necessita di una biosintesi enzimatica a partire dai 3 amminoacidi che lo compongono.

La pathway biosintetica del glutathione a partire dalla cisteina avviene essenzialmente in due fasi ATP dipendenti (Figura 8). La prima fase prevede la sintesi dell'intermedio γ -glutamylcisteina (γ -EC) a partire da glutammato e cisteina legati assieme con un legame γ -peptidico dall'azione catalitica dell'enzima γ -glutamylcisteina sintetasi (o glutammato-cisteina ligasi) che consuma una molecola di ATP.

La seconda fase invece prevede l'aggiunta di una glicina al C-terminale della cisteina dell'intermedio γ -glutamylcisteina tramite l'enzima ATP dipendente glutathione sintetasi (GSH-S).

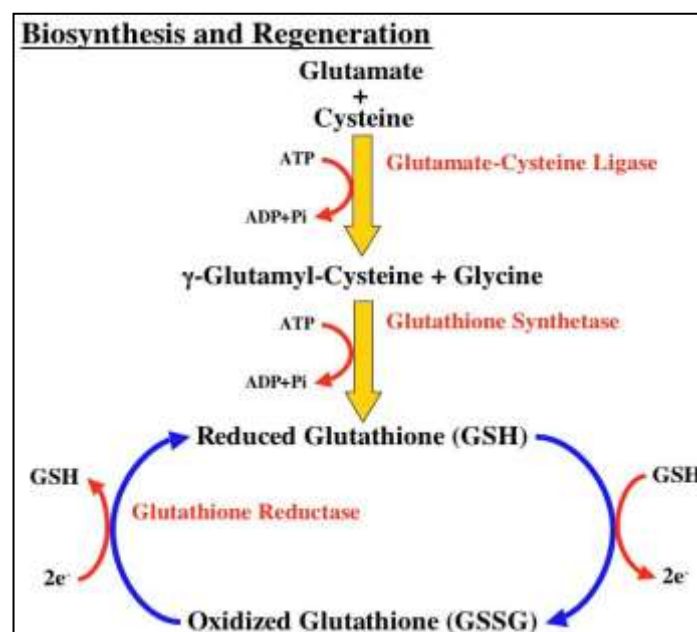
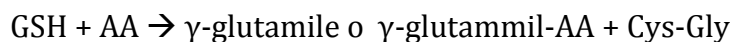


Figura 8: Biosintesi del glutathione (<http://www.gout-aware.com/glutathione-gout-treatment.html>)

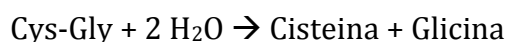
In *Arabidopsis*, i geni per la sintesi del glutatione sono essenzialmente due, il primo, *gsh1* che codifica per la γ -glutamylcisteina sintetasi, ed è localizzata esclusivamente sui plastidi, mentre il secondo, *gsh2* codificante la glutatione sintetasi, presente sia nel citosol che nei plastidi (Wachter et al., 2005). Conseguentemente, il precursore intermedio, γ -glutamylcisteina (γ -CE), deve essere esportato dal plastidio al citosol per consentire la biosintesi citosolica del GSH, suggerendo che il trasporto di glutatione tra i compartimenti è fondamentale per il mantenimento dei livelli ottimali di GSH nella cellula. In questo modo il livello di glutatione plastidiale è regolato direttamente dall'attività dell'enzima codificato da *gsh1*. Il contenuto nei plastidi è influenzato però da sistemi di efflusso, che consentono a qualche precursore γ -EC di essere trasportato al citosol dove viene convertito in GSH dall'azione dell'enzima codificato dal gene *gsh2* (Pasternak et al., 2008). Il GSH sintetizzato nei plastidi può anche essere direttamente trasportato già pronto al citosol da trasportatori specifici situati sulla membrana plastidiale.

1.4.3 Degradazione

Per quanto riguarda la degradazione e la riutilizzazione degli amminoacidi derivanti per una nuova biosintesi di glutatione, la fase più importante si svolge nello spazio esterno alla membrana plasmatica, ad opera di due enzimi: la γ -glutamyl transpeptidasi (γ -GT o GGT) e una Dipeptidasi. Il primo enzima ad agire sul glutatione extracellulare è la GGT, che è uno dei pochi enzimi in grado di attaccare il legame γ -peptidico tra cisteina e glutammato. La sua azione transferasica le permette di liberare γ -glutamile che viene trasferito o ad altri amminoacidi oppure recuperato dentro la cellula per sintetizzare nuovo glutatione, e cisteinilglicina (Cys-Gly) l'intermedio di degradazione del GSH.



Questo intermedio viene a sua volta idrolizzato in cisteina e glicina da dipeptidasi di parete e i prodotti riciccolati all'interno della cellula da trasportatori di membrana.



Anche gli γ -glutamylamminoacidi (γ -glutamyl-AA) sono riciclati dentro la cellula dove diventano substrati per γ -glutamylciclotransferasi che li converte in 5-oxo-prolina e amminoacidi corrispondenti. Solo in seguito questa 5-oxo-prolina ad opera di una 5-oxo-prolinasi viene convertita in L-glutamato che può essere utilizzato per sintetizzare nuove molecole di glutatione (Leustek et al., 2000) (Figura 9).

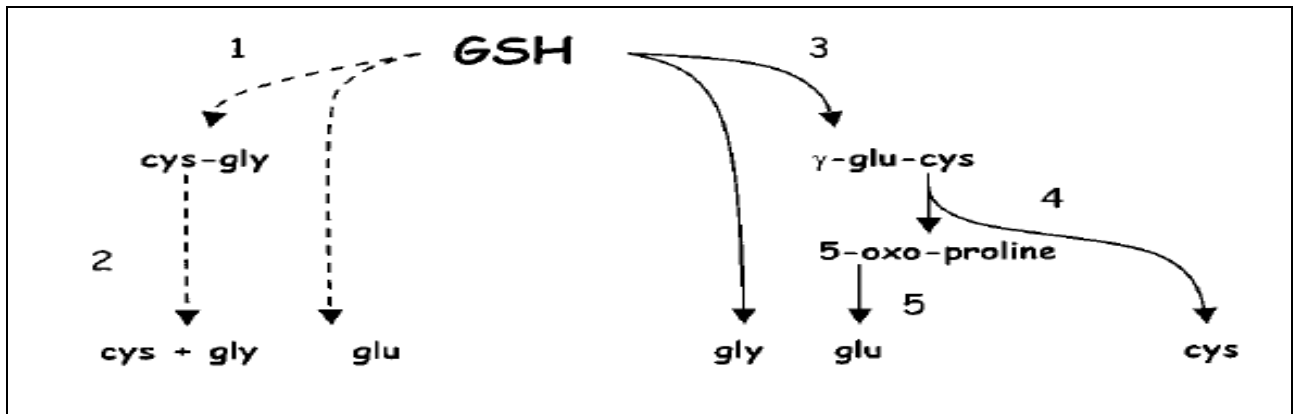


Figura 9: Diagramma schematico della degradazione del glutathione nelle piante (Leustek et al., 2000). Enzimi: 1, γ -glutamyl-transpeptidasi; 2, dipeptidasi; 3, carboxipeptidasi; 4, γ -glutamyl-cyclo-transferasi; 5, 5-oxo-prolinasi.

1.4.3.1 Ciclo del γ -glutamile

Tutte queste reazioni vanno a costituire il cosiddetto “ciclo del γ -glutamile”, che risulta simile a quello che si verifica nelle cellule animali (Ferretti et al., 2009). La differenza principale tra i due regni è la localizzazione dell’enzima GGT che è legata alla membrana cellulare nelle cellule animali, mentre come dimostrato da diverse indagini istologiche la GGT vegetale è localizzata sulla parete della cellula e sul vacuolo (Grzam et al., 2007; Ohkama-ohtsu et al., 2007a).

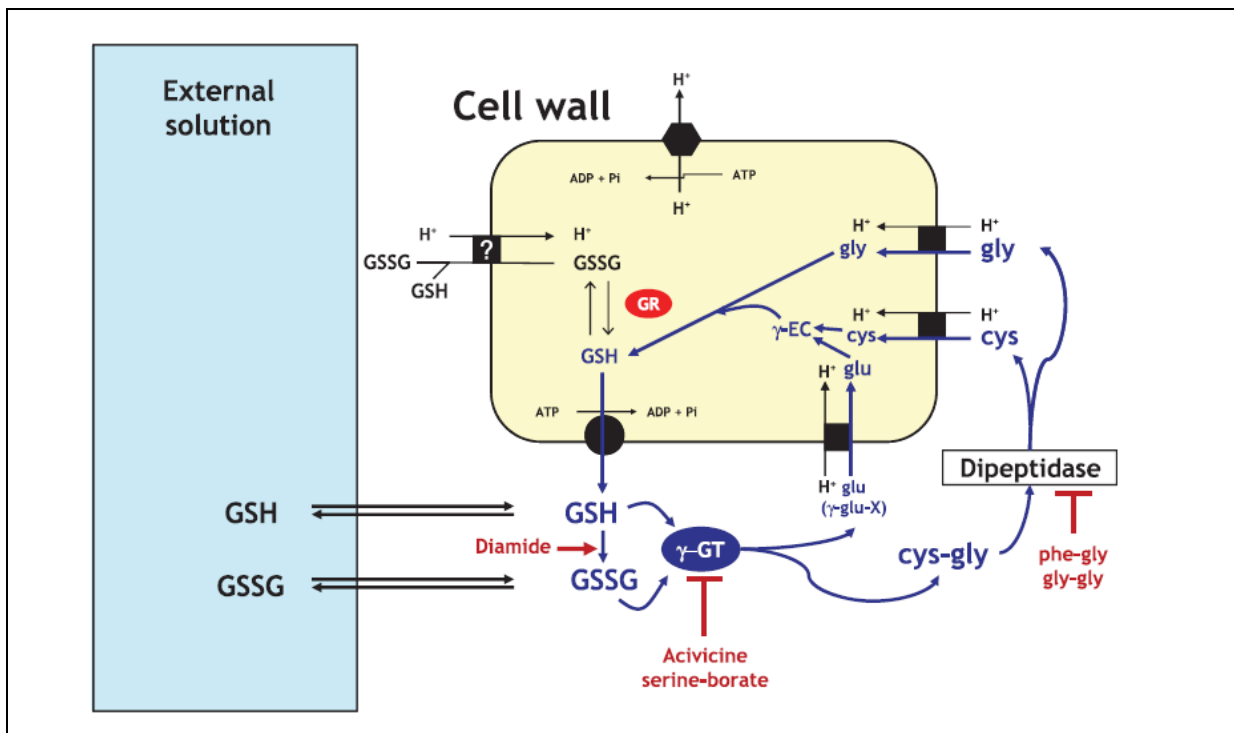


Figura 10: Ciclo del γ -glutamile (Ferretti et al., 2009)

Nel ciclo messo a punto su tessuti di cortex di radici di orzo (*Hordeum vulgare*), gli enzimi chiave all'interno della cellula sono la γ -glutamylcisteina sintetasi e la glutatione sintetasi che attivati reciprocamente da una molecola di ATP, legano i 3 amminoacidi, glicina, cisteina e glutammato e formano la molecola di glutatione. L'estrusione dalla cellula invece avviene mediante un trasportatore attualmente non ancora definito, che però si è rilevato stimolato da trattamento con diamide, una molecola tiolo-ossidate, e da aggiunta di glutatione ossidato (GSSG). Gli enzimi che metabolizzano il glutatione nell'apoplasto sono invece la γ -GT, ancorata alla parete e le dipeptidasi extracellulari presenti. Il ricircolo dentro la cellula degli amminoacidi prodotti dalla degradazione, avviene tramite co-trasportatori a protoni, con consumo di ATP per creare gradiente protonico. (Figura 10, Ferretti et al., 2009)

1.4.4 Localizzazione e meccanismi di trasporto

Il glutatione è una molecola coinvolta in moltissimi processi cellulari ed il suo trasporto dal sito di sintesi agli organi bersaglio è fondamentale per la sua funzione, infatti dopo che viene sintetizzato nel citosol e nei cloroplasti, è portato fuori dalla cellula ai vasi di trasporto per essere veicolato in altri tessuti e organi vegetali. È stato infatti verificato, il suo movimento da tessuti vegetativi maturi a quelli giovani, e dai tessuti vegetativi al seme durante la sua formazione (Sunarpi and Anderson, 1997).

Il GSH è una delle molecole di trasporto dello zolfo ridotto tra le cellule nelle piante e partecipa al controllo metabolico del suo assorbimento dal terreno (Leustek and Saito, 1999).

Il GSH non è solo un metabolita di trasporto, ma fa parte di un sistema di trasduzione del segnale che rileva la presenza di zolfo nella pianta e ne media la concentrazione cellulare. Inoltre il movimento di GSH e GSSG attraverso la membrana plasmatica gioca un ruolo ancora più importante nel mantenere nell'apoplasto le capacità difensive verso condizioni di stress ossidativo. Questo movimento del GSH fuori e dentro le cellule vegetali, passando da citosol, ad apoplasto e floema, richiede sistemi specifici di trasporto attraverso la membrana plasmatica, secondo o contro gradiente di concentrazione (Bergmann et al., 1978).

Nel trasporto intercellulare sono state studiate delle proteine definite oligopeptidi trasportatori (OPT) che intervengono nel trasporto attraverso il plasmalemma.

Queste proteine scoperte inizialmente in *Saccharomyces cerevisiae* dove prendono il nome di HGT1, sono in grado di trasportare il GSH, GSSG e i GS-coniugati e altri piccoli peptidi dentro e fuori la cellula (Bourbouloux et al., 2000). Geni omologhi di questi, identificati in riso (*Oriza sativa*), e chiamati OsGT1, consentivano anche qui il trasporto di GSH, GSSG e i GS-coniugati (Zhang et al., 2004). In Arabidopsis sono stati identificati 9 geni codificanti per proteine OPT (Koh et al., 2002), e in particolare gli studi sul prodotto di uno di questi geni, l'OPT6, han dimostrato che questo consentirebbe il trasporto cellulare di GSH, GSSG e composti GS-coniugati (Cagnac et al., 2004).

Nel trasporto interno tra citosol e cloroplasti, sono state invece identificate delle proteine, raggruppate nella famiglia di proteine CLT (CRT-Like Transporter), ovvero dei trasportatori omologhi ai trasportatori di resistenza al farmaco Cloroquine, del Plasmodium *falciparum* (PfCRT, Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter) il parassita che causa la malaria. Mutanti di Arabidopsis che mancano di questi trasportatori sono sensibili ai metalli pesanti, carenti di glutatione, ed ipersensibili alle infezioni di Phytophthora, a conferma che questi geni sono indispensabili per una corretta omeostasi del GSH nelle risposte di difesa.

Il triplo mutante knockout *clt1 clt2 clt3* risultava avere il citosol impoverito di GSH diversamente dal cloroplasto che ne risultava arricchito, in quanto la maggior parte del glutatione prodotto dentro i plasmidi non poteva essere traslocato al citosol (Maughan et al., 2010).

Nel trasporto vacuolare sono state identificate proteine trasportatrici MRP (Multidrug resistance-associated protein), funzionanti come trasportatori ABC (ATP-binding cassette) che utilizzano l'energia dell'idrolisi dell'ATP per trasportare molecole attraverso il tonoplasto, la membrana vacuolare (Foyer et al., 2001). Queste proteine MRP di Arabidopsis se inserite in *Saccharomyces cerevisiae*, permettevano infatti di trasportare GSSG, GSH e GS-coniugati dentro i vacuoli (Lu et al., 1998). Una importante funzione di queste MRP vacuolari è quella di detossificazione i composti citotossici, infatti molti metaboliti tossici prodotti dalle cellule vegetali durante le normali reazioni di catabolismo e anabolismo, vengono coniugati al GSH e attraverso le MRP compartimentalizzati dentro il vacuolo dove subiscono la degradazione senza influenzare la vitalità cellulare (Foyer et al., 2001).

