

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.



Laurea di primo livello in Biologia Molecolare

Elaborato di Laurea

Sistemi di controllo redox nel cloroplasto

Relatore: Dott. Elisabetta Bergantino
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Laureando: Fabio De Pascale

Anno Accademico: 2006-2007

Sommario

Questo elaborato di laurea è una tesi compilativa che si propone di dare una visione dello stato dell'arte sul tema del controllo redox nel cloroplasto. Partendo da cinque review (Aro and Ohad, 2003; Barnes and Mayfield, 2003; Link, 2003; Buchanan and Balmer, 2005; Pfannschmidt and Liere, 2005) ampliate dall'esame di pubblicazioni apparse più recentemente, vengono trattati cinque diversi aspetti del controllo redox della fotosintesi. Dopo un'introduzione alla fotosintesi e ai cloroplasti, vengono trattati i meccanismi di controllo della fosforilazione delle proteine del fotosistema II e del *Light Harvesting Complex II* (Capitolo 2), arricchiti da informazioni sulle chinasi coinvolte in questo processo. I Capitoli 3 e 4 trattano l'espressione genica, redox regolata, dei geni fotosintetici plastidiali e nucleari. Il Capitolo 5 è invece un breve aggiornamento del controllo redox degli enzimi del ciclo di Calvin, processo storico nello studio della regolazione redox, e di due enzimi della sintesi dell'amido. Nel Capitolo 6, infine, viene illustrata una recentissima teoria, avanzata dal gruppo di Buchanan, riguardante il controllo redox dell'attività enzimatica nel lumen tilacoidale.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I Cloroplasti

I plastidi sono organelli caratteristici degli organismi eucarioti fotosintetici. Originatisi, probabilmente, grazie all'instaurarsi di una relazione endosimbiotica, tra un eucariote primordiale e un procariote fotosintetico, antenato degli attuali cianobatteri, in seguito ad un'evento di fagocitosi. Tra le numerose evidenze a sostegno di questa teoria spicca il fatto che i plastidi presentano genoma e sistemi di espressione genica autonomi (Allison, 2000; Zerges, 2000). Possiedono, infatti, all'interno dello stroma, sia un piccolo cromosoma (presente in circa un centinaio di copie) contenente 100-200 geni, sia apparati di trascrizione e traduzione. I ribosomi sono omologhi a quelli batterici e le RNA polimerasi codificate nel genoma plastidiale, hanno struttura e sequenza simili alle polimerasi batteriche (Gray and Lang, 1998; Maliga, 1998).

Oltre ai geni codificanti le componenti dell'apparato per l'espressione genica, nel cromosoma plastidiale sono codificate alcune delle subunità dei complessi proteici coinvolti nelle reazioni fotosintetiche (Zerges, 2000). I cloroplasti, un particolare tipo di plastidi, sono infatti la sede della fotosintesi. Presentano al loro interno un complesso sistema di membrane, i tilacoidi, contenente le strutture della catena di trasporto fotosintetica degli elettroni: particolari complessi multiproteici responsabili della cattura dell'energia luminosa e della sua conversione in energia chimica, ATP e NADPH, attraverso la formazione di un gradiente protonico tra il lumen, lo spazio interno dei tilacoidi, e lo stroma del cloroplasto. Nello stroma avviene poi l'assimilazione del carbonio: attraverso l'azione dell'enzima Rubisco e il successivo ciclo di Calvin, l'anidride carbonica atmosferica viene fissata nei composti organici. I cloroplasti, inoltre, sono coinvolti in molte altre vie metaboliche come la sintesi di aminoacidi e pirimidine o la riduzione di solfati e nitrati.

Come già detto solo una parte delle proteine dei complessi fotosintetici sono codificate nel genoma plastidiale e sintetizzate nello stroma e quindi, subito disponibili. Proprio la sintesi o la degradazione di queste proteine, centrali nel funzionamento dei rispettivi complessi, è prontamente regolata dai cambiamenti ambientali. In particolare sono altamente controllate dall'intensità luminosa, attraverso cambiamenti dello stato redox di molecole collegate alla catena di trasporto fotosintetica.

1.2 La catena di trasporto fotosintetica degli elettroni

Alla luce i due fotosistemi, PSI (*photosystem I*) e PSII (*photosystem II*), assorbono i fotoni e trasferiscono elettroni a valle della catena di trasporto fino ad arrivare alla riduzione del NADP. Gli elettroni persi dai fotosistemi in seguito all'assorbimento dei fotoni, devono essere rimpiazzati da nuovi elettroni per garantire il funzionamento continuo della catena di trasporto e quindi della fotosintesi. Il PSII recupera dall'acqua l'elettrone perso attraverso il complesso che evolve ossigeno, complesso proteico strettamente associato al PSII sul lato lumenale della membrana tilacoidale. Il PSI, invece, rimpiazza l'elettrone perso con quello proveniente dal PSII da cui arriva grazie all'azione dei trasportatori di membrana fotosintetici.

Il PSII passa gli elettroni al plastoquinone (PQ) attraverso la feofitina. Il PQ ridotto può diffondere nel doppio strato lipidico e raggiungere il citocromo b_6f a cui trasferisce i suoi elettroni. Il cyt b_6f passa infine gli elettroni al PSI attraverso la plastocianina. Il PSI fornisce, quindi, attraverso la ferredossina (Frx) e l'enzima Ferredossina-NADP ossidoreduttasi gli elettroni necessari alla riduzione del NADP (Fig. 1.1). La Frx può però fornire gli elettroni necessari anche alla riduzione della tioredoxina (Trx) che avviene attraverso l'azione dell'enzima Frx-Trx ossidoreduttasi. Questa proteina sembra ricoprire un ruolo sempre più rilevante nel controllo esercitato dallo stato redox sull'intero metabolismo cellulare.

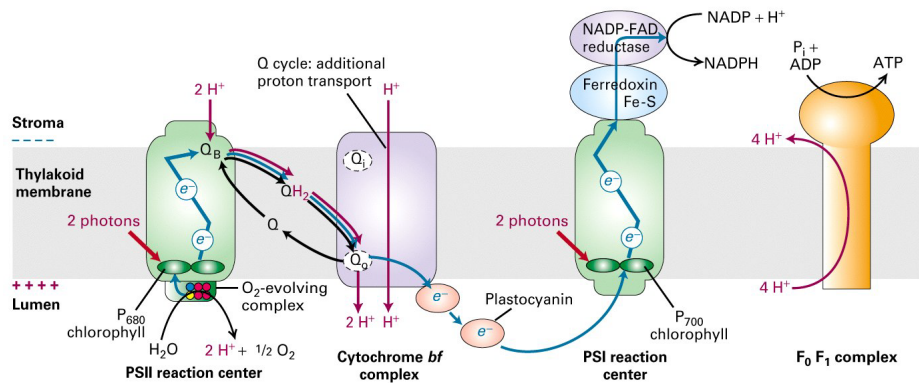


Figura 1.1: La catena di trasporto fotosintetica degli elettroni. Fonte: *Molecular Cell Biology - fifth edition*, Lodish et al., W.H. Freeman, 2004.

1.3 Fotosistemi e Fotoequilibrio

I due fotosistemi assorbono luce a due diverse lunghezze d'onda: il PSII assorbe a 680 nm mentre il PSI a 700 nm. A seconda della luce incidente i due fotosistemi avranno attività differente. A lunghezze d'onda più basse sarà più

attivo il PSII mentre a lunghezze d'onda maggiori sarà maggiormente attivo il PSI. Per un ottimale funzionamento della catena di trasporto fotosintetica, però, le attività dei due fotosistemi devono essere equilibrate. Questo perché la loro azione è collegata attraverso il flusso di elettroni: se il PSI assorbe meno luce del PSII non ci sarà ossidazione dei trasportatori a monte, dal PSII al PSI, che giungeranno a saturazione e saranno quindi in maggioranza ridotti. Gli elettroni quindi non riusciranno a fluire liberamente dal PSII quando questo viene eccitato, portando ad una minore efficienza della fotosintesi. Se invece il PSI assorbe più luce del PSII si avrà l'effetto opposto: non arriveranno abbastanza elettroni dal PSII per rimpiazzare quelli persi dal PSI quando viene eccitato. I trasportatori a monte del PSI risulteranno completamente ossidati mentre quelli a valle, Frx e quindi Trx, saranno per la maggior parte ridotti.

Per un corretto e ottimale funzionamento della fotosintesi quindi, le attività dei due fotosistemi e i rapporti tra specie ossidata e specie ridotta dei vari trasportatori della catena, devono essere in costante equilibrio. In situazioni di squilibrio si azionano, infatti, sistemi che tendono a riequilibrare le attività dei due fotosistemi. Questi meccanismi possono essere sia a breve termine come la transizione del complesso antenna LHCI (*light-harvesting complex II*) dal PSII al PSI (stato 2) e viceversa dal PSI al PSII (stato 1) (vedi Capitolo2), oppure a lungo termine come l'aumento della sintesi di nuove proteine dei centri di reazione, per aggiustarne il rapporto stechiometrico. Entrambi questi meccanismi sono mediati dallo stato redox dei trasportatori di elettroni. In particolare la transizione di LHCI viene innescata da un'elevata riduzione del pool di plastochinone il quale partecipa anche in un segnale, detto di *priming*, per il controllo della traduzione di *psbA*, il gene codificante la proteina del centro di reazione del PSII, e di *psaAB*, i geni codificanti le proteine del centro di reazione del PSI. Lo squilibrio nella catena fotosintetica si può ripercuotere sull'intero stato della cellula. Il cambiamento che ne consegue nello stato redox dei diversi trasportatori può portare alla riduzione o ossidazione di proteine e molecole al di fuori della catena diffondendo, infatti, lo squilibrio a tutto l'organello e successivamente a tutta la cellula.

