



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di

AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E
AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

Tesi di laurea

***Analisi proteomica di linee mutanti di Arabidopsis
thaliana con diversa espressione dell'enzima
gamma-glutammiil-trasferasi nei semi.***

Relatore

Prof. Antonio Masi

Laureanda

Martina Francesca

Giambruno

Matricola n. 617340

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Alla mia famiglia,

INDICE

RIASSUNTO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUZIONE	11
1.1 IL GLUTATIONE	11
1.1.1 Quadro storico	11
1.1.2 Struttura.....	12
1.1.3 Funzioni del glutatione	14
1.1.3.1 Glutazione e reazioni redox.....	15
1.1.3.2 Il ciclo Ascorbato - Glutazione	16
1.1.3.3 Glutazione e assimilazione di zolfo.....	17
1.1.4 Biosintesi	18
1.1.5 Degradazione	21
1.1.5.1 Ciclo γ -glutammile.....	22
1.1.6 Localizzazione e meccanismi di trasporto	23
1.2 LA GGT (γ -GLUTAMIL TRASFERASI O γ -GT).....	25
1.2.1 γ -GT vegetale.....	26
1.2.2 Localizzazione cellulare	27
1.2.3 Il mutante knockout GGT1	28
1.3 SEMI	29
1.3.1 Proteine di riserva	29
1.3.2 GSH nei semi	31
1.3.3 Funzione antiossidante	31
1.3.4 Delivery di cisteina	33
2. OBIETTIVO	35
3. MATERIALI E METODI	37
3.1 Materiale vegetale	37
3.2.1 Analisi proteomica.....	39
3.2.2 Estrazione con esano e purificazione delle proteine da semi di <i>Arabidopsis</i>	39
3.2.3 Quantificazione concentrazione totale delle proteine con BCA	40

3.2.4 SDS-PAGE-Tricina.....	41
3.2.4.1 Colorazione gel con blu di Coomassie brilliant	43
3.2.4.2 Colorazione gel tricina con Silver staining	44
3.2.4.3 Densitometria.....	44
3.2.5 Saggio di attivita' enzimatica	44
3.2.5.1 Estrazione	45
3.2.5.2 Saggio spettrofotometrico	45
3.2.6 Western blot con semy-dry system	46
3.2.6.1 Estrazione.....	46
3.2.6.2 Saturazione della membrana.....	47
3.2.6.3 Rilevamento	47
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	49
4.1 Contenuto in semi di proteine totale e a basso peso molecolare	49
4.3 Attività enzimatica di GGT	52
4.4 Espressione qualitativa di GGT	53
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	56
6.1 Siti internet consultati	65
6.2 Acronimi ed abbreviazioni testuali	66

RIASSUNTO

Nelle piante la cisteina è il substrato naturale per la sintesi di glutatione (GSH) ed è un prodotto derivante dall'assimilazione dello zolfo. Il glutatione è un tiolo antiossidante di natura non proteica trasportato per via floematica dalle foglie al seme, e lì utilizzato.

Studi in *Arabidopsis* hanno identificato una famiglia genica che codifica per quattro isoforme di GGT, tra le quali soltanto due (*ggt1* e *ggt2*) sono presenti nel seme. Questo enzima, ancora poco studiato nelle piante, è coinvolto nella fase di degradazione del glutatione. In questa fase la GGT rompe il legame γ -peptidico liberando γ -glutamile che è poi trasferito ad altri amminoacidi oppure recuperato all'interno della cellula per sintetizzare del nuovo glutatione e cisteinilglicina, l'intermedio di degradazione del GSH. In seguito questo intermedio è idrolizzato in cisteina e glicina da una dipeptidasi e i prodotti vengono recuperati e trasportati all'interno della cellula.

Da un'analisi proteomica precedente condotta nel laboratorio di fisiologia vegetale (DAFNAE), tramite tecnica iTRAQ, era emersa nei semi di *Arabidopsis thaliana* *WT*, *ggt1*- e *L3*, una diversa quantità di proteine di riserva (albumina 2S e cruciferina). In particolare, il mutante *L3* (ottenuto tramite RNAi) evidenzia una marcata diminuzione di proteine di riserva rispetto sia al wild-type che al mutante singolo *knockout ggt1*. Da ciò è scaturita l'ipotesi che il silenziamento di entrambi i geni *ggt1* e *ggt2* comporti un ridotto rilascio di cisteina al seme e conseguentemente una ridotta capacità di sintesi delle proteine di riserva.

Il lavoro di tesi consiste nello studio proteomico di linee mutanti di *Arabidopsis* con diversa espressione dell'enzima γ -Glutammina trasferasi (GGT) per verificare se l'attività GGAsica condiziona il rifornimento di cisteina nel seme.

Pertanto utilizzando i mutanti *knockout ggt1* e i mutanti con silenziamento doppio per *ggt1*- e *ggt2*- sono state condotte analisi sul contenuto proteico, sull'attività dell'enzima GGT per via spettrofotometrica, e per il suo livello di espressione tramite western blot. Infine siamo andati a determinare la quantità di proteine di riserva tramite elettroforesi monodimensionale.

ABSTRACT

Cystein in plants is the natural substratum for the glutathione (GSH) synthesis and is produced from the assimilation of sulfur. The glutathione is a non proteic antioxidant thiol transported through phloematic means from the leaves to the seeds, and here used.

Studies on *Arabidopsis thaliana* have identified a genetic family that codifies in the seeds four isoforms of GGT among which only two are in seeds (*ggt1* and *ggt2*). This enzyme of which little is known, in plants is involved in the phase of degradation of glutathion. In this phase the GGT breaks the γ -peptide bonding releasing γ -glutamyl to other aminoacids or recovered inside the cell to synthetized the new GSH and Cys-Gly (the intermediate of GSH degradation). In the second phase this intermediate is hydrolized in cystein and glycin by a dipeptidase. The products are trasported to the inside of the cell.

In a previous analysis carried out at in the (DAFNAE) laboratory of vegetable physiology, using the iTRAQ technic, a different quantity of storage proteins (Albumins 2S and Cruciferins) appeared in the seeds of *Arabidopsis thaliana* of *WT*, *ggt1* and *L3*. In particular, the mutant *L3* (obtained by RNAi) shows a relevant decrease of storages proteins compaired both to wild-type a sto the single mutant knockout *ggt1*.

Thus, the hypothesis of the down-regulation of the genes *ggt1/ggt2* causes a reduced release of cystein to the seeds and therefore a reduced capacity of synthesis of the storage proteins.

My thesis involves the proteomic study of *Arabidopsis* mutants with different expressions of the GGT enzyme to verify if the GGT activity influences the supply of cystein in the seeds.

Therefore analysis have been carried by the employment of the lines where *ggt1* and *ggt2* expression was lowered *ggt1* for of the proteic contents on the GGT activity by spectrophotometry and on the level of the expression by Western Blot. In the end we determined the quantity of the proteins storage by monodimensional electrophoresis.

1. INTRODUZIONE

1.1 IL GLUTATIONE

Dato il ruolo centrale nell'omeostasi cellulare, il glutatione (GSH) ha ricevuto molta attenzione da parte delle comunità scientifiche. Questo è documentato da numerose pubblicazioni focalizzate su diversi aspetti del metabolismo di GSH in quanto molecola chiave nella nutrizione vegetale ed assimilazione, nello sviluppo della pianta e la regolazione cellulare, nella difesa delle piante, nell'adattamento all'ambiente, e controllo delle reazioni redox (May et al., 1998; Noctor et al., 1998; Vernoux et al., 2000; Beemster et al., 2003; Tausz et al., 2004; Mullineaux and Rausch., 2005; Meyer, 2008; Szalai et al., 2009; Foyer and Noctor, 2009).

1.1.1 Quadro storico

Il glutatione è stato scoperto nel 1888 da Rey-Pailhade. Egli scoprì in cellule di lievito la presenza di una sostanza che reagisce autonomamente con lo zolfo elementare formando idrogeno sulfide (Noctor, 2011). Studi successivi stabilirono che la molecola scoperta nel 1888, chiamata all'epoca *philothion*, è diffusa sia in tessuti animali sia in tessuti vegetali. E' costituita da cisteina e in presenza di ossigeno può subire ossidazioni reversibili ad una forma disulfide (de Rey-Pailhade, 1928). Successivamente, nel 1921 Frederick Gowland Hopkins estrae un composto da tessuto muscolare costituito da cisteina con funzione antiossidante a cui dà per la prima volta il nome di glutatione (Hopkins, 1921). Hopkins scopre che il glutatione è un tripeptide di acido glutammico, cisteina e glicina (Hopkins, 1929) e vince il premio Nobel per la medicina e la fisiologia per questo e altri lavori su vitamine e relativi fattori nutrizionali.

La caratterizzazione delle funzioni di glutatione nelle piante inizia nel 1931 da Szent-Gyorgyi. Egli osservò che il tessuto della foglia di cavolo era in grado di ridurre la forma ossidata di acido ascorbico e che questo avveniva contemporaneamente con l'ossidazione del glutatione. Già si sapeva che l'acido ascorbico comunemente si trova in forma ridotta nelle piante, nonostante la presenza di ossidasi e altri enzimi, pertanto questo ha portato a concludere che era necessaria la presenza di meccanismi di riduzione. Infatti, l'ipotesi fu confermata nel 1936 con la scoperta dell'agente riducente di questo meccanismo, il glutatione (Noctor, 2011).

La scoperta nel 1960 dell'anione superossido (O_2^-), una specie reattiva dell'ossigeno (ROS), aumenta l'interesse per il glutatione nelle piante poiché fu collegata a un contesto fisiologico. Infatti, alla via dell'ascorbato-glutatione fu assegnata una funzione chiave nel metabolismo del perossido d'idrogeno (H_2O_2) all'interno dei cloroplasti (Foyer e Halliwell, 1976) mentre il glutatione viene utilizzato dalla pianta in meccanismi di resistenza generici allo stress (Esterbauer and Grill, 1978; recensito da Tausz et al, 2004).

Allo stesso tempo, il ruolo dei tioli nei cloroplasti nella regolazione enzimatica fu caratterizzato (Wolosiuk e Buchanan, 1977). L'aumento di attenzione si è rivolto verso la sintesi del glutatione, la sua degradazione, trasporto e compartimentazione (Rennenberg, 1982; Alscher, 1989).

Con l'avvento della tecnologia transgenica e di clonazione, il riconoscimento del ruolo antiossidante del glutatione mostra la produzione di piante con elevato contenuto di glutatione o con ridotta capacità di produrre glutatione (Foyer et al, 1991, 1995; Aono et al, 1993; Broadbent et al, 1995; Strohm et al, 1995; Noctor et al, 1996, 1998a, b; Creissen et al., 1999) come pure l'identificazione di geni che codificano per gli enzimi responsabili della sintesi e riduzione del glutatione nelle piante (Maggio and Leaver, 1994; Creissen et al., 1995; Rawlins et al., 1995; Ullman et al., 1996). L'idea che lo stato del glutatione possa essere coinvolto nella trasmissione dei segnali ossidativi attivati da stress ha iniziato a svilupparsi (Foyer et al, 1997; May et al, 1998a). Da allora, l'analisi di mutanti di Arabidopsis ha fornito dimostrazioni convincenti che il glutatione è necessario per lo sviluppo delle piante (Vernoux et al., 2000; Cairns et al., 2006). Oggi, vi è la prova evidente che il glutatione è un metabolita multifunzionale importante nelle piante per le ragioni redox e come molecola segnale per le reazioni di difesa. Alcune delle più importanti intuizioni sono state rese possibili dalla disponibilità di mutanti di Arabidopsis e dall'aumentare delle informazioni generate da approcci genomici e post-genomici. Tutto l'insieme di queste informazioni mette questo piccolo composto tiolico al centro della regolazione dello sviluppo di piante e delle risposte per l'ambiente.

1.1.2 Struttura

Il glutatione (GSH; γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina) è una molecola non proteica costituita da tre amminoacidi: L-cisteina (Cys), glicina (Gly) e glutammato (γ -Glu).

I legami di questi tre amminoacidi si caratterizzano in quanto è presente un legame atipico tra glutammato e cisteina. Infatti, essendo la cisteina un amminoacido polare e la glicina un

amminoacido non polare possono legarsi formando un classico legame α -petidico. Ciò non accade tra il glutammato e la cisteina. In questo caso il legame tra i due amminoacidi è di tipo γ -petidico e si forma tra il gruppo carbossilico (-COOH) della catena laterale del glutammato e il gruppo amminico (-NH₂) della cisteina. L'atipicità di legame conferisce stabilità alla molecola in quanto presenta il gruppo sulfidrilico della cisteina libero di subire ossidazioni e di formare un dimero con un'altra molecola di glutatione, in tal modo si forma il glutatione ossidato(GSSG).

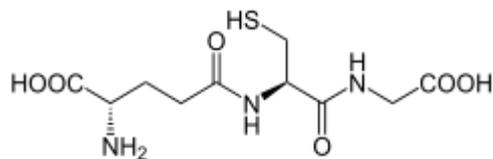


Figura 1. Formula di struttura glutatione (GSH)

Il glutatione è un metabolita essenziale in molteplici organismi perché svolge attività importanti nello sviluppo, in situazioni di stress biotici e abiotici, attraverso la reazione di ossido-riduzione del suo gruppo tiolico (-SH) presente nella cisteina (agente riducente). Il suo stato redox, ovvero l'alternarsi della sua forma ridotta (GSH) e di quella ossidata dimerica (GSSG), è utilizzato per definire lo stato redox della cellula stessa (Schafer FQ. And Buettner Gr., 2001). Questa posizione strategica tra ossidanti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) e riducenti cellulari rende il meccanismo di azione del glutatione perfettamente funzionante come molecola segnale (Srijani Ghanta, 2011). Tutto ciò non ha un ruolo esclusivo nelle piante, ma presenta un ruolo centrale anche negli animali, dove agisce nel metabolismo di difesa. Studi hanno dimostrato che la carenza indotta di GSH nei mammiferi come ratti neonati porta ad una rapida inibizione della funzionalità degli organi portandoli alla morte in pochi giorni (Meister 1944). Nelle piante il glutatione svolge un ruolo importante nella regolazione del metabolismo cellulare. Il quale include 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).

Tuttavia, ci sono alcune variazioni interessanti del glutatione in organismi come halobacteria, dove il glutatione può essere sostituito da altri composti dello zolfo, come tiosolfato (Newton

e Javor, 1985). Un altro composto che esegue funzioni simili al glutatione in alcuni protozoi parassiti è il tripanotione (N1, N8-bis glutathionyl spermidina) (Fairlamb et al., 1985). In questi protozoi parassiti il GSH può essere sostituito da altri composti solforati come la γ -glutamylcisteina (γ -EC) e il tiosolfato (Newton & Javor, 1985). Inoltre, in alcune specie di piante si trovano le forme omologhe del glutatione che presentano in posizione C-terminale della glicina altri amminoacidi come serina, β -alanina o glutammato (Rennenberg, 1982; Klapheck, 1988; Klapheck et al., 1922; Meuwly et al., 1993). Nei legumi ad esempio, oltre a GSH è presente l'omoglutatione (γ -Glu-Cys- β -Ala) la cui sintesi è a carico di enzimi propri codificati da differenti geni (MacNicol, 1987; Frendo et al., 2001). Nella specie modello *Arabidopsis* queste forme omologhe del GSH non sono significativamente rappresentate, mentre recenti studi suggeriscono la presenza di altri omologhi in varie specie.

La concentrazione del glutatione nei tessuti vegetali è il risultato di un innumerevole quantitativo di processi ed interazioni a livello intracellulare ed intercellulare (apoplasto). Questi processi includono l'assimilazione di zolfo e azoto i quali forniscono i precursori metabolici del glutatione, la regolazione dei meccanismi di biosintesi e degradazione, l'entrata e l'uscita di glutatione da floema e xilema, e il suo turnover cellulare per la produzione di glutatione derivati (Rennenberg, 1977).

1.1.3 Funzioni del glutatione

Il glutatione è un metabolita essenziale con funzioni multiple. Studi hanno dimostrato che le piante non possono sopravvivere senza glutatione. Le ragioni per cui questa piccola molecola è indispensabile non sono pienamente comprese, ma si può dedurre che il glutatione svolga attività importanti nello sviluppo delle piante che non possono essere eseguite da altri tioli o antiossidanti. Il glutatione è coinvolto in diverse vie metaboliche. Infatti, oltre ad agire come molecola antiossidante è coinvolto nei processi regolativi che determinano l'assimilazione dello zolfo e azoto ridotto, è associato alla crescita e allo sviluppo in quanto connesso al metabolismo dei carboidrati e fotosintesi, è legato al differenziamento cellulare, alla senescenza, alla morte cellulare, alla resistenza a organismi patogeni e a stress abiotici. La funzione fondamentale scoperta da qualche tempo è l'interazione tiolo-disolfuro, interazione in cui il glutatione ridotto (GSH) viene continuamente ossidato nella forma disolfuro (GSSG), ed è poi riconvertito a GSH dall'enzima NADPH-dipendente glutatione reduttasi (GR). La sua posizione strategica tra ossidanti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) e riducenti cellulari rendono il meccanismo di azione del glutatione perfettamente funzionante come molecola

segnale. Recenti scoperte evidenziano l'utilizzo del peptide come molecola segnale e omeostasi cellulare. Il glutatione è in grado di percepire lo stato redox a livello intracellulare, così perturbazioni dello stato ridotto del glutatione sono tradotte in cambiamenti dell'espressione genica. Questo ruolo richiede un preciso controllo di entrambe le concentrazioni e dello stato di riduzione del glutatione nei diversi compartimenti.