Il trasporto del glutatione è quindi molto importante per mantenere lo stato redox citosolico (Tommasini et al., 1993) e suggerisce che l'accumulo intracellulare di

glutathione ossidato sia un segnale fisiologico molto importante per dare risposta allo stress ossidativo (Queval et al., 2011), in quanto, questo accumulo stimola le proteine MRP vacuolari a trasportare le forme ossidate e coniugate del GSH all'interno del vacuolo, dove verranno metabolizzate da una carbossipeptidasi (CPase) e da una γ -GT vacuolare. Non sono comunque escluse le ipotesi che queste proteine MRP possano essere presenti in isoforme differenti anche in altre membrane tipo quella plasmatica dove fungono da trasportatori verso l'apoplasto delle varie forme di glutathione per essere degradate ad opera della γ -GT legata alla parete cellulare (Foyer et al., 2001). In Figura 11, troviamo l'insieme dei meccanismi di trasporto del glutathione, presenti nella cellula vegetale. Si possono distinguere sulla membrana plasmatica dei trasportatori a gradiente (quadrati neri), che utilizzano il gradiente protonico generato dall'azione delle H^+ -ATPasi di tipo P di membrana (esagono nero), per l'uptake di peptidi, aminoacidi, GSH, GSSG e GS-coniugati. Per quanto riguarda il trasporto vacuolare, si osserva la presenza delle proteine MRP (cerchio nero), una sottoclasse delle pompe ATP-dipendenti per la traslocazione di glutathione ridotto, ossidato e coniugato. Rappresentata con il cerchio rosso, è invece la presenza di MRP diverse a livello del plasmalemma per l'esportazione fuori dalla cellula dei composti (Foyer et al., 2001). I meccanismi di trasporto dentro e fuori il cloroplasto, non erano ancora noti ai tempi di questa pubblicazione di Foyer et al., nel 2001, che rappresentava il meccanismo con un punto di domanda, ma ora è noto che nella membrana dei cloroplasti, sono presenti i trasportatori CLT (Maughan et al., 2010).

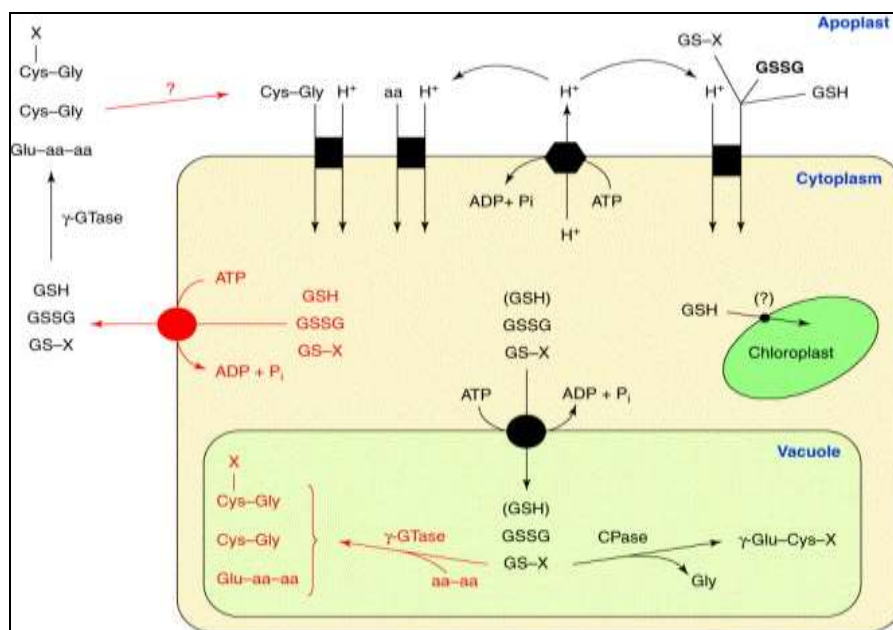


Figura 11: Sistemi di trasporto del glutathione in cellule vegetali (Foyer et al., 2001)

1.4.5 Funzione antiossidante

Il glutatione è un antiossidante non enzimatico presente nelle cellule in una forma ossidata (GSSG) o ridotta (GSH). Nel suo stato ridotto, il glutatione può essere utilizzato direttamente per donare protoni ai ROS riducendoli, o indirettamente, attraverso reazioni catalizzate da enzimi (Dixon et al., 1998; Gill and Tuteja, 2010; Noctor and Foyer, 1998). L'ossidazione del gruppo tiolico -SH del GSH porta alla formazione di un ponte disolfuro tra due molecole di glutatione formando una molecola dimerica di glutatione disolfuro (GSSG). Il GSSG non presenta nessun potere antiossidante e deve essere rigenerato a GSH attraverso la reazione catalizzata dall'enzima glutatione reductasi.

L'accumulo di glutatione nelle piante come risultato di risposta a stress abiotici incluso il trattamento con radiazione UV-B è stato riportato in molto lavori scientifici (Gill and Tuteja, 2010). L'aumento della biosintesi di GSH durante lo stress può essere una strategia per contrastare gli effetti dell'ossidazione della riserva di glutatione e mantenere il funzionamento del circuito antiossidante (Noctor and Foyer, 1998). Sia i livelli di GSH che quelli di GSSG aumentano dopo una breve esposizione a radiazioni UV-B, con il rapporto GSH/GSSG che tende comunque a salire (Agarwal, 2007). Il rapporto GSH/GSSG nel grano (*Triticum aestivum*) esposto a raggi UV-B seguiva un andamento simile a quello del rapporto AsA/DHA, aumentando quando la temperatura era adeguata (Yang et al., 2007). Tuttavia, nei mutanti VTC1 di *A. thaliana* si registrava un rapporto GSH/GSSG ridotto rispetto agli organismi WT (Gao e Zhang, 2008), il che indica che altri componenti del metabolismo antiossidante possono avere un effetto sul ciclo di conversione tra GSH e GSSG.

I composti derivati della degradazione e dalla sintesi del glutatione operata dagli enzimi γ -Glutamyl Transferasi, Cys-Gly dipeptidasi presenti negli spazi extracellulari, e glutammato-cisteina sintetasi presente dentro la cellula, sono indicatori dello stato d'ossidazione della pianta perché un aumento di γ -glutamylcisteina e cisteinilglicina sta a significare che vi è un elevato turnover del glutatione dentro e fuori dalla cellula.

1.4.5.1 Il Ciclo Ascorbato - Glutatione

Sulla base dell'ipotesi che ascorbato e glutatione avessero il potenziale di agire nella detossificazione di composti tossici nelle cellule, è stato dimostrato che i metaboliti, gli enzimi tipo la NADPH ossidasi, e il glutatione e l'ascorbato stesso, si trovano spesso in

preparati di cloroplasti isolati sottoposti a stress da H_2O_2 (Foyer e Halliwell, 1976; Foyer e Halliwell, 1977). A questo punto, si è pensato che l'enzima ascorbato perossidasi potesse fungere da riducente terminale, e quindi come un riserva di potere riducente da trasferire alle molecole che venivano ossidate dai ROS, anche se questa affermazione non ha mai trovato conferme. Nonostante questo, il ruolo proposto per l'ascorbato e il glutatione nel metabolismo del perossido d'idrogeno nei cloroplasti ha condotto all'identificazione di una ascorbato perossidasi legata al tilacoide e solubile nello stroma, l'APox (Grodén and Beck, 1979; Kelly e Latzko, 1979). È stato successivamente dimostrato che l'ascorbato potesse essere rigenerato nei cloroplasti anche da altri meccanismi, come quello basato sulla ferredossina o sul NADPH (Asada, 1999).

Al giorno d'oggi questa serie di reazioni che giocano un ruolo chiave nel metabolismo del H_2O_2 è conosciuto come il ciclo ascorbato-glutatione o pathway "Foyer-Halliwell-Asada". Sia l'ascorbato che il glutatione sono abbondanti e stabili nei tessuti cellulari, e presentano adeguati potenziali redox per interagire con numerosi composti e percorsi mantenendoli generalmente in uno stato ridotto. Essi funzionano insieme modulando il pathway di omeostasi redox del perossido d'idrogeno. Il ciclo ascorbato-glutatione è da tempo considerato come un sistema integrato, ma una questione fondamentale e più ampia riguarda l'analisi della interdipendenza della funzione e dello stato delle due riserve antiossidanti, ovvero, come il consumo di uno dei due componenti del ciclo influisca sull'altro (Noctor et al., 2000; Potters et al., 2002; Noctor, 2006).

Sebbene le riserve di ascorbato e glutatione possano essere predisposte, con un meccanismo di compensazione, a rispondere alle perturbazioni dovute ad uno stress, si è notato con studi su mutanti di *Arabidopsis* che i due composti hanno funzioni specifiche e uniche e non devono essere quindi considerati come due antiossidanti interscambiabili tra di loro (Reichheld et al., 2007; Frottin et al., 2009; Bashandy et al., 2010).

Ascorbato e glutatione godono quindi di una certa indipendenza d'azione, ma tra di loro c'è anche una dipendenza, nei meccanismi che li coinvolgono nella risposta allo stress ossidativo.

Si può distinguere dunque il pathway dell'ascorbato-glutatione in tre metabolismi separati, ma comunque interconnessi tra di loro (Figura 12):

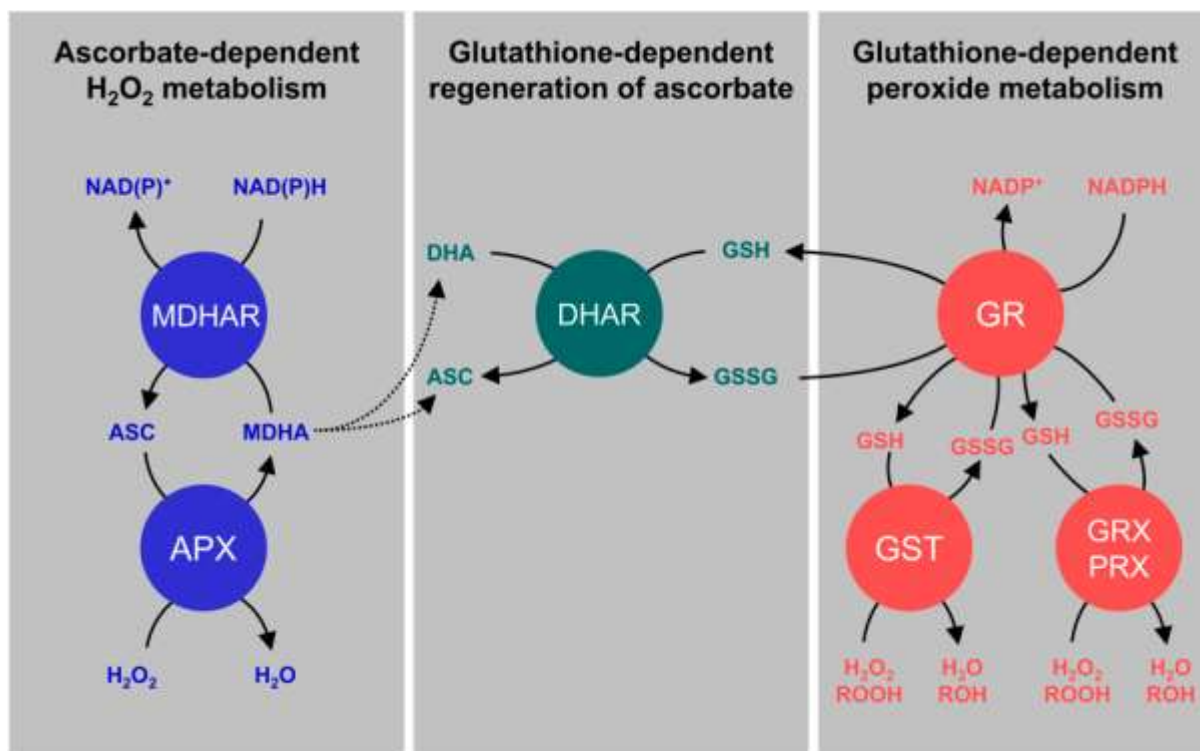


Figura 12: Ciclo ascorbato-glutatione (Foyer and Noctor, 2011)

1. Metabolismo di H₂O₂ ascorbato-dipendente: l'enzima superossido dismutasi (SOD) converte lo ione superossido (O₂⁻) in perossido d'idrogeno, e questo viene ridotto in acqua dall'azione dell'enzima ascorbato perossidasi (APX) utilizzando ascorbato (ASC) come donatore di elettroni, ossidandolo a monodeidroascorbato (MDHA). Successivamente, il MDHA viene rigenerato ad ascorbato ridotto, ad opera dell'enzima monodeidroascorbato reductasi (MDHAR), che utilizza come donatore di elettroni il NAD(P)H, trasportatore di potere riducente.
2. Rigenerazione di ascorbato glutathione-dipendente: il monodeidroascorbato è un composto instabile, perché si trova sotto forma di radicale, e se non ridotto rapidamente, si combina con un'altra molecola di MDHA formando un composto che subisce la rapida rottura in una molecola di AsA e deidroascorbato (DHA) una molecola che presenta due gruppi ossidrilici ossidati. Per rigenerare l'ascorbato ridotto dal DHA deve agire l'enzima deidroascorbato reductasi (DHAR) che cede elettroni prelevati dal glutathione all'ascorbato ossidato convertendolo in ridotto (ASC). Facendo ciò causa l'ossidazione del gruppo -SH del glutathione, e la combinazione di 2 molecole ossidate instabili porta alla formazione del glutathione

ossidato (GSSG) una molecola dimerica in cui i monomeri sono legati insieme stabilmente da un ponte di solfuro a livello dei gruppi -SH ossidati.

3. **Metabolismo dei perossidi glutatione-dipendente:** per rigenerare glutatione ridotto (GSH) dal glutatione ossidato derivato dall'azione del enzima DHAR, la molecola di GSSG deve essere rotta in due dall'azione dell'enzima glutatione reduttasi (GR) che è in grado di rompere il ponte di solfuro e ridurre i gruppi tiolici delle molecole di glutatione, utilizzando il NAD(P)H come donatore di elettroni. Altri enzimi come le perossiredossine (PRX), glutatione perossidasi (GRX) e glutatione S-transferasi (GST), sono in grado di ridurre il perossido d'idrogeno o altri composti organici ossidati (ROOH) ricavando potere riducente dal glutatione ridotto, che dovrà essere rigenerato ad opera dell'enzima GR (Rouhier et al., 2002; Tarrago et al., 2009; Dixon et al., 2009).

1.5 La GGT (γ -glutamyl transferasi o γ -GT)

1.5.1 Caratteristiche biologiche e strutturali

La gamma glutamil transferasi è un ectoenzima appartenente alla classe delle transferasi, ovvero quegli enzimi che operano trasferendo un gruppo funzionale da una molecola donatrice ad un'altra definita accettore. In particolare la γ -GT è coinvolta nel trasferimento del gruppo γ -glutamilico in posizione N-terminale delle molecole di GSH, GSSG e di altri composti S-coniugati del GSH, a molecole accettori come possono essere amminoacidi (L-cisteina, L-glutammina, L-metionina), alcuni dipeptidi (L-glutaminilglicina, L-alanilglicina, L-serilglicina e la Glicilglicina) e acqua (Taniguchi e Ikeda, 1998). La γ -GT è quindi un enzima chiave nel metabolismo del glutatione sia nel mondo animale che vegetale.

Negli animali e anche nelle piante il gene che codifica per questo enzima è trascritto e tradotto inizialmente in una singola catena polipeptidica precursore. L'enzima attivo invece è composto da due subunità derivate da modificazioni post-traduzionali, ad opera di enzimi proteolitici, sul precursore iniziale, che comprendono anche l'aggiunta di residui di acido sialico e la glicosilazione. Nell'enzima animale le due subunità che compongono l'enzima attivo hanno dimensioni diverse, la subunità maggiore ha un peso di circa 55-60 kDa, mentre quella minore è di circa 21-30 kDa (Meister, 1988). La regione N-terminale della subunità maggiore presenta un dominio trans-membrana che ancora l'enzima alla membrana cellulare, mentre l'attività catalitica viene svolta dal

dominio extracellulare costituito dalla subunità minore (Hanigan, 1998). Il sito catalitico interagisce con il substrato attraverso la formazione di un legame estereo intermedio tra il gruppo γ -glutamilico e l'enzima. In supporto a questa affermazione, è infatti noto l'effetto inibente del complesso serina-borato e della molecola acivicina nei confronti del sito attivo della γ -GT (Taniguchi e Ikeda, 1998).