1.4 Glutazione, ROS e controllo redox

Il glutatione è un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) che espone un gruppo -SH sul residuo di cisteina con il quale può formare legami disolfuro con altre molecole di glutatione o con gruppi -SH esposti su proteine bersaglio. Il suo ruolo nel controllo del metabolismo plastidiale e cellulare, è molto ampio (Mullineaux and Rausch, 2005). È coinvolto nella protezione dalle intossicazioni di metalli pesanti, nel metabolismo dello zolfo, ha effetti nella crescita e nello sviluppo ed è fonte di potere riducente in alcune reazioni enzimatiche. Inoltre, promuove la risposta dell'organismo in molte situazioni di stress come lo stress ossidativo, la risposta ad agenti patogeni o ancora, la mancanza di

nutrienti. In questi casi agisce sia proteggendo proteine bersaglio da eccessiva ossidazione, processo detto glutationilazione, sia modificando l'espressione genica, nucleare o plastidiale, attivando geni per la difesa o per l'adattamento dell'organismo all'ambiente. Nel cloroplasto, in particolare, modula l'attività di una chinasi che fosforila l'RNA polimerasi dei plastidi PEP-A (*Plastid-Encoded Plastid RNA polymerase*) (Baginsky et al., 1999) (vedi sez. 3.1.2). A parte questo suo ruolo nel controllo di PEP-A non ci sono altre evidenze del coinvolgimento diretto del glutazione nella regolazione plastidiale di trascrizione o traduzione, anche se ciò non può essere escluso. Il glutazione potrebbe, inoltre, essere coinvolto nell'espressione coordinata dei geni nucleari e dei geni plastidiali fotosintetici. Esiste infatti un possibile legame tra la fotointesi e la sintesi del glutazione che avviene in parte nello stroma e in parte nel citosol (Mullineaux and Rausch, 2005). In questo modo l'efficienza fotosintetica si trasmetterebbe alla sintesi del glutazione, con fluttuazioni del livello di glutazione in risposta a fluttuazioni dell'attività fotosintetica.

Nei cloroplasti la continua produzione di ossigeno che avviene al PSII può generare facilmente delle specie ROS, le quali devono essere prontamente allontanate o eliminate. Questo è importante perchè molte proteine possono venire danneggiate dalla presenza di agenti altamente ossidanti quali le specie ROS. Basti pensare a tutte le molecole che sono sotto controllo redox: queste devono infatti avere dei gruppi esposti, come ponti disolfuro -S-S- (stato ossidato) o gruppi ditiolo -SH HS- (stato ridotto), facilmente ossidabili o riducibili dalle molecole messaggere così da modularne l'attività. Se questi gruppi venissero ridotti o ossidati da specie non controllate, come i ROS, le proteine che li portano agirebbero in modo incontrollato aggravando lo stato della cellula. Inoltre molte proteine posseggono ponti disolfuro per stabilizzare la loro struttura tridimensionale che potrebbero venire alterati dalle specie ROS, portando così alla perdita della conformazione nativa della proteina e quindi della sua funzione.

Non solo la luce quindi, ma moltissime altre vie metaboliche del cloroplasto capaci di generare specie ROS, influenzano lo stato redox che viene quindi ad essere un fondamentale sensore della generale attività dell'organello. Ovviamente il cloroplasto non è un sistema chiuso ma risente e influenza, lo stato generale di tutta la cellula. Esistono, infatti, sistemi di comunicazione tra i vari compartimenti cellulari che si esplicano attraverso lo scambio di composti "compatibili" alle diverse attività metaboliche (intermedi metabolici). Questo sistema di comunicazione è indispensabile non solo per l'omeostasi generale della cellula, ma anche perchè la maggior parte delle proteine presenti nel cloroplasto, e quindi anche le altre subunità dei complessi fotosintetici, sono codificate nel nucleo (Barkan and Goldschmidt-Clermont, 2000). In conclusione, deve esserci un sistema in grado di coordinare l'espressione nucleare con l'espressione plastidiale. Una via attraverso cui questa regolazione potrebbe avvenire è il controllo dello stato redox di particolari molecole come il gluta-

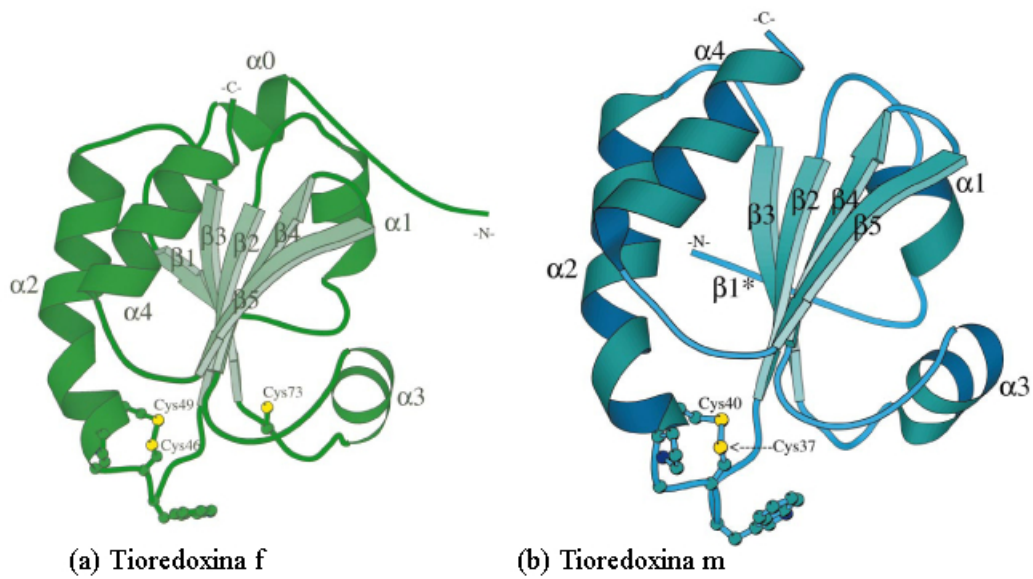


Figura 1.2: Strutture tridimensionali delle due tioredoxine cloroplastiche centrali nella regolazione enzimatica, le tioredoxina *f* e *m*. Sono state infatti identificate altre due tioredoxine nel cloroplasto il cui ruolo deve ancora essere chiarito (Buchanan and Luan, 2005). In giallo sono visibili i residui di cisteina indispensabili per la funzione di queste proteine. In (a) è visibile, sempre in giallo, un terzo residuo di cisteina, responsabile del legame con il glutatione, processo detto glutationilazione. Immagine tratta da Capitani G. *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, vol. 302, 2000.

tione, la tioredoxina e il plastochinone. Queste molecole possono agire sia direttamente su proteine bersaglio sia attraverso l'attivazione di secondi messaggeri, come ad esempio le chinasi. Il loro stato redox viene influenzato da diversi fattori: dall'attività fotosintetica e quindi dall'intensità luminosa; da altre vie metaboliche che producono equivalenti riducenti o ossidanti; e infine, dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Capitolo 2

Controllo della fosforilazione di LHCII e PSII

La fosforilazione di proteine bersaglio per la trasduzione di messaggi intracellulari è un meccanismo altamente conservato sia nei procarioti che negli eucarioti. Lo stato di transizione del complesso antenna del fotosistema II, LHCII, e il controllo del turnover delle proteine del centro di reazione del fotosistema stesso, sono entrambi controllati dalla presenza di gruppi fosfato su particolari proteine del complesso.

La fosforilazione dell'LHCII avviene in condizioni in cui il pool di plastoquinone è ridotto quando, cioè, il PSII cede elettroni più velocemente del PSI e porta allo spostamento del complesso antenna dal PSII (stato 1) al PSI (stato 2). La defosforilazione, che avviene in condizioni in cui il pool di plastoquinone è ossidato, provoca il ritorno dell'LHCII al PSII (Allen, 2003).