Il glutatione non può essere funzionalmente sostituito nelle piante, salvo che siano omologhi tripeptidici come homoglutatione (γ - Glu - β - Cys - Ala). Questo ha dimostrato la diminuzione biochimica e genetica del GSH.

1.1.3.1 Glutatione e reazioni redox

Il glutatione è legato a molte reazioni del gruppo sulfidrilico della cisteina, e come altri tioli può sottoporsi a numerose reazioni redox. La forma ossidata include disolfidi o altri residui della cisteina, per produrre glutatione disulfide (GSSG) (Foyer e Noctor, 2005). La coniugazione del glutatione a molecole elettrofile mediante le glutatione s-trasferasi (GSTs) gioca un ruolo di detossificazione. Infatti, il glutatione si lega a metalli pesanti e/o xenobiotici che vengono poi traslocati nel vacuolo dove saranno degradati. Tuttavia, è abbondante la formazione potenziale di una serie di glutatione coniugato con endogeni e specie elettrofile xenobiotiche (Wang e Ballatori, 1988; Dixon e Edwards, 2010). In particolare, al nitrosoglutatione (GSNO) è stata data una particolare attenzione per il suo significato come molecola segnale o come riserva di ossido nitrico (NO) (Lindermayr et al., 2005).

I composti in grado di ossidare GSH ad alti livelli sono i ROS come lo ione superossido e il radicale ossidrilico. Il glutatione all'interno della cellula ha un'elevata concentrazione e questo gli conferisce un potere riducente che previene l'eccessiva ossidazione delle altre componenti. Molti metaboliti primari e secondari si comportano come antiossidanti. Tuttavia, a differenza del glutatione, le forme ossidate di questi composti non sono stabili e non sono riciclabili. In confronto, il glutatione è mantenuto in stato ridotto da specifiche glutatione reduttasi (GR) localizzate nel citosol, nei plastidi, nei mitocondri e perossisomi, e possiedono un'alta affinità per il glutatione ossidato (GSSG) e per il NADPH (Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato) (Halliwell and Foyer, 1978; Smith et al., 1989; Edwards et al., 1990; Jimenez et al., 1997; Chew et al., 2003; Kataya and Reumann, 2010). Nella foglia è mantenuto un rapporto 99:1 di GSH:GSSG, che varia in presenza di stress abiotici. Inoltre, l'ossidazione del glutatione si verifica non soltanto a livello chimico, ma anche mediante enzimi che catalizzando sono in grado di utilizzare GSH per ridurre H_2O_2 o altre forme reattive

dell'ossigeno. Infine, l'enzima deidroascorbato reduttasi (DHAR) lega l'ossidazione del glutatione alla rigenerazione di ascorbato, anche se questa reazione può verificarsi chimicamente, ma a ritmi più bassi (Foyer and Mullineaux, 1998). La riduzione GSH-dipendente di deidroascorbato (DHA) consente l'ossidazione da parte di NADPH associato alla rimozione dei ROS da parte della via dell'ascorbato e del glutatione (Foyer and Halliwell, 1976).

1.1.3.2 Il ciclo Ascorbato - Glutazione

Questa via metabolica svolge il ruolo di disintossicare la cellula dal prodotto di scarto del metabolismo cellulare, il perossido d'idrogeno. 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. 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. Il ciclo consta di diverse molecole antiossidanti con i rispettivi enzimi (Noctor and Foyer, 1998). In primo luogo, il perossido d'idrogeno è ridotto ad acqua mediante l'intervento dell'Ascorbato Perossidasi (APX), enzima che sfrutta l'ascorbato come donatore di elettroni; in seguito l'ascorbato ossidato (monodeidroascorbato) è rigenerato dalla MonoDeidroAscorbato riduttasi (MDAR) (Wells and Xu, 1994). Il monodeidroascorbato è un radicale che deve essere ridotto velocemente per evitare che generi ascorbato o deidroascorbato. Il deidroascorbato si riduce ad ascorbato dalla deidroascorbato riduttasi a spese del glutatione, producendo glutatione ossidato (GSSG). Quest'ultimo è riconvertito a glutatione dalla glutatione reduttasi (GR) usando NADPH come donatore di elettroni (Figura 2).

In sostanza, il ciclo è un flusso di elettroni che si sposta dalla molecola di acqua ossigenata al NADPH. La riduzione del deidroascorbato, inoltre, può essere non-enzimatica o catalizzata da proteine con attività deidroascorbato reduttasica, come ad esempio le glutaredossine (Whitbread et al., 2005; Rouhier et al., 2002).

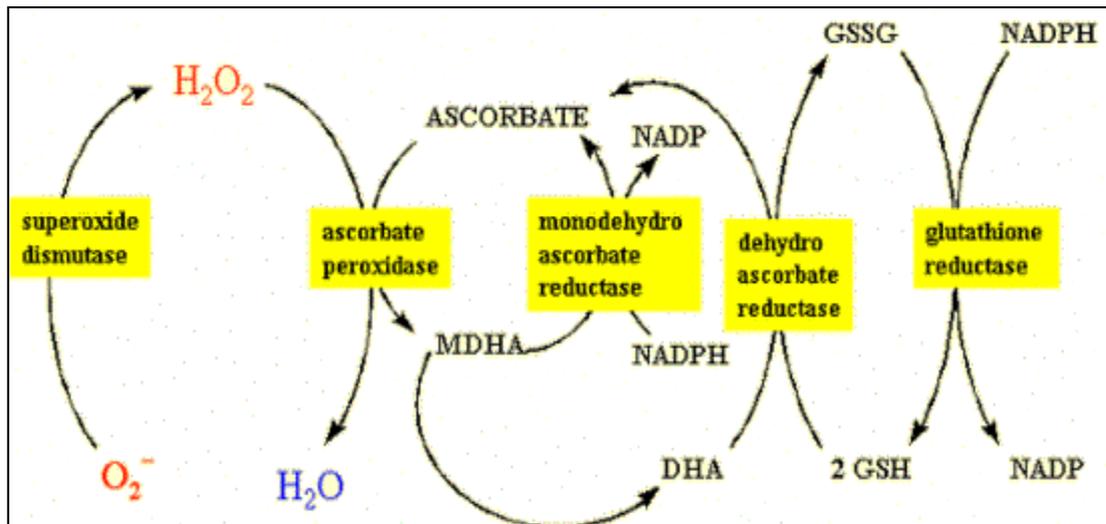


Figura 2. Ciclo Ascorbato - Glutazione.

Nelle piante, questo ciclo si posiziona a livello del citosol, nei mitocondri, nei plastidi e nei perossisomi (Meyer, 2009; Jimenez et al., 1998) e considerando che ascorbato e NADPH sono presenti ad alte concentrazioni nelle cellule vegetali si può ipotizzare che il ciclo ascorbato-glutazione svolga un ruolo chiave per detossificare le cellule dall'acqua ossigenata. Tuttavia, altri enzimi (perossidasi) compresi perossidasi e glutatiolione perossidasi, utilizzando diversi substrati riducenti come tioredossine o glutaredossine, contribuiscono alla rimozione di H_2O_2 (Rouhier et al., 2008).

1.1.3.3 Glutazione e assimilazione di zolfo

La cisteina è uno dei prodotti organici derivanti dall'assimilazione dello zolfo nelle piante ed è successivamente utilizzata come substrato per la sintesi di glutatiolione (GSH), la forma più abbondante di zolfo ridotto nei vegetali (Kopriva and Rennenberg, 2004). Il glutatiolione è un'importante molecola non proteica per ridurre lo zolfo in quanto fornisce una resistenza correlata a molti patogeni. Questo fattore assume il nome di resistenza zolfo indotta o SIR (Bloem et al., 2007). Nonostante le cause della SIR rimangano ancora da identificarsi, i tessuti contenenti glutatiolione o i suoi precursori, potrebbero essere tra i fattori che uniscono la nutrizione di zolfo alle risposte della pianta verso l'attacco di funghi patogeni e infezioni virali (Gullner et al., 1999; Bloem et al., 2007; Zechmann et al., 2007; Holler et al., 2010).

In *Arabidopsis* come in altre piante, il GSH è utilizzato nel metabolismo dello zolfo. Infatti, mediante fasi di attivazione, riduzione a solfuro e incorporazione dello stesso nella cisteina attraverso l'attività enzimatica di ATP sulfurasi (codificato dal gene *APS1*) accompagna la diminuzione dell'afflusso di zolfo e dell'attività del gene *APS1* in radici (Lapartient et al., 1999).

Lo zolfo limita l'accumulo di GSH nelle piante (Nikiforova et al., 2003). Studi in mutanti di *Arabidopsis* knockout per il gene *Sultr1;2* che codifica per la proteina specifica trasportatrice di zolfo, evidenziano che il livello di glutatione diminuisce (Maruyama-Nakashita et al., 2003). In altri studi si emerge l'espressione costitutiva di un gene *APR* (Adenosina 5'-fosfato reductasi) batterico, che appare essere sensibile all'incremento del contenuto di cisteina e glutatione in *Arabidopsis* (Tsakraklides et al., 2002). Infine, stress ambientali da ozono si verificano in concomitanza con l'incremento dei livelli di cisteina e glutatione, associato alla attivazione post- trasduzionale di *APR1* (Bick et al., 2001).

1.1.4 Biosintesi

La pathway biosintetica del glutatione è costituita da più livelli regolativi ATP dipendenti, perché essendo un tripeptide di natura non proteica, richiede una biosintesi enzimatica dai tre amminoacidi che lo compongono. Questa via metabolica è essenziale e molto simile nella maggior parte degli organismi contenenti GSH (Meister, 1988b).

Principalmente il glutatione è sintetizzato da glutammato e cisteina, grazie all'azione di due enzimi: γ -Glutamilmcisteina sintetasi (γ -ECS) e Glutatione sintetasi (GSH-S).

In primo luogo, γ -Glutamilmcisteina sintetasi (γ -ECS) catalizza la formazione di un legame peptidico tra il gruppo γ -carbossilico del glutammato e il gruppo α -amminico della cisteina che consuma una molecola di ATP, e forma così l'intermedio γ -glutamilmcisteina (γ -EC).

In seconda fase, l'enzima Glutatione sintetasi (GSH-S) aggiunge una glicina al C-terminale della cisteina dell'intermedio γ -glutamilmcisteina (γ -EC) mediante il consumo di una molecola di ATP.

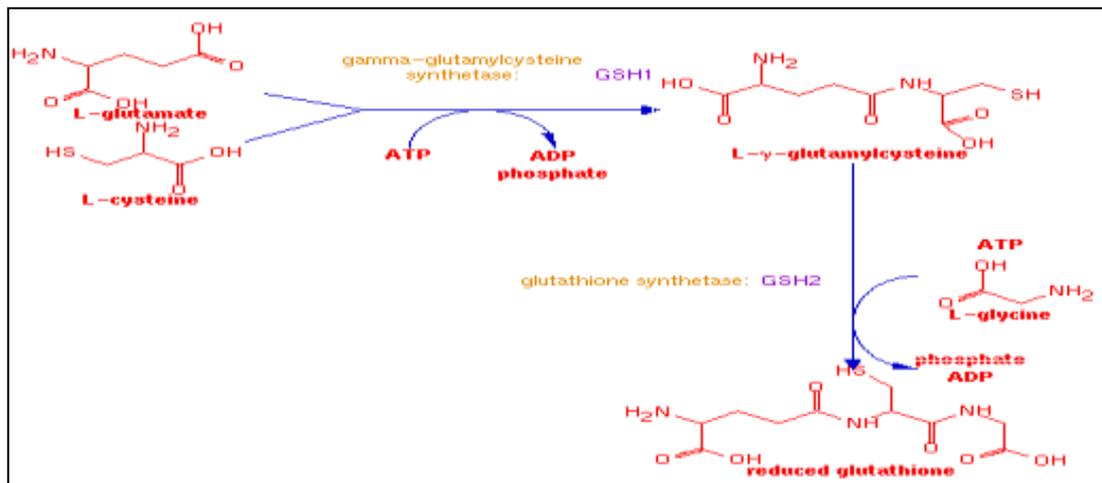


Figura 3. Pathway biosintetica glutatione (GSH)

In *Arabidopsis* l'enzima γ -glutamilcisteina sintetasi (γ -ECS) è codificato dal gene GSH1 (At4g23100) e svolge la sua attività principalmente nei plastidi (Wachter et al., 2005). In foglie di grano, l'attività del gene è strettamente associata ai cloroplasti (Noctor et al., 2002). Per quanto riguarda l'enzima glutatione sintetasi (GSH-S), è codificato da un singolo gene GSH2 (At5g27380) in due trascritti, dove il più abbondante è la forma più breve che si localizza nei cloroplasti dove catalizza la formazione del legame peptidico tra il gruppo carbossilico della cisteina della γ -Glutamilcisteina e l' α -amminogruppo della glicina. Il GSH si localizza sia nei cloroplasti sia nel citosol (Wacher et al., 2005). L'intermedio γ -glutamilcisteina (γ -EC) deve essere esportato dal plastidio al citosol allo scopo di attivare la biosintesi citosolica del GSH. Questo fatto suggerisce che il trasporto di glutatione tra i compartimenti è fondamentale per il mantenimento dei livelli ottimali di GSH nella cellula. Questo step è guidato dall'attività enzimatica di γ -glutamilcisteina sintetasi. La regolazione della pathway è attribuita anche agli enzimi della sintesi della cisteina (Strohm et al., 1955; Noctor et al., 1996, 1998^{*}; Creissen et al., 1999; Harms et al., 2000; Noji e Saito, 2002; Wirtz e Inferno, 2007). Sebbene i fattori sopranominati siano considerati i principali comandi, la regolazione della via biosintetica del glutatione è guidata in altri livelli dalla presenza di glicina e di ATP (Buwalda et al., 1990; Ogawa et al., 2004). Pertanto anche se il flusso complessivo della via biosintetica del glutatione è relativamente bassa rispetto al metabolismo primario, la molteplicità di regolazioni suggerisce che la via è fortemente controllata e finemente sensibile all'ambiente redox cellulare circostante. Questa

complessità può essere intesa in termini di differenti funzioni fisiologiche di modifiche della sintesi del glutatione.

Successivamente il contenuto di glutatione all'interno dei plastidi è regolato da sistemi di efflusso che mediante precursori γ -EC lo trasportano nel citosol dove viene trasformato in GSH dall'azione enzimatica di glutatione sintetasi (GSH-S) (Pasternak et al., 2008). Il glutatione sintetizzato all'interno dei plastidi può inoltre essere trasportato direttamente nel citosol da trasportatori specifici di membrana plastidiale.

Alcuni mutanti knockout di GSH1 si caratterizzano fenotipicamente in quanto sono embriofetali (Cairns et al., 2006). Mutazioni meno severe di questo gene producono una parziale diminuzione del contenuto di glutatione. Queste mutazioni sono state significative per chiarire le funzioni del glutatione nelle piante. I mutanti *rml1* (rootmeristemless1) producono il 5% in meno di glutatione rispetto al contenuto di glutatione in *wild-type* e si è visto che non riesce a sviluppare la radice meristemica apicale poiché la differenziazione delle cellule meristematiche si blocca nella fase G1 del ciclo cellulare (Vernoux et al., 2000). Questo mutante è molto meno influenzato fenotipicamente.

Altre combinazioni di mutanti per il gene GSH1, hanno evidenziato un disturbo nel trasporto e nel metabolismo dell'auxina, perdendo così la dominanza apicale e la ridotta produzione di radici secondarie (Bashandy et al., 2010). Mutanti per il gene GSH2 evidenziano la morte allo stadio di plantula, probabilmente perché riflette la sostituzione parziale delle funzioni del glutatione tramite γ -CE, che si accumula raggiungendo alte concentrazioni (Pasternak et al., 2008).

Ad ogni modo, studi dimostrano che l'espressione dei geni responsabili della sintesi del glutatione (GSH1 e GSH2) sono indotti da Acido Jasmonico (JA) e dalla presenza di metalli pesanti (Xiang e Oliver., 1998; Sung et al., 2009) oltre al fatto di rispondere alla luce e a condizioni di stress come siccità a attacco da parte dei patogeni. L'incremento della disponibilità di H_2O_2 è un fenomeno noto per l'accumulo di glutatione in diversi compartimenti della pianta (Smith et al., 1984; Maggio e Leaver, 1993; Willekens et al, 1997; Queval et al., 2009).

Per quanto riguarda la sovraespressione della via biosintetica del glutatione, vediamo che alcuni studi dimostrano l'espressione di γ -ECS all'interno di cloroplasti di pioppo o all'interno del citosol e cloroplasti di foglia di tabacco, dove aumenta di un massimo di quattro volte (Noctor et al, 1996, 1998a,.; Creissen et al, 1999). Studi effettuati in *Arabidopsis* evidenziano la sovraespressione del gene GSHs, il quale è aumentata anche se in modo meno marcato (Xiang et al., 2001). La sovraespressione di glutatione nelle piante è collegata a una maggiore resistenza verso i metalli pesanti e ad alcuni erbicidi (Zhu et al, 1999a; Gullner et al., 2001).

La sovraespressione di γ -ECS all'interno dei cloroplasti di pioppo, comporta l'aumento della concentrazione di glutatione ma anche di numerosi amminoacidi liberi come leucina, isoleucina, tirosina e lisina (Noctor et al., 1998a). Le cause di questi effetti restano poco chiare, ma rimane interessante notare che vari enzimi coinvolti nella sintesi o nel metabolismo di alcuni degli amminoacidi suddetti rientrano tra gli enzimi identificati come potenziali obiettivi delle TRX attraverso approcci proteomici redox (Montrichard et al., 2009).