1.5.2 La γ -GT vegetale

A differenza delle γ -GT animali che sono state altamente studiate per la molteplicità di ruoli che svolgono negli animali, le γ -GT vegetali sono state scarsamente caratterizzate, e il loro ruolo è ancora sottostimato, anche se recentemente hanno assunto enorme interesse in molti lavori scientifici. È stato verificato infatti che le γ -GT delle piante mostrano molte similarità con gli enzimi animali, hanno tutti i residui amminoacidici necessari per l'attività catalitica che presentano le γ -GT animali, subiscono lo stesso processamento post-traduzionale e hanno la stessa localizzazione extracellulare (Martin and Slovin, 2000; Storozhenko et al., 2002). Per quanto riguarda le caratteristiche strutturali, anche le γ -GT vegetali sono costituite da 2 subunità, ma la dimensione di queste, variano anche di molto in base alla specie vegetale presa in considerazione, a causa di un diverso processamento e glicosilazione post-traduzionale.

In *A. thaliana*, esistono quattro geni omologhi alla γ -GT animale, che vanno a costituire una piccola famiglia genica. Si possono discriminare quattro isoforme dell'enzima, chiamate AtGGT1, AtGGT2, AtGGT3, e AtGGT4 (Ohkama-Ohtsu et al., 2007b; Martin et al., 2007).

Gli enzimi codificati dai geni AtGGT1 e AtGGT2 sono enzimi apoplastici, associati i primi alla parete cellulare, mentre i secondi alla membrana plasmatica, come si osserva dai risultati di espressione svolti mediante mutanti knockout e transgenici portanti costrutti di fusione con il gene GUS (Ohkama-Ohtsu et al., 2007b). I loro geni sono consecutivi e sono molto simili (96% identità), che indica che ci sia stato un evento di duplicazione durante l'evoluzione. Nonostante questa marcata somiglianza, AtGGT1 è vincolata alla parete cellulare ed espressa in tutti gli organi, mentre AtGGT2 risulta essere vincolato alla membrana plasmatica, e si esprime principalmente nelle siliques, dove rappresenta circa il 50% di tutta l'attività γ -glutamil traspeptidasica (Martin et al., 2007).

L'isoforma codificata dal gene AtGGT4, è stata localizzata nel vacuolo dove coopera con l'enzima carbossipeptidasi alla degradazione dei GSH-coniugati (Grzam et al., 2007).

Il gene AtGGT3 si pensa sia uno pseudogene perché è costituito da una breve sequenza, probabilmente derivata dalla porzione C-terminale codificata dal gene AtGGT1 o AtGGT2, e solo alcuni studi sulla sua non trascrizionalità, hanno dimostrato che è possibile la trascrizione ma solo a livelli molto limitati (Martin et al., 2007).

Nella pianta AtGGT1 è espresso in tutti i tessuti e principalmente nei tessuti vascolari, soprattutto nel floema, mentre AtGGT2 è espresso soprattutto negli embrioni dentro le silique e in modo transiente in altri tessuti come il polline, in quanto questa isoforma è coinvolta nel trasporto di GSH all'interno dei semi in formazione. A conferma di questo, mutanti knockout di AtGGT2 presentano metà contenuto di GSH nelle silique. Prove di espressione attraverso RT-PCR semiquantitativa e analisi in silico su organismi wild-type hanno dimostrato che l'isoforma AtGGT1 è espressa in tutti i tessuti ma specialmente nelle foglie, mentre AtGGT2 e AtGGT3 esclusivamente in silique e AtGGT4 nelle radici (Destro et al., 2010).

1.5.3 Localizzazione cellulare

La localizzazione tramite enzimo-istochimica nei tessuti di molte piante, ha dimostrato che i principali siti di attività delle γ -GT sono le foglie e le radici. Precisamente, l'attività enzimatica è stata rilevata particolarmente nelle cellule parenchimatiche associate ai fasci vascolari, negli apici radicali, nelle cellule dell'epidermide e nelle cellule di guardia degli stomi (Masi et al., 2007), coincidenti con i risultati di localizzazione della proteina osservati in *A. thaliana*, attraverso la creazione di un costrutto di fusione transgenico dei geni *GGT:GUS*, per mettere in evidenza i siti di trascrizione del gene (Martin et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007 a,b).

Un'ulteriore conferma si ha nei tessuti di mais (*Zea mays*), dove la localizzazione immunologica dell'enzima, con anticorpi anti- γ GT e analisi al microscopio ottico, ha messo in evidenza la presenza di un forte segnale di legame antigene-anticorpo nelle foglie a livello dell'epidermide, cellule vascolari, cellule di guardia e anche cellule del mesofillo, e nelle radici a livello del parenchima della cortex, dell'epidermide e del cilindro centrale. È stata evidenziata la presenza dell'enzima anche nelle zone di formazione dei nuovi primordi radicali, ma la zona a più elevata presenza di enzima resta quella dell'apice radicale, nella regione Cap dove sono presenti la columella e le cellule del protoderma, il meristema primario della radice (Masi et al., 2007). Analisi immunologiche in tessuto radicale di orzo (*Hordeum vulgare*) con microscopio

elettronico han dimostrato che l'enzima γ -GT è localizzato maggiormente nella parete cellulare delle cellule parenchimatiche, e quindi è inequivocabile la distribuzione dell'enzima nell'apoplasto radicale. In relazione con i dati di attività enzimatica determinati con analisi enzimo-istochimica, che dimostrano la presenza di attività nello spazio extracellulare delle cellule parenchimatiche radicali (Ferretti et al., 2009).

La presenza di attività della γ -GT nel parenchima delle cellule degli elementi di conduzione indica che il glutatione o i suoi derivati possono agire come substrati dell'enzima in questi tessuti vascolari e quindi spiegare come il glutatione venga trasportato e ridistribuito tra le varie parti della pianta. Si può quindi dedurre che la presenza dell'enzima sia relazionabile alla presenza anche del glutatione. Per quanto riguarda il meristema e l'epidermide radicale dove da letteratura si sa che il glutatione è presente (Sanchez-Fernandez et al., 1997), questo svolge la funzione di mantenimento dei tessuti giovani stimolando la divisione cellulare (Vernoux et al., 2000), e la γ -GT sarebbe dunque importante per la disponibilità di GSH alle cellule meristematiche.

Nelle cellule dell'epidermide la γ -GT prende parte al recupero del glutatione ossidato nell'interfaccia con l'ambiente esterno. Il redox-sensing ambientale e la modulazione redox-dipendente della crescita e sviluppo radicale sono coinvolti nelle strategie di adattamento che le piante hanno evoluto per sopravvivere in un ambiente in continuo cambiamento (Sanchez-Fernandez et al., 1997).

1.5.4 Mutante *ggt1*

Per studiare in modo preciso e funzionale l'azione di un gene vengono svolte delle analisi di reverse genetics, ovvero analisi in cui per verificare gli effetti prodotti dall'azione di un singolo gene si producono linee mutanti in cui quel gene d'interesse viene spento (knockout). In tal modo l'organismo mutante non è più in grado di trascrivere il gene e si possano verificare gli effetti fenotipici rispetto ad organismi wild-type (WT) in cui sono presenti tutti i geni, anche quello d'interesse.

La linea mutante k/o *ggt1* di *A. thaliana* (*SALK_80363*), presenta il gene AtGGT1 (At4g39640) silenziato tramite inserzione con T-DNA. Il genotipo utilizzato è stato acquisito tramite il Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC), il centro europeo che provvede alla selezione e mantenimento dei vari genotipi del genere Arabidopsis.

Il mutante, non presenta un chiaro fenotipo differente rispetto al WT, se non per un ridotto ciclo vitale, rappresentato da una fioritura anticipata e da una senescenza prematura (Destro et al., 2010; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b).

I protoplasti di *A. thaliana* di organismi mutanti knockout per il gene AtGGT1 sono in grado di recuperare GSH dal mezzo di crescita (Ohkama-Otsu et al., 2007b), ma piante di *A. thaliana* mancanti dell'isoforma GGT1 funzionale possono sopravvivere quando sono coltivate in una soluzione nutritiva con GSH come unica fonte di zolfo (Martin et al., 2007). La capacità delle piante *ggt1* di crescere in terreni contenenti GSH, combinato con il fatto che i mutanti *ggt1* non esibiscono nessun fenotipo caratteristico, ha portato a supporre che l'isoforma codificata dal gene AtGGT1 presenta un ruolo minore nel recupero del GSH extracellulare. Data una presunta ridondanza funzionale nei meccanismi di recupero del GSH, si è concluso che la γ -GT extracellulare è superflua, e che sono presenti altri meccanismi non correlati all'attività della γ -GT responsabili dell'assorbimento del GSH nei mutanti. Un altro studio, dimostra tuttavia, che piantine d'orzo riescono ad assorbire GSH da un mezzo esterno, ma questa funzione è gravemente compromessa quando viene aggiunta la serina/borato un inibitore della attività della γ -GT (Ferretti et al., 2009), dimostrando che l'assorbimento di GSH da un mezzo esterno si basa anche sull'attività enzimatica della γ -GT.

È sperimentalmente dimostrato che l'isoforma GGT2 è espressa anche nelle radici, ed è up-regolata sia quando il gene AtGGT1 è interrotto che in presenza di GSH extracellulare. Una transitoria up-regolazione dell'espressione del gene AtGGT1 in radici di organismi WT è stata inoltre indotta dall'aggiunta di GSH, suggerendo che i due geni potrebbero essere regolati in modo analogo da questo stimolo (Destro et al., 2010).

La localizzazione extracellulare dell'attività degli enzimi apoplastici GGT1 e GGT2 può essere sfruttata per misurare l'attività della γ -GT in vivo attraverso il monitoraggio della liberazione di p-nitroanilina dal suo precursore γ -glutamile (Ferretti et al., 2009). Questo approccio è risultato efficace nel dimostrare la differenza di attività delle γ -GT nella radici di *A. thaliana* WT rispetto al mutante *ggt1*, andando a verificare, che nelle radici, vi è una compensazione nell'assorbimento di GSH ad opera dell'isoforma GGT2, quando manca l'isoforma GGT1 (Destro et al., 2010). L'inducibilità di geni AtGGT1 e AtGGT2 da parte del glutatione è supportato da alcuni dati disponibili in letteratura: alti livelli di espressione dei geni AtGGT1, AtGGT2 e AtGGT4 sono stati osservati in condizioni naturali in tricomi radicali in via di sviluppo (Martin et al, 2007), in cui il

contenuto di GSH è quasi 300 volte superiore rispetto a quello dello strato epidermico fogliare (Gutiérrez-Alcalá et al., 2000).

1.6 L'apoplasto dei tessuti vegetali

1.6.1 Proprietà

L'apoplasto è il sistema continuo di pareti cellulari e di spazi aeriferi intercellulari dei tessuti della pianta, compresi gli spazi cellulari dei vasi conduttori che han perso il loro citoplasma, come nei dotti xilematici e nelle fibre (Dietz 1997). Nella via apoplastica l'acqua può muoversi attraverso le pareti cellulari e qualsiasi altro spazio extracellulare senza attraversare mai la membrana plasmatica. Il percorso apoplastico, dunque facilita il trasporto di acqua e soluti attraverso un tessuto o organo. I fluidi apoplastici o ECWF (Extra Cellular Washing Fluids) sono quindi costituiti essenzialmente da acqua nella quale sono disciolti diversi soluti. L'apoplasto è inoltre sede di importanti processi di ossido-riduzione e di eventi di percezione e risposta agli stimoli, quindi è importante per tutte le interazioni della pianta con l'ambiente esterno. L'anidride carbonica, per esempio, è la fonte principale di carbonio per la pianta, e deve essere solubilizzata nell'apoplasto prima di diffondere attraverso la membrana plasmatica nel citoplasma della cellula ed essere utilizzata dai cloroplasti durante la fotosintesi. Nelle radici, l'acqua e i sali assorbiti dai peli radicali si diffondono nell'apoplasto dell'epidermide prima di diffondere all'interno delle cellule (simplasto) quando incontrano la banda del Caspary. Allo stesso modo, tutte le molecole gassose emesse e rilevate dalle piante, come gli ormoni vegetali, devono sempre passare per l'apoplasto prima di raggiungere la membrana cellulare e il citoplasma. L'apoplasto è anche un importante sito per la comunicazione cellula-cellula infatti i prodotti dello stress ossidativo, perossido di idrogeno e anione superossido, possono diffondere attraverso l'apoplasto e veicolare un segnale di avvertimento alle cellule vicine. Inoltre, una alcalinizzazione locale dell'apoplasto causata da uno stress può viaggiare per alcuni minuti in tutto il resto della pianta tramite lo xilema e conferire resistenza sistemica acquisita che permette alla pianta di rispondere in modo più rapido a nuove fonti di stress biotico e abiotico.

1.6.2 L'apoplasto fogliare

Il flusso xilematico di acqua e soluti, attraverso i piccioli, dal fusto entra nella foglia dove viene trasportato prevalentemente nelle nervature principali ai siti di rapida evaporazione, come lo sono i margini fogliari. Se le nervature hanno subito rotture meccaniche, come può verificarsi spesso in natura ad opera di condizioni ambientali o attacco di organismi parassiti, il sito di rottura è rapidamente bypassato, aumentando il tasso di trasporto della linfa xilematica nelle nervature minori.

La funzione dell'apoplasto della foglia come un serbatoio per ioni K^+ è stata dimostrata nelle cellule di guardia degli stomi (Bowling, 1987; Freudling et al, 1988), l'apoplasto ha infatti diversi vantaggi rispetto al vacuolo per quanto riguarda lo stoccaggio di cationi e anioni (Grignon & Sentenac, 1991; Mühlhling & Sattelmacher, 1995). Quindi, l'apoplasto risulta avere un ruolo importante come serbatoio di breve durata per gli ioni, con il vantaggio principale della facilità con cui gli ioni possono essere assunti e ceduti dall'apoplasto al citoplasma cellulare attraverso la membrana citoplasmatica. Gli ioni vengono assorbiti facilmente, perché gli anioni che non possono diffondere liberamente per la membrana plasmatica possono essere neutralizzati da ioni H^+ . Uno scambiatore H^+ /ioni, porta ad una riduzione della carica negativa e aumenta il gradiente elettrochimico degli ioni attraverso la membrana. Le dimensioni molto piccole dell'apoplasto della foglia facilita la comprensione di come anche piccole quantità di ioni possono provocare cambiamenti significativi sul potenziale osmotico della membrana (Blatt, 1985). Per questi motivi si può ipotizzare che le condizioni ioniche nell'apoplasto della foglia possano essere una delle ragioni della differenza tra cellule vegetali e animali per quanto riguarda le specie ioniche pompate attraverso la membrana per la generazione del gradiente elettrochimico. Le cellule animali pompano principalmente ioni Na^+ mentre le cellule vegetali utilizzano ioni H^+ (Sattelmacher, 2001).

Gli effetti dello stress biotico e abiotico sui sistemi antiossidanti dello spazio apoplastico sono stati studiati da molti autori, e i risultati suggeriscono che questo comparto tissutale risulta essere importante nella risposta della pianta contro fattori di stress ossidativo, tra i quali anche i patogeni (Luwe, 1996; Vanacker et al., 1998b).

Analogamente, è noto che i fattori di stress sono in grado di indurre la sintesi di ROS nell'apoplasto delle cellule vegetali e modulare sia il livello di antiossidanti cellulari così come il livello di enzimi antiossidanti nell'apoplasto (Luwe, 1996. Ranieri et al, 1996).

Alcuni lavori scientifici specificano che ascorbato e deidroascorbato si ritrovano a concentrazioni relativamente elevate nell'apoplasto fogliare (Luwe, 1996; Ranieri et al., 1996; Vanacker et al., 1998b), a differenza del glutatione che in genere è assente o presente a livelli molto bassi (Vanacker et al., 1998). Sono stati inoltre trovate isoforme di diversi enzimi implicati nel metabolismo antiossidante, come la SOD, APOX, GR, CAT (Edwards et al., 1991; Wingsle et al., 1991), anche se le concentrazioni relative nell'apoplasto risultano molto basse se confrontate con i valori dell'estratto totale fogliare (Streller and Wingsle, 1994; Vanacker et al., 1998b).