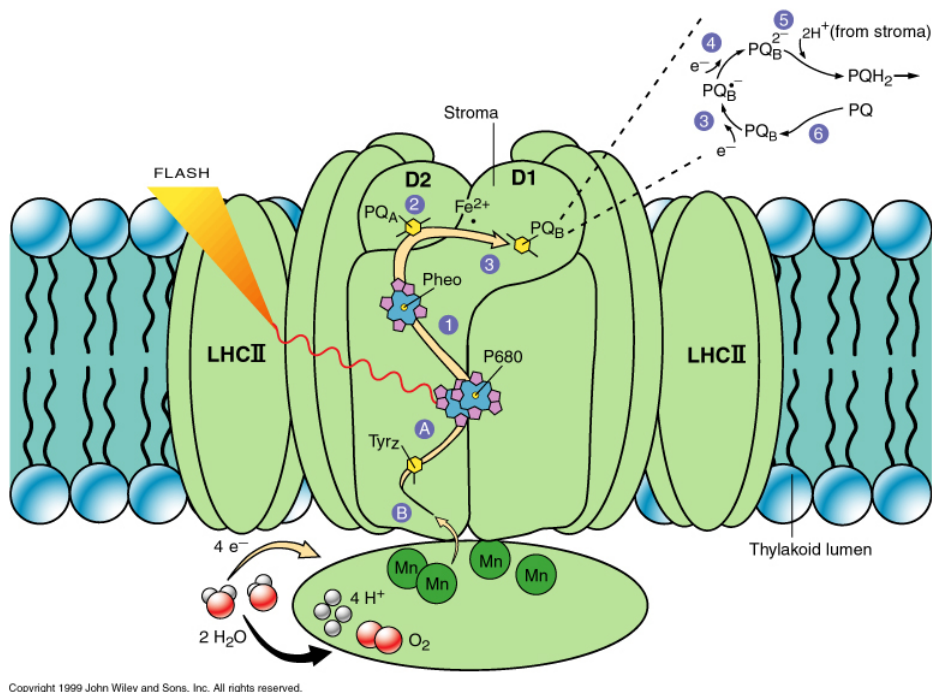


Figura 2.1: Il fotosistema II, il complesso che evolve ossigeno e il complesso antenna LHCII.

La fosforilazione delle proteine del centro di reazione del PSII è invece responsabile della loro stabilità. In situazioni di elevata luminosità le proteine

del centro di reazione del PSII vengono facilmente danneggiate sia dalla luce incidente sia dalle specie reattive dell'ossigeno che si creano al complesso che evolve ossigeno, portando al fenomeno della fotoinibizione. Perché vengano riparate o rimpiazzate il fotosistema deve migrare dai grana, dove si trova, alle lamelle stromali dei tilacoidi, dove le proteine vengono gradualmente defosforilate rendendo così possibile la riparazione del fotosistema (Baena-González et al., 1999).

2.1 Stt7, Stn7 e Stn8

Le proteine bersaglio che vengono fosforilate durante lo stato di transizione, sono le proteine Lhcb1 e Lhcb2, del complesso antenna, leganti le clorofille *a* e *b*. Le proteine il cui stato di fosforilazione è chiave nel processo di riciclo del PSII sono le proteine del centro di reazione D1, D2, CP43 e PsbH. I residui fosforilati sia delle proteine del centro di reazione che delle proteine del complesso antenna, sono treonine (Thr) localizzate nei primissimi residui amminoacidici all'N-terminale (Bellafiore et al., 2005; Vainonen et al., 2005).

Due delle chinasi coinvolte in questi due processi molto importanti per il corretto funzionamento della catena fotosintetica, sono state individuate solo recentemente e il loro ruolo deve ancora essere compreso pienamente. In *Chlamydomonas reinhardtii* è stata isolata la prima chinasi che fosforila l'LHCII, la proteina Stt7 (Depège et al., 2003). In *Arabidopsis thaliana*, invece, sono state identificate sia la chinasi omologa Stn7, che fosforila il complesso antenna (Bellafiore et al., 2005), sia la chinasi che fosforila le proteine del centro di reazione del PSII, la proteina Stn8 (Bonardi et al., 2005; Vainonen et al., 2005). Lo studio in *Chlamydomonas* partì dall'analisi di mutanti con difetti nello stato di transizione, arrivando all'isolamento di mutanti difettivi nello stesso gene nucleare, codificante una Ser-Thr chinasi. Lo studio in *Arabidopsis* fu, invece, effettuato grazie all'uso di mutanti d'inserzione nei geni codificanti per Stn7 e Stn8, identificati mediante ricerche di similarità di sequenza con il gene *stt7* di *Chlamydomonas*.

2.2 Il ruolo del Plastochinone

Studi precedenti hanno identificato il plastochinone ridotto e il suo legame al sito Q_o del cyt *b₆f*, come il principale regolatore dell'attività delle chinasi che fosforilano questi due complessi della membrana tilacoidale. È stata infatti identificata un'attività chinasica, coinvolta nello stato di transizione, che comigra assieme al citocromo. Inoltre, mutanti nel sito Q_o, non presentano transizione del complesso antenna che resta quasi completamente in stato non fosforilato (Zito et al., 1999).

Il plastochinone ha un ruolo centrale nella catena di trasporto degli elettroni

perchè trasporta due elettroni persi dal PSII al *cyt b₆f*, sottoforma di atomi di idrogeno. Inoltre, prendendo due protoni dallo stroma, per formare i due atomi di idrogeno, contribuisce alla generazione del gradiente protonico della membrana tilacoidale, necessario per la produzione di ATP (cfr fig. 1.1). La forma completamente ridotta del plastoquinone, PQH₂, si dissocia dal PSII e raggiunge il *cyt b₆f* a cui si lega sul sito Q_o. Qui viene ossidato dal citocromo che passa successivamente gli elettroni alla plastocianina.

L'attivazione della chinasi è dovuta ad un processo dinamico che si verifica nella struttura del *cyt b₆f* in seguito al legame del plastoquinone al sito Q_o (Finazzi et al., 2001). Il processo avviene in due passaggi. Nel primo (step 1), il legame del plastoquinone induce il movimento della proteina Rieske dalla posizione lontana alla posizione vicina, rispetto al sito Q_o. Questo spostamento induce un cambiamento conformazionale all'intero citocromo che potrà all'attivazione della chinasi tramite cambiamenti nell'interazione proteina-proteina. Nel secondo (step 2), la proteina Rieske torna nella posizione lontana provocando il rilascio della chinasi attivata dal *cyt b₆f*, consentendole così di raggiungere l'LHCII.

2.3 Il ruolo della Tioredoxina

L'attività delle chinasi che fosforilano LHCII non è, però, controllata solo dallo stato redox del PQ tramite il suo legame al *cyt b₆f*, ma è regolata anche dalla riduzione e ossidazione di gruppi disolfuro regolatori da parte di proteine simili alla tioredoxina ma associate alle membrane tilacoidali (Martinsuo et al., 2003). Secondo il modello attuale (Rintamäki et al., 2000), l'LHCII chinasi è presente in tre stati, inattivo, attivo e inibito: quello prevalente tra questi, è determinato dallo stato redox del cloroplasto. La forma inattiva è presente in assenza di plastoquinone ridotto, o in presenza di plastoquinone ossidato, al sito Q_o del *cyt b₆f*. Si ipotizza che in questa condizione la chinasi stessa, e/o una proteina sensore di membrana non ancora identificata, presentino gruppi tiolo ossidati (ponti disolfuro) esposti in membrana. La chinasi è in forma attiva quando al sito Q_o è presente il PQH₂. In questa conformazione il ponte disolfuro regolatorio è nascosto all'interno della proteina, irraggiungibile da equivalenti riducenti. La forma inibita, infine, è indotta dalla presenza di equivalenti riducenti in grado di ridurre gruppi disolfuro, quindi da equivalenti "tioredoxina-like". Dato che i legami disolfuro regolatori sono esposti solo nella forma inattiva della chinasi, solo questa può essere inibita (Fig. 2.2).

La presenza di grandi quantità di plastoquinone ridotto porta all'attivazione della chinasi. Se il PQH₂ viene rapidamente ossidato dal *cyt b₆f*, però, la chinasi ritorna in forma inattiva e non andrà a fosforilare l'LHCII, dato che è attivo anche il PSI. Quando questo non si verifica la chinasi viene attivata e aziona la transizione del complesso antenna. In condizioni, invece, in cui è più attivo il PSI rispetto al PSII ci saranno poche molecole di PQH₂ e