Ad ogni modo l'iper-espressione di GSH ha effetti molto meno marcati sul contenuto di glutatione in quanto nessun aumento sostanziale è stato rilevato in pioppo (Hall et al., 1995; Noctor et al., 1998a) anche se incrementi di GSH erano indotti una volta aggiunto γ -EC ai tessuti fogliari. Sono stati numerosi gli studi per chiarire il controllo della biosintesi del GSH (Xiang et al., 1988, 2002; Xiang et al., 2001; Jez et al., 2004), mentre molto poco è stato fatto per quanto riguarda la sua degradazione nelle piante.

1.1.5 Degradazione

La degradazione del glutatione è stata ben descritta nei mammiferi, ed è uno step che costituisce parte del ciclo del γ -glutamile (Meister 1988). Questo coinvolge l'idrolisi o transpeptidazione del glutatione sulla membrana plasmatica ed è effettuata da parte di due enzimi: la γ -glutamyl transpeptidasi (γ -GT o GGT) e una Dipeptidasi. Il legame γ -peptidico presente tra cisteina e glutammato risulta resistente alle proteasi standard (Taniguchi and Ikeda, 1998), ma l'enzima γ -glutamyl transpeptidasi (GGT) è in grado di romperlo. La sua azione transferasica gli consente di liberare γ -glutamile che è poi trasferito ad altri amminoacidi oppure recuperato all'interno della cellula per sintetizzare del nuovo glutatione e cisteinilglicina, l'intermedio di degradazione del GSH. In seguito questo intermedio è idrolizzato in cisteina e glicina da una dipeptidasi e i prodotti vengono recuperati e trasportati all'interno della cellula. Questa via è ben descritta nei mammiferi, dove svolge un ruolo chiave nel bilanciamento redox cellulare e nel recupero del glutatione dallo spazio extracellulare, mentre nelle piante è poco conosciuta. Ad ogni modo queste attività enzimatiche e anche le attività da parte di γ -glutamylamminoacidi sono riciclati all'interno della cellula come substrati per la γ -glutamylciclotrasferasi (GGC), la quale li trasforma mediante la 5-oxo-prolinasi in L-glutamato libero che può essere utilizzato per sintetizzare nuove molecole di glutatione (Leustek et al., 2000). Queste reazioni enzimatiche sono state

1.1.6 Localizzazione e meccanismi di trasporto

Il glutatione è sintetizzato all'interno dei cloroplasti e nel citosol e successivamente trasportato tra cellule e organi. Insieme a S-metilmetionina, il glutatione è considerato la più abbondante forma organica di zolfo trasportata nel floema (Herschbach and Rennenberg, 1994, 1995; Bourgis et al., 1999; Mendoza-Còzati et al., 2008) per poi essere veicolato in altri tessuti e organi vegetali. Studi dimostrano il suo movimento da tessuti maturi a quelli giovani, e dai tessuti vegetativi al seme nella sua fase di differenziazione (Sunarpi and Anderson, 1997).

Il glutatione è una delle molecole di trasporto dello zolfo ridotto tra le cellule nelle piante e partecipa al controllo metabolico del suo assorbimento del terreno (Leustek and Saito, 1999). Inoltre, il glutatione non è soltanto un metabolita di trasporto, ma fa parte di un sistema di trasduzione del segnale che percepisce la presenza di zolfo nella piante e ne media la concentrazione (Bergman et al., 1978).

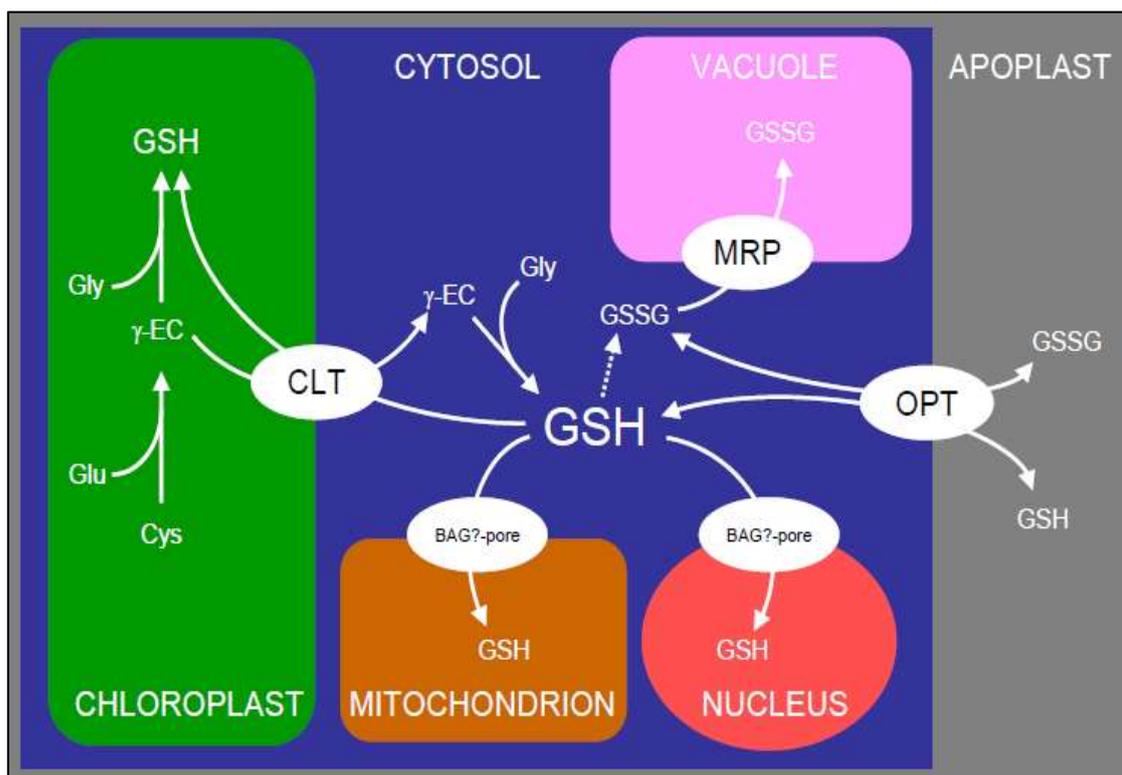


Figura 5. Meccanismi di trasporto GSH e compartimentazione (Noctor et al., 2011)

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* da cui prendono il nome di HGT1, sono in grado di trasportare il GSH, GSSG e i GS-coniugati e altri piccoli peptidi dentro e fuori dalla cellula (Bourbouloux et al., 2000). Espressioni omologhe del gene BjGT1, in lievito, mostrano che queste proteine competono per l'assorbimento del glutatione (Bogs et al., 2003). In *Arabidopsis*, sono stati evidenziati nove geni OPT (Koh et al., 2002), tra cui il gene OPT6 è in grado di trasportare GSH, GSSG e composti GS-coniugati (Cagnac et al., 2004).

Nel trasporto tra plastidi e citosol, è stato recentemente identificato una famiglia di proteine chiamata 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. I cloroplasti che assorbono GSH da questa famiglia di trasportatori probabilmente spiegano l'osservazione fatta in presenza di mutanti di *Arabidopsis* knockout per il gene *gsh2* nei quali si ha un'espressione di glutatione soltanto nel citosol (Pasternak et al., 2008).

Nel trasporto vacuolare sono state identificate proteine trasportatrici MRP (Multidrug resistance-associated protein), le quali svolgono il ruolo di trasportatori ABC (ATP-binding cassette) utilizzando l'energia dell'idrolisi dell'ATP per trasportare molecole attraverso il tonoplasto, la membrana vacuolare (Foyer et al., 2001). Queste MRP di *Arabidopsis* sono in grado di trasportare GSSG e GS-coniugato all'interno dei vacuoli (Lu et al., 2001). Un ruolo chiave di queste proteine è quello di detossificare i composti citotossici, per questo molti metaboliti tossici prodotti dalle cellule vegetali nelle normali fasi di catabolismo e anabolismo, vengono coniugati al GSH e mediante le MRP compartimentalizzati nel vacuolo, sito in cui vengono degradati senza influenzare la vitalità cellulare (Foyer et al., 2001).

Il trasporto nel nucleo è stato evidenziato grazie all'immunolocalizzazione (Zechmann et al., 2007) che ha permesso di chiarire il concetto di ciclo redox nucleare durante la fase G1. La localizzazione del GSH nel nucleo, nella fase G1, è accompagnata da un aumento di ROS e da un abbassamento dello scudo ossidativo difensivo, come risulta dalle analisi trascrittomiche (Diaz-Vivancos et al., 2010).

1.2 LA GGT (γ -GLUTAMIL TRASFERASI O γ -GT)

La gamma-glutamyl transferasi è un enzima chiave nel metabolismo del glutatione, in quanto è l'unico enzima in grado di rompere il legame γ -peptidico atipico presente tra due aminoacidi (cisteina e il glutammato) costituenti il glutatione. È un enzima molto studiato nel mondo animale e meno nel mondo vegetale, ma per entrambi molto importante. La GGT è un ectoenzima appartenente alla classe delle trasferasi in quanto è in grado di catalizzare il trasferimento di un gruppo funzionale da una molecola donatrice ad un'altra molecola detta accettore che lo riceve. Il gene che la codifica, viene trascritto e tradotto inizialmente in un precursore a singola catena polipeptidica, viene poi successivamente processato autocataliticamente per formare le due subunità. Nel momento in cui l'enzima è attivo a livello cellulare, presenta una struttura formata da due subunità, sia negli animali che nelle piante. Le dimensioni delle subunità sono diverse per la GGT animale e vegetale. Nell'enzima animale le due subunità presentano diverse dimensioni, infatti 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). Studi in tabacco hanno evidenziato sovra esprimendo il gene *ggt1* (At4g39640) che presenta una subunità maggiore di 41kDa e una subunità minore di 29 kDa (Melinda N., et al, 2007).

Il sito catalitico interagisce con il substrato attraverso la formazione di un legame estero intermedio tra il gruppo γ -glutamminico e l'enzima.

Si ipotizza dallo studio delle analisi di sequenziamento, che la GGT sia un enzima fortemente glicosilato. Dal punto di vista biochimico è stato confermato che GGT di *Arabidopsis* è molto simile alla GGT di lievito, mammiferi ed altre piante (Storozhenko et al., 2002), ma il ruolo di questo enzima nelle piante deve ancora essere accertato. Nei mammiferi, questo enzima è fortemente attivo negli organi con funzione di secrezione o assorbimento ed è in grado di abbassare il quantitativo extracellulare di glutatione, comportandosi quindi come trasportatore di componenti amminoacidici nelle cellule. Nei tessuti animali, la GGT lavora riattivando e ridistribuendo il GSH e i suoi metaboliti coniugati, ma svolge anche la funzione di regolatore all'interno della cellula ed è una proteina promotrice la S-tiolazione (Corti et al., 2005). Infatti, la ricchezza dei dati per la GGT nei mammiferi indica che questo enzima svolge un ruolo chiave nella regolazione della disponibilità di GSH, nel bilancio redox, nella crescita della cellula e come farmaco per la prevenzione del cancro (Dominici et al., 1999; Whitfield, 2001).

1.2.1 γ -GT vegetale

In *Arabidopsis thaliana*, la GGT è rappresentata da una piccola famiglia genica costituita da quattro membri: GGT1 (At4g39640), GGT2 (At4g39650), GGT3 (At1g69820) e GGT4 (At4g29210). Gli enzimi codificati dai geni GGT1 e GGT2 sono enzimi apoplastici, il primo è associato alla parete cellulare mentre il secondo alla membrana plasmatica, come si osserva dai risultati di espressione svolti in mutanti knockout e transgenici portanti costrutti di fusione con il gene GUS (Ohkama-Ohtsu et al., 2007). I loro geni sono consecutivi e molto simili in sequenza aminoacidica (96% di identità), ciò fa ipotizzare che ci sia stato un evento di duplicazione durante l'evoluzione. Nonostante questa evidente similitudine, GGT1 viene espressa in radice, foglia, silique, e nei tessuti vascolari, principalmente nel floema, mentre GGT2 si esprime principalmente nelle silique, dove rappresenta circa il 50% di tutta l'attività gamma-glutammina transpeptidasi (Martin et al., 2007) 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. L'isoforma codificata dal gene GGT4, è stata localizzata nel vacuolo dove lavora insieme alla carbossipeptidasi per degradare i GSH-coniugati (Grzam et al., 2007). Il gene GGT3 si pensa sia un pseudogene perché è costituito da una breve sequenza, probabilmente derivata dalla porzione C-terminale codificata dal gene GGT1 o GGT2, ma su questo fatto pochi studi hanno dimostrato che è possibile la trascrizione ma solo a livelli molto limitati (Martin et al., 2007).

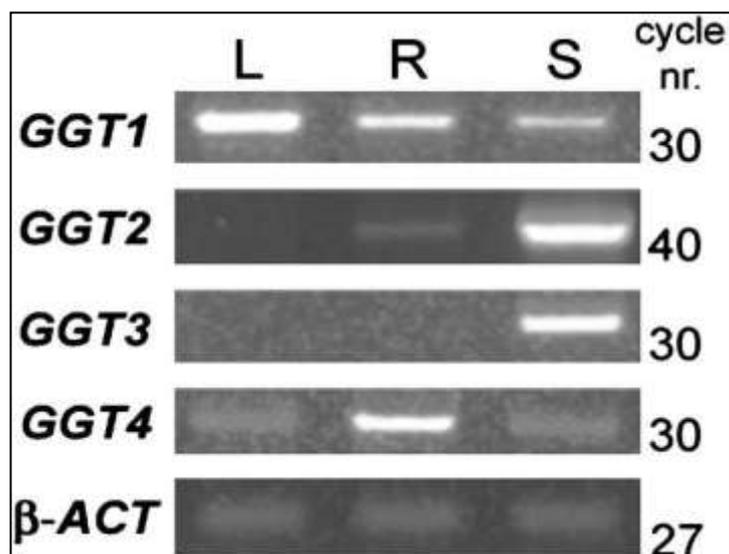


Figura 6. Analisi di espressione delle isoforme GGT in differenti tessuti (L, foglia; R, radice; S, silique) mediante PCR-semiquantitativa (Destro et al., 2010)

Altri studi suggeriscono la presenza di GGT e di peptidasi nel regno vegetale analoghi agli animale. Ad esempio in risposta allo stress foto-ossidativo da UV-B in foglie di mais (*Zea mays L.*) si dimostra un aumento del contenuto di Cys-Gly apparentemente risultante dalla degradazione del glutatione per azione della GGT (Masi et al 2002). La GGT oltre al recupero di GSH forma metaboliti secondari in alcune leguminose (Kean e Hare, 1980) e nella germinazione dove l'alta attività dell'enzima durante la germinazione potrebbe chiarire l'accumulo di trascritto GGT2 nei semi di *Arabidopsis* durante l'embriogenesi (Ohkama-Ohtsu et al., 2007a). Ad ogni modo le funzioni delle varie GGT apoplastiche sono numerose e legate alla specie, all'organo e allo stadio di sviluppo in cui sono espresse.

Nelle piante GGT è poco studiata e quindi il loro ruolo rimane ancora sottostimato, ma negli ultimi tempi ha suscitato molto interesse nel campo della ricerca.

1.2.2 Localizzazione cellulare

La GGT, nei mammiferi, è un enzima localizzato sulla membrana cellulare alla quale si ancora per mezzo di un dominio trans membrana N-terminale; nelle piante è localizzata anche nella parete cellulare e nel vacuolo. E' nel dominio extracitosolico che questo enzima svolge la sua azione attraverso una reazione di transpeptidazione che genera peptidi γ -glutamilici ; questi entrano nel ciclo del γ -glutamile che porta al recupero degli amminoacidi.

La localizzazione cellulare tramite analisi enzimo-istochimica suggerisce che i principali siti di attività della GGT sono i parenchimi dei fasci vascolari, gli apici radicali (Ferretti et al., 2008) e le cellule di guardia degli stomi e ciò coincide, come osservato in *Arabidopsis*, con la colorazione determinata dall'impiego di costrutti di fusione GGT:GUS (Martin et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007). Analisi

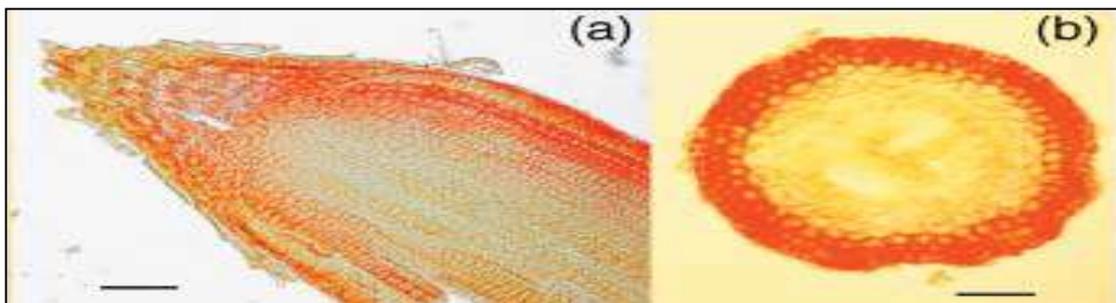


Figura 7. Analisi enzimo-istochimica dell'attività di gamma-glutamyl trasferasi in radici di orzo (*Hordeum vulgare*). (a) sezione longitudinale (b) sezione trasversale. (Ferretti., et al 2008)

immunocitochimiche hanno dimostrato che la parete cellulare risulta il maggior sito di localizzazione delle forme apoplastiche in radici, e ciò è stato dimostrato ulteriormente a livello del vacuolo concludendo che sia la parete che il vacuolo sono importanti siti di attività (Ferretti et al., 2009). La produzione di GSH da parte di organismi batterici e fungini nel terreno, potrebbe essere considerata la spiegazione dell'incremento di attività delle GGT apoplastiche all'apice radicale con funzione di assorbimento dello zolfo ambientale. La presenza dell'enzima a livello di fasci vascolari e parenchimi potrebbe suggerire un coinvolgimento dell'enzima nel trasporto di GSH come forma di zolfo ridotto attraverso questi elementi fino alle radici dove l'attività della GGT scompone il GSH nei suoi amminoacidi costituenti (Vernoux et al., 2000).