2. OBIETTIVO

Da precedenti studi condotti nel laboratorio di biochimica e fisiologia vegetale del dipartimento DAFNAE, dove è stata svolta l'attività sperimentale di tesi, è emerso che l'enzima gamma-glutamyl transferasi (γ -GT) è molto importante nella risposta della pianta all'ambiente.

È stato verificato infatti che organismi di *A. thaliana* mutanti knockout *ggt1* presentavano una alterazione a livello molecolare nel metabolismo antiossidante rispetto agli organismi wild-type, anche quando questi vengono posti in condizioni di crescita normali, senza l'applicazione di particolari stress. È stato riscontrato infatti che nonostante i due genotipi WT e *ggt1* non presentino differenze fenotipiche evidenti, nel mutante *ggt1* per l'enzima gamma-glutamyl transferasi vi è una alterazione nel contenuto di enzimi e molecole di natura antiossidante; quindi potrebbe risultare più suscettibile alle condizioni ambientali avverse rispetto all'organismo WT (Tolin et al., 2013).

Lo scopo di questo lavoro di ricerca è quello di verificare come le piante *ggt1* si comportano in condizioni di stress ossidativo dato dal trattamento con radiazione UV-B. In particolare lo studio è stato condotto verificando come variano i valori delle due principali molecole antiossidanti solubili, l'ascorbato e il glutatione, sia all'interno della cellula sia nello spazio dell'apoplasto in cui è localizzato l'enzima del quale il mutante è privo.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

Per la sperimentazione sono state utilizzate piante di *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia 0 utilizzate come controllo o reference (WT), e linee mutanti knockout per il gene *ggt1* (polimorfismo SALK_80363) di *A. thaliana* provenienti dalla collezione di mutanti del NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://nasc.nott.ac.uk/>), ed ottenute per inserzione sotto vuoto di T-DNA in vettore pROK2 tramite *A. tumefaciens* (Alonso et al., 2003).

I semi dopo alcuni giorni di vernalizzazione a 4°C al buio, sono stati piantati in vasi con substrato terroso (torba da giardinaggio) fino alla germinazione della plantula.

Dopo una settimana dalla semina, le plantule dei 2 diversi genotipi sono state trasferite in vaschette di plastica riempite di torba ad una distanza di 7-8 cm l'una dall'altra, spazio sufficiente a garantire una buona espansione fogliare. Le vaschette sono state tenute in serra presso l'azienda sperimentale L. Toniolo, sita vicino al campus di Agripolis, fino a quando dopo circa 30-35 giorni il loro sviluppo era adeguato, ovvero nella fase di massima espansione della rosetta (pre-bolting). A questo punto le vaschette con le piante sono state prelevate dalla serra e trasferite in cella climatica presso il laboratorio, per consentire l'acclimatazione delle piante a condizioni ambientali diverse, prima di procedere con i trattamenti e le analisi.

3.2 Trattamento con radiazione UV

Le piante prelevate dalla serra sono state trasferite in cella climatica per un periodo (24-48 ore) di acclimatazione in cui erano presenti i seguenti parametri ambientali:

- PAR (Radiazione Fotosinteticamente Attiva): $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (PAR),
- Temperatura: 21 °C
- Umidità relativa (RH): 60%
- Fotoperiodo: 12 ore luce, 12 ore buio

Il trattamento con raggi UV-B è stato realizzato all'inizio del periodo di luce, per un periodo ininterrotto di 8 ore, alla fine delle quali venivano prelevati i campioni fogliari. La radiazione ultravioletta, era fornita da due lampade Philips TL40W/12; lo spettro della radiazione elettromagnetica presente nelle condizioni di crescita in cella climatica

è rappresentato in Figura 13, dove si evidenzia la presenza di un picco nella regione UV-B a 312 nm solo per quanto riguarda il trattato (PAR+UV-B).

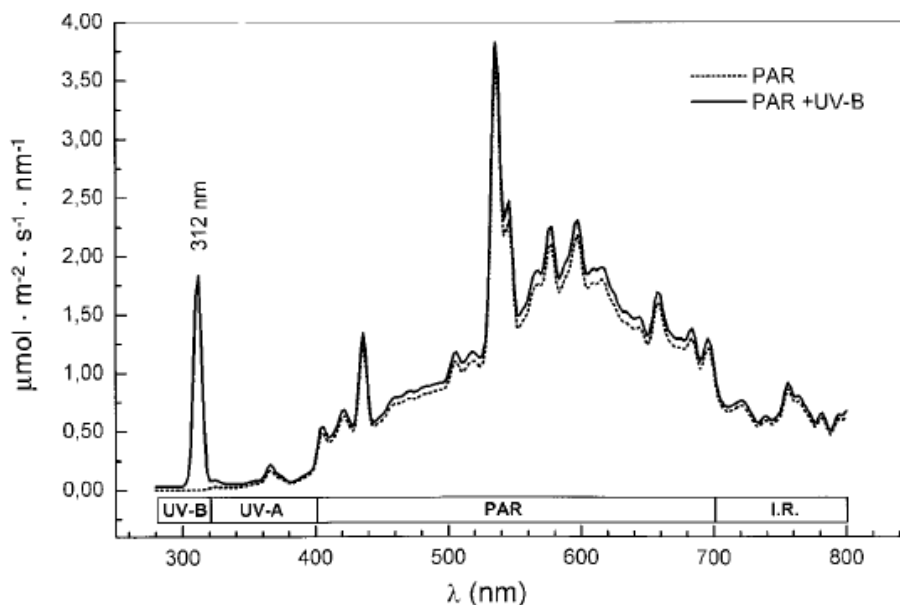


Figura 13: Spettro della radiazione elettromagnetica nella regione 280-800 nm nella cella climatica

3.3 Estrazione di campioni fogliari

3.3.1 Estratto totale

Per estratto totale si intende quello ottenuto dalla macinazione in mortaio con azoto liquido di tutto il tessuto fogliare. Nella pratica si esegue una estrazione in rapporto 1:4. Ovvero ad 1 grammo di foglie rese polvere attraverso il trattamento con mortaio, pestello e azoto liquido si aggiungono 4 mL di tampone d'estrazione.

A seconda dell'analisi che si vuole realizzare il tampone varia, per composizione, pH, forza ionica.

Il tampone di estrazione utilizzato per l'analisi di ascorbato e DHA è un tampone costituito da acido metafosforico (MPA) 1% e sodio-EDTA 1 mM.

3.3.2 Fluidi extracellulari

Per estrarre i fluidi extracellulari si utilizza un tampone di infiltrazione che viene fatto assorbire dalle foglie attraverso l'applicazione di una pompa a vuoto. Il tampone andrà ad occupare tutti gli spazi extracellulari in cui è presente aria e rende più efficace il successivo passaggio di estrazione con centrifuga.

Il tampone di infiltrazione usato è un tampone fosfato con scarsa forza ionica (KCl 50mM) in modo da non andare ad estrarre anche le proteine legate al lato apoplastico della membrana cellulare e poter analizzare solo i soluti in esso disciolti.

Un grammo di foglie vengono poste in un becker e sommerse con il tampone di infiltrazione. I becker con le foglie si mettono dentro una campana da vuoto e si applica la pompa a vuoto per 10 minuti. Passato questo tempo si tirano fuori le foglie dal becker e le si asciuga accuratamente per eliminare i residui di tampone sull'esterno. A questo punto le foglie appaiono molto turgide e dal colore traslucido perché il tampone è stato assorbito. Si incide la base di ogni foglia e si pongono dentro ad una siringa di plastica, privata dello stantuffo e dell'ago, avendo comunque cura di inserire le foglie con la parte del taglio rivolto verso il beccuccio della siringa. A questo punto si mettono a centrifugare nella centrifuga basculante per 5 minuti. Questo trattamento permetterà ai fluidi e al tampone di infiltrazione di fuoriuscire dalla base della foglia ed essere raccolti all'interno della eppendorf posta sotto il beccuccio della siringa.

Per conservare ed evitare l'ossidazione del fluido estratto, questo è trattato con 10 μ L di acido perclorico al 5 %, e, se non utilizzato subito per analisi di ascorbato o DHA è congelato fino a quando non verrà utilizzato per altre analisi che non necessitano del campione fresco.

3.4 Determinazione di ascorbato ridotto e ossidato

L'analisi dei livelli di ascorbato e di deidroascorbato nei tessuti cellulari è indice del valore di stress ossidativo che la pianta ha subito. Per l'analisi di queste molecole è stata sfruttata l'analisi spettrofotometrica basata sulle differenze di assorbimento del campione ad una determinata lunghezza d'onda in presenza di ascorbato ridotto od ossidato (Hewitt and Dickes, 1961).

3.4.1 Analisi spettrofotometrica di ascorbato ridotto

Il principio di base dell'analisi dell'ascorbato ridotto è quello di misurare la sua quantità verificando come cala l'assorbimento del campione quando viene aggiunto l'enzima Ascorbato Ossidasi (AOX) che lo converte completamente a deidroascorbato (DHA).

Ottenuto l'estratto si procede alla lettura allo spettrofotometro nel campo dell'UV alla lunghezza d'onda di 265 nm. A questo valore di lunghezza d'onda sono molte le componenti dell'estratto che assorbono radiazione, quindi per verificare solo il

contenuto di ascorbato dobbiamo eliminarlo, convertendolo a deidroascorbato e verificare come cala l'assorbimento del nostro campione. L'enzima Ascorbato Ossidasi è infatti in grado di ossidare in modo rapido le molecole di ascorbato che in questo stato non assorbono più la radiazione UV che viene inviata. La quantità di ascorbato è data quindi dalla differenza tra il valore di assorbanza iniziale del campione e quello che si stabilizza dopo l'aggiunta dell'enzima.

Per l'analisi vengono posti in cuvetta:

- 875 μL di tampone potassio-fosfato pH 6,5
- 25 μL di campione
- 50 μL di tampone di estrazione

Si misura l'assorbanza di partenza del campione, quando risulta stabile si aggiungono 25 μL di Ascorbato Ossidasi corrispondenti ad una Unità enzimatica. Si ripone la cuvetta dentro lo spettrofotometro e si monitora il calo dell'assorbanza, fino a quando non raggiunge una stabilità.

Per relazionare la riduzione di assorbimento alla quantità di ascorbato presente nel campione, bisogna costruire una curva di calibrazione utilizzando degli standard a diversa concentrazione di ascorbato di sodio, oppure utilizzare il coefficiente di estinzione molare " ϵ " di $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.4.2 Analisi spettrofotometrica di deidroascorbato

Il principio di base dell'analisi dell'ascorbato ossidato o deidroascorbato è quello di misurare la sua quantità verificando come varia l'assorbimento del campione quando questo viene ridotto ad ascorbato ad opera di un agente riducente e poi riportato allo stato ossidato con l'enzima Ascorbato ossidasi. Gli agenti riducenti testati nelle nostre analisi sono stati vari. Dopo una serie di analisi comparative abbiamo ritenuto che l'agente riducente più affidabile per le analisi alle nostre condizioni operative era il DTT, ditiotreitolo, un tiolo ad elevato potere riducente nei confronti delle molecole in soluzione.

Per l'analisi vengono posti in cuvetta:

- 875 μL di tampone sodio-fosfato 114 mM (pH 6,8)
- 25 μL di campione
- 50 μL di tampone di estrazione

Misurata l'assorbanza del campione a 265 nm, si aggiungono 25 μL di DTT 100 mM e si verifica l'aumento dell'assorbanza, che possiamo identificare come quantità di deidroascorbato che viene ridotto ad AsA. Quando l'assorbanza si stabilizza e non aumenta più, si aggiungono 25 μL (1 Unita) dell'enzima Ascorbato Ossidasi (spatole di AOX da cucurbita, risospese in 425 μL di tampone Na-fosfato 0.1 M, pH 5.6, corrispondenti a 17 U enzimatiche) che riporta tutto l'ascorbato ridotto alla forma ossidata. La differenza tra i due valori corrisponde all'assorbanza relativa del deidroascorbato presente in soluzione.

Per determinare a quale concentrazione di deidroascorbato corrispondono i diversi valori di assorbanza si utilizza il coefficiente di estinzione molare pari a $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5 Determinazione del contenuto di tioli con HPLC

3.5.1 Principio

I tioli sono composti organici assimilabili agli alcoli in cui l'atomo di ossigeno del gruppo ossidrilico è stato sostituito da un atomo di zolfo, andando a costituire il gruppo sulfidrilico (-SH). Queste classe di composti ha quindi formula generale R-SH, ed è proprio il residuo sulfidrilico che conferisce caratteristiche chimico-fisiche molto importanti a queste molecole.

Per esempio l'ossidazione reversibile di un tiolo è un processo che combina due residui sulfidrilici ossidati e porta alla formazione di disolfuri R-S-S-R. Questo legame disolfuro è molto diffuso nelle molecole biologiche contenenti zolfo ed è particolarmente importante nelle proteine, nelle quali contribuisce a formare strutture tridimensionali.

Uno dei composti tiolici più rappresentato nei tessuti vegetali, è il glutatione. La sua molecola presenta il gruppo sulfidrilico della cisteina libero di subire l'ossidazione e di formare il dimero con un'altra molecola di glutatione ossidato.

L'analisi del glutatione viene dunque eseguita sfruttando una molecola, l'ammonio 7-fluoro-2,1,3-benzoossadiazolo-4-sulfonato o SBD-F, un fluorocromo che reagisce specificatamente con i gruppi sulfidrilici delle molecole, formando prodotti altamente fluorescenti e stabili. Oltre al glutatione l'SBD-F si lega anche a tutti i tioli che presentano il gruppo -SH libero per es: γ -glutamilcisteina (γ -EC), cisteina (cys) e cisteinilglicina (cys-gly). Le molecole che han reagito con il fluorocromo sono poi separate in HPLC (High pressure Liquid Cromatography), e quantificate usando un rilevatore fluorimetrico (Masi et al., 2002).

3.5.2 Riduzione e derivatizzazione

L'analisi viene condotta macinando un grammo di campione di foglie in azoto liquido e trattandolo con 4 mL di tampone di estrazione (MPA 1%, sodio-EDTA 1 mM) oppure nel caso di ECWF usando questo tampone come infiltrante nel processo di estrazione.

Una volta separato il surnatante dai residui vegetali si procede con le reazioni di riduzione e derivatizzazione. La riduzione consiste nella reazione con un forte riducente come la Tributyl Fosfina 1% (TBP) che provoca la rottura dei ponti di solfuro riducendo i gruppi -SH.

In una eppendorf da 1.5 mL si pongono:

- 15 μ L di campione
- 195 μ L di Tampone Borato 1M (pH 10.5)
- 10 μ L di TBP 1%.
- Si lascia ridurre per 10-15 minuti e poi si aggiungono: 10 μ L di SBD-F 0.3 %.

La reazione di derivatizzazione operata dal fluorocromo verrà portata avanti per 60 minuti in bagno termostatico Dubnoff a 60°C (± 1) con agitazione. Terminato il tempo di incubazione si pongono i campioni in ghiaccio e si ferma la reazione del fluorocromo aggiungendo 20 μ L di HCl 4M.

Le reazioni di TBP e SBDF sono favorite dal pH alcalino del tampone. In particolare il fluorocromo si lega ai gruppi -SH a pH alcalino, e quando il pH cala per aggiunta dell'acido il legame di tioli e SBDF è reso stabile e irreversibile.

La derivatizzazione serve dunque ad evidenziare le molecole coi gruppi sulfidrilici, e contemporaneamente a renderle stabili per subire le analisi cromatografiche. Il campione derivatizzato è infatti stabile a temperatura ambiente, in quanto il glutatione non sarà più suscettibile all'ossidazione.

3.5.3 Analisi cromatografica

I campioni derivatizzati vengono analizzati in HPLC (Beckman Coulter System Gold 126), utilizzando una colonna RP C18 (150 mm x 3,0 mm I.D., fase stazionaria di 3 μ m, Luna, Phenomenex) e come fase mobile un tampone NH₄-formiato 75 mM e metanolo in proporzione 97:3 (pH 2.9).