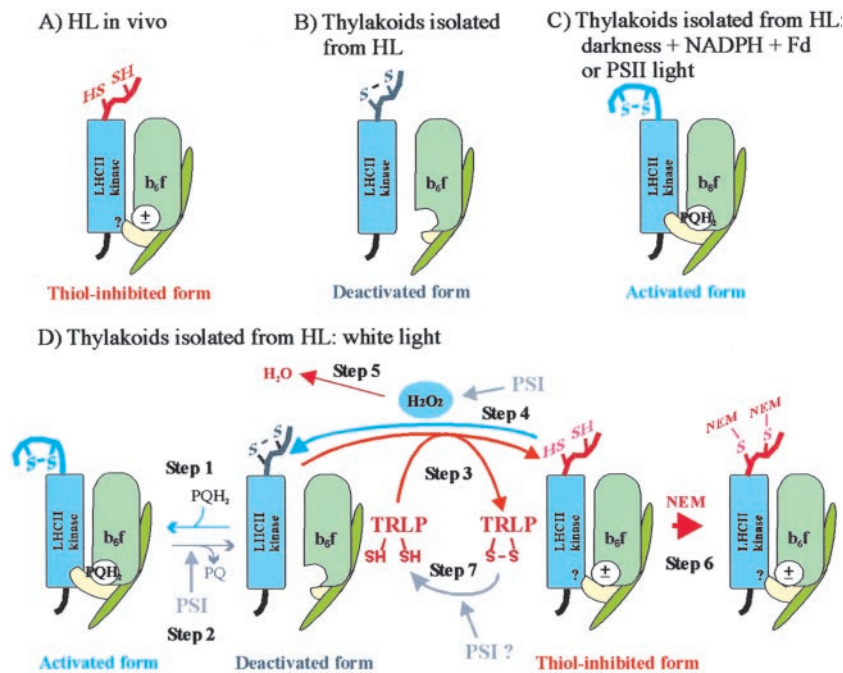


Figura 2.2: (A) La forma inibita della chinasi è predominante nei cloroplasti in *high light*, cioè in un ambiente altamente riducente, come in caso di una maggiore attività di PSI. (B) La forma inibita viene ossidata durante l'isolamento dei tilacoidi. In *high light* il pool di plastoquinone è ossidato e quindi la chinasi è inattiva. (C) Il pool di plastoquinone è ridotto, si è quindi in una condizione di maggiore attività del PSII e la chinasi viene, quindi, attivata. (D) Processo di attivazione-inattivazione-inibizione della chinasi di LHCII: (step1) attivazione della chinasi, maggiore attività di PSII, pool del plastoquinone ridotto; (step2) inattivazione della chinasi, normale attività dei due fotosistemi; (step3) inibizione della chinasi, maggiore attività di PSI, la proteina "tioredoxina-like" riduce il ponte disolfuro della chinasi; (step4) ossidazione della forma inibita la chinasi torna nella forma inattiva; (step 5 e 6) conferme sperimentali per rilevare la presenza della forma inibita; (step7) rigenerazione della proteina "tioredoxina-like". Immagine tratta da Martinsuo et al. (2003)

molte di tioredoxina ridotta. I legami disolfuro esposti dalla chinasi verranno ridotti, facendo passare la proteina nella forma inibita, impedendo l'inutile fosforilazione del complesso antenna, che resterà tutto al PSII garantendone l'attività.

L'esame delle strutture primarie e secondarie della chinasi finora identificate, mostra che solo la proteina Stn8 sembra avere un dominio all'N-terminale, esposto nel lumen tilacoidale, che potrebbe essere coinvolto nel rilevare la presenza di PQH_2 nel sito Q_0 del cyt b_6f (Vainonen et al., 2005). Le chinasi Stt7 e Stn7, d'altra parte, presentano dei residui di cisteine all'N-terminale, esposto nel lumen tilacoidale, che potrebbero essere coinvolte nel controllo redox (Vainonen et al., 2005). Ci sono, inoltre, evidenze di uno stato fosforilato della Stn7 (Bellafiore et al., 2005) il che potrebbe indicare possibili cascate di fosforilazione per l'attivazione della chinasi stessa.

Capitolo 3

Controllo della trascrizione

3.1 Controllo della trascrizione dei geni plastidiali

In situazioni di squilibrio tra le attività dei due fotosistemi, il PQ media, quindi, la risposta a breve termine promuovendo lo stato di transizione di LHCII. Il plastoquinone controlla, però, anche la stechiometria dei due fotosistemi, modificando l'espressione dei geni codificanti le proteine dei centri di reazione dei due fotosistemi. È questa una risposta a lungo termine (Pfannschmidt et al., 1999a,b).

Esperimenti di misurazione della trascrizione nei plastidi in vivo con sonde per *psaAB*, gene che codifica le proteine PsaA e PsaB del centro di reazione del PSI, e con sonde per *psbA*, gene che codifica D1 la proteina del centro di reazione di PSII, evidenziano questo fatto. Utilizzando la sonda per *psaAB*, plastidi cresciuti in condizioni di eccitazione maggiore del PSI, danno livelli di trascrizione inferiori rispetto a plastidi cresciuti in condizioni di luce che ecciti preferenzialmente il PSII. Misurando invece la trascrizione con la sonda per il *psbA* mRNA si hanno risultati opposti: i plastidi cresciuti sotto luce che ecciti il PSI danno più alti livelli di trascrizione (Pfannschmidt et al., 1999a).

Si nota quindi che a seconda della qualità della radiazione luminosa viene aumentata la sintesi delle proteine di uno o dell'altro fotosistema. Un'eccitazione preferenziale del PSI risulterà in una maggiore sintesi di D1, aumentando così la quantità di PSII, mentre una maggiore attività del PSII promuoverà la produzione di nuovi centri di reazione del PSI. Inoltre viene contemporaneamente repressa l'espressione dei geni codificanti le proteine del centro di reazione del fotosistema più attivo. I cloroplasti, modificando in questo modo la stechiometria tra i due fotosistemi, riescono a riequilibrare il flusso di elettroni attraverso la catena fotosintetica. Questi cambiamenti nell'espressione genica avvengono nell'arco di pochi minuti garantendo così una veloce risposta dell'organello ai cambiamenti di luminosità (Pfannschmidt et al., 1999a).

Il ruolo chiave del plastoquinone si esplica probabilmente attraverso un'estensione del meccanismo di controllo che esercita sulla risposta a breve termine, lo stato di transizione. Infatti, esperimenti con inibitori della riduzione (DCMU) o dell'ossidazione (DBMIB) del pool di PQ, mimano gli effetti che avrebbero sul plastoquinone diverse attività dei due fotosistemi. I cambiamenti che si osservano nella trascrizione e nella seguente modificazione della stechiometria

dei fotosistemi, sono identici a quelli osservati *in vivo* nei plastidi cresciuti a diversa luce incidente (Pfannschmidt et al., 1999a).

3.1.1 TSP9

La proteina TSP9 (*thylacoid soluble phosphoprotein of 9 kDa*), una proteina periferica della membrana tilacoidale, era ritenuta un possibile fattore di traduzione per il controllo della trascrizione. Si era, infatti, osservato che la proteina possedeva un possibile dominio di legame al DNA e si dissociava dalla membrana in seguito a riduzione da parte del plastochinone. Un recente studio ha confermato questa ipotesi (Carlberg et al., 2003). La fosforilazione di questa proteina, da parte di una chinasi associata alla membrana, risponde allo stato redox del pool del plastochinone. L'aggiunta di tre gruppi fosfato su tre treonine bersaglio, provoca il rilascio di TSP9 dalla membrana. Alcune caratteristiche di questa proteina come il punto isoelettrico o la differenza nei residui fosforilati in proteine omologhe, entrambe caratteristiche delle proteine leganti gli acidi nucleici, fanno pensare che TSP9 sia coinvolta in un qualche stadio iniziale dell'espressione genica (trascrizione o traduzione) (Carlberg et al., 2003).

3.1.2 RNA Polimerasi plastidiali e PTK

Un'altra possibile via per il controllo redox della trascrizione, è la regolazione di una chinasi associata all'apparato di trascrizione plastidiale. L'enzima PEP-A è l'RNA polimerasi maggiormente attiva nei cloroplasti ed è responsabile della trascrizione redox dipendente dei geni fotosintetici (Link, 2003). Essendo omologa alle polimerasi batteriche la specificità di riconoscimento delle sequenze promotrici le viene conferita dall'associazione con proteine simili ai fattori sigma (*SLF Sigma Like Factor*) (Allison, 2000).

Una delle numerose proteine associate a PEP-A è la chinasi detta PTK (*plastid transcription kinase*). Proteina omologa alle chinasi CK2 citosoliche (*casein kinase*), è codificata nel nucleo (Ogrzewalla et al., 2002) e fosforila su residui di serina sia gli SLF sia la polimerasi stessa (Baginsky et al., 1997, 1999). L'aggiunta di gruppi fosfato sugli SLF o sull'enzima si traduce in un cambiamento nella trascrizione: la fosforilazione *in vitro* degli SLF caratteristici dei cloroplasti, li converte in una forma ezioplasto-specifica, che riconosce cioè i promotori altrimenti riconosciuti dagli SLF ezioplastici (Tiller and Link, 1993). La fosforilazione della polimerasi risulta, invece, in un cambiamento di attività (Baena-González et al., 2001): la trascrizione dei geni fotosintetici diminuisce, mentre aumenta quella degli altri geni (risposta a stress ossidativo).