1.2.3 Il mutante knockout GGT1

Per poter analizzare in modo preciso la funzionalità di un gene vengono applicate analisi di reverse genetics, ovvero analisi in cui per verificare il ruolo e gli effetti prodotti dall'azione di un singolo gene si producono linee mutanti in cui il gene d'interesse viene spento (knockout). In tal modo l'organismo mutante non è più in grado di trascrivere il gene e si possono verificare gli effetti per confronto del organismo wild-type (WT) in cui sono presenti tutti i geni, compreso quello di interesse.

La linea mutante knockout *ggt1* di *Arabidopsis 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., 2010; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b).

I protoplasti di *Arabidopsis thaliana* di organismi mutanti k/o per il gene AtGGT1, non riescono a recuperare GSH dal mezzo di crescita (Ohkama-Otsu et al., 2007a), ma le piante di *Arabidopsis* prive dell'isoforma funzionale GGT1, che si pensava fosse l'unica GGT apoplastica espressa in radice, può sopravvivere se coltivata in una soluzione nutritiva integrata con GSH come unica fonte di zolfo (Martin et al., 2007). La capacità delle piante *ggt1* di crescere in terreni contenti GSH, insieme al fatto che i mutanti *ggt1* non evidenzino alcun fenotipo, ha portato ad assegnare a GGT1 un ruolo minore nel recupero di glutazione extracellulare. Inoltre, considerando una ridondanza funzionale presunta nei meccanismi di

recupero di GSH, si è concluso che la GGT è superflua, e si è sostenuto che altri meccanismi non correlati all'attività di GGT possono essere responsabili dell'assorbimento di GSH nei mutanti *ggt1*. Un successivo studio, tuttavia ha riscontrato in piante di orzo che recuperano il GSH da un mezzo esterno, che questa funzione è gravemente compromessa quando è stato aggiunto serina/borato per inibire l'attività di GGT (Ferretti et al., 2009), suggerendo che il recupero di GSH da un mezzo di coltura esterno si basa su attività GGT.

E' 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)

1.3 SEMI

Il seme nelle piante non rappresenta soltanto un organo di propagazione e dispersione. La quantità di proteine presenti nei semi varia da circa 10% nei cereali, a un 40% nei legumi della sostanza secca dei semi. All'interno del seme maturo troviamo uno o più gruppi di proteine (a seconda delle diverse varietà di pianta) presenti in abbondanza che servono come rifornimento di aminoacidi durante la germinazione e lo sviluppo. Queste proteine di riserva sono importanti perché a seconda della loro diversa composizione variano le proprietà qualitative del seme.

Per esempio, il basso contenuto di lisina, treonina e triptofano nei cereali e di cisteina e metionina nei legumi, comporta una scarsa proporzione di questi aminoacidi nelle proteine di riserva e provoca una limitata qualità nutrizionale di questi semi in animali monogastrici (Shewry et al. 1995)

1.3.1 Proteine di riserva

Le proteine di riserva dei semi sono il serbatoio che utilizzano i semi delle piante, nelle prime fasi della germinazione, quando sono necessarie nuove proteine ma la fotosintesi non è ancora attiva. Nonostante le proteine presentino un ampio numero di strutture, tutte le proteine di riserva possiedono delle proprietà in comune. In primo luogo, sono sintetizzate in alte concentrazioni in specifici tessuti e in determinate fasi di sviluppo. Infatti, la loro sintesi è regolata dalla nutrizione; agiscono come un fonte di azoto, e zolfo (cisteina e metionina). I

semi contengono gruppi diversi di proteine di riserva, alcune delle quali sono ricche in aminoacidi solfidrilici mentre altri sono poveri di questi. La presenza di diverse storage proteins può consentire alle piante di mantenere alti i livelli di sintesi proteica anche quando la disponibilità di zolfo non è elevata. (Shewry et al. 1995). La seconda proprietà in comune delle proteine di riserva nel seme maturo è la loro presenza in piccoli depositi chiamati corpi proteici, la cui origine è stata oggetto di alcune controversie e può infatti variare a seconda della specie. Infine, tutte le proteine di riserva sono miscele di componenti che presentano polimorfismo sia all'interno dei singoli genotipi e tra genotipi della stessa specie. Questo polimorfismo deriva dalla presenza di famiglie geniche, e in alcuni casi, dal processamento proteolitico e di glicosilazione.

Le proteine di riserva a causa della loro abbondanza e importanza economica, sono state tra le prime proteine ad essere caratterizzate e le proteine nei semi sono state divise in classi in base alla loro solubilità in diversi solventi. Nelle Angiosperme, con l'eccezione delle Graminacee, i semi contengono soprattutto globuline, albumine (Osborne, 1924; Danielsson, 1949; Derbyshire, Wright and Boulter, 1976) e prolamine. Le globuline sono insolubili in acqua ma solubili in soluzioni saline concentrate, considerando che le albumine sono solubili in acqua o in soluzioni saline diluite. Per molto tempo, le globuline sono state considerate proteine di riserva, e recentemente, le albumine sono state valutate come proteine metaboliche (Danielsson, 1956; Boulter and Derbyshire, 1971; Millerd, 1975; Aston, 1976; Youle and Huang, 1978a, 1979).

Le globuline sono state ampiamente caratterizzate, soprattutto dal punto di vista nutrizionale, in legumi e semi oleosi. Le globuline sono generalmente ad elevato peso molecolare con coefficienti di sedimentazione che vanno da 7 a 13S, queste proteine contengono elevate quantità di arginina, glutammina (e glutammato) e asparagina (e aspartato). Una tale composizione aminoacidica ad alto contenuto di azoto è importante poiché le globuline sono proteine di riserva che forniscono azoto per la germinazione. Le globuline inoltre, contengono una bassa quantità di aminoacidi contenenti zolfo, il che può essere un fattore limitante per il loro valore nutrizionale (Derbyshire et al., 1976).

In *Arabidopsis*, la proteina di riserva principale è la cruciferina, una globulina 12S che è sintetizzata come preproteina, per poi essere tagliata in un polipeptide di 30-35 kDa e un polipeptide di 21-25 kDa assemblati come esameri (C. Daniel Riggs, 2013).

Le albumine sono ampiamente distribuite in semi di dicotiledoni e sono state ampiamente studiate nelle Crucifere, in particolare in semi oleosi di colza (chiamati napins), girasole, senape, semi di lino, mandorla, lupino, arachide, cetrioli, noci del Brasile, nocciole, yucca, ricino, cotone e *Arabidopsis*. Le albumine presentano valori di sedimentazione 2S e

funzionano come proteine di riserva nella fase di germinazione del seme. La loro composizione aminoacidica è molto simile alle globuline dei rispettivi semi, ma presentano un alto contenuto di arginina, glutammina (Glutammato), asparagina (aspartato), e sono particolarmente ricche in cisteina (Richard J. Youle and Anthony H. C. Huang, 1981).

In *Arabidopsis thaliana*, sono state studiate le 2S albumine seed storage proteins per fornire un modello di targeting vacuolare e di elaborazione post-trascrizionale (Youle and Huang, 1981) e si è visto che in *Arabidopsis* le albumine sono codificate da una piccola famiglia genica costituita da 5 membri (Guerche et al., 1990; Van der Klei et al., 1993). Queste proteine sono sintetizzate come precursori di 18kD da cui derivano 21 aminoacidi che costituiscono altri tre pre-peptidi che vengono rimossi durante la maturazione della proteina. La proteina matura è composta da due subunità non glicosilate di 3- e 9- kDa collegate tra loro da due ponti disolfuro (Krebbers et al., 1988).

1.3.2 GSH nei semi

Durante lo sviluppo del seme, il GSH interviene in tutti i processi di sviluppo, dalla divisione cellulare dei semi in formazione fino all'essiccazione variando il suo contenuto in base allo stadio di differenziazione.

1.3.3 Funzione antiossidante

I semi come anche altri tessuti che costituiscono la pianta producono ROS. In particolare nel primo stadio di germinazione, durante la respirazione e durante l'essiccazione. Per difendere i tessuti dalle elevate concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno, il seme produce molecole antiossidanti come GSH, ascorbato e tocoferoli, oltre a produrre enzimi come dismutasi, catalasi e perossidasi (Noctor et al., 1988; Noctor and Foyer 1998).

Durante la maturazione, il seme, per contrastare i danni provocati dalla normale disidratazione accumula proteine LEA (*late embryogenesis abundant*), zuccheri non riducenti e sistemi antiossidanti che prevengono l'instaurarsi di processi ossidativi a carico di strutture cellulari.

Durante l'essiccazione del grano, si ha una ossidazione del glutatione, fattore che evidenzia il più alto rapporto tra GSH e GSSG (De Gara et al., 2003). Inoltre, nel grano l'aumento del numero di gruppi proteici-SH era osservato nei primi 21 giorni della maturazione, ma

diminuiva dopo il 28°giorno. La formazione di ponti disolfuro suggerisce che il GSH partecipa allo stato redox del seme agendo come protezione contro lo stress ossidativo. La modificazione dei gruppi sulfidrilici a ponti disolfuro può spiegare la diminuzione di gruppi-SH proteici. Inoltre, suggerisce che lo stato redox del GSH, insieme all'ascorbato, partecipano al ripiegamento delle proteine e alla protezione contro lo stress ossidativo (Hwang et al., 1992; De Gara et al., 2003). Infatti, la sensibilità all'essiccamento di semi di specie vegetali recalcitranti, ovvero i cui semi rimangono vitali per poco tempo, sembra essere correlata all'incapacità di reprimere i ROS durante il metabolismo causando seri danni ossidativi. Altre prove dell'attività antiossidante del glutatione è legata ai disolfidi misti del GSH (PSSG) caratterizzati per accumularsi nel tessuto essiccato suggerendo una protezione dipendente dal GSH dei gruppi tiolici tramite formazione di legami disolfuro intermolecolari (Kranter and Grill 1966; Noctor et al., 2002; De Gara et al., 2003).

La glutationalizzazione, cioè l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici dei disolfidi misti, avviene con la reazione di molecole di GSSG con gruppi tiolici liberi di proteine, dando così origine ad un complesso glutatione-proteina e una molecola di GSH (Kranter an Grill, 1996; Noctor et al., 2002; De Gara et al., 2003).

Il glutatione ossidato (GSSG) non soltanto modula la tiolazione, ma anche la sintesi proteica. Infatti l'applicazione esogena di GSH influiva sulla composizione delle proteine immagazzinate nei semi di soia (Awazuhara et al., 2002).

In semi di fagiolo, lo stato tollerante all'essiccazione era accompagnato da un'altra attività delle GR e catalasi. L'attività delle GR solitamente rimaneva costante nei primi stadi poi improvvisamente diminuiva durante l'essiccazione in semi di *Triticum durum* (De Gara et al., 2003).

Lo stoccaggio prolungato di norma riduce la germinabilità delle sementi, anche se il tasso di deterioramento varia tra specie. Il danneggiamento in semi invecchiati è stato a lungo associato con i danni dello stress ossidativo. Queste reazioni includono radicali ossidanti, enzimi deidrogenasi e reazioni di Maillard (Bernal-lugo and Leopold, 1998). I radicali ossidanti possono riflettere il tasso di perossidazione lipidica, accumulazione di acqua ossigenata e i livelli di GSH nei semi vecchi. Sia nell'invecchiamento naturale che artificiale dei semi di cotone, la malondialdeide (MDA), un prodotto della perossidazione lipidica, e i livelli totali di perossidi aumentano di tre volte nei diciotto mesi di stoccaggio (Goel et al., 2003; Goel and Sheoran) con una contemporanea perdita di GSH. In girasole era associato anche un aumento di GSSG (De Paula et al., 1996), come in semi di pomodoro (De Vos et al., 1994). Tuttavia, il contenuto di GSH è variabile durante lo stoccaggio dei semi e dipende dalle condizioni ambientali e dalla durata, ad esempio semi di *Azadirachta indica* se stoccato a 32% di umidità

relativa rimanevano stabili nei livelli di GSH dopo 24 settimane, mentre l'invecchiamento accelerato si verificava ad alta umidità relativa e temperatura (Mc Donald, 1999)

L'attività di enzimi antiossidanti come perossidasi, catalasi, ascorbato perossidasi, GR e superossido dismutasi sono stati ampiamente esaminati nell'invecchiamento ed è stato evidenziato una diminuzione di germinabilità in semi immagazzinati, correlata con la diminuzione dell'attività di questi enzimi (Goel et al., 2003; Goel and Sheoran, 2003). Ad esempio il declino dell'attività GR durante l'invecchiamento era osservata in semi di pomodoro (De Vos et al., 2004), girasole (De Paula et al., 1996) e cotone (Goel et al., 2003; Goel and Sheoran, 2003). Il risultante calo di attività di questi enzimi era correlata con un declino del vigore del seme.

Durante l'assorbimento di acqua che avviene nel periodo di germinazione, si instaurano metabolismi aerobi. Nelle prime ore di imbibizione, gli antiossidanti (GSH, ascorbato, tocoferoli) sono rapidamente accumulati nei semi (Simontacci et al., 2003). In semi secchi di *Pinus picea* i livelli di ascorbato ridotto precedentemente non rilevabili, aumentavano per riattivazione della sintesi nelle prime 24 ore di imbibizione. Mentre l'incremento dei livelli di GSH era per lo più dovuto al riciclo del GSSG (Tommasi et al., 2001).

In semi di pisello, il livello di glutatione aumentava in modo significativo da 3 a 12 ore di imbibizione per poi ritornare al livello iniziale (Kranner and Grill, 1993). I livelli di GSH in embrioni di grano diminuivano durante le prime 2 ore di imbibizione, mentre GSSG e PSSG diminuivano nei primi 10 minuti dall'imbibizione. Nonostante è evidente che anche i ROS partecipano all'induzione della germinazione come dimostrato da diversi esperimenti che attraversano applicazioni esogene di H₂O₂ inducevano la protusione della radichetta (Fontaine et al., 1994). Il trattamento era accompagnato da un incremento dei livelli di GSH (Fontaine et al., 1994).

1.3.4 Delivery di cisteina

I semi, durante lo sviluppo, assorbono zolfo ossidato e ridotto e in essi avviene la riduzione del solfato (Sexton e Shibles, 1999) nei bacelli di soia (*Glicine max*).

L'assimilazione dello zolfo dai tessuti materni può essere influenzata direttamente dalla fornitura e dal metabolismo dei composti solforati, come ad esempio, nello sviluppo dell'endosperma di frumento (*Triticum aestivu*; Fitzgerald et al., 2001). L'esigenza di zolfo da parte del seme è soddisfatta tramite solfato oppure sotto forma di composti floematici ridotti

come GSH (Rennenberg, 1982; Herschbach et al., 2000) e S-methylmethionine (Bourgis et al., 1999).

I semi in stadio di sviluppo richiedono una grande quantità di zolfo ridotto per la sintesi di proteine strutturali, metaboliche di riserva. L'assimilazione dello zolfo ha inizio dalla solfato inorganico ed avviene prevalentemente all'interno dei cloroplasti utilizzando il potere riducente generato con la fotosintesi (Leustek et al., 2000). È stato dimostrato che i tessuti di grano hanno la capacità di assimilare solfato (Fitzgerald et al., 2001) inoltre, in lupino, attraverso l'attività di enzimi coinvolti nell'assunzione del solfato (Tabé e Droux, 2001) si è dedotto che l'assimilazione di zolfo all'interno dei cotiledoni in formazione, potrebbe contribuire in modo significativo all'accumulo di zolfo organico nelle riserve del seme. In soia la somministrazione di GSH a cotiledoni immaturi provoca un aumento di proteine di riserva mentre la somministrazione della cisteina non dà lo stesso effetto (Awazuhara et al., 2002).

Nell'endosperma di grano il solfato rappresenta la forma più presente, mentre altri composti come il GSH risultano in quantità inferiore (Fitzgerald et al., 2001). La spiegazione che i semi contengono zolfo ridotto sotto forma di GSH è supportata dalla rilevazione di alte concentrazioni di glutatione nei tessuti floematici di riso (*Oryza sativa*; Kuzuhara et al., 2000). Questi risultati suggeriscono un ruolo chiave come metabolita trasportatore di zolfo ridotto al seme.

Nell'endosperma di frumento, il GSH è metabolizzato nei singoli aminoacidi costituenti, necessari per la sintesi di proteine di riserva (Anderson e Fitzgerald, 2001). Nei semi, il GSH viene rapidamente catabolizzato per fornire cisteina libera necessaria per la sintesi delle proteine di riserva (Fitzgerald et al., 2001).

In *Arabidopsis*, il primo stadio di sviluppo dell'endosperma è un sincizio, poi cellularizza ed infine l'embrione in crescita raggiunge lo stadio cuore (Berger, 2003). Durante la fase sinciziale, l'endosperma manca di vacuoli e ciò potrebbe spiegare la carenza della via di detossificazione GSH-dipendente nei primi stadi di sviluppo dell'endosperma, che come risultato porta normalmente al sequestro dei coniugati con GSH nel vacuolo.

Utilizzando un approccio non invasivo basato sulla localizzazione floematica del GSH con traccianti fluorescenti, è stato dimostrato che nei semi di *Arabidopsis* esiste il trasporto di glutatione tra il floema e l'embrione (Stadler et al., 2005). Il caricamento di GSH nell'embrione richiederebbe, così, efficienti sistemi di trasporto, ed è stato suggerito che potrebbero essere coinvolti alcuni membri della famiglia dei oligopeptidi trasportatori (Cagnac et al., 2004). Inoltre, il glutatione viene traslocato dal germoglio alla radice attraverso il floema, agendo come repressore dell'assorbimento di solfato nelle radici (Lappartient and Touraine, 1997; Lappartient et al., 1999).