Attraverso il campionatore automatico (Gilson 234 Autoinjector) ed il Loop di caricamento vengono iniettati in colonna 20 μ L di campione. Il flusso della colonna è di 0.3 mL al minuto e il tempo di analisi viene impostato a 60 minuti. La colonna di HPLC separa i vari componenti della miscela di tioli derivatizzati in base alla loro interazione con essa. La colonna è infatti costituita di particelle di materiale inerte a cui sono associate catene carboniose da 18 atomi di carbonio. È dunque una colonna che forma interazioni idrofobiche con le molecole del campione. Le molecole più idrofiliche interagiscono poco con essa e vengono quindi eluite per prime, quelle idrofobiche invece vengono rallentate dalle interazioni con la colonna. Maggiore è l'idrofobicità delle molecole maggiore risulta il tempo di permanenza all'interno della colonna. A parità di idrofobicità vengono comunque eluite le molecole che presentano catene carboniose più piccole.

Le molecole fluorescenti che escono dalla colonna vengono rivelate da un rivelatore fluorimetrico (Yasco 821 FP) impostato ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 386 nm e in grado di rivelare lunghezze d'onda di emissione di 516 nm. I tempi di uscita delle molecole dalla colonna vengono chiamati tempi di ritenzione, e sono caratteristici per le diverse molecole. La quantificazione viene comunque effettuata attraverso il confronto con una curva di calibrazione costruita con appositi standard a concentrazioni diverse. Il tempo di uscita dalla colonna ci indica quale molecola è stata separata, mentre l'area del picco di assorbimento rivelato dal fluorimetro verrà confrontato nella curva di calibrazione per determinare la quantità di molecole che sono uscite dalla colonna in quel determinato tempo di ritenzione.

3.6 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con software SAS (SAS 9.2, 2008). Le statistiche descrittive per le variabili studiate sono state ottenute utilizzando le procedure Means e Freq e le fonti di variazione sono state analizzate utilizzando la procedura GLM (general linear model).

Il modello finale usato per l'analisi statistica è:

$$Y_{abc} = \mu + \text{Tesi}_a + \text{Trattamento}_b + \text{Tesi} * \text{Trattamento}_c + E_{abc}$$

Dove μ rappresenta la media del valore dell'intercetta, $Tesi_a$ equivale ai due genotipi utilizzati WT e *ggt1*, $Treatments_b$ indica le condizioni di Controllo e di UV-B, mentre, $Tesi*Trattamento_c$ corrisponde all'interazione tra i primi due. Per finire E_{abc} rappresenta l'errore casuale residuo delle 3 variabili.

Le comparazioni multiple tra le medie per le classi ad effetto fisso, WT, *ggt1*, Controllo e UVB, sono state corrette usando il Test conservativo di Bonferroni.

($P < 0.001 \rightarrow ***$; $P < 0.01 \rightarrow **$; $P \leq 0.5 \rightarrow *$)

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il trattamento con radiazione UV-B sulle piante ha indotto sia nei mutanti che negli organismi WT, uno stress ossidativo caratterizzato da un cambiamento nei contenuti di molecole antiossidanti, confermando le informazioni di letteratura che indicano che la radiazione UV-B è uno dei principali fattori di stress ossidativo per le piante. Le analisi svolte hanno cercato di mettere in evidenza come reagiscono organismi WT e mutanti *ggt1* sottoposti allo stesso stress ossidativo, confrontando come variano i contenuti di ascorbato e glutatione. Sono state analizzate sia le differenze tra i due genotipi trattati, che rispetto a campioni controllo non sottoposti allo stress con radiazione UV-B.

4.1 Analisi del contenuto di Ascorbato

4.1.1 Variazione dei contenuti di ascorbato in base all'età delle piante

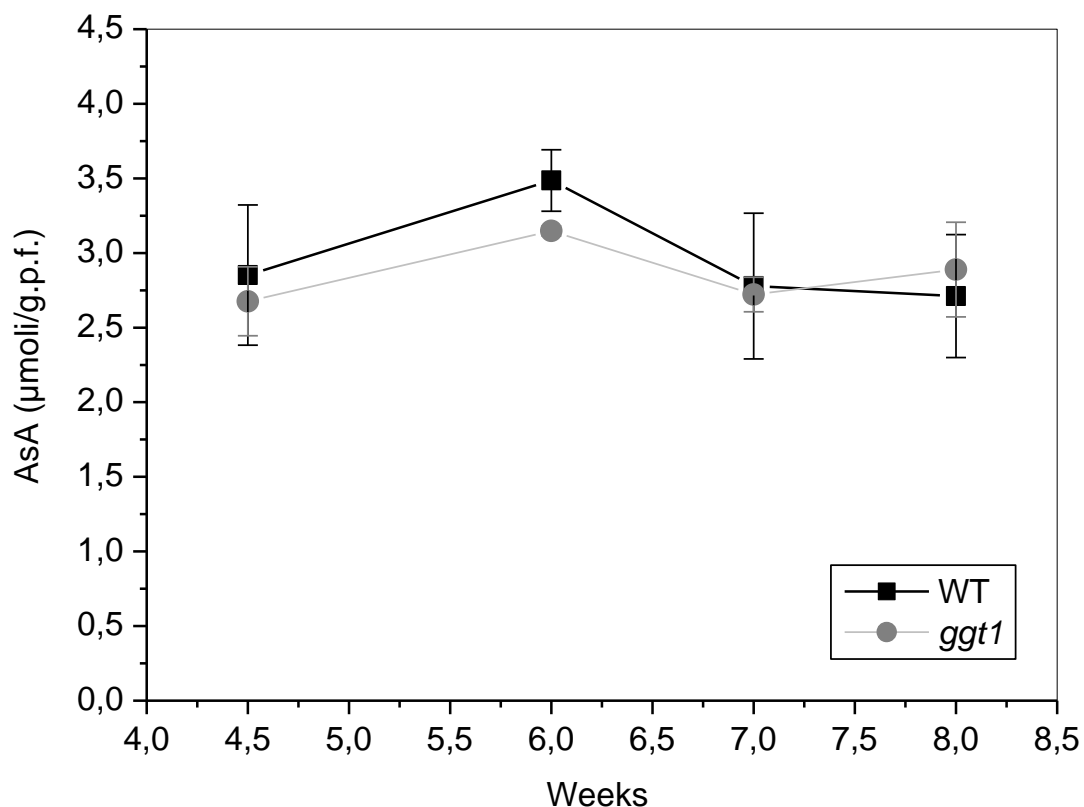


Figura 14: Variazione del contenuto di Ascorbato totale durante lo sviluppo delle piante.

Nel grafico in Figura 14, si può vedere come campioni fogliari di piante di *A. thaliana* WT e mutante *ggt1*, a diversa età di sviluppo (4.5, 6, 7, 8 settimane), presentano differenti quantità di ascorbato totale.

Le piantine sono state seminate a differenti periodi ma l'analisi è stata eseguita su piante in pieno sviluppo vegetativo, e non in fioritura. In particolare nel confronto tra le varie età delle piante esaminate, si verifica un incremento del contenuto di ascorbato nelle piantine di 6 settimane di età. Un incremento indipendente dal genotipo delle piante, in quanto sia WT che mutante presentano un picco di ascorbato nelle foglie di piante a 6 settimane di vita dalla germinazione.

Si può supporre che i livelli di ascorbato nelle foglie delle piante più giovani siano dovuti all'azione protettiva dell'ascorbato nel primo periodo di sviluppo della pianta. Le piante più vecchie invece presentano valori di ascorbato minori, perché vengono sintetizzate dalla pianta altre molecole ad azione protettiva come flavonoidi ed antociani. Questa ipotesi è confermata dalla presenza di un precipitato biancastro durante la preparazione della miscela di reazione per la determinazione del ascorbato, solo nei campioni di 7 e 8 settimane di vita.

Questa analisi su campioni a varie età di sviluppo è stata eseguita come analisi preliminare per monitorare come varia il contenuto di ascorbato nei diversi stadi di crescita della pianta, ed è stato scelto il tempo di 6 settimane come periodo ottimale per i futuri campionamenti.

4.1.2 Contenuto di ascorbato nell'estratto totale

Il livello di ascorbato nelle foglie sottoposte a radiazione UV-B aumenta sia in organismi WT che nei mutanti *ggt1* (Figura 15). I dati presentano un aumento della quantità di ascorbato totale limitato nel WT sottoposto a trattamento, rispetto a ciò che accade nel mutante, in cui l'aumento della quantità di ascorbato rilevata dopo trattamento, risulta statisticamente rilevante, rispetto ai valori del mutante controllo.

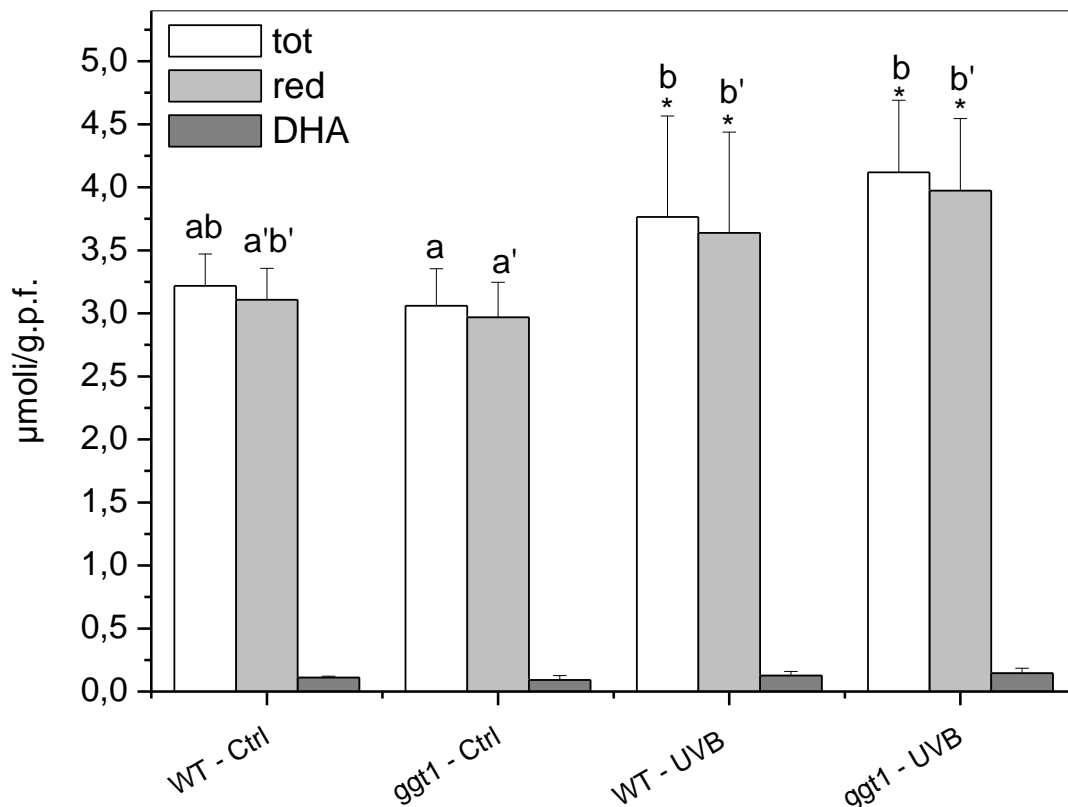


Figura 15: Contenuto di Ascorbato in estratti fogliari.

Si può supporre dunque che per quanto riguarda l'ascorbato, la sensibilità allo stress ossidativo determinato dal trattamento con radiazione UV-B è lievemente maggiore negli organismi mutanti. Si nota inoltre che vi è una compartimentalizzazione delle forme di ascorbato, ovvero, all'interno della cellula si trova per gran parte in forma ridotta (AsA), pronto a rispondere ad agenti ossidanti che entrano riducendoli e convertendosi nella forma ossidata (DHA), che comunque nell'analisi sull'estratto totale eseguite, non supera mai valori del 1-5 % sul totale. Questo fatto si spiega ipotizzando un'azione rapida e tempestiva del glutathione, che agisce sulla forma ossidata

dell'ascorbato (DHA) riconvertendolo ad ascorbato ridotto, in armonia con quanto descritto nel ciclo del ascorbato-glutatione (Ferretti et al., 2009).

4.1.2 Contenuto di ascorbato nei fluidi extracellulari

Nell'apoplasto la quantità di ascorbato rilevata dopo estrazione con infiltrazione, è risultata molto più limitata rispetto ai quantitativi riscontrati negli estratti fogliari totali. L'ascorbato trovato nei fluidi extracellulari è esclusivamente nella forma ossidata (DHA). L'apoplasto è infatti uno spazio esterno alla membrana cellulare e risulta quindi, meno protetto rispetto allo spazio intracellulare da molecole ad azione ossidante, che agiscono sull'ascorbato ridotto convertendolo in DHA.

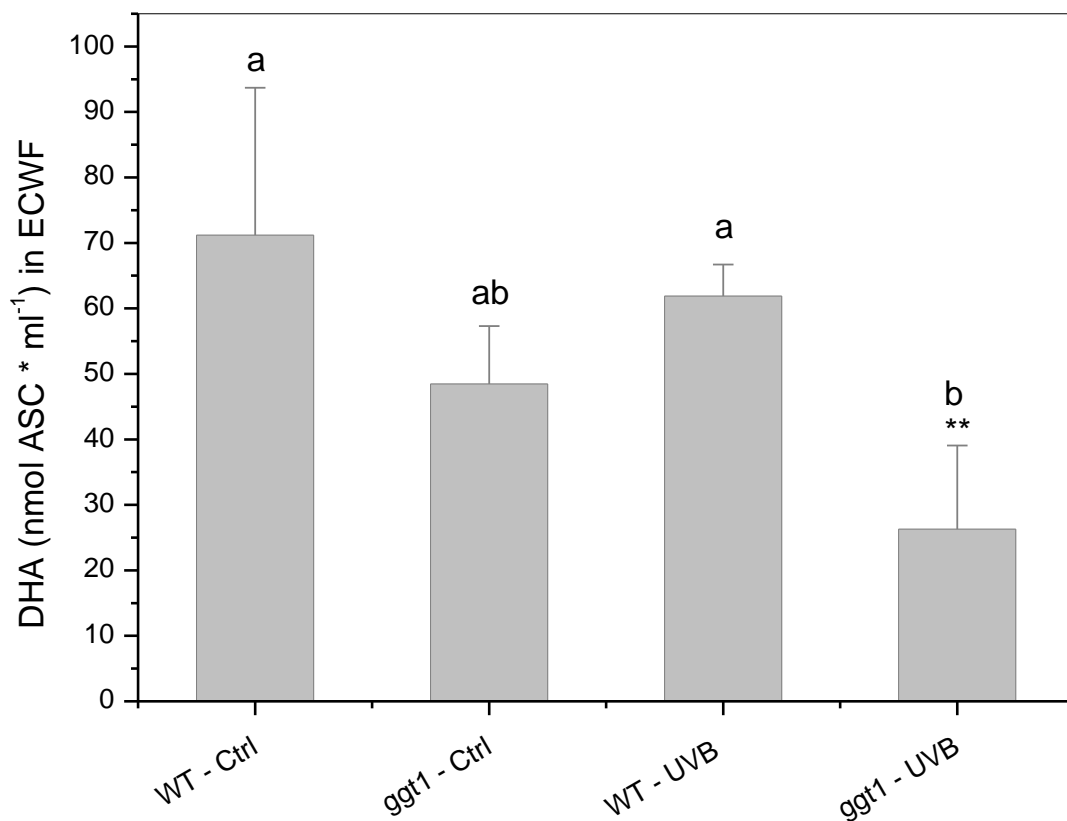


Figura 16: Contenuto di DHA nei fluidi extracellulari

Come si può osservare in Figura 16, l'analisi della variazione del contenuto di ascorbato in organismi WT e mutante *ggt1* descrive una diminuzione della quantità di ascorbato ossidato nell'apoplasto dopo il trattamento con raggi UV-B. Questa diminuzione risulta però essere più elevata e statisticamente rilevante negli organismi mutanti.

È possibile spiegare questo calo in seguito al trattamento, come una necessità della cellula di trattenere al suo interno le molecole di ascorbato, che le serviranno per aumentare la protezione intracellulare contro gli ossidanti originati dal trattamento. Di conseguenza i livelli apoplastici di ascorbato calano, perché la cellula tende a trascurare la protezione dell'ambiente esterno alla cellula, favorendo la protezione di quello interno. Questo può essere associato all'aumento della biosintesi di nuovo ascorbato cellulare che spiega la variazione positiva del contenuto di ascorbato totale nelle foglie in seguito al trattamento ossidativo (Figura 15).