L'attività di PTK, *in vitro*, è regolata in modo antagonistico dallo stato di fosforilazione e dallo stato redox di gruppi tiolo. L'enzima non fosforilato è attivo ma viene inibito dalla riduzione con glutatione ridotto, GSH, mentre l'en-

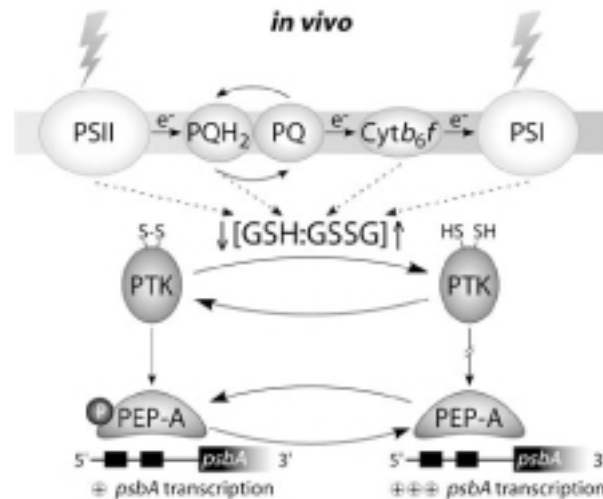


Figura 3.1: Controllo redox della trascrizione di *psbA*: i livelli di GSH e GSSG sono influenzati sia dalla quantità di luce che arriva ai fotosistemi sia da altri fattori, come la concentrazione di specie ROS. Un elevato rapporto GSH/GSSG porta alla riduzione dei legami disolfuro regolatori su PTK, e quindi alla sua inibizione; questo si traduce in una maggiore affinità di PEP-A per il promotore di *psbA*, e quindi in un'elevata quantità di trascritto. Un minore rapporto GSH/GSSG porta, invece, all'ossidazione dei legami disolfuro regolatori su PTK e quindi alla sua attivazione; PTK può allora fosforilare PEP-A diminuendo la sua affinità per il promotore di *psbA*. Immagine tratta da Pfannschmidt and Liere (2005).

zima fosforilato è inattivo ma è riattivato dal trattamento con GSH (Baginsky et al., 1999). Non ci sono evidenze *in vivo* di un meccanismo di fosforilazione di PTK ma il fatto che la sua attività venga regolata *in vitro* anche dal trattamento con chinasi, fa credere che possa esserci una cascata di fosforilazione che venga attivata da sensori attivi nel cloroplasto (Baginsky et al., 1999).

Il controllo dell'attività di PTK da parte del glutatione ridotto ha, invece, un riscontro più concreto *in vivo*. In situazioni di stress ossidativo come in condizioni di elevata luminosità, il GSH si ossida aumentando così il pool di GSSG. In queste condizioni viene aumentata l'espressione dei geni di difesa in risposta alla situazione di stress, mentre viene diminuita quella dei geni fotosintetici. Questo avviene perchè la chinasi attivata dal GSSG fosforila la polimerasi diminuendone l'affinità per i promotori dei geni fotosintetici, che verranno quindi trascritti ad un basso livello. Una volta terminata la situazione di stress, il livello di GSH aumenta portando all'inibizione di PTK. Questo si traduce in una maggiore trascrizione dei geni fotosintetici, condizione necessaria per riattivare la fotosintesi (Baginsky et al., 1999). Questo meccanismo di regolazione implica però che PTK sia nello stato defosforilato, lo stato, cioè, suscettibile all'inibizione da GSH (Fig. 3.1).

3.2 Controllo della trascrizione dei geni nucleari codificanti proteine fotosintetiche

Nel nucleo sono codificate molte delle proteine plastidiali tra cui anche numerose subunità dei complessi fotosintetici. Come già detto l'espressione di questi geni deve essere coordinata con quella dei geni plastidiali codificanti le altre subunità. L'espressione dei geni nucleari risente dell'attività fotosintetica (Fey et al., 2005; Piippo et al., 2006). Per molto tempo si è pensato che il plastochinone potesse essere il primo responsabile del controllo esercitato dalla catena di trasporto fotosintetica sull'espressione dei geni nucleari, dato che l'espressione dei geni di LHCI, seguiva lo stato redox di questo trasportatore di elettroni centrale nel trasporto elettronico (Fey et al., 2005).

Nelle piante superiori un recente lavoro (Piippo et al., 2006) ha dimostrato che il plastochinone non è la fonte del messaggio che, dal cloroplasto, controlla l'espressione nucleare nemmeno per quanto riguarda l'espressione dei geni del complesso antenna di PSII. Composti che sembrano coinvolti con questo *signaling* al nucleo, sono lo stato redox di alcune molecole stromali, probabilmente generate dal PSI, alcuni intermedi della via di fissazione del carbonio o ancora, il rapporto ATP/ADP, mentre il glutatione sembra coinvolto solo nell'espressione dei geni per la difesa. Un altro caso è l'inibizione dell'espressione dei geni nucleari per la biosintesi della clorofilla che è promossa proprio da un intermedio della via la magnesio protoporfirina 9. Questo meccanismo, però, agisce durante lo sviluppo del cloroplasto, e non nel normale stato fisiologico; inoltre, non controlla geni appartenenti alla catena di trasporto fotosintetica.

I messaggeri centrali in questo *signaling*, fisiologico per il continuo *turnover* delle proteine fotosintetiche, dal cloroplasto al nucleo, sembrano essere lo stato redox di specie a valle del PSI, con un minimo o nullo coinvolgimento del plastochinone, e molecole coinvolte nel segnalare il livello di attività della fissazione del carbonio (Piippo et al., 2006).

Capitolo 4

Controllo della Traduzione

Molti dei trascritti prodotti nei cloroplasti si accumulano al buio a livelli relativamente alti, che non cambiano in modo rilevante con l'esposizione alla luce. Devono quindi esserci dei meccanismi di controllo posttrascrizionali che spieghino l'aumento di sintesi proteica osservato in condizioni di luminosità (Malnoë et al., 1988). Questi controlli agiscono nelle diverse fasi del processamento posttrascrizionale degli RNA plastidiali. Ben studiati sono i processi che avvengono nella regolazione dell'inizio della traduzione di *psbA*, il gene codificante la subunità D1 del PSII. Altri controlli operano durante la fase di allungamento delle proteine nascenti. Ci sono, però, anche sistemi di controllo a monte della traduzione come la regolazione dello splicing degli mRNA, o la regolazione di stabilità e degradazione dei trascritti.

L'osservazione che il DTT, che presenta due gruppi sulfidrici vicini, interferisce con la stabilità degli RNA in *C. reinhardtii*, ha fatto supporre che la tioredoxina sia coinvolta nella regolazione di un qualche apparato proteico che controlli la stabilità degli RNA (Salvador and Klein, 1999) proteggendoli, o in alternativa promuovendone la degradazione.

4.1 p54

p54 è una 3' endoribonucleasi plastidiale, coinvolta nel processamento dei trascritti *trnK* e *rps16* (codificanti rispettivamente il tRNA^{Lys} e la proteina ribosomiale CS19) e di un RNA bicistronico contenente i geni *trnK* e *psbA* (Nickelsen and Link, 1993). Il trascritto di *psbA* originato da questo taglio è più lungo di quello che si origina a partire dal promotore del gene: questa regione addizionale al 5' potrebbe essere coinvolta nella regolazione della traduzione di questo mRNA. L'attività di p54 è controllata sia dallo stato fosforilato che dallo stato redox tramite l'azione del glutatione (Liere and Link, 1997). La fosforilazione sembra essere un prerequisito per la successiva attivazione da parte del glutatione ossidato, dato che solo così, *in vitro*, si ha una sua efficiente attivazione. Questo potrebbe essere dovuto ad un cambiamento conformazionale che avviene in conseguenza alla fosforilazione (Nickelsen and Link, 1993).

4.2 Controllo della fase di inizio della traduzione

Il modello più studiato di regolazione posttrascrizionale è la traduzione dell'mRNA di *psbA*, trascritto che si accumula anch'esso al buio. Cellule cresciute in assenza di luce presentano livelli relativamente alti di proteine di legame a questo mRNA, a cui si legano però con bassa affinità. Trasferendo queste cellule alla luce si ha un aumento elevato dell'attività di legame all'mRNA, senza che ci sia però un corrispondente aumento di sintesi proteica. Questo indica una dipendenza dalla luce di questa attività di legame (Malnoë et al., 1988). È stato identificato un complesso costituito dalle quattro proteine RB47, RB60, RB38 e RB55, che si lega al 5'-UTR (*untranslated region*) dell'mRNA di *psbA* in modo luce dipendente (Danon and Mayfield, 1991) e che attiva la sua traduzione.

RB47 è una proteina codificata nel nucleo che media il legame al trascritto dell'intero complesso: si lega, infatti, ad una sequenza di 36 nucleotidi, con conformazione a forcina, adiacente e a monte del sito di legame dei ribosomi (Danon and Mayfield, 1991). Questa proteina è omologa alle proteine di legame al poli-A (PABPs *poly-A binding proteins*) (Yohn et al., 1998) caratteristiche degli apparati di traduzione eucariotici e infatti, nel sito di legame sull'mRNA è presente un corto poli-A che si è visto essere indispensabile per la traduzione di *psbA* (referenze in (Yohn et al., 1998)).

Studi successivi hanno correlato la dipendenza dell'attività di legame al trascritto di *psbA* con lo stato redox e lo stato fosforilato del complesso. La forma ossidata e la forma ridotta di RB47 hanno, infatti, diversa capacità di legame: la prima è inibita e non si lega al sito sul 5'UTR, mentre la seconda ha attività di legame (Kim and Mayfield, 1997). RB60 è stata poi identificata come la responsabile sia dell'attivazione redox dipendente di RB47, sia della dipendenza dell'attività di legame dallo stato fosforilato (Danon and Mayfield, 1994; Kim and Mayfield, 1997).