2 OBIETTIVO

Da un'analisi proteomica precedente condotta nel laboratorio di fisiologia vegetale (DAFNAE), tramite tecnica iTRAQ, era emersa nei semi di *Arabidopsis thaliana* WT, *ggt1*- e *L3*, una diversa quantità di proteine di riserva (albumina 2S e cruciferina). In particolare, il mutante *L3* (ottenuto tramite RNAi) evidenzia una marcata diminuzione di proteine di riserva rispetto sia al wild-type che al mutante singolo *knockout ggt1*. Da ciò è scaturita l'ipotesi che il silenziamento di entrambi i geni *ggt1* e *ggt2* comporti un ridotto rilascio di cisteina al seme e conseguentemente una ridotta capacità di sintesi delle proteine di riserva. Questa ipotesi implica che il GSH, naturale substrato delle GGT, sia traslocato dalle foglie ai semi e lì utilizzato. Questo è in effetti noto e dimostrato in letteratura (Anderson JW et al., 2001).

Scopo della tesi è quindi verificare se l'attività GGTasica condiziona il rifornimento di cisteina al seme; per fare questo, siamo andati a caratterizzare linee mutanti a ridotta espressione dei geni *ggt*, ottenute presso il laboratorio in cui è stata svolta la tesi, allo scopo di determinare il quantitativo proteico, l'attività dell'enzima GGT per via spettrofotometrica, e il suo livello di espressione tramite western blot. Infine siamo andati a determinare la quantità di proteine di riserva tramite elettroforesi monodimensionale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato riguarda esclusivamente semi ottenuti mediante allevamento in serra di diverse linee di *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Brassicaceae. E' considerata un organismo modello poiché presenta una serie di caratteristiche vantaggiose per processi di analisi e ricerca nel campo della genetica, della biologia molecolare, cellulare e vegetale. Infatti, *Arabidopsis thaliana* possiede un genoma di dimensioni ridotte facilmente manipolabile e veloce da sequenziare. Nel 2001 il suo genoma è stato completamente sequenziato. Inoltre, è considerata una pianta modello in quanto il suo ciclo di vita è di circa sei settimane, questo permette di accelerare i tempi per tutti i tipi di ricerca. In fine anche le dimensioni sono atte per stare in laboratorio.

Nelle analisi eseguite è stato utilizzato soltanto il seme di varie linee di *Arabidopsis*. Come reference o pianta controllo è stato utilizzata *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo *Columbia 0*, che da ora in poi, per facilitare la lettura verrà citata come WT; Inoltre, abbiamo utilizzato linee mutanti *knockout ggt1* (polimorfismo SALK_004694) e *ggt2* di *A. thaliana* ecotipo 0 (Alonso *et al.*, 2003), derivanti 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*.

Le isoforme *ggt1* e *ggt2* si trovano entrambi nel cromosoma 4 di *At* e sono due geni adiacenti, per tale motivo la possibilità di un *crossing over* è quasi nulla. Per cercare di ottenere il doppio mutante sono state create delle linee F1, trasformate con T-Dna (*L1*, *L2*, *L3* e *L4*) ottenute e già prodotte nel laboratorio del dipartimento DAFNAE.

In particolare, *L2*, *L4*, sono state trasformate con T-DNA a partire dalla pianta controllo *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo *Columbia 0*, mentre le linee *L1* ed *L3*, sono state trasformate con T-DNA a partire dal mutante singolo *knockout ggt1* di *A. thaliana* ecotipo 0 (Alonso *et al.*, 2003), derivanti dalla collezione di mutanti del NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, <http://nasc.nott.ac.uk/>).

Clonaggio del costrutto interferenza per la trasformazione delle linee

L1, L2, L3 e L4.

La sequenza target per l'induzione di RNAi in *Arabidopsis t.* è stata amplificata e clonata nel vettore di destinazione "hairpin RNA-expressing pwatergate" (CSIRO Plant industry) usando il

sistema gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Un frammento del Gene GGT2 di 363 bp (dal nucleotide 104 al 467) è stato amplificato usando una coppia di primer contenenti siti di ricombinazione AttB1 e AttB2 nell'estremità 5' rispettivamente. La sequenza utilizzata è stata scelta in quanto altamente omologa al frammento corrispondente del gene GGT1. Ciò dovrebbe così permettere, nelle linee trasformate, di sottoesprimere entrambi i geni. La concentrazione del template era 200 ng mentre quella dei primer 10 pmol.

Primer Forward:

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAAACGCTAACGCTGTGA 3'

Primer Reverse:

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGCCGTGTATAGACCCGC 3'

L'amplificazione è avvenuta in 3 step:

1° step - Iniziale denaturazione a 95°C per 2 minuti, 15 secondi a 94°C, 30 secondi a 60°C, 45 secondi a 68°C per 10 cicli; 10ul di questo prodotto PCR viene trasferito nei 40 ul della miscela PCR contenente 40 pmol di ciascun primer attB1 e attB2.

2° step - Iniziale denaturazione di 1 minuto a 95°C, 15 secondi a 94°C, 30 secondi a 45°C, 45 secondi a 68°C per 5 cicli.

3° step - Lo stesso mix di PCR è inoltre corso per 20 cicli con un diverso profilo di temperatura. Denaturazione iniziale 1 minuto a 95°C, 15 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C, 45 secondi a 68°C per 20 cicli.

L'amplificato ottenuto è stato prima clonato nel vettore donatore pDONR221 (Invitrogen™) per creare un clone entry, quindi la specifica sequenza genica è stata trasferita al vettore binario T-DNA pWatergate mediante enzimi LR clonasi (Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix , Invitrogen™). Infine il costrutto ricombinato pWG-GGT è stato introdotto in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pMP90), con metodo di congelamento-scongelo.

Una volta ottenuti i batteri le piante sane di *Arabidopsis t.* ecotipo Columbia 0, nella fase fenologica di fioritura, sono state immerse nella sospensione cellulare di *Agrobacterium tumefaciens* contenente il plasmide PWG-GGT per 10 minuti sotto vuoto a 40 kPa. L'inserzioni di T-DNA nelle piante resistenti alla kanamicina sono state verificate mediante l'amplificazione PCR del DNA genomico.

3.2.1 Analisi proteomica

L'analisi proteomica consiste nello studio della struttura, funzione, attività, interazioni e modifiche post-traduzionali delle proteine nelle cellule e permette in particolare di confrontare pattern di espressione proteici di campioni biologici differenti (ad es. controllo vs. trattato, sano vs. ammalato, diversi compartimenti cellulare, etc.). Il proteoma è l'insieme delle proteine espresse dal genoma di un organismo e differisce tra varie cellule poiché è in continua evoluzione nelle sue interazioni con il genoma e con l'ambiente. Di fatto, un organismo ha espressioni proteiche radicalmente diverse in base alla fase del ciclo vitale, alle condizioni ambientali presenti e dal comparto cellulare in cui si trova. Ecco che la proteomica ci aiuta giacché è lo studio del proteoma che ha lo scopo di identificare quante e quali proteine sono espresse in determinate condizioni ma non solo perché, ha lo scopo di caratterizzare lo stato di un organismo, un tessuto, una cellula in determinate condizioni, sulla base del pattern di espressione proteica mediante il confronto di almeno due campioni biologici sufficientemente simili per permettere l'identificazione di una diagnostica.

Al fine di rendere l'analisi affidabile, riproducibile e informativa è estremamente necessario che alcuni accorgimenti vengano rispettati:

- I campioni devono essere sufficientemente simili e differire possibilmente soltanto per la variabile biologica di nostro interesse.
- Eseguire più repliche biologiche per diminuire l'errore che si ottiene per la presenza di altre variabili biologiche nel campione, della tecnica utilizzata e dell'operatore che esegue l'analisi.

Tutto questo permette di ottenere risultati facili da confrontare.

3.2.2 Estrazione con esano e purificazione delle proteine da semi di *Arabidopsis*

Questa fase iniziale consiste nell'estrarre le proteine dal loro sistema biologico denaturandole e conservandole in soluzioni senza alterarne alcuna proprietà fisico-chimico fondamentale perché queste saranno sfruttate in un secondo momento dalle tecniche che verranno applicate in base allo scopo dell'analisi. La fase di estrazione è stata svolta con tre repliche biologiche dei sette genotipi di *A. thaliana* (*WT*, *ggt1*, *ggt2*, *L1*, *L2*, *L3*, *L4*). Sono stati pesati 5 mg di semi in tre repliche per ogni genotipo. Ogni eppendorf preparata è stata passata in azoto liquido e in seguito sono state estratte le proteine mediante macinazione meccanica con biglia di acciaio

nell'apposito mulino sbattitore (Tissue Lyser2 QIAGEN) per 1 minuto a 30Hz/sec. Ogni ciclo di macinazione era seguito da un lavaggio in esano. Lo step in esano è di vitale importanza per la rimozione dei grassi, soprattutto nei semi, i quali in modo particolare, contengono lipidi come riserva di energia. Dopo il lavaggio segue la centrifugazione a 10000 rpm per tre minuti. Questi passaggi sono stati ripetuti per tre volte al fine di purificare l'estratto di proteine. Il pellet così ottenuto è lasciato seccare sotto cappa, successivamente risospeso in 150 µl di tampone fostato-SDS (Fosfato 50 mM pH 7.0, SDS 0.1%) e vortexato allo scopo di solubilizzare e saggiare con acido bicinconinico.

Inoltre, è importante separare le proteine da vari detriti cellulari, oltre ad impedire che si associno tra loro o precipitino. La purificazione di una proteina costituisce un passaggio essenziale e per mantenere queste accortezze è importante evitare la degradazione proteica. Per farlo vanno utilizzate condizioni poco aggressive nei confronti dell'estratto e degli inibitori di proteasi, è importante prevenire alterazioni delle proprietà chimico-fisiche usando detergenti non carichi per non alterare la carica intrinseca, è necessario standardizzare il più possibile le procedure sperimentali e cercare di mantenere il giusto rapporto peso proteina/buffer tra campioni diversi.

3.2.3 Quantificazione concentrazione totale delle proteine con BCA

Procedere con una stima della concentrazione totale delle proteine è importante in quanto ci permette di portare ogni campione a pari concentrazione rendendoli quantitativamente confrontabili tra loro.

Il processo di quantificazione è possibile farlo eseguendo varie metodiche come il metodo di Bradford o il saggio con Acido Bicinconinico (BCA) le quali sfruttano reazioni colorimetriche che permettono di ricavare la concentrazione proteica dai valori di assorbanza misurati con lo spettrofotometro a lunghezza d'onda prestabilita secondo il tipo di proteina che s'intende evidenziare. Il saggio dell'acido Bicinconinico (BCA) (Smith *et al.*,1985) è un metodo usato per determinare, in modo sensibile e preciso, la concentrazione proteica in una soluzione d'interesse, può infatti rilevare quantità di proteina inferiori a 0.5ug/ml.

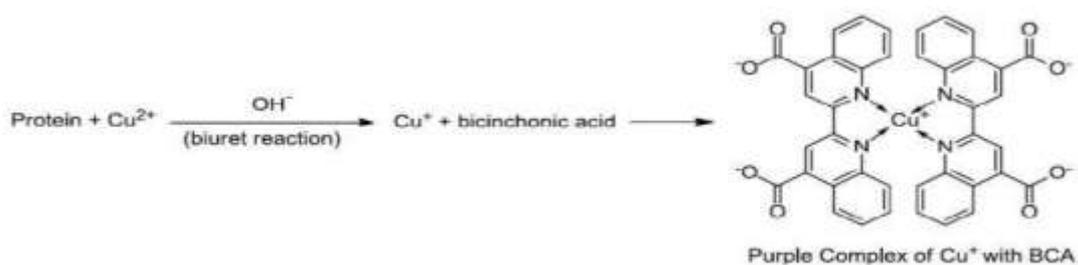


Figura 8. Struttura di conformazione BCA e rame

L'acido bicinconinico è un reagente altamente sensibile, stabile e specifico per il rame. Infatti, in condizioni alcaline gli ioni rame Cu^{2+} formano un complesso con i legami peptidici della proteina e vengono ridotti a Cu^+ , successivamente due molecole di BCA chelano uno ione Cu^+ formando con esso un composto color porpora la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteina presente. L'intensità è determinata mediante misure di assorbanza a λ 562 nm. Il valore della concentrazione è quindi determinato da una retta di taratura costruita utilizzando campioni a concentrazione nota di albumina di siero bovino (BSA). Per la taratura sono stati necessari sette punti di concentrazione (0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 μ l) di BSA (1 mg/ml) con l'aggiunta di acqua deionizzata e tampone fostato-SDS. Per il saggio sono stati aggiunti 2 ml di reattivo BCA (Bicinchoninic Acid Solution e solfato di rame solution) alle soluzioni di taratura e alle soluzioni campione (5 μ l estratto, 45 μ l di tampone fosfato e 50 μ l di acqua deionizzata). La lettura è stata svolta allo spettrofotometro a λ 562 nm.

3.2.4 SDS-PAGE-Tricina

Questa tecnica permette di separare in modo relativamente veloce frammenti di DNA e proteine. L'elettroforesi consiste nel fare polimerizzare un gel, generalmente di poliacrilammide, per le proteine e di agarosio per grossi frammenti di DNA. Questi gel si caratterizzano per la concentrazione di agarosio o acrilamide giacché più elevata sarà la concentrazione, più il gel avrà delle maglie strette che consentiranno la separazione di proteine o frammenti di DNA di diverse dimensioni. Pertanto maglie piccole saranno adatte per separare piccole molecole e viceversa, gel con maglie grandi separeranno molecole di maggiori dimensioni.

Il gel può essere preparato direttamente dall'operatore o acquistato sotto forma di gel precast e in seguito è inserito in una vaschetta ripiena di Buffer salino al quale è applicato un campo elettrico. Come abbiamo appena detto, i gel svolgono la funzione di setacci molecolari poiché

proteine o frammenti di DNA, sono separate in base alla loro dimensione e velocità di migrazione che varia secondo il potenziale elettrico applicato. Nel caso specifico delle proteine la velocità di migrazione equivale al rapporto tra mobilità elettroforetica che dipende dunque, dalla carica, forma e dimensione delle molecole, viscosità, dimensione dei pori del gel utilizzato, pH e forza ionica del tampone di corsa e temperatura del mezzo per l'intensità del campo elettrico (V/cm).

Il gel utilizzato per separare le proteine è costituito da due fasi, uno Stacking gel (4% T, 3% C) e Separating gel (16.5% T, 3% C).

Lo stacking gel, è la parte superiore del gel e la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza. Questo gel è costituito da un gel buffer (3M tris, 0.3% SDS pH 8.45), acrilammide e metilenbisacrilammide, glicerolo, APS 10%, acqua e TEMED. Il Separating gel, è la parte inferiore e la sua funzione è di separare le proteine dei vari campioni sulla base del loro peso molecolare. È composto dagli stessi elementi dello *stacking gel*, ma in quantità diverse. In particolare è la concentrazione di acrilammide a variare, secondo la porosità desiderata: concentrazioni maggiori portano a pori di dimensioni minori, dunque capaci di separare le proteine con una risoluzione maggiore. Ciò che permette l'allineamento delle proteine e la successiva corsa è dato dall'aggiunta di SDS, un detergente anionico caricato negativamente che lega le proteine e le carica negativamente permettendo loro di migrare verso il polo positivo, separandosi nel Separating gel, nel momento in cui verrà applicato un campo elettrico.

	Running gel (16,5% T, 3% C)	Stacking gel (4% T, 3% C)
Acqua dist.	0.1 ml	1.9 ml
Glicerolo	1.0 g	/
Acril/Bisacril (30% T, 3% C)	4.1 ml	0.42 ml
Gel buffer	2.5 ml	0.775 ml
APS 10%	20 µl	20 µl
Temed	4 µl	4 µl

GEL BUFFER (3M tris, 0.3% SDS pH 8.45)

Tabella 1. Costituenti gel tris-tricina

Prima di utilizzare il gel tricina, sono stati prodotti gel monodimensionali 11% acrilamide-bis-acrilamide per separare le proteine aventi pesi molecolari compresi tra 210 kDa e 8 kDa ma, una volta sviluppati si è visto che non erano presenti differenze importanti tra le linee. Inoltre, l'analisi densitometrica, ovvero l'acquisizione percentuale delle diverse bande nei genotipi, non ha permesso di valutare l'espressione delle proteine a basso peso molecolare in quanto la separazione di queste ultime non erano ben distinte. Pertanto, per la separazione elettroforetica delle proteine è stato utilizzato il gel SDS-PAGE-TRICINA. Questo è un gel monodimensionale che permette di separare proteine di massa superiore a 10 kDa.

Per questo motivo, è stata eseguita una prova di gel tricina caricando estratto proteico di *Arabidopsis thaliana* WT e *ggt1* in diverse quantità (10-15-20 µl) allo scopo di selezionare mediante un'analisi visiva, le quantità più significative di proteine di riserva in base al quantitativo caricato.

Una volta scelto il quantitativo proteico da caricare sono stati prelevati 40µl di estratto conservato a -80°C per ogni genotipo e di una replica alla volta. Ogni campione è stato risospeso con 20µl di Laemmli concentrato a 37°C, sottoposto a 100°C per tre minuti e poi inseriti in ghiaccio. Nei pozzetti sono stati caricati 20 µl di campione trattato per avere ~160µg di proteine per lane, 4µl di marker Apritinin di peso molecolare 6,5 kDa insieme a 4µl di marker Citocromo C di peso molecolare 12,4 kDa in precedenza diluiti in Laemmli e 4 µl di blu di bromofenolo. Il gel è stato caricato con Catodo Buffer (Tris 0.1M, SDS 0.1%, tricina 0.1M pH 8.25) all'interno mentre esternamente è stato utilizzato Anodo Buffer (0.2 tris pH 8.9). La corsa è stata inizialmente impostata a 20 mA per permettere la corretta uscita dallo stacking gel e poi condotta a 30 mA per circa 5 ore.