4.2 Analisi del contenuto di Tioli

4.2.1 Cys in ECWF

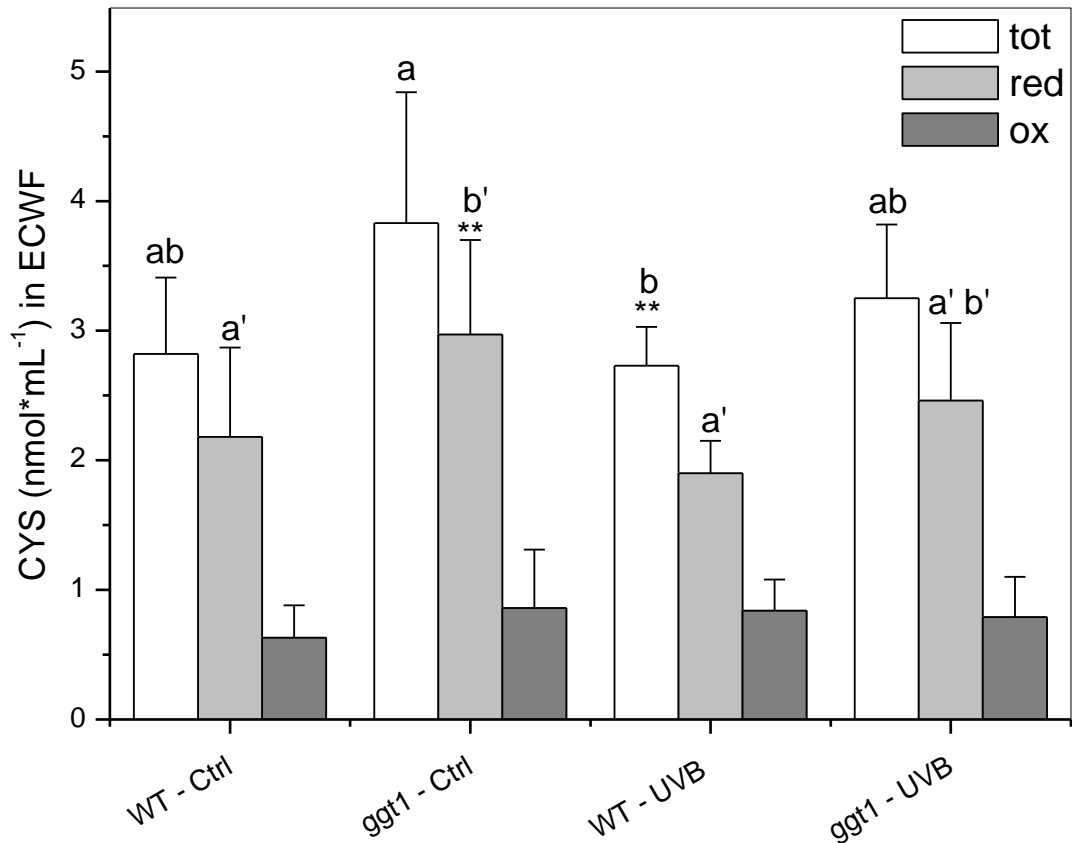


Figura 17: Contenuto di Cisteina nei fluidi extracellulari

Come si vede in Figura 17, il contenuto di Cisteina totale nei fluidi apoplastici del mutante (*ggt1*-Ctrl) risulta essere maggiore rispetto alle altre condizioni osservate, anche se non statisticamente rilevante. Quando le piante vengono sottoposte a trattamento con UV-B si vede una tendenza alla diminuzione nel contenuto di cisteina, anche se, il WT e il mutante non presentano differenze significative tra di loro. Lo stesso andamento, anche se più marcato, si evidenzia a livello della componente ridotta della cisteina; in particolare osservando i due genotipi in condizione di controllo risulta statisticamente rilevante il confronto tra WT e *ggt1*. Questo può essere dovuto all'effetto antiossidante dalle cisteina che viene utilizzata dal mutante come strategia di compensazione alla mancanza dell'enzima γ -GT, in quanto possiede questa un gruppo -SH molto reattivo. In mancanza di un ciclo del glutammile funzionante, per contrastare

la formazione di ROS, la cellula potrebbe dunque ricorrere alla cisteina come molecola antiossidante in collaborazione con il glutatione.

L'estrusione di Cys nel mutante in condizioni fisiologiche (*ggt1*-Ctrl) potrebbe dunque essere interpretato come un meccanismo di controllo antiossidante. Nel mutante dopo trattamento (*ggt1*-UVB), la concentrazione di cisteina totale nell'apoplasto risulta diminuita, probabilmente per l'ossidazione irreversibile ad acido sulfenico, sulfonico e sulfonico dovuta alle forti condizioni ossidative imposte dalla radiazione UV-B.

4.2.2 Cys-Gly in ECWF

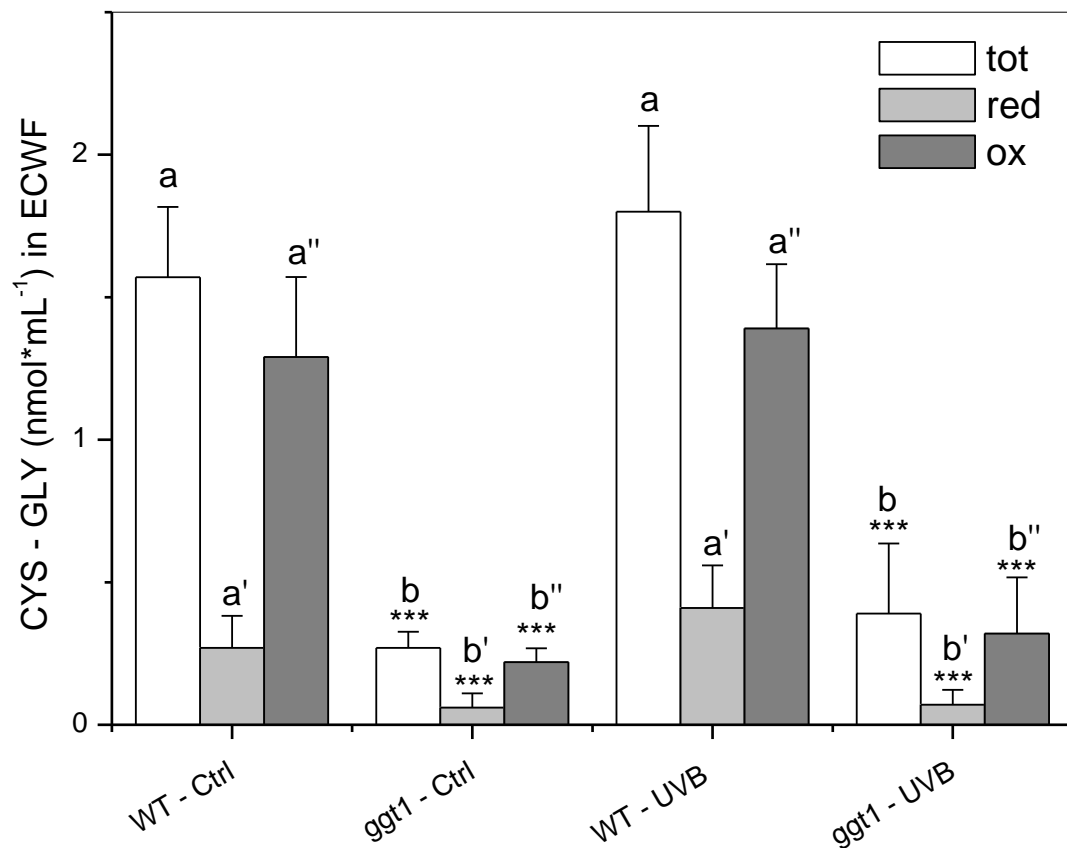


Figura 18: Contenuto di Cisteinilglicina nei fluidi extracellulari

I livelli di cisteinilglicina totale nei fluidi apoplastici evidenziano una marcata differenza genotipica tra WT e mutante *ggt1*. In particolare sia nel trattato che nel controllo, i valori del WT sono molto più elevati di quelli del mutante (Figura 18). Il trattamento causa un aumento di Cys-Gly totale sia nel WT che nel mutante, ma non è statisticamente rilevante, anche se conferma risultati precedenti ottenuti in foglie di mais (*Zea mays*) trattate con UV-B (Masi et al., 2002). La differenza tra i contenuti di Cys-Gly totale è

invece molto significativa ($P \leq 0,001$) tra i due genotipi, e si spiega con la mancanza nei mutanti, dell'isoforma apoplastica dell'enzima gamma-glutamyl transferasi (AtGGT1) che degrada il glutatione liberando Cys-Gly. La quantità di Cys-Gly totale residua riscontrata nei fluidi apoplastici fogliari della linea mutante è molto ridotta rispetto al wild-type, ma misurabile e in linea con misure precedenti (Destro et al., 2010); essa potrebbe derivare o da contaminazioni dal citosol nella fase di estrazione, o da attività proteasica/peptidasica diversa, o da meccanismi non collegabili alla γ -GT.

4.2.3 GSH in ECWF

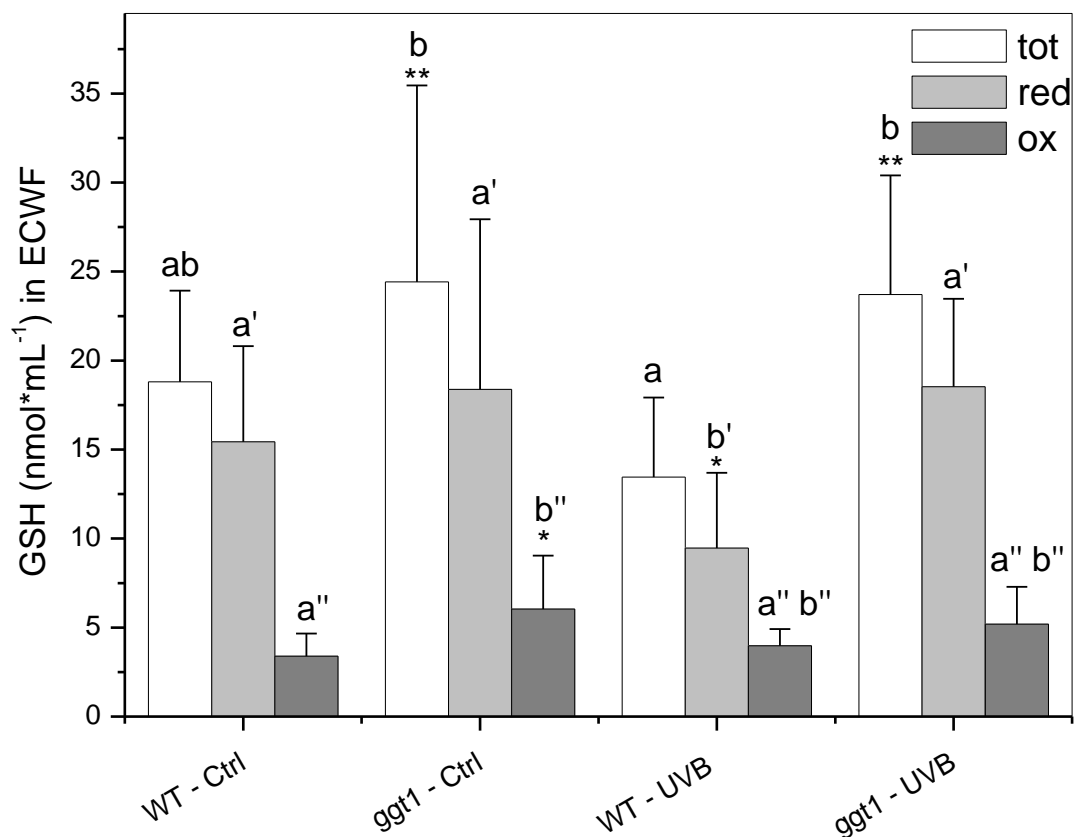


Figura 19: Contenuto di Glutatione nei fluidi extracellulari

I livelli di glutatione totale nei fluidi apoplastici (Figura 19) evidenziano una differenza genotipica anche se non statisticamente rilevante tra WT e mutante *ggt1*, con il secondo che presenta quantità fisiologiche maggiori del primo. Per quanto riguarda il WT, si ha una diminuzione del contenuto di glutatione totale, che risulta statisticamente rilevante solo per la parte della componente ridotta. Nel WT infatti, la quantità di glutatione extracellulare diminuisce dopo trattamento per un accelerato turnover di glutatione

dall'apoplasto all'interno della cellula. Nel mutante invece, il ciclo del gamma-glutamile non avviene a causa della mancanza dell'enzima γ -GT ancorato alla parete cellulare e quindi il contenuto di GSH nell'apoplasto rimane invariato anche dopo il trattamento con raggi UV-B. Le quantità elevate di glutatione nel mutante si spiegano considerando il metabolismo antiossidante alterato che queste piante presentano. Per quanto riguarda la componente ossidata, considerando che l'enzima γ -GT presenta maggiore affinità per il glutatione ossidato, nel mutante (*ggt1*-Ctrl) l'accumulo maggiore di GSSG rispetto al WT è spiegato con la mancanza di tale enzima.

4.2.4 Cys in estratto totale

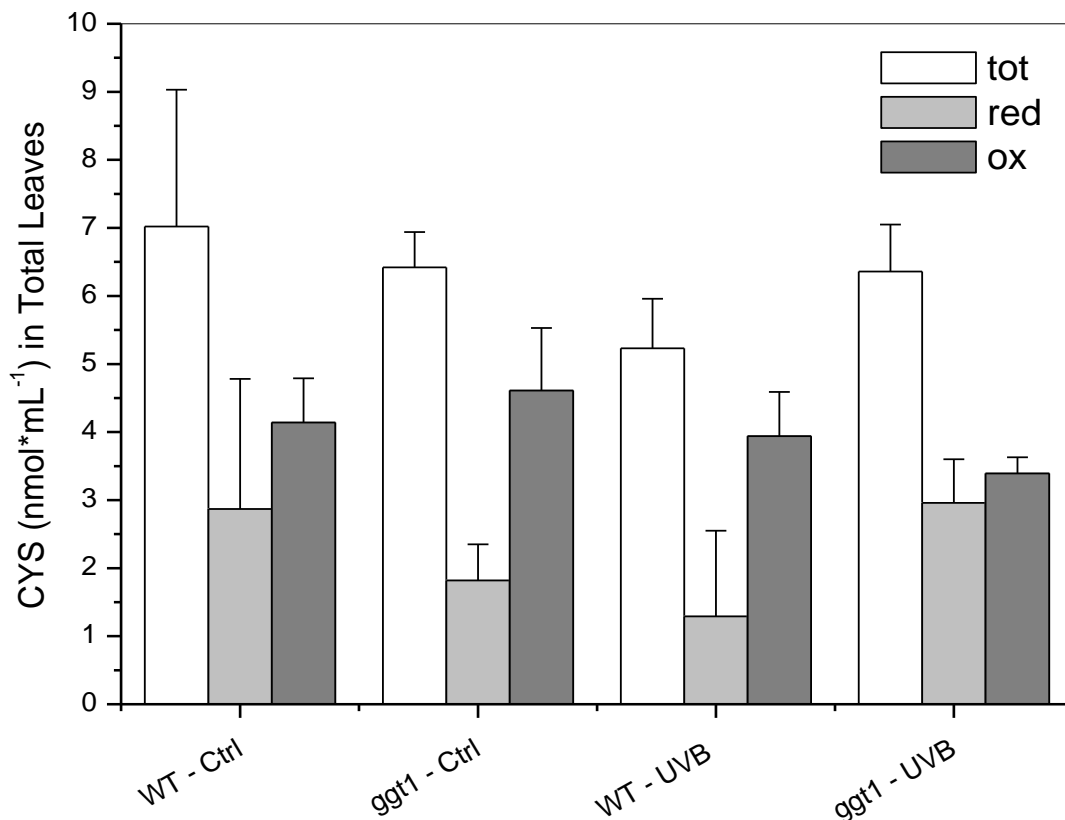


Figura 20: Contenuto di Cisteina in estratti fogliari totali.

I livelli di cisteina (Cys) nell'estratto totale fogliare (Figura 20) non evidenziano differenze statisticamente rilevanti dovute al trattamento o al genotipo.