RB60 è una proteina disolfuro isomerasi e presenta, quindi, un gruppo disolfuro esposto, facilmente ossidabile e riducibile. Viene ridotta direttamente dall'enzima ferredoxina-tioredoxina ossidoreduttasi (FTR) e passa gli equivalenti riducenti a RB47 (Kim and Mayfield, 1997; Terbitsh et al., 2000). Anche questa ha come gruppo redox bersaglio un ponte disolfuro esposto. La presenza di gruppi tiolo vicini su entrambe le proteine spiega l'utilizzo dell'FTR invece che di semplici equivalenti riducenti, che non attivano il complesso. RB60 è anche sensibile alla fosforilazione che inibisce la sua attività di disolfuro isomerasi riducendo così l'attività di legame al *psbA* mRNA e quindi la sua traduzione (Danon and Mayfield, 1994; Kim and Mayfield, 1997; Terbitsh et al., 2000). La chinasi che fosforila RB60 è ADP-dipendente ed è attiva, quindi, solo ad alte concentrazioni di ADP (Danon and Mayfield, 1994). Questo si verifica solo al buio quando non c'è produzione fotosintetica di ATP e la quantità di ADP sale. La concentrazione di ADP è quindi essa stessa il segnale

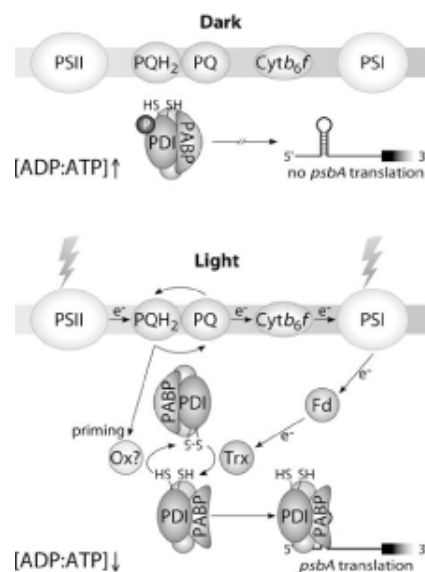


Figura 4.1: Al buio, **Dark**, non si ha traduzione dell'mRNA di *psbA* in quanto il rapporto ADP/ATP è elevato e RB60 (in figura PDI *protein disulfide isomerase*) è fosforilata dalla chinasi ADP dipendente e il complesso di legame all'mRNA è, quindi, inattivo. Alla luce, **Light**, il rapporto ADP/ATP è minore e la chinasi ADP dipendente è quindi inattiva. RB60 è attiva e può (non mostrato in figura) ridurre RB47 (in figura PABP *poly-A binding protein*) che andrà a legarsi all'mRNA di *psbA*, consentendone la traduzione. Immagine tratta da Pfannschmidt and Liere (2005).

che indica quando deve essere inibita la sintesi di D1, dato che è uno spreco sintetizzarla al buio situazione in cui non viene danneggiata dalla luce.

Quindi, mentre RB47 è la proteina che media il legame all'RNA, RB60 è la proteina regolatrice dell'attività dell'intero complesso: i sistemi di controllo convergono su questa proteina che controlla a sua volta il legame all'mRNA e quindi la successiva sintesi di D1. I meccanismi di controllo che agiscono sulla traduzione di *psbA* sono, infatti, due e sono entrambi regolati dai fotosistemi (PSI e PSII) (Terbitsh and Danon, 2001) (Fig. 4.1). Il segnale proveniente dal PSI si trasmette attraverso il potenziale redox con la riduzione della ferredoxina e successivamente di RB60 e RB47. Il segnale proveniente dal PSII si realizza ancora una volta attraverso lo stato redox del pool di plastochinone. Questo segnale, detto di *priming*, non è ancora stato identificato ma agisce con cascate di fosforilazione/defosforilazione in cui è probabilmente coinvolta la chinasi ADP-dipendente che fosforila RB60 (Terbitsh et al., 2000). Questo segnale è detto di *priming* perchè la sua azione è richiesta affinché il controllo redox sulla traduzione di *psbA* possa aver luogo (Kim and Mayfield, 1997; Terbitsh and Danon, 2001).

I due sistemi di controllo assicurano che la sintesi di D1 sia regolata sia dal corretto funzionamento della catena di trasporto (segnale redox da PSI), sia dall'attività relativa dei due fotosistemi (segnale di *priming* attraverso PQ). Inoltre, entrambe le vie vengono influenzate dal complessivo stato redox e biochimico del cloroplasto portando così ad un'integrazione elevata della sintesi

di D1 nell'intero metabolismo dell'organello (Terbitsh and Danon, 2001).

RB47 è stata isolata associata alle membrane tilacoidali (Zerges and Rochaix, 1998): questo è in linea con il fatto che la sintesi di D1 avvenga contemporaneamente al suo inserimento in membrana (Zerges, 2000) e identifica RB47 come la proteina che “ancora” l'mRNA di *psbA* alle membrane tilacoidali.

Capitolo 5

Regolazione delle attività enzimatiche nello stroma

L'assimilazione del carbonio nei carboidrati, tramite la cosiddetta “fase oscura” della fotosintesi e la successiva ossidazione di questi per produrre energia, avvengono entrambe nello stroma dei cloroplasti. Occorre, quindi, un sistema di controllo che spenga una delle due vie metaboliche mentre l'altra è accesa e viceversa, evitando così dei cicli futili che porterebbero solo a sprechi di energia. La luce è il segnale che controlla l'attività di enzimi chiave delle due vie, garantendone quindi la regolazione. Di giorno, infatti, gli enzimi della via biosintetica sono attivi, mentre quelli della via di degradazione vengono disattivati (Buchanan and Balmer, 2005). Il controllo da parte della luce si esplica attraverso due meccanismi, il pH e lo stato redox di ponti disolfuro sugli enzimi chiave.

Il pH aumenta nello stroma a causa del passaggio dei protoni nel lumen innescato dal flusso di elettroni nella catena di trasporto (vedi Fig. 1.1). Due esempi di enzimi della via di biosintesi sensibili al pH sono la Rubisco, la cui velocità di attivazione aumenta in ambiente alcalino e la fruttosio 1,6-bisfosfatasi la cui attività è di 100 volte più elevata con il pH stromale diurno (circa 8 nello stroma e 5 nel lumen).

Il controllo redox agisce, invece, tramite la tioredoxina. Gli enzimi della via biosintetica sono attivati tramite riduzione dei disolfuro regolatori e disattivati da ossidazione. Gli enzimi della degradazione dei carboidrati sono regolati in modo opposto, vengono cioè attivati da ossidazione e disattivati tramite riduzione (Buchanan and Balmer, 2005). Queste due vie del controllo redox, l'attivazione e l'inibizione tramite riduzione di legami disolfuro bersaglio, sembra siano mediate separatamente dalle due prevalenti tioredoxine cloroplastiche (vedi Fig. 1.2). La tioredoxina *f* funzionerebbe principalmente nell'attivazione enzimatica, mentre la tioredoxina *m* nella deattivazione enzimatica (Schürmann and Jacquot, 2000).

5.1 Regolazione degli enzimi del ciclo di Calvin

Gli enzimi del ciclo di Calvin regolati tramite lo stato redox, sono tutti coinvolti nell'ultima tappa del ciclo, la terza fase, che porta alla rigenerazione del ribulosio 1,5-bisfosfato e i cui intermedi metabolici sono condivisi con altre importanti *pathways* del cloroplasto tramite la via dei pentosi fosfato. Questi

enzimi sono: la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, la fruttosio 1,6 bisfosfatasi, la fosforibulochinasi e la sedoheptulosio 1,7 bisfosfatasi. Ognuno di essi controlla una reazione irreversibile e quindi, una volta attivati consentono l'intero proseguimento del ciclo. La loro riduzione avviene, come già detto, alla luce tramite l'azione della tioredoxina f che viene ridotta dal PSI. In questo modo è resa possibile la conversione dell'energia luminosa, accumulata dal flusso elettronico nella catena fotosintetica, in energia chimica sottoforma di carboidrati di nuova sintesi.

Un altro enzima coinvolto nel ciclo di Calvin che sembra essere sottoposto a controllo redox è la Rubisco attivasi, una proteina che promuove l'attivazione della Rubisco, ponendo così un punto di regolazione, da parte dello stato redox, anche all'inizio della via di assimilazione del carbonio (Schürmann and Jacquot, 2000).

L'isoforma cloroplastica dell'enzima glucosio 6-fosfato deidrogenasi catalizza la prima tappa della via dei pentosi fosfati, nel cloroplasto, ed è sottoposto a controllo redox (Schürmann and Jacquot, 2000). Lo stato ridotto di questo enzima è inattivo e porta quindi ad un blocco dell'intera via metabolica. In questo modo, nei cloroplasti, la via dei pentosi fosfati è inibita alla luce in quanto condivide molti enzimi con la terza fase del ciclo di Calvin ma procede in verso opposto a questa. La via è, invece, attiva di notte quando rappresenta una fonte di ribosio e di NADPH. Inoltre di giorno non è necessaria la produzione di NADPH tramite la reazione catalizzata dalla glucosio 6-fosfato deidrogenasi, in quanto viene già prodotto in grande quantità dalla fotosintesi.