3.2.4.1 Colorazione gel con blu di Coomassie brilliant

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è immerso in una vaschetta contenente Blu di Coomassie, un colorante a base di trifenilmetano che lega soltanto le proteine. Dopo aver colorato le proteine, si eluisce il colore in eccesso con un solvente detto Destaining solution (acqua deionizzata, 100 ml etanolo e 150 ml Acido Acetico) over night. Questo passaggio permette di osservare diverse bande, dove ogni una delle quali corrisponderà ad una o più proteine con uno specifico peso molecolare.

3.2.4.2 Colorazione gel tricina con Silver staining

La colorazione all'argento è una tecnica molto potente e sensibile per visualizzare con precisione anche bassissime quantità di proteina all'interno di un gel, che si basa sulla precipitazione di sali d'argento in ambiente basico.

Il protocollo di silver staining di proteine prevede una prima fase di disidratazione. In questa fase il gel è posto all'interno di una vaschetta contenente una prima soluzione di disidratazione (etanolo 50%, acido acetico 10%) e messa in agitazione leggera per trenta minuti. Successivamente viene disidratato in una seconda soluzione (etanolo 5%, acido acetico 1%) e messo in agitazione per 15 minuti. In seguito sono stati fatti tre lavaggi in acqua, ogni uno per cinque minuti. Poi il gel è incubato per novanta secondi in solvente tiosolfato di sodio (0.2 g/l, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e nuovamente risciacquato per tre volte in acqua. Nelle fasi successive si applica l'argento e si lascia incubare per trenta minuti coprendo la vaschetta per impedire l'ingresso della luce. In fine il gel s'immerge nella soluzione di sviluppo (Na_2CO_3 , formaldeide e solvente tiosolfato) e si fa reagire per dieci minuti.

3.2.4.3 Densitometria

In fase finale, allo scopo di poter effettuare una diagnosi sulle proteine separate, il gel colorato viene scannerizzato. Si ottiene un'immagine sulla quale è applicata la Densitometria delle bande. La densitometria rileva l'ammontare di proteine colorate e quantifica i risultati in termini di densità ottica permettendoci di confrontare quantitativamente le proteine presenti nei vari campioni caricati nella corsa elettroforetica. I gel sono stati acquisiti con la macchina fotografica BIORAD Molecular imager[®] (ChemiDOCTM XRS+) e analizzati con Image LabTM Software per calcolare la densitometria delle bande.

3.2.5 Saggio di attività enzimatica

Il saggio di attività enzimatica permette di valutare la velocità delle reazioni catalizzate da enzimi e da fattori che possono influenzarla misurando la variazione in funzione del tempo.

Gli enzimi agiscono formando complessi fisici con i loro substrati specifici. In questo caso la GGT favorisce il trasferimento del gruppo glutamile alla glicilglicina dando origine così alla L- γ -glutamil-glicil-glicina e 4-nitroanilina. La formazione dei due complessi è proporzionale all'attività dell'enzima e misurata mediante tecnica spettrofotometrica a lunghezza d'onda di 407 nm. Il

metodo si basa sulla misurazione di cambiamenti di assorbimento del campione associato al tempo e alla velocità di scomparsa del substrato. Seguendo la variazione di assorbimento a una determinata lunghezza d'onda è possibile monitorare la degradazione dell'enzima presente all'interno della soluzione A (L- γ -glutamyl-4-nitroanilide 4.6 mM, Tris-HCl pH 8.0, MgCl₂ 10 mM).

I dosaggi enzimatici sono saggi di attività su campioni che contengono quantità sconosciute di un enzima in particolare. Questo implica che le velocità misurate riflettono la concentrazione dell'enzima attivo.

Questa tipologia di saggio è eseguibile a temperatura ambiente, a pH, forza ionica e concentrazione di Sali fissi. Pertanto il dosaggio è fatto con l'enzima che reagisce a velocità massima. Questo consente, una sensibilità elevata e riduce l'errore di misura.

L'attività misurata pertanto è direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima nella reazione, che considera la diluizione, nel campione iniziale. Di norma, si esprime la concentrazione dell'enzima in termini di unità di attività per unità di volume.

Questo metodo spettrofotometrico presenta vantaggi nell'esecuzione poiché è veloce ed economico.

3.2.5.1 Estrazione

Il saggio di attività enzimatica è stato eseguito utilizzando semi di tutti e sette i genotipi (WT, GGT1, GGT2, L1, L2, L3, L4) macinati meccanicamente mediante l'utilizzo del mulino sbattitore (vedi paragrafo). A pellet asciutto è stato aggiunto un Tampone di Estrazione (Tris-HCl 40 mM pH 8.8, Triton 3%, Inibitori di proteasi, NaCl 1M), precisamente 600 μ l per eppendorf e lasciato reagire per due ore a temperatura ambiente in agitazione leggera. Poi è stata applicata una centrifuga a 4°C 10000rpm per dieci minuti che ci ha permesso di prelevare il surnatante da utilizzare per leggere l'attività enzimatica e quantificare.

3.2.5.2 Saggio spettrofotometrico

Il saggio è stato condotto utilizzando lo spettrofotometro impostato per compiere una lettura a 407 nm per determinare la variazione lineare della reazione enzima-substrato in sessantacinque minuti di tempo totale. A questo scopo sono state preparate due soluzioni diverse. Una Soluzione A contenente Tris-HCl, L- γ -glutamyl-4-nitroanilide 4.6 mM, MgCl₂ 100 mM, pH 8 e una soluzione B costituita da glicin-glicina 575 mM sciolta in H₂O, NaOH 1M, pH 8.

Quindi, le cuvette sono state riempite con 1 ml di soluzione A, 100 µl di soluzione B e 100 µl di estratto. A questo punto l'assorbanza è stata rilevata a intervalli regolari di cinque minuti per sessantacinque minuti totali ad una lunghezza d'onda pari a 407 nm.

I dati sono stati analizzati secondo la formula:

$$U/gpf = Abs/min * (2000*103/7400) * V_{fin}/V_{estr}$$

Dove:

U = nmoli/min;

1000 = diluizione iniziale del campione con il tampone di estrazione;

103 = fattore di conversione da µmoli a nmoli;

7400^{\wedge} = ε (assorbimento di una mol/l di 4-nitroanilina a 407 nm);

V_{fin} = Volume finale in cuvetta;

V_{estr} = Volume estratto (100 µl);

3.2.6 Western blot con semy-dry system

E' una tecnica che permette di identificare una determinata proteina sfruttando il riconoscimento specifico da parte di un anticorpo. In questa tipologia di analisi le proteine sono separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e poi trasferite su un supporto che può essere una membrana di nitrocellulosa o un filtro. In seguito una specifica proteina è identificata mediante la sua reazione specifica con un anticorpo. Infatti, utilizza un anticorpo primario specifico per legare la proteina d'interesse e un anticorpo secondario in grado di legare in modo specifico l'anticorpo primario.

Gli anticorpi o immunoglobuline (Ig) sono proteine a forma di Y costituiti da quattro catene glicoproteiche. Questi si caratterizzano per possedere una regione variabile contenente il sito di combinazione con l'antigene che varia a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene.

3.2.6.1 Estrazione

Il western blot si sviluppa in più fasi. In questo caso l'estrazione è stata eseguita mediante macinazione meccanica di 5mg di semi dei genotipi WT, GGT1, GGT2, L1, L2, L3, L4. Inizialmente le proteine sono separate in base alle loro dimensioni su un gel di poliacrilammide mediante elettroforesi. La SDS-PAGE mantiene i polipeptidi denaturati una volta trattati con agenti

riducenti forti e quindi permette la migrazione delle proteine verso l'elettrodo positivo. Pertanto il surnatante è stato, risospeso in Leammli 3x (Mercatoetanolo 5%, Tris-HCl 0.625 M, Glicerolo 20%, SDS 2%, Blu-bromofenolo), bollito per cinque minuti in acqua a 100°C e sotto posto a shock termico prima di essere caricati nel gel di poliacrilammide 11% con stacking 4%.

In particolare lo stacking gel è costituito da Acqua, Tris-HCl pH 6.8 0.5mM, Acril/Bisacril-ammide, APS 10%, SDS 10%, Temed; Mentre il Running gel presenta Tris-HCl pH8.8 1.5 mM e ¼ di Acril/Bisacril-ammide, quindi imposto la corsa elettroforetica a 25 mA per un'ora.

Nella seguente fase le proteine sono trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante un campo elettrico. In particolare, il gel è posto tra strati di carta da filtro con la membrana a contatto diretto sul lato dell'elettrodo positivo. Nel momento in cui è applicato il campo elettrico, le proteine migrano fuori dal gel verso l'elettrodo positivo, direzione in cui incontreranno la membrana e si legheranno mantenendo l'organizzazione presente nel gel. A questo scopo prima che di avviare questa fase di trasferimento, abbiamo attivato la membrana di nitrocellulosa e il gel immergendoli per cinque minuti in agitazione leggera in Transfer Blot (20% MetOH, 25 mM Tris-HCl, 192mM Glicina, pH 8.3). Questo passaggio è stato eseguito a basso voltaggio (10 V) per cinquantadue minuti. L'effettivo trasferimento è controllato colorando la membrana di nitrocellulosa con Rosso Ponceau per almeno cinque minuti e colorando il gel trasferito in Coomassie Blu. La membrana è in seguito lavata utilizzando acqua deionizzata fino a vedere le bande.

3.2.6.2 Saturazione della membrana

La membrana di nitrocellulosa è bloccata allo scopo di prevenire interazioni tra la membrana e l'anticorpo utilizzato per rilevare la proteina bersaglio. Per questo motivo è utilizzata una Soluzione di Saturazione di latte essiccato senza grassi 5% Milk in T-TBS (Tween-Tris buffer solution 10mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.05% tween-20) e lascio in agitazione leggera per 1h 45'. Questo passaggio mi permette di eliminare il rumore di fondo.

3.2.6.3 Rilevamento

Questa fase si svolge in due passaggi per permettere che la proteina d'interesse sia rilevata da un anticorpo che a sua volta è collegato a un enzima messaggero che esposto al Luminolo dà una reazione colorimetrica.

Nella prima fase l'anticorpo primario utilizzato è un antisiero di coniglio specifico per la regione C-terminale della subunità maggiore di GGT (DTTHPISYYKPEFYTPDDGG) fornito dall'Università di Pisa. La membrana di nitrocellulosa è stata incubata per due ore a temperatura ambiente in agitazione leggera con Anticorpo primario diluito 1:1000 con Milk 5% in T-TBS (tween-Tris buffer solution 10mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.05% tween-20).

Prima di passare alla seconda fase la membrana è lavata dall'anticorpo primario non legato mediante due lavaggi in T-TBS di cinque minuti ciascuno.

Dopo il risciacquo, alla membrana è associato un altro anticorpo. In questo caso è un anti-anticorpo di coniglio (anti-rabbit IgG-HRP) diluito in TBS 1:4000 con una perossidasi associata che permetterà all'anti-anticorpo di legare l'anticorpo primario e produrre luminescenza in base alla quantità di proteina presente. Quindi la membrana viene incubata per 1h30' in agitazione leggera a temperatura ambiente.

Per la rilevazione colorimetrica si esegue una scansione con BIORAD Molecular imager[®] (ChemiDOCTM XRS+) della membrana di nitrocellulosa trattata con Santa Cruz Biotechnology Luminol, un reagente costituito da una soluzione A e una soluzione B che inserite in parti uguali nella vaschetta contenente la membrana formano il reagente di chemiluminescenza.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Contenuto in semi di proteine totale e a basso peso molecolare

Analisi precedenti hanno dimostrato che una diminuzione del quantitativo delle proteine di riserva presenti nel seme di frumento era correlato alla carenza nutrizionale dello S, provando inoltre che l'attività GGT è implicata nell'idrolisi del GSH (proveniente dalle foglie) e di conseguenza nel rilascio di cisteina al seme (Anderson JW et al., 2001). Anche in studi condotti nel laboratorio di fisiologia vegetale, tramite tecnica iTRAQ, era emersa nei semi di *Arabidopsis thaliana* WT, *ggt1*- e L3, una diversa quantità di proteine di riserva (albumina 2S e cruciferina).

Per valutare più precisamente questo effetto nei vari mutanti di *Arabidopsis thaliana* (*ggt1*, *ggt2*, L1, L2, L3, L4) sono state eseguite analisi sulla concentrazione totale delle proteine con BCA e analisi elettroforetiche monodimensionali con l'ipotesi che un'alterazione a livello di enzima GGT potesse influire sulla composizione proteica.

Dalla quantificazione totale di proteine eseguita su estratto di semi con BCA si sono rilevate differenze significative tra i vari mutanti in quanto è presente un calo di proteine totali in tutti i genotipi (Figura 9). In particolare, la linea knockout *ggt2* diminuisce con un 18% il suo quantitativo totale di proteina. Anche le linee L2 ed L3 presentano un calo di proteina totale pari a 10% nel primo e pari a 16% nel secondo.

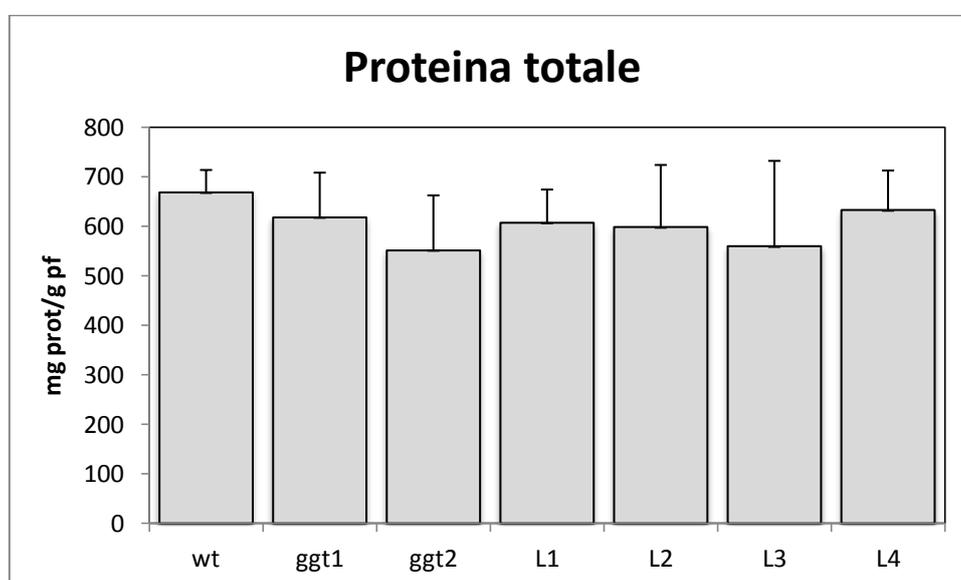


Figura 9. Quantificazione di proteina totale in estratto di semi di *Arabidopsis thaliana*.

Considerando la variazione di proteina totale nel seme, abbiamo voluto vedere in che modo vengono influenzate le proteine principalmente accumulate nel seme.

In *Arabidopsis thaliana*, le crucifere sono le proteine più abbondanti e si presentano nella forma finale come esameri costituiti da α -polipeptidi di 30-35 kDa e da β -polipeptidi di 21-25 kDa (Daniel Riggs et al., 2013). Un'altra categoria di seed storage proteins sono le 2S albumine; allo stato maturo sono costituite da due subunità non glicosilate legate tra loro da due ponti -SH con un peso molecolare di 3-9 kDa (Enno Krebbers et al., 1993).

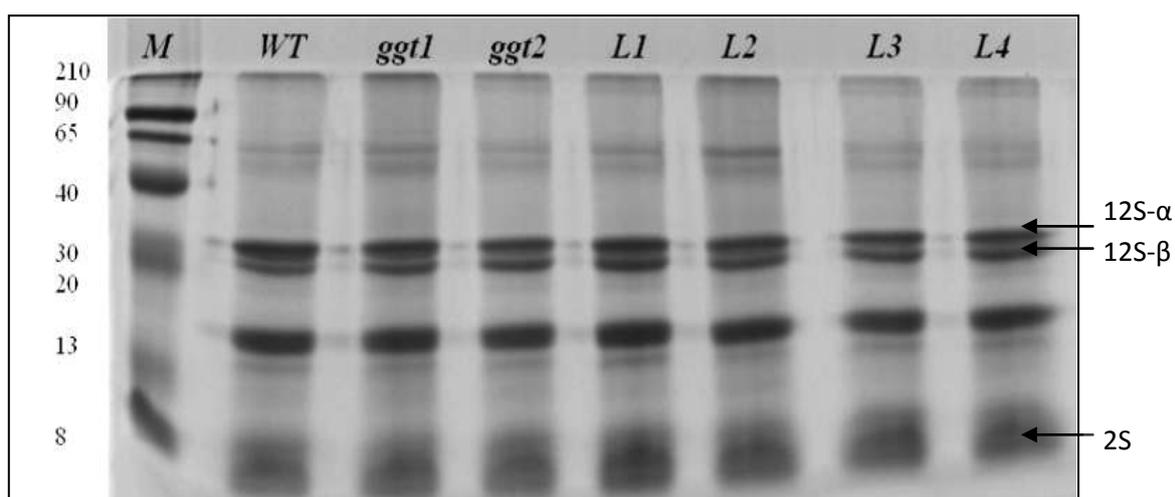


Figura 10. Profilo elettroforetico monodimensionale, gel 11% acrilamide-bis-acrilamide.