Nonostante questo l'effetto del trattamento UV-B nel WT determina una diminuzione del contenuto di cisteina ridotta; nel mutante invece si ha un aumento della componente ridotta della cisteina, a scapito di quella ossidata.

4.2.5 Cys-Gly in estratto totale

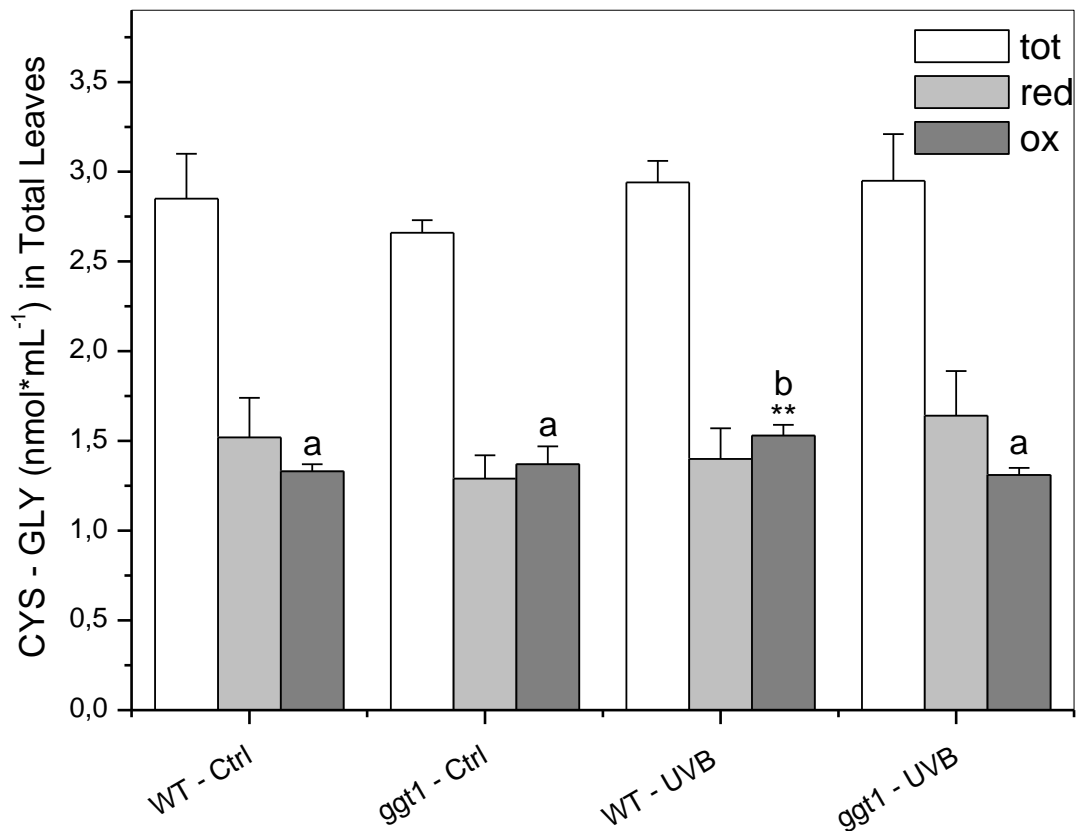


Figura 21: Contenuto di Cisteinilglicina in estratti fogliari totali.

I livelli di Cisteinilglicina nell'estratto totale fogliare (Figura 21) evidenziano, che nel WT le quantità totali restano pressochè costanti a seguito del trattamento UV-B, mentre nel mutante si ha un aumento del contenuto totale anche se non statisticamente rilevante per le piccole . Il trattamento nel WT porta comunque ad avere un aumento della componente ossidata rispetto a quella ridotta sia confrontandola con il controllo che con il mutante. Nel mutante invece si verifica un aumento anche se non statisticamente rilevante della quantità totale di cisteinilglicina dopo il trattamento rispetto al controllo. Questo può essere spiegato ipotizzando un effetto compensatorio delle altre isoforme dell'enzima gamma-glutamyl transferasi come quella vacuolare (AtGGT4), che permette il recupero del glutatione coniugato intracellulare.

4.2.6 GSH in estratto totale

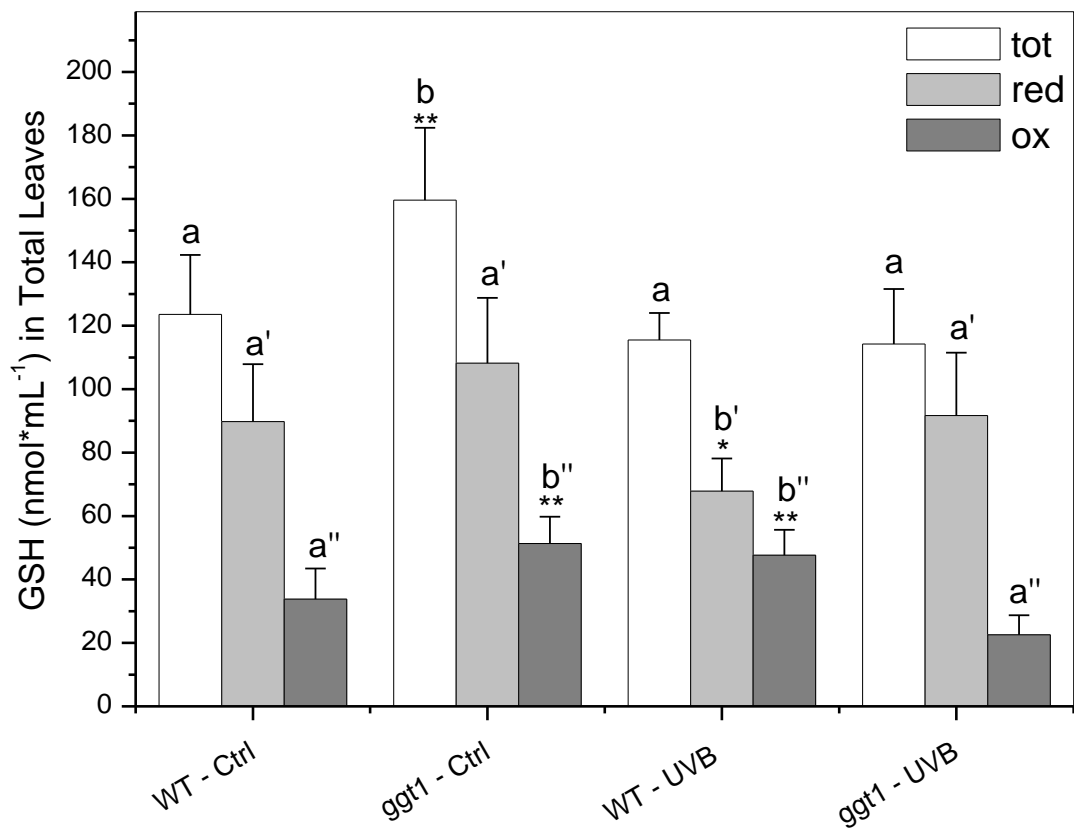


Figura 22: Contenuto di Glutazione in estratti fogliari totali.

I livelli di glutazione nell'estratto totale fogliare (Figura 22) risultano essere stabili nel WT controllo e trattato, per quanto riguarda la quantità totale, anche se il rapporto tra la quantità di GSH ridotto e quello ossidato tende a diminuire dopo il trattamento, a conferma che la radiazione UV-B causa uno stress ossidativo che la pianta tenta di limitare con enzimi e composti antiossidanti. Nel mutante la quantità di GSH nel controllo (*ggt1*-Ctrl) risulta essere molto più elevata e statisticamente rilevante rispetto alla quantità totale dei campioni sottoposti a trattamento (*ggt1*-UVB), ma non si verifica una diminuzione del rapporto redox GSH/GSSG che rimane pressochè costante. Questa diminuzione del contenuto di glutazione totale nel mutante può essere spiegata dalla sua coniugazione con lipoperossidi provenienti dalla perossidazione dei lipidi di membrana indotta dalla radiazione UV-B. Il mutante dunque a causa dello stress ossidativo perde una quantità maggiore di glutazione rispetto al WT per l'azione delle glutazione S-transferasi (GST) che convertono il glutazione in GSH-coniugati. Verosimilmente ricorre

poi alla γ -GT vacuolare per ripristinare il GSH ridotto. L'analisi cromatografica del contenuto di glutatione non è purtroppo in grado di rilevare questi coniugati del glutatione, e quindi può spiegare il calo nel contenuto totale di GSH nel mutante. In conclusione si può ipotizzare per il mutante un differente meccanismo di ripristino del GSH, che non potendo contare sulla γ -GT apoplastica deve impiegare l'isoforma vacuolare di tale enzima.

5. CONCLUSIONI

Il lavoro presentato rientra in un progetto di caratterizzazione del mutante knockout *ggt1* di *A. thaliana*, valutandone la risposta allo stress ossidativo indotto da trattamento con radiazione UV-B. A tal fine sono state analizzate le concentrazioni e lo stato redox intra- e extra-cellulari dell'ascorbato e del glutatione, le due principali molecole antiossidanti solubili nei vegetali.

È stato verificato che la concentrazione di ascorbato nelle piante, non è stabile e che varia in base all'età delle piante (sia in WT che *ggt1*), evidenziando una maggiore presenza di ascorbato ridotto nelle piante più giovani, lasciandoci ipotizzare che l'ascorbato sia una molecola antiossidante sintetizzata in grandi quantità soprattutto nei primi periodi di sviluppo della pianta come confermato da dati di letteratura (Foyer and Noctor, 2009). I dati sul contenuto di ascorbato nelle foglie, evidenziano incrementi maggiori nel mutante *ggt1* rispetto al wild-type a seguito del trattamento con UV-B, che può essere interpretato come una strategia alternativa di protezione a situazioni ossidative. In mancanza di un ciclo del glutammile funzionante, nelle cellule del mutante si realizza pertanto un aumento della biosintesi di nuovo ascorbato. È interessante notare che l'ascorbato è totalmente ridotto nelle cellule (coerentemente a dati in letteratura che descrivono percentuali di riduzione fino al 99% e oltre), mentre nei fluidi apoplastici è risultato misurabile solo ascorbato ossidato (DHA). In risposta al trattamento con UV-B, i mutanti *ggt1* hanno mostrato una significativa diminuzione nel suo contenuto rispetto al WT. Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'ascorbato viene trattenuto all'interno delle cellule per proteggere dai ROS i componenti cellulari.

Per quanto riguarda il glutatione, le concentrazioni dei composti della sua degradazione nell'apoplasto delle foglie mutanti è coerente con la localizzazione apoplastica dell'isoforma AtGGT1 dell'enzima γ -GT. Le concentrazioni di Cys-Gly (cisteinilglicina) che è il composto derivante dalla degradazione del glutatione, sono infatti praticamente nulle rispetto al WT negli estratti apoplastici del mutante, se non per una piccola quantità che può essere attribuita a contaminazione, azione di proteasi/peptidasi su altri composti amminoacidici, o altre reazioni indipendenti dall'enzima γ -GT.

I dati relativi all'analisi dei tioli indicano nel complesso che, se durante lo stress ossidativo il WT impiega la γ -GT apoplastica e il ciclo del gamma-glutammile per rigenerare il glutatione ridotto, il mutante mette a punto un'altra strategia metabolica. Questa prevede di coniugare i composti ossidati che si originano a causa dello stress con

il glutatione per formare composti GS-coniugati. Questi composti vengono prodotti tramite l'azione delle glutatione S-transferasi (GST) e saranno poi processati all'interno del vacuolo dall'isoforma AtGGT4. In questo modo il mutante otterrà i componenti di base per iniziare un nuova sintesi citoplasmatica di glutatione. La conferma possibile a questa ipotesi può risultare da recenti articoli di letteratura (Tolin et al., 2013), che evidenziano nel profilo proteico del mutante *ggt1* una sovraespressione di questi enzimi GST.

Inoltre, il mutante sembra utilizzare la cisteina come strategia di compensazione alla mancanza dell'enzima γ -GT nell'apoplasto. La cisteina infatti possiede un gruppo -SH molto reattivo, anche più del glutatione, e risulta quindi un efficace composto riducente. In mancanza dunque di un ciclo del glutammile funzionante, il mutante è in grado di contrastare la formazione di ROS, ricorrendo all'estrusione di cisteina come riducente e del glutatione come molecola da sfruttare nella coniugazione.

In conclusione, gli organismi mutanti knockout per il gene *ggt1* presentano uno stato metabolico dei composti antiossidanti diverso rispetto al WT ma non necessariamente risultano più suscettibili. I due genotipi per quanto riguarda il glutatione attuano solo strategie diverse di degradazione e neosintesi, che permettono ad entrambe le tipologie di piante di contrastare lo stress ossidativo indotto dall'UV-B.

6. BIBLIOGRAFIA

Agarwal S., (2007). *Increased antioxidant capacity in Cassia seedlings under UV-B radiation. Biologia Plantarum 51(1): 157-160.*

Allen R.G., and Tresini M., (2000). *Oxidative stress and gene regulation. Free Radic. Biol. Med. 28, 463–499.*

Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J. et al., (2003). *Genomewide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 2003, 301, 653–657*

Ambasht N.K., Agrawal M., (2003). *Effects of enhanced UV-B radiation and tropospheric ozone on physiological and biochemical characteristics of field grown wheat. Biologia Plantarum 47(4): 625-628.*

Arrigoni O., De Gara L., Tommasi F., Liso R., (1992). *Changes in the ascorbate system during seed development of Vicia faba L. Plant Physiol 99: 235 – 238.*

Asada K., (1999). *The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 601–639*

Baig MM, Kelly S, Loewus F, (1970). *L-ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulonono-1, 4-lactone and L-galactono-1, 4-lactone. Plant Physiol. 46(2):277–280.*

Baker NP, Noguees S, Allen DJ, (1997). *Photosynthesis and photoinhibition. In Lumsden P (ed.). Plants and UV-B : Responses to Environmental Change, Cambridge University Press pp 95-111.*

Bashandy T, Guillemint J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP, (2010). *Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. Plant Cell 22:376–391*

Bergmann L, Rennenberg H,(1978). *Efflux and production of glutathione in suspension cultures of Nicotiana tabacum. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, 88: 175-185*

Bigelow D.J., Squier T. C., (2011). *Thioredoxin-dependent redox regulation of cellular signaling and stress response through reversible oxidation of methionines. Molecular Biosystems 7(7): 2101-2109*

Blatt M.,(1985). *Extracellular potassium activity in attached leaves and its relation to stomatal function. Journal of Experimental Botany 36:240–251.*

Bolwell G.P., (1999). *Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. CurroOpin. Plant Bioi. 2:287-294.*

Bornman JF., (1989). *Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. Journal of Photochemistry and Photobiology 4, 145–58.*

Bornman JF, Sundby-Emmanuelson C, (1995). *Response of plants to UV-B radiation:some biochemical and physiological effects. In N. Smirnoff (ed), Environment and Plant Metabolism, Bioscientific, Oxford pp 245-262.*

Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, Delrot S, Bachhawat AK, (2000). *Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 2000;275:13259–13265.*

Bowling DJ, (1987). *Measurement of the apoplastic activity of K⁺ and Cl⁻ in the leaf epidermis of Commelina communis in relation to stomatal activity. Journal of Experimental Botany 38: 1351–1355.*

Britt AB, (1997). *Genetic analysis of DNA repair in plants. In Lumsden P (ed.). Plants and UV-B: Responses to environmental change, Cambridge University Press. pp 77-93.*

Britt AB, (1999). *Molecular genetics of DNA repair in higher plants. TRENDS in Plant Science 4(1): 20-25*

Cagnac O, Bourbouloux A, Chakrabarty D, Zhang MY, Delrot S, (2004). *AtOPT6 transports glutathione derivatives and is induced by primisulfuron. Plant Physiol 135: 1378–1387.*

Caldwell MM, (1977). *The effects of solar UV-B radiation (280-315nm) on higher plants : implications of stratospheric ozone reduction. In Castellani A. ed., Research in Photobiology, Academic Press, New York pp 597-607.*

Caldwell MM, Björn LO, Bornman JF, Flint SD, Kulandaivelu G, Teramura AH, Tevini M, (1998). *Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 46: 40-52.