5.2 Regolazione redox della sintesi dell'amido

La sintesi primaria dell'amido avviene nello stroma dei cloroplasti. Il substrato di partenza è l'ADP-glucosio, che viene aggiunto tramite l'enzima amido sintasi, a molecole di amido già esistenti, come avviene per la sintesi del glicogeno nei mammiferi. L'enzima che produce l'ADP-glucosio è l'ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPasi). Questo enzima, centrale quindi nella sintesi dell'amido, è sottoposto a controllo redox (Fu et al., 1998). La riduzione del ponte disolfuro regolatore è necessaria per l'attivazione dell'enzima e avviene infatti, prima del legame dei substrati che danno luogo, invece, al cambiamento conformazionale che attiva effettivamente l'enzima.

Il fatto che l'attivazione avvenga attraverso riduzione indica che la sintesi di amido è attiva mentre è attivo anche il ciclo di Calvin, che infatti produce la gliceraldeide 3-fosfato, composto di partenza per la sintesi del glucosio. Non è ancora certo quale sia la tioredoxina che media la riduzione dell'AGPasi, anche se sia la f che la m attivano l'enzima *in vitro* (Geigenberger et al., 2005). Lo studio sull'AGPasi di Fu et al. (1998) riguarda i tessuti di riserva della pianta di patata, ma il meccanismo di regolazione può essere esteso anche all'isoforma dei tessuti fogliari (Geigenberger et al., 2005).

La proteina cloroplastica DSP4 (*Dual-specificity Protein Phosphatase*) di *Arabidopsis thaliana* è una fosfatasi coinvolta, secondo un recente lavoro di Sokolov et al. (2006), nell'accumulo dell'amido. In mutanti in cui l'espressione di *DSP4* è nulla, l'accumulo di amido è più di 2,5 volte maggiore rispetto al *wild type*. Lo stesso studio ha evidenziato, inoltre, che questa proteina è associata, in modo luce-dipendente, ai granuli di amido. Non è stato, però, chiarito se la capacità di legame sia influenzata dallo stato redox o dalla variazione del pH. Sembra certo, invece, che l'attività fosfatasi di DSP4 sia regolata dallo stato redox, in quanto il trattamento dell'enzima con glutatione ossidato o H_2O_2 , inibiscono questa attività. Sembra quindi che la fosfatasi DSP4 sia centrale nell'integrare il controllo redox e la regolazione per fosforilazione nel metabolismo dell'amido. La fosforilazione di proteine bersaglio gioca, infatti, un ruolo importante nella sintesi e nella degradazione dell'amido e DSP4 è, attualmente, l'unica proteina nota in cui convergono questi due meccanismi di controllo.

Capitolo 6

Ipotesi di regolazione delle attività enzimatiche nel lumen

Le membrane tilacoidali formano un complesso di dischi intercalari e stromali al cui interno è racchiuso un unico e continuo scompartimento cellulare, il lumen. Oltre ad ospitare il complesso che evolve ossigeno e quindi la collaterale produzione di potenti agenti ossidanti, nel lumen vengono accumulati i protoni pompato dalla catena di trasporto fotosintetica degli elettroni, portando, così, il pH a livelli molto bassi, tra 4,5 e 6. Solo recenti studi di proteomica in *Arabidopsis thaliana* hanno dimostrato che numerose proteine sono localizzate in questo compartimento, ancora pochissimo conosciuto (Schubert et al., 2002): dieci di queste appartengono alla famiglia delle immunofiline.

6.1 Le Immunofiline

Le immunofiline sono proteine ubiquitarie, inizialmente studiate nei mammiferi in quanto coinvolte nell'immunosoppressione. Vengono suddivise, a seconda del ligando che riconoscono, in due famiglie: le ciclofiline e le FKBP. Le immunofiline in seguito al legame con ciclosporina A, ligando delle ciclofiline, e FK-506, ligando delle FKBP (FK506 *Binding Protein*), sequestrano e inibiscono la calcineurina, proteina centrale nell'attivazione dei geni responsabili della risposta immunitaria. Hanno attività di PPIasi (vedi dopo) e si ritiene che in seguito al legame del ligando siano in grado di scatenare l'immunosoppressione (Romano et al., 2005).

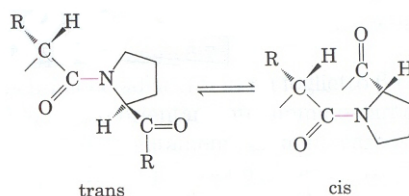


Figura 6.1: Isomeri *trans* e *cis* del legame peptidico a cui partecipa l'azoto imminico della prolina. Immagine tratta da *I principi di biochimica di Lehninger - terza edizione*, Nelson and Cox, Zanichelli, 2002.

L'azione enzimatica delle immunofiline è quella di catalizzare l'isomerizzazione dei legami peptidici della prolina, grazie alla loro attività peptidilprolil *cis-trans* isomerasi (PPIasi). Diversamente dagli altri legami peptidici

nelle proteine, per i quali l'isomero *trans* è nettamente favorito, nel caso del legame X-Pro la frequenza dei legami *cis-trans* è di 1:4 (Fig. 6.1). Ovvero nella formazione di questo legame esiste un'alta probabilità che si formi l'isomero "sbagliato". Nel processo di ripiegamento delle proteine dalla conformazione primaria alla conformazione tridimensionale nativa, l'isomerizzazione di questi legami è un processo di per sè molto lento e l'intervento dell'attività PPIasica delle immunofiline lo favorisce.

Queste proteine hanno, però, un ruolo molto più ampio e non ancora del tutto conosciuto, anche se pare che ogni immunofilina abbia funzione e bersaglio precisi nel metabolismo cellulare. Questa ipotesi è basata sul fatto che sequenze e strutture tridimensionali delle diverse immunofiline, divergono molto tra loro pur mantenendo conservato il sito di legame per il substrato. Le funzioni cellulari, in piante o animali, in cui è dimostrato il coinvolgimento delle immunofiline sono: il traffico proteico, il controllo del ciclo cellulare, la risposta agli shock termici, la regolazione di recettori canali e pori di membrana e il ripiegamento proteico.

6.2 AtFKBP13

AtFKBP13 è un'immunofilina lumenale di *Arabidopsis thaliana* di cui si conosce sia il meccanismo di controllo dell'attività sia una parte del ruolo che ricopre nel cloroplasto. Questa immunofilina, infatti, interagisce con la proteina Rieske, una componente del citocromo *b₆f* (Gupta et al., 2002). Le due proteine sarebbero associate lungo la via di targeting cellulare, cioè nel citosol e nello stroma, per poi dissociarsi nel lumen tilacoidale una volta eliminato il peptide di transito. Il modello proposto spiega l'interazione tra le due proteine come un meccanismo di regolazione della quantità di proteina Rieske in membrana in quanto il legame tra le due proteine AtFKBP13 sequestrerebbe la proteina Rieske in eccesso, nel citoplasma o nello stroma.

L'attività PPIasica di AtFKBP13 è sensibile allo stato redox e infatti, la proteina presenta due legami disolfuro esposti al solvente (Gopalan et al., 2004). Il trattamento della proteina con agenti riducenti provoca una diminuzione dell'attività catalitica. La proteina attiva è quindi, quella in forma ossidata, anche se la semplice aggiunta di equivalenti ossidanti alla proteina purificata non è sufficiente a ripristinarne l'attività, il che fa credere ad un'attivazione controllata enzimaticamente (Shapiguzov et al., 2006). Questa proteina, inoltre, è attiva anche a pH 5 caratteristica che indica il suo adattamento al lumen tilacoidale (Gopalan et al., 2004).