Come possiamo vedere nel profilo elettroforetico monodimensionale (Figura 10) degli estratti proteici ottenuti dai semi di *Arabidopsis thaliana*, grazie all'utilizzo di denaturanti come SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) sono ben visibili i monomeri che costituiscono le crucifere, 12S- α a circa 30-35 kDa e 12S- β a 21-25kDa, ma non sono presenti differenze importanti tra le varie linee mutanti (dati densitometrici non riportati).

La banda più bassa non evidenzia perfettamente le due subunità di 2S albumina seed storage ma si posiziona nel gel tra circa 9-3 kDa, permettendoci di ipotizzare che la banda sia corrispondente alla proteina suddetta.

L'analisi densitometrica delle bande, ovvero l'intensità percentuale delle diverse bande nei genotipi, non ha permesso di valutare l'espressione delle proteine a basso peso molecolare in quanto la separazione delle 2S seed proteins storage non presenta la giusta risoluzione.

Per tale motivo, analisi successive si sono focalizzate sull'utilizzo di gel di tris-tricina che è più specifico per la separazione di peptidi a bassi pesi molecolari.

Il profilo elettroforetico in tricina è stato effettuato in 3 repliche e ha rilevato differenze significative (Figura 11). L'analisi visiva permette di verificare la presenza di due bande a ~8 e 3 kDa, corrispondenti alle proteine di riserva 2S. Inoltre, la loro diversa intensità descrive un abbassamento del quantitativo di 2S albumine seed storage proteins in ogni genotipo rispetto al *wild-type* (WT).

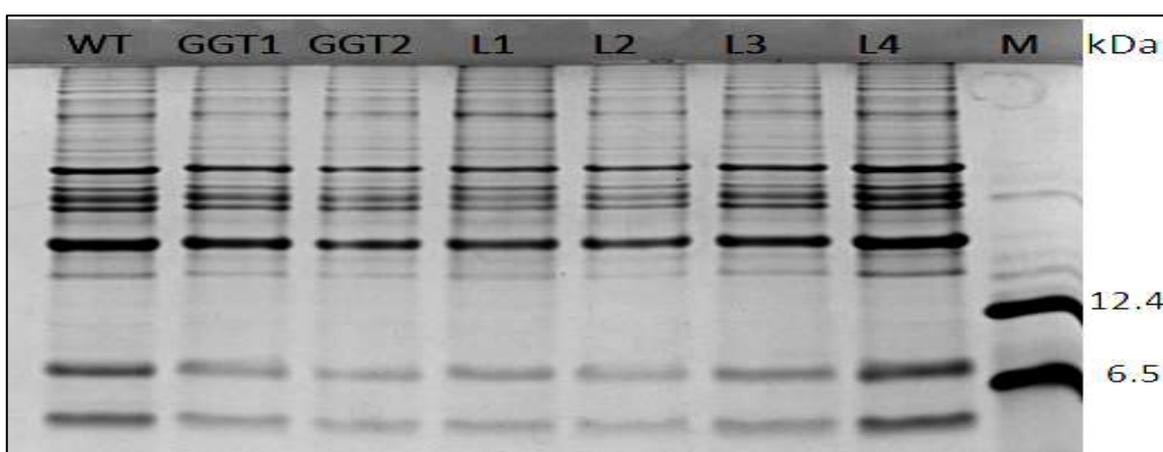


Figura 11. Profilo elettroforetico monodimensionale, gel tris-tricina.

L'esame di densitometria delle ultime due bande delle tre repliche (Tabella 3) rileva il quantitativo proteico presente in esse, evidenziando il calo delle proteine 2S. In modo particolare, nelle linee *knockout ggt1* e *ggt2*, la quantità di proteina diminuisce di circa 43.37% per il primo e 34.7% per il secondo rispetto al controllo (WT). Per quanto riguarda le linee silenziate L1 e L3 notiamo una diminuzione di proteina di riserva di ~30% rispetto al *wild type* per entrambi, mentre la linea L2 presenta una diminuzione di circa 18.8% ed L4 di 9.22% rispetto al controllo (Figura 11). Questo conferma l'ipotesi di partecipazione dell'enzima GGT nell'accumulo di proteine di riserva nei semi.

	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Valori Assoluti	Dev. Standard	
WT	0%	0%	0%	33,66	26,56	%
GGT1	13,19%	65,89%	40,40%	19,06	30,97	%
GGT2	18,45%	34,66%	44,16%	21,98	11,45	%
L1	9,32%	42,53%	36,04%	22,83	11,73	%
L2	25,52%	41,56%	28,70%	22,67	25,38	%
L3	57,81%	21,02%	22,74%	23,46	50,14	%
L4	4,44%	19,73%	12,26%	29,23	22,35	%

Tabella 2. Diminuzione delle proteine 2S albumine seed storage proteins in % rispetto al wild-type (WT).

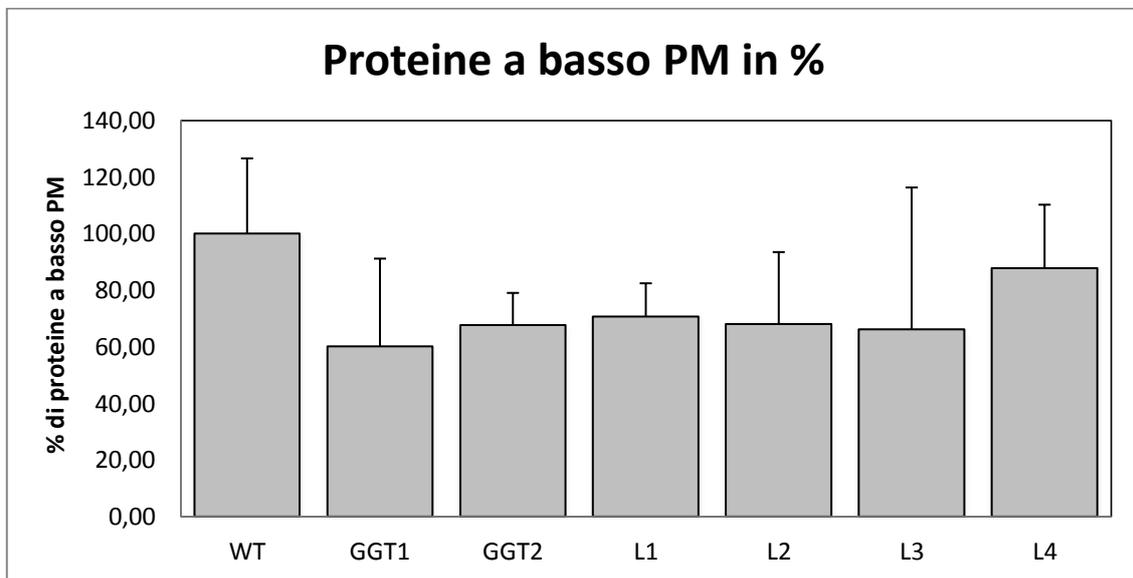


Figura 12. Calo delle 2S albumine seed storage proteins in % rispetto al wild-type (WT).

4.3 Attività enzimatica di GGT

L'attività enzimatica della GGT eseguita su semi è stata eseguita per monitorare la degradazione della gamma-glutamil-4-nitroanilide, misurata nel tempo a 407 nm, allo scopo di valutare

l'attività della γ -glutammina traspeptidasi (GGT), enzima capace di rompere il legame γ -peptidico presente tra cisteina e glutammato nella molecola di glutatione.

In *Arabidopsis*, il gene *ggt1* è espresso in tutti i tessuti, particolarmente nei tessuti vascolari, come il floema, e il gene *ggt2* è espresso negli embrioni in formazione all'interno delle silique e in modo transiente in altri tessuti come il polline. Pertanto, considerando quanto suddetto, e considerando che la linea L1 ed L3 sono state silenziate a partire dal mutante knockout *ggt1*, e che le linee L2 ed L4 sono linee silenziate a partire da WT, possiamo ipotizzare che rispetto al controllo (WT), la perdita di funzione delle isoforme apoplastiche è dimostrata specialmente nei genotipi *ggt1*, L1 ed L3, con una perdita di attività enzimatica che varia dal 60% al 80%; anche le linee *ggt2*, L2 ed L4 mostrano una diminuzione dell'attività di GGT, compresa tra il 20% e il 40% (Figura 13), probabilmente minore in quanto il silenziamento delle GGT è parziale e derivante dal genotipo wild-type (WT). Inoltre, è anche possibile ipotizzare che vi sia un meccanismo di compensazione per ristabilire l'attività dell'enzima GGT quando l'isoforma apoplastica è assente.

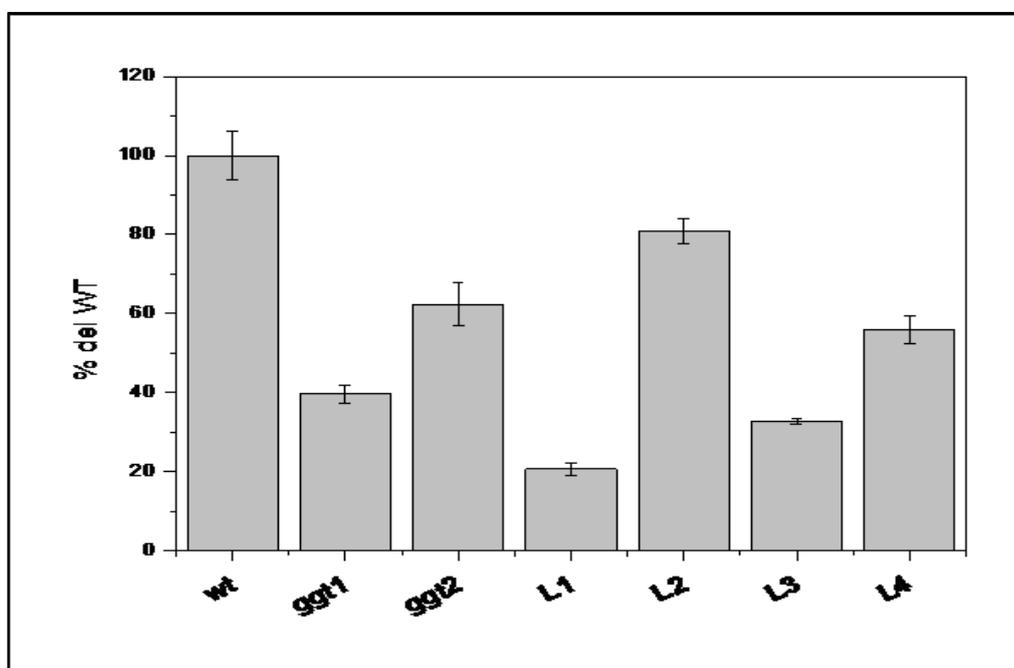


Figura 13. Attività GGAsica nei semi dei diversi genotipi a confronto

4.4 Espressione qualitativa di GGT

Le analisi eseguite con Western Blot sono state eseguite allo scopo di rilevare la presenza di GGT mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico per la proteina di interesse nei vari mutanti. L'analisi

effettuata, mette in evidenza bande con differenze irrilevanti tra i vari genotipi e rivelano un peso molecolare non corrispondente alle subunità della GGT (Figura 14).

L'anticorpo utilizzato si è dimostrato efficace in mais, dove sono state eseguite analisi sulla proteina immunoprecipitata da foglie e radici, e che riteneva la sua attività (Masi et al., 2006); queste prove di funzionalità non sono state invece ancora condotte in *Arabidopsis thaliana* e questo potrebbe spiegare il risultato osservato; in sintesi, l'anticorpo impiegato potrebbe non riconoscere la proteina di *Arabidopsis*. Le bande riconosciute nel blot seguente sono quindi riconducibili alla reazione anticorpale aspecifica o comunque verso proteine non collegate ad alcuna GGT. A ulteriore conferma, nessuna delle bande riconosciute corrisponde ai pesi molecolari teorici calcolati sulla base delle sequenze geniche disponibili nei databases.

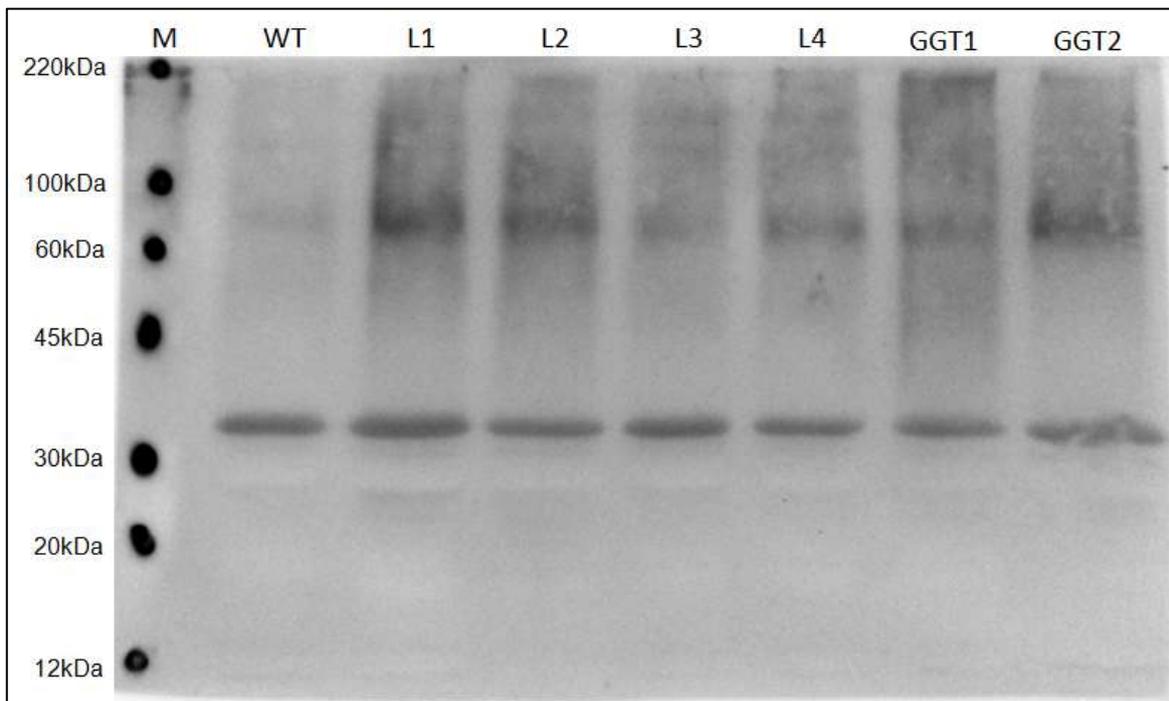


Figura 14. Western blot con semy-dry system

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La γ -Glutamyl transferasi (GGT) svolge un'attività degradativa del glutatione con formazione di cys-gly e acido glutammico, che vengono a loro volta riassorbiti dalla cellula e riutilizzati per formare nuovi peptidi e per la risintesi del glutatione. Le isoforme apoplastiche GGT1 e GGT2 si trovano entrambi negli embrioni all'interno delle silique.

I dati ottenuti suggeriscono che la riduzione di espressione dei geni *ggt1* e *ggt2* comporta la diminuzione dell'attività enzimatica di GGT, diminuzione di proteina totale, e in particolare un calo di proteine di riserva.

L'attività enzimatica si dimostra ridotta nei genotipi mutanti, in modo particolare in alcune linee interferenziali dove l'attività dell'enzima è maggiormente silenziata in quanto derivante da un genotipo *knockout ggt1*. Considerando quanto suddetto insieme ai dati ottenuti sia sulla quantificazione proteica sia totale che di proteine di riserva è correlabile all'influenza che possiede l'enzima studiato con l'accumulo di cisteina nel seme.

Prospettive future si focalizzano su ulteriori indagini per chiarire il ruolo dei geni *ggt1* e *ggt2*. Rivolgendo particolare attenzione verso il trasporto nel floema, verso la localizzazione e specificità di funzione di γ -Glutamyl transferasi .

6. BIBLIOGRAFIA

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR, (2003).**
Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Genomic Analysis Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037, USA. Science. Aug 1;301(5633):653-7.
- Anderson ME and Meister A, (1986).** *Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase and induction of glutathionuria by gamma-glutamyl amino acids.* Proc Natl Acad Sci U S A. July; 83(14): 5029–5032.
- Anderson JW, Fitzgerald MA, (2001).** *Physiological and metabolic origin of sulphur for the synthesis of seed storage proteins.* J Plant Physiol 158: 447–456.
- Awazuhara M, Kim H, Hayashi H, Chino M, Kim SG, Fujiwara T, (2002).** *Composition of seed storage proteins changed by glutathione treatment of soybeans.* Biosci Biotechnol Biochem 66: 1751–1754.
- Berger F, (2003).** *Endosperm: the crossroad of seed development.* Curr Opin Plant Biol 6: 42–50.
- Bergman L, Rennenberg H, (1993).** *Glutathione metabolism in plants.* In: De Kok Lj, Stulen I, Rennenberg H, Brunold C, Rauser WE, eds. *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants.* The Hague, the Netherlands: SPB Academic Publishing, 109-123.
- Bernal-Lugo I, Leopold AC, (1998).** *The dynamics of seed mortality.* Journal of Experimental Botany, Eynsham, v.49, n.326, p.1455-1461.
- Bick JA, Setterdahl AT, Knaff DB, Chen Y, Pitcher LH, Zilinskas BA, Leustek T, (2001).** *Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress.* Biochemistry. 2001;40:9040–9048.
- Bloem E, Haneklaus S, Salac I, Wickenhäuser P, Schnug E, (2007).** *Facts and fiction about sulfur metabolism in relation to plantpathogen interactions.* Plant Biol. 2007;9:596–607.
- Bogs J, Bourbonloux A, Cagnac O, Wachter A, Rausch D, Delrot S, (2003).** *Functional characterization and expression analysis of a glutathione transporter, BjGT1, from Brassica juncea: evidence for regulation by heavy metal exposure.* Plant Cell Environ; 26:1703–1711.