Carletti P., Masi A., Wonisch A., Grill D., Tausz M., Ferretti M., (2003). *Changes in antioxidant and pigment pool dimensions in UV-B irradiated maize seedlings. Environmental and Experimental Botany* 50: 149-157

Chen Z., Young T.E., Ling J., Chang S.C., Gallie D.R., (2003). "Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 6, pp. 3525–3530

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., (2003). *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Faseb Journal* 17(10): 1195-1214

Dawar S., Vani T., Singhal G.S., (1998). *Stimulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in thylakoid membranes of wheat. Biologia Plantarum* 41(1): 65-73

DeLong J.M. & Steffen K.L., (1998). *Lipid peroxidation and α -tocopherol content in α -tocopherol -supplemented thylakoid membranes. Environmental and Experimental Botany* 39: 177-185

Destro T, Prasad D, Martignago D, Bernet IL, Trentin AR, Renu IK, Ferretti M, Masi A, (2010). *Compensatory expression and substrate inducibility of γ -glutamyl transferase GGT2 isoform in Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot.;*62:805–814.

Dietz KJ, (1997). *Functions and responses of the leaf apoplast under stress. Prog Bot* 58: 221–254

Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R, (2009). *Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. J Exp Bot* 60: 1207–1218

Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R., (1998). *Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Current Opinion in Plant Biology* 1(3): 258-266

Edwards R, Blount JW, Dixon RA, (1991). *Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. Planta* 184: 403–409

Ferretti M, Destro T, Tosatto SCE., La Rocca N, Rascio N, Masi A, (2009). *Gamma-glutamyl transferase in the cell wall participates in extracellular glutathione salvage from the root apoplast. New Phytol. 2009;181:115–126.*

Foyer CH, Halliwell B, (1976). *The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21–25*

Foyer CH, Halliwell B, (1977). *Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. Phytochemistry 16: 1347–1350*

Foyer CH, Noctor G, (2011). *Ascorbate and Glutathione: the heart of the redox hub. Plant Physiology Vol. 155, pp. 2-18*

Foyer CH, Rennenberg H, (2000). *Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence. In: Brunold C, Rennenberg H, De Kok LJ, Stulen I, Davidian J-C (eds) Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants. Paul Haupt, Berne, pp 127–153*

Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S, (2001). *The functions of intercellular and intracellular glutathione transport systems in plants. Trends Plant Sci. 2001;6:486–492.*

Freudling C, Starrach N, Flach D, Gradmann D, Mayer WE, (1988). *Cell walls as reservoirs of potassium ions for reversible volume changes of pulvinar motor cells during rhythmic leaf movements. Planta 175:193–203.*

Frottin F, Espagne C, Traverso JA, Mauve C, Valot B, Lelarge-Trouverie C, Zivy M, Noctor G, Meinel T, Giglione C, (2009). *Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. Plant Cell 21: 3296–3314*

Gao Q., Zhang L., (2008). *Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate deficient vtc1 mutants of Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Physiology 165: 138-148*

Garg N. & Manchanda G., (2009). *ROS generation in plants: boon or bane? Plant Biosystems 143(1): 81-96*

Gill S.S. & Tuteja N. (2010). *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930*

Greenberg BM, Gaba V, Canaani O, Malkin S, Mattoo AK, Edelman M, (1989). *Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:6617–6620.*

Grignon C, Sentenac H, (1991). *pH and ionic conditions in the apoplast. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:103–128.*

Groden D, Beck E, (1979). *H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. Biochim Biophys Acta 546: 426–435*

Grzam A, Martin MN, Hell R, Meyer AJ, (2007). *γ-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. FEBS Letters 581: 3131-3138*

Gutiérrez-Alcalá G, Gotor C, Meyer AJ, Fricker M, Vega JM, Romero LC, (2000). *Glutathione biosynthesis in Arabidopsis trichome cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 2000;97:11108–11113*

Han C., Liu Q., Yang Y., (2009). *Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of Picea asperata seedlings. Plant Growth Regulation 58: 153-162*

Hancock R.D., Viola R., (2005). *“Improving the nutritional value of crops through enhancement of ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, no. 13, pp. 5248–5257.*

Hanigan H.M., (1998). *γ-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. Chemico-Biological Interactions, 111-112: 333-342*

Hewitt E.J., and Dickes G.J, (1961). *Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues. Biochem. J., 78 (384–391)*

Horemans N, Asard H, Caubergs RJ, (1996). Transport of ascorbate into plasma membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma*. 1996;194:177–185.

Jain K, Kataria S, Guruprasad K.N., (2003). Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UV-B and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Science* 165: 551-557.

Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F, (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiol* 114: 275–284.

Kelly GJ, Lutzko E, (1979). Soluble ascorbate peroxidase: detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften* 66: 617–619

Kendrick RE, Kerckhoffs LHJ, Tuinen AV, Koornneef M (1997). Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant Cell Environ*. 20: 746-751.

Koh S, Wiles AM, Sharp JS, Naider FR, Becker JM, Stacey G, (2002). An oligopeptide transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*;128:21–29.

Lamb C, Dixon RA, (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.

Leustek T, Saito K, (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol*. Jul;120(3):637-44.

Leustek T, Martin MN, Bick J-A, Davies JP, (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetics studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:141–165.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb CJ, (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593.

Longstreth JD, de Gruijl FR, Kripke ML, Takizawa Y, van der Leun JC, (1995). Effects of increased solar ultraviolet radiation on human health. *Ambio* 24: 153-165.

López-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A, (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J* 19: 6770–6777.

Loewus FA, (1963). *Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. Phytochemistry. 2:109–128.*

Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hörtensteiner S, Martinoia E, Rea PA, (1998). *AtMRP2. An Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1 Plant Cell. 1998;10:267–282.*

Luwe M., (1996). *Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (Fagus sylvatica L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentration in air. Plant Cell Environment 19:321–328*

Mano J, Ushimaru T, Asada K, (1997). *Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase Photosynthesis Research 53 197–204*

Mano J., Miyatake F., Hiraoka E., Tamoi M., (2009). *Evaluation of the toxicity of stress-related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. Planta 230(4): 639-648*

Martin MN, Saladores PH, Lambert E, Hudson AO, Leustek T, (2007). *Localization of members of the γ -Glutamyl transpeptidase family identifies sites glutathione and glutathione S conjugates hydrolysis. Plant Physiology 144: 1715-1732.*

Martin MN, Slovin JP, (2000). *Purified γ -Glutamyl transpeptidase from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-coniugates. Plant Physiology 122: 1417-1426.*

Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Müller C, Salcedo-Sora E, Kruse C, Orsel M, Hell R, Miller AJ, Bray P, Foyer CH, Murray JAH, Meyer AJ, Cobbett CS, (2010). *Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquinone resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:2331–2336.*

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D, (1998). *Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. J Exp Bot* 49: 649–667

Masi A, Destro T, Turetta L, Varotto S, Caporale G, Ferretti M, (2007). *Localization of gamma-glutamyl transferase activity and protein in Zea mays organs and tissues. Journal of Plant Physiology.* 164:1527–1535.

Masi A, Ghisi R, Ferretti M, (2002). *Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in Zea mays L. Journal of Plant Physiology.*159:499–507.

Meister A., (1988).*Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 263, No. 33, Issue of November 25, pp. 17205-17208,1988*

Mittler R., (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. TRENDS in Plant Science* 7(9): 405-410

Moller I.M., Jensen P.E., Hansson A., (2007). *Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481

Mozafar A, Oertli JJ, (1993). *Thiamin Vitamin B1 translocation and metabolism by soybean seedling. Journal of plant physiology,* 142(4), 1993, pp. 438-445.

Mühling KH, Sattelmacher B, (1995). *Apoplasmic ion concentration of intact leaves of field bean (Vicia faba) as influenced by ammonium and nitrate nutrition. Journal of Plant Physiology* 147: 81–86.

Musil CF, (1995). *Differential effects of elevated ultraviolet-B radiation on the photochemical and reproductive performances of dicotyledonous and monocotyledonous arid-environment ephemerals. Plant Cell Environ.* 18: 844-854.

Musil CF, (1996). *Cumulative effect of elevated ultraviolet-B radiation over three generations of the arid environment ephemeral *Dimorphotheca sinuata* DC (Asteraceae). Plant Cell Environ.* 19: 1017-1027.

Musil CF, Chimphango SBM, Dakora FD, (2002). Effects of elevatedultraviolet-B radiation on native and cultivated plants of southernAfrica. *Anna. Bot.* 90: 127-13.

Noctor G, (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29: 409–425.

Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Foyer CH, (2000). Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Proc Biol Sci* 355: 1465–1475.

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

Ohkama-Ohtsu N, Zhao P, Xiang C, Oliver DJ, (2007a). Glutathione-conjugates in the vacuole are degraded by γ -Glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 49: 878-888.

Ohkama-Ohtsu N, Radwan S, Peterson A, Zhao P, Badr A, Xiang C, Oliver D, (2007b). Characterization of the extracellular γ -Glutamyl transpeptidase, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 49:865-877.

Pallanca JE, Smirnoff N, (1999). Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of d-glucosone, l-sorbosone, and l-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology*20,453–462.

Pasternak M, et al. (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J* 53:999–1012.

Pekker I, Tel-Or E., Mittler R., (2002). Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. *Plant Molecular Biology* 49(5): 429-438

Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 40: 537–548

Quaite FE, Sutherland BM, Sutherland JC, (1992). Quantitation of pyrimidine dimers in DNA from UVB-irradiated alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. *Appl Theor Elect* 2: 171-175.

Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G., (2011). Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 34:21–32

Ranieri A, D'Urso G, Nali C, Lorenzini G, Soldatini GF, (1996). Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol Plant.* 97:381–387

Reichheld JP, Khafif M, Riondet C, Droux M, Bonnard G, Meyer Y, (2007). Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 19: 1851–1865

Rennenberg H., (1997). Molecular approaches to glutathione biosynthesis. In: Cram WJ, DeKok LJ, Brunold C, Rennenberg H (eds) *Sulfur Metabolism in Higher Plants*. Backhuys Publishers, Leiden, pp 59–70

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP, (2002). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 277: 13609–13614

Sanchez-Fernandez R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inze D, May MJ, (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2745–2750

Schafer F.Q., Buettner G.R., (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212.

Selvakumar V., (2008). Ultraviolet-B radiation (280-315 nm) invoked antioxidant defence systems in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Crotalaria juncea* L. *Photosynthetica* 46(1): 98-106

Sattelmacher B, (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, Tansley Reviews no. 22, 149: 167–192

Smirnoff N, Pallanca JE., (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions.* 24,472–478.

Storozhenko S, Belles-Boix E, Babiychuk E, Héroutart D, Davey MW, Slooten L, Van montagu M, Inzé D, Kushnir S, (2002). γ -Glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localiztion, processing, and biochemical properties. *Plant Physiology* 128: 1109-1119.

Streller S, Wingsle G, (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta* 192: 195–201

Strid A, Chow WS, Anderson JM, (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth Res.* 39:475–489.

Sunarpi H, Anderson JW, (1997). Effect of nitrogen nutrition on remobilization of protein sulfur in the leaves of vegetative soybean and associated changes in soluble sulfur metabolites. *Plant Physiol* 115:1671–1680.

Taniguchi N, Ikeda Y, (1998). Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1998;72:239-78.

Tarrago L, Laugier E, Zaffagnini M, Marchand C, Le Marechal P, Rouhier N, Lemaire SD, Rey P, (2009). Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins. *J Biol Chem* 284: 18963–18971

Tevini M, Teramura AH, (1989). UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem. Photobiol.* 50: 479-487.

Teramura AH, Ziska LH, Sztein AE, (1991). Changes in growth and photosynthetic capacity of rice with increased UV-B radiation. *Physiol Plant* 83: 373-380

Tolin S, Arrigoni G, Trentin AR, Veljovic-Jovanovic S, Pivato M, Zechman B, Masi A, (2013). Biochemical and quantitative proteomics investigations in *Arabidopsis ggt1* mutant leaves reveal a role for the gamma-glutamyl cycle in plant's adaptation to environment. *Proteomics*, 13, 2031–2045

Tommasini R., Martinoia E., Grill E., Dietz K-J., Amrhein N., (1993). Transport of oxidized glutathione into barley vacuoles: evidence for the involvement of the glutathione-S-conjugate ATPase. *Z. Naturforsch.* 1993;48c:867–871.

Van Breusegem F., Bailey-Serres J., Mittler R., (2008). *Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. Plant Physiology 147(3): 978-984*

Vanacker H, Harbinson J, Carver TLW, Foyer CH, (1998). *Antioxidant defenses of the apoplast. Protoplasma 205:129–140.*

Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH, (1998b). *Pathogen induced changes in the antioxidant status of the apoplasto in barley leaves. Plant Physiol 117: 1103–1114*

Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D et al. (2000). *The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione- dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. Plant Cell 12:97–110*

Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T, (2005). *Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. Plant J 41:15–30.*

Welch R.W., Wang Y., Crossman A., Park J.B., Kirk K.L., Levine M., (1995). *The accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. J. Biol. Chem. 270:12584-12592.*

Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N, (1998). *The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature 393:365-369*

Wingsle G, Gardestrom P, Hallgren JE, Karpinski S, (1991). *Isolation, purification and sub-cellular localization of isozymes of superoxide-dismutase from Scots pine (Pinus sylvestris L.) needles. Plant Physiol 95: 21–28*

Xu C., Natarajan S., Sulllivan J.H., (2008). *Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. Environmental and Experimental Botany 63: 39-48*

Yang S.H., Wang L.J., Li S.H., Duan W., Loescher W., Liang Z.C., (2007). *The effects of UV-B radiation on photosynthesis in relation to Photosystem II photochemistry, thermal dissipation and antioxidant defenses in winter wheat (Triticum aestivum L.) seedlings at different growth temperatures. Functional Plant Biology 34(10): 907-917.*

Zancan S., Suglia I., La Rocca N., Ghisi R., (2008). *Effects of UV-B radiation on antioxidant parameters of iron-deficient barley plants. Environmental and Experimental Botany 63: 71-79*

Zhang MY, Bourbonloux A, Cagnac O, Srikanth CV, Rentsch D, Bachhawat AK, Delrot S, (2004). *A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. Plant Physiol. 2004;134:482–491.*

6.1 Siti internet consultati

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.plantphysiol.org>

<http://www.plantcell.org>

<http://www.newphytologist.org>

<http://www.journals.elsevier.com/phytochemistry>

<http://jpe.oxfordjournals.org>

<http://www.theplantjournal.org>

<http://www.wikipedia.org>

<http://nasc.nott.ac.uk/>

6.2 Acronimi ed abbreviazioni testuali

ROS – Reactive Oxygen Species

GSH – Glutathione ridotto

GSSG – Glutathione ossidato

AsA – Ascorbato ridotto

DHA – deidroascorbato

MDHA – monodeidroascorbato

GGT, γ -GT – gamma-glutamyl transferasi (transpeptidasi)

SOD - superossido dismutase

CAT – catalase

APox - ascorbato perossidasi

GPox - glutathione perossidasi

GR - glutathione reduttasi

CoA – Coenzima A

MDHAR – monodeidroascorbato reduttasi

DHAR - deidroascorbato reduttasi
NAD(P)H - Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato
γ-EC - γ-glutamincisteina
GSH-S - Glutazione sintetasi
OPT - oligopeptidi trasportatori
CLT - CRT-Like Transporter
MRP - Multidrug resistance-associated protein
ABC- ATP Binding Cassette
ATP- Adenosina Trifosfato
CPase - carbossipeptidasi
PRX - perossiredossine
GRX - glutazione perossidasi
GST - glutazione S-transferasi
ROOH - composti organici ossidati
DTT- ditiotreitolo
HPLC- high performance liquid chromatography
NASC - Nottingham Arabidopsis Stock Center
ECWF - Extra Cellular Washing Fluids
PAR - Radiazione Fotosinteticamente Attiva
RH - Umidità relativa
MPA – acido metafosforico
EDTA – Etilen diammino tetracetico
KCl – cloruro di potassio
AOX – Ascorbato ossidasi
SBD-F - ammonio 7-fluoro-2,1,3-benzoossadiazolo-4-sulfonato
TBP - Tributil Fosfina
HCl – acido cloridrico

ACKNOWLEDGEMENTS

“A special thank to Syed Muhammad Muntazir Mehdi, for helping and supporting me in the analysis carried out for this thesis project. Thanks for all the work that we and the other staff of the laboratory did in the past 10 months.”