Un'ipotesi che riunisce il controllo redox dell'attività PPIasica di AtFKBP13 e la sua interazione con la proteina Rieske implica stati ridotti e ossidati dell'immunofilina matura e immatura (Romano et al., 2005). Nel citosol il precursore ossidato opera come chaperone mantenendo la Rieske in una forma inattiva e solubile trasportandola fino allo stroma. Qui, in presenza di condizioni che

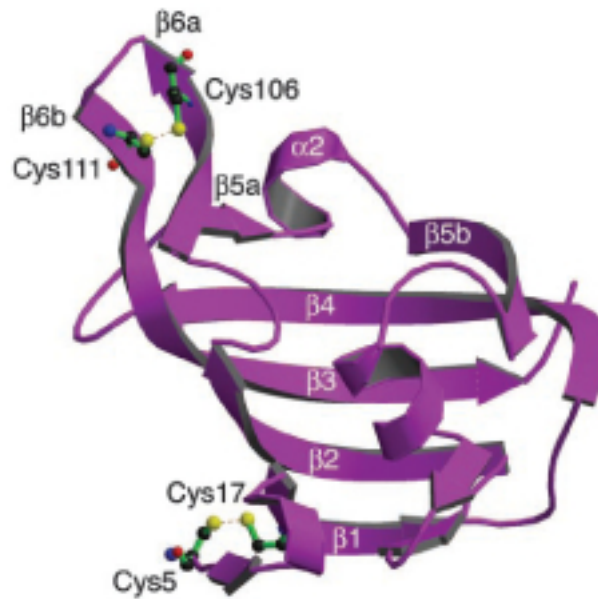


Figura 6.2: Struttura tridimensionale di un monomero di AtFKBP13, sono visibili in giallo i quattro residui di cisteina che formano i due ponti disolfuro. Immagine tratta da Gopalan et al. (2004).

promuovono l'assemblaggio di nuovo citocromo b_6f , AtFKBP13 viene ridotta dalla tioredoxina e il complesso AtFKBP13-Rieske si inserisce nella membrana tilacoidale. Successivamente l'immunofilina si dissocia e viene traslocata nel lumen perdendo così il peptide di transito. Qui, nella sua forma matura l'attività PPIasica può venire attivata tramite ossidazione e catalizzare così il ripiegamento delle proteine, del lumen o delle membrane tilacoidali, danneggiate dagli agenti ossidanti così comuni nei tilacoidi (Shapiguzov et al., 2006).

6.3 Ipotesi di controllo dell'attività enzimatica nel lumen

Unicamente sulla base degli studi sulla proteina AtFKBP13, Buchanan e Luan (2005) hanno avanzato una proposta di controllo redox sull'attività delle proteine localizzate nel lumen. Anche se sarà necessario attendere una conferma da studi in corso, il controllo redox nel lumen potrebbe coinvolgere non solo AtFKBP13 ma anche le altre immunofiline o enzimi biosintetici di questo compartimento. Tutte queste proteine verrebbero attivate tramite ossidazione al contrario di quanto avviene nello stroma, dove gli enzimi degradativi sono attivati da ossidazione mentre gli enzimi biosintetici vengono attivati tramite riduzione.

AtFKBP13 e le altre proteine lumenali sotto controllo redox verrebbero ridotte nello stroma e nel citoplasma, dove vengono di fatto sintetizzate, dalla tioredoxina e quindi dal fotosistema I. Nella forma ridotta risulterebbero inat-

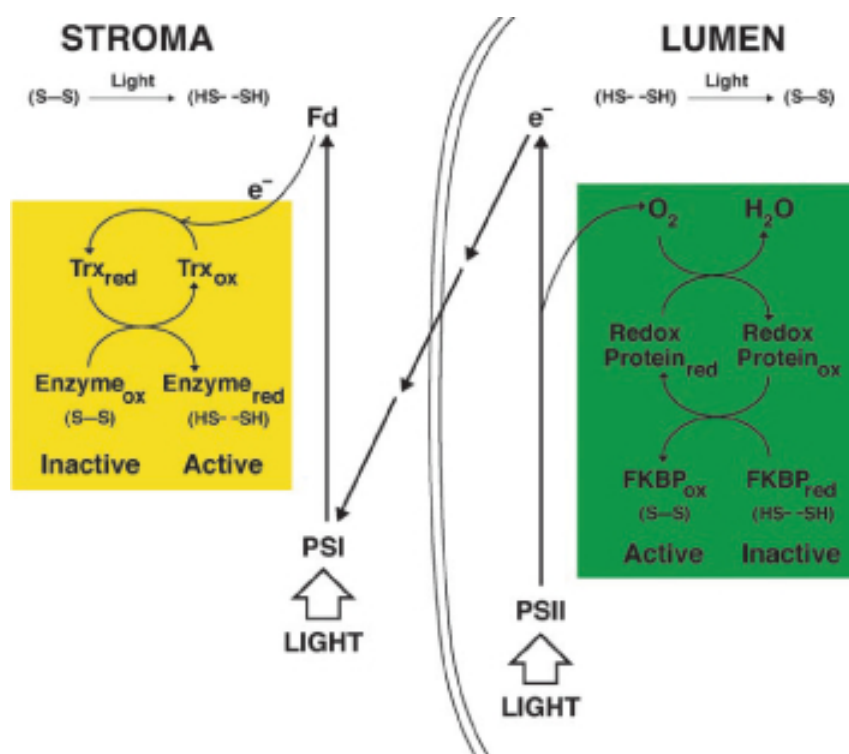


Figura 6.3: Schema proposto da Gopalan et al. (2004) per il controllo redox di AtFKBP.

tive mentre, una volta importate nel lumen, sarebbero ossidate direttamente o attraverso l'azione di una proteina sensibile allo stato redox, dalle specie reattive dell'ossigeno generate dalle reazioni che avvengono al fotosistema II (Fig 6.3) (Buchanan and Luan, 2005).

La risposta degli enzimi regolatori ai cambiamenti nello stato redox dipende quindi, in generale, dal potenziale redox del compartimento in cui si trovano. In un ambiente riducente, come lo stroma durante la fase luminosa, gli enzimi sottoposti a controllo redox la cui attività è necessaria in ambiente riducente, vengono attivati tramite riduzione. Allo stesso modo, di notte, in ambiente ossidante, gli enzimi degradativi vengono attivati tramite ossidazione per produrre energia. Infine nel lumen, che presenta un ambiente molto ossidante di giorno, gli enzimi necessari verrebbero attivati proprio tramite ossidazione.

Bibliografia

- J.F. Allen. State transitions—a question of balance. *Science*, 299:1530–1532, 2003.
- L.A. Allison. The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82: 537–548, 2000.
- E.M. Aro and I. Ohad. **Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation.** *Antioxidants Redox Signaling*, 5:55–67, 2003.
- E. Baena-González, S. Baginsky, P. Mulo, H. Summer, E.M. Aro, and G. Link. Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant Physiology*, 127:1044–1052, 2001.
- E. Baena-González, R. Barbato, and E.M. Aro. Role of phosphorylation in repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta*, 208:196–204, 1999.
- S. Baginsky, K. Tiller, and G. Link. Transcription factor phosphorylation by protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Molecular Biology*, 34:181–189, 1997.
- S. Baginsky, K. Tiller, T. Pfannschmidt, and G. Link. PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid *in vitro* transcription. *Plant Molecular Biology*, 39:1013–1023, 1999.
- A. Barkan and M. Goldschmidt-Clermont. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, 82:559–572, 2000.
- D. Barnes and S.P. Mayfield. **Redox control of posttranscriptional processes in the chloroplast.** *Antioxidants Redox Signaling*, 5:89–94, 2003.
- S. Bellafiore, F. Barneche, G. Peltier, and J.D. Rochaix. State transitions and light adaptation require chloroplast thylacoid protein kinase STN7. *Nature*, 433:892–895, 2005.
- V. Bonardi, P. Pesaresi, T. Becker, E. Schleiff, R. Wagner, T. Pfannschmidt, P. Jahns, and D. Leister. Photosystem II phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 437:1179–1182, 2005.

- B.B. Buchanan and Y. Balmer. **Redox regulation: a broadening horizon.** *Annual Review Plant Biology*, 56:187–220, 2005.
- B.B. Buchanan and S. Luan. Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. *J. Experimental Botany*, 56:1439–1447, 2005.
- I. Carlberg, M. Hansson, T. Kieselbach, P.S. Wolfgang, A. Bertil, and A.V. Vener. A novel plant protein undergoing light-induced phosphorylation and release from the photosynthetic thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:757–762, 2003.
- A. Danon and S.P. Mayfield. ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding *in vitro*: implications in light modulated translation. *EMBO J.*, 13:2227–2235, 1994.
- A. Danon and S.P.Y. Mayfield. Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.*, 10:3993–4001, 1991.
- N. Depège, S. Bellafiore, and J.D. Rochaix. Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHClI phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, 299:1572–1575, 2003.
- V. Fey, R. Wagner, K Bräutigam, and T. Pfannschmidt. Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *J. Experimental Botany*, 56:1491–1498, 2005.
- G. Finazzi, F. Zito, R.P. Barbagallo, and F.A. Wollman. Contrasted effects of inhibitors of cytochrome b_6f complex on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biological Chemistry*, 276:9770–9774, 2001.
- Y. Fu, M.A. Ballicora, J.F. Leykam, and J. Preiss. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biological Chemistry*, 273:25045–25052, 1998.
- P. Geigenberger, A. Kolbe, and A Tiessen. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J. Experimental Botany*, 56:1469–1479, 2005.
- G. Gopalan, Z. He, Y. Balmer, P. Romano, R. Gupta, A. Héroux, B.B. Buchanan, K. Swaminathan, and S. Luan. Structural analysis uncovers a role for redox in regulating FKBP13, an immunophilin of the chloroplast thylakoid lumen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:13945–13950, 2004.
- M.W. Gray and B.F. Lang. Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. *Trends in Microbiology*, 6:1–3, 1998.

- R. Gupta, R.M. Mould, Z. He, and S. Luan. A chloroplast FKBP interacts with and affects the accumulation of Rieske subunit of cytochrome *bf* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:15806–15811, 2002.
- J. Kim and