- 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.
- Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, (1999).** *Smethylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase.* Plant Cell 11: 1485–1498.
- Casadei M., Tiziana Persichini a, Fabio Polticelli a, Giovanni Musci b, Marco Colasanti a,(2007).** *S-Glutathionylation of metallothioneins by nitrosative/oxidative stress.* Experimental Gerontology 43 (2008) 415–422.
- Castellano I., Merlino A. (2012).** *Gamma-Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications.* Cell. Mol. Life Sci. (2012) 69:3381–3394; DOI 10.1007/s00018-012-0988-3.
- 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.
- Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS, Meyer AJ, (2006).** *Maturation of arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo.* Plant Physiol. 2006 Jun;141(2):446-55. Epub Mar 10.
- Chew O, Whelan J, Millar AH, (2003).** *Molecular definition of the ascorbateglutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants.* J. Biol. Chem. 2003;278:46869–46877.
- De Gara, De Pinto MC, Moliterni VMC, D'Egidio MG, (2003).** *Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of Triticum durum.* Journal of experimental botany 54 (381), 249-258.
- De Paula M, Perez-Otaola M, Darder M, Torres M, Frutos G, Martinez CJHonduvilla,(1996).** *Function of the ascorbate-glutathione cycle inane sunflower seeds.* Physiol Plant 96: 543-550.
- 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.
- De Vos CHR, Kraak HL, Bino RJ, (1994).** *Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation.*Physiol Plant 92: 131-139.

- D'Hondt k., Jose Van Damme, Christel Van Den Bossche, Suporn Leejeerajumnean, Riet De Rycke, Jan Derksen, Joel Vandekerckhove, and Enno Krebbers (1993).** *Studies of the Role of the Propeptides of the Arabidopsis thaliana 2S Albumin.* Plant Physiol, (1993) 102:425-433.
- Diaz-Vivancos P, Dong YP, Ziegler K, Markovic J, Pallardó F, Pellny TK, Verrier P, Foyer CH, (2010).** *Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole cell redox homeostasis in 55 Arabidopsis thaliana and lowers the oxidative defence shield.* Plant J. 2010a;64:825–838.
- Dong-Gi Lee,a Norma L. Houston,a Severin E. Stevenson,a Gregory S. Ladics,b Scott McClain,c Laura Privalled and Jay J. Thelen*a (2010)** *Mass spectrometry analysis of soybean seed proteins: optimization of gel-free quantitative workflow* The Royal Society of Chemistry 2010 Anal. Methods, 2010, 2, 1577–1583 | 1577.
- Droux M, (2004).** *Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey.* Photosynth. Res. 2004;79:331–348.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM, (1990).** *Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in pea (Pisum sativum L.).* Planta;180:278–284.
- Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A, (1985).** *Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids.* Science. Mar 22;227(4693):1485-7.
- 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.
- Fitzgerald MA, Ugalde TD, Anderson JW, (2001).** *Sulphur nutrition affects delivery and metabolism of S in developing endosperms of wheat.* J Exp Bot 52: 1519–1526.
- Fondamenti di Biochimica. Donald Voet, Judith G. Voet, Vharlotte W. Pratt (2006).** **Cinetica enzimatica, inibizione e regolazione 337-370.**
- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L, (1995).** *Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees.* Plant Physiol.;109:1047–1057.
- 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.
- Frendo P, Jiménez MJ, Mathieu C, Duret L, Gallesi D, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A, (2001).** *A Medicago truncatula homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication.* Plant Physiol. Aug;126(4):1706-15.

- Galant A, Mary L. Preuss², Jeffrey C. Cameron¹ and Joseph M. Jez^{1*} (2011).** *Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products.* Mini Review article published: 05 September 2011 doi: 10.3389/fpls.2011.00045
- Goel A, Goel AK, Sheoran IS, (2003).** *Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (Gossypium hirsutumL.) seeds.* J Plant Physiol 160: 1093-1100.
- Goel A, Sheoran IS, (2003).** *Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in cotton seeds under natural ageing.* Biol Plant 46: 429-434.
- Grzam A, Tennstedt P, Clemens S, Hell R, Meyer AJ, (2006).** *Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase.* FEBS Lett. 2006;580:6384–6390. 57
- 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.
- Gullner G, Tóbiás I, Fodor J, Kömives T, (1999).** *Elevation of glutathione level of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco.* Free Rad. Res. 1999;31:155–161.
- Halliwell B, Foyer CH (1978).** *Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography.* Planta.;139:9–17.
- Herschbach C, van Der Zalm E, Schneider A, Jouanin L, De Kok LJ, Rennenberg H, (2000).** *Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing gamma-glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H₂S.* Plant Physiol 124: 461– 473.
- Huu Cuong Nguyen*, Rainer Hoefgen and Holger Hesse.** *Improving the nutritive value of rice seeds: elevation of cysteine and methionine contents in rice plants by ectopic expression of a bacterial serine acetyltransferase.* Journal of Experimental Botany, Vol. 63, No. 16, pp. 5991–6001, 2012 doi:10.1093/jxb/ers253
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF, (1992).** *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum.* Science.;257:1496–1502.
- Jez JM, Cahoon RE J, (2004).** *Kinetic mechanism of glutathione synthetase from Arabidopsis thaliana.* Biol Chem. Oct 8;279(41):42726-31. Epub 2004 Aug 9.
- Jez JM, Cahoon RE, Chen SJ, (2004).** *Arabidopsis thaliana glutamatecysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity.* Biol Chem. Aug 6;279(32):33463-70. Epub Jun 4.
- Kataya AMR, Reumann S, (2010).** *Arabidopsis glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol.* Plant Signal. Behav. 2010;5:171–175.

- Kean EA, Hare ER**, (1980). *Gamma Glutamyl Trans Peptidase of the Ackee Plant Blighia sapida*. Phytochemistry (Oxford) 19, 199-204.
- Klapheck S**, (1988). *Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes*. Physiol. Plant.;74:727–732.
- Klapheck S, Chrost B, Starke J, Zimmermann H**, (1992). *γ -Glutamylcysteinylserine a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae*. Bot. Acta.;105:174–179.
- 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.
- Kranner I, Grill D**, (1993). *Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea seeds*. Physiol Plant 88: 557-562.
- Kranner I, Grill D**, (1996). *Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development*. Bot. Acta.;109:8–14.
- Kuzuhara Y, Isobe A, Awazuhara M, Fujiwara T, Hayashi H**, (2000). *Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions*. Soil Sci Plant Nutr 46: 265–270.
- Lappartient AG, Touraine B**, (1997). *Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity, SO₄²⁻ uptake, and oxidative stress response in intact canola roots*. Plant Physiol 114: 177–183.
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass AD, Touraine B**, (1999). *Interorgan signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound*. Plant J 18: 89–95.
- Leustek T, Saito K**, (1999). *Sulfate transport and assimilation in plants*. Plant Physiol. Jul;120(3):637-44.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP**, (2000). *Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 141–165.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J**, (2005). *Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis*. Plant PhysiolMar;137(3):921-30. Epub 2005 Feb 25.
- MacNicol PK**, (1987). *Homoglutathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification and substrate specificity*. Plant Sci.;53:229–235.
- 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.

- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H, (2003).**
Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. Plant Physiol. 2003;132:597–605.
- 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.
- 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 tissue.* Journal of plant Physiology 164: 1527-1535.
- Matta N. K. *, Arvinder Singh and Yogesh Kumar (2009).** *Manipulating seed storage proteins for enhanced grain quality in cereals.* African Journal of Food Science Vol 3.(13) pp. 439-446, December, 2009 Available online <http://www.acadjourn.org> ISSN 1996-0794 © 2009 Academic Journals.
- Mc Donald MB, (1999).** *Seed deterioration: physiology, repair and assessment.* Seed Sci Technol 27: 177-237.
- Meister A, (1988).** *Glutathione metabolism and its selective modification.* J. Biol. Chem.;263:17205–17208.
- Meyer1,* , Thorsten Brach1, Laurent Marty1, Susanne Kreye1, Nicolas Rouhier2, Jean-Pierre Jacquot2 and Rüdiger Hell (2007).** *Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer.* The Plant Journal (2007) 52, 973–986.
- Mike J. May1,4 , Teva Vernoux1, Chris Leaver3, Marc Van Montagu1 and Dirk Inzé.** *Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development.* Journal of Experimental Botany Volume 49, Issue 321 Pp. 649-667.
- Meuwly P, Thibault P, Rauser WE, (1993).** *Gamma-Glutamylcysteinylglutamic acid--a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium.* FEBS Lett. Dec 28;336(3):472-6.
- Meyer A, (2009).** *The integration of glutathione homeostasis and redox signaling.* J Plant Physiol. 165:1390-1403.
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB, (2009).**
Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. J. Proteomics. 2009;72:452–474.
- Newton GL, Javor B, (1985).** *Gamma-Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria.* J Bacteriol. Jan;161(1):438-41.

- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R, (2003).** *Transcriptome analysis of sulfur depletion in Arabidopsis thaliana: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity.* Plant J.;33:633–650.
- Noctor G, Arisi AC, Jouanin L, Foyer CH, (1998).** *Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast.* Plant Physiol. Oct;118(2):471-82.
- Noctor G and Foyer CH, (1998).** *Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control.* Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 49, 249-279.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH, (2002).** *Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling.* J. Exp. Bot. 2002;53:1283–1304.
- Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH, (2011).** *Glutathione.* The Arabidopsis Book, February 18.
- Noctor G, Amna Mhamdi¹, Sejir Chaouch¹, Yi Han¹, Jenny Neukermans¹, Belen Marquez-Garcia², Guillaume Queval² & Christine H. Foyer (2012).** *Glutathione in plants: an integrated overview Plant, Cell and Environment (2012) 35, 454–484.*
- Ohkama-Ohtsu N, Radwan S, Peterson A, Zhao P, Badr A, Xiang C, Oliver D, (2007a).** *Characterization of the extracellular γ -Glutamyl transpeptidase, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis.* Plant Journal 49:865-877.
- Ohkama-Ohtsu N, Zhao P, Xiang C, Oliver DJ, (2007b).** *Glutathioneconjugates in the vacuole are degraded by γ -Glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis.* Plant Journal 49: 878-888.
- Ohkama-Ohtsu N, Oikawa A, Zhao P, Xiang C, Saito K, Oliver D, (2008).** *A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in Arabidopsis.* Plant Physiol. 2008;148:1603–1613.
- Otegui M., Rachel Herder,^a Jan Schulze,^c Rudolf Jung,^c and L. Andrew Staehelin (2006)** *The Proteolytic Processing of Seed Storage Proteins in Arabidopsis Embryo Cells Starts in the Multivesicular Bodies.* The Plant Cell, Vol. 18, 2567–2581, October 2006, www.plantcell.org ^a 2006 American Society of Plant Biologists
- Pasternak M, Lim B, Wirtz M, Hell R, Cobbett CS, Meyer AJ, (2008).** *Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development.* Plant J. 2008;53:999–1012.
- Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G, (2011).** *Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts.* Plant Cell Environ. 2011;34:21–32.
- Rennenberg H, Schmitz K, Bergmann L, (1979)** *Long distance transport of sulfur in Nicotiana*

tabacum. *Planta* 176:68–74. 64

- Rennenber H, Filner P, (1982).** *Stimulation of h(2)s emission from pumpkin leaves by inhibition of glutathione synthesis.* *Plant Physiol. Apr;*69(4):766-70.
- Rennenberg H, (1982).** *Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants.* *Phytochemistry* 21: 2771–2781.
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP, (2008).** *The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation.* *Annu Rev Plant Biol* 59: 143–66.
- Saito K, (2000).** *Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfurcontaining amino acids.* *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2000;3:188–195.
- Sayyar Khan,a Florian Heinrich Haas,a Arman Allboje Samami,a Amin Moghaddas Gholami,b Andrea Bauer,b Kurt Fellenberg,c Michael Reichelt,d Robert Ha" nsch,e Ralf R. Mendel,e Andreas J. Meyer,Markus Wirtz,a and Ru" diger Hella,1.(2010).** *Sulfite Reductase Defines a Newly Discovered Bottleneck for Assimilatory Sulfate Reduction and Is Essential for Growth and Development in Arabidopsis thaliana.* *The Plant Cell*, Vol. 22: 1216–1231, April 2010 American Society of Plant Biologists.
- Schmidt M.A and Eliot M. Herman (2008).** *Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation* *Plant Biotechnology Journal* (2008) 6 , pp. 832–842.
- Schafer FQ, Buettner GR, (2001).** *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.* *Free Radic Biol Med.* Jun 1;30(11):1191-212.
- Shewry P,' Johnathan A. Napier, and Arthur S. Tatham (1995).** *Seed Storage Proteins: Structures 'and Biosynthesis.* *The Plant Cell*, Vol. 7, 945-956, July 1995 O 1995 American Society of Plant Physiologists.
- Stadler R, Lauterbach C, Sauer N, (2005).** *Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos.* *Plant Physiol* 139: 701–712.
- Storozhenko S, Belles-Boix E, Babiychuk E, Hérouart 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.
- Sunarpi and 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.

SURESH S. TATE AND ALTON MEISTER (1978). *Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of γ -glutamyl transpeptidase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 75, No. 10, pp. 4806-4809, October 1978 Biochemistry.

Tabe LM, Droux M, (2001). *Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed.* Plant Physiol 126: 176–187.

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

Tate SS, Meister A, (1978). *Serine-borate complex as a transition state inhibitor of γ -glutamyl transpeptidase.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 75: 4806-4809.

Tolin S., Giorgio Arrigoni^{2,3}, Anna Rita Trentin¹, Sonja Veljovic-Jovanovic⁴, Micaela Pivato¹, Bernd Zechman⁵ and Antonio Masi¹ (2013) *Biochemical investigations and proteomic profiling in ggt1- mutant leaves reveal a role for the gamma-glutamyl cycle in the plant's adaptation to the environment.* Proteomics.

Tommasi F, Paciolla C, De Pinto MC, De Gara L, (2001). *A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of Pinus pinea L. seeds.* J Exp Bot 52: 1647-1654.

Tsakraklides G, Martin M, Chalam R, Tarczynski MC, Schmidt A, Leustek T, (2002). *Sulfate reduction is increased in transgenic Arabidopsis thaliana expressing 5'-adenylylsulfate reductase from Pseudomonas aeruginosa.* Plant J. 2002;32:879–889.

Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos P, Krahenbuhl U, den Camp RO, Brunold C, (2002). *Flux control of sulphate assimilation in Arabidopsis thaliana: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols.* Plant J.;31:729–740.

Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D, May MJ, Sung ZR, (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. 2000;12:97–110.

Wachter A, Wolf S, Steiniger 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. 2005;41:15–30.

Xiang C, Oliver DJ, (1998). *Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis.* Plant Cell. Sep;10(9):1539-50.

Xiang C, Werner BL, Christensen EM Oliver DJ, (2001). *The biological functions of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels.* Plant Physiol.;126:564–574.

Xiang C and Oliver DJ, (2002). *Multilevel regulation of glutathione homeostasis in higher plants.* In Handbook of Plant and Crop Physiology (Pessarakli M, ed.), New York: Marcel Dekker, Inc., Pages 539-548

Yimei Lin¹, Agnieszka Pajak², Frédéric Marsolais^{2,3}, Peter McCourt¹, C. Daniel Riggs^{1*}
Characterization of a Cruciferin Deficient Mutant of Arabidopsis and Its Utility for Overexpression of Foreign Proteins in Plants.

YOULE RICHARD J. AND ANTHONY H. C. HUANG Biology Department, University of South Carolina, Columbia, South Carolina 29208. *Occurrence Of Low Molecular Weight And High Cysteine Containing Albumin Storage Proteins In Oilseeds Of Diverse Species' .Amer. J. Bot. 68(1): 44-48. 1981*

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.Sigmaaldrich.com>

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

<http://bionanotech.uniss.it>

<http://www.med.unibs.it>

<http://www.masterms.it>

<http://www.biotechland.it>

6.2 Acronimi ed abbreviazioni testuali

ABC- ATP Binding Cassette	GSSG- Glutazione ossidato
Abs- Assorbanza	GGP1- Gamma-glutamyl peptidase 1
APR- Adenosina 5'-fosfato riduttasi	GGT- Gamma Glutami Transpeptidasi
APS- Ammonio Persolfato	HRP- Horse Radish Peroxidase
APX- Ascorbato Perossidasi	Ig- Immunoglobuline
ATP- Adenosina Trifosfato	JA- Acido Jasmonico
BCA- Acido Bicinconinico	MDAR- MonoDeidroAscorbato
BSA- Albumina di Siero Bovino	MRP- Multidrug Resistance-Associated Protein
CLT- Chloroquine Resistance Transporter (CRT) -like Transporter	NL- Non Linear
DTT- DiThioThreitol	NO- Ossido nitrico
DHA- Deidroascorbato	PCS- Phytochelatin synthase
DHAR- Deidroascorbato riduttasi	PMSF- Phenylmethanesulfonyl fluoride
GGC o γ -EC- Gamma-glutamylcysteine	ROS- Reactive Oxygen Species
γ -ECS- Gamma-glutamylcisteina sintetasi	SDS- Sodium dodecyl sulfate
GGMN-Glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide	TBS- Tris Buffer Solution
GR- Glutazione riduttasi	T-TBS- Tween Tris Buffer Solution
GSH- Glutazione ridotto	TRX- Tioredoxina
GSNO- S-nitrosoglutazione	WT- wild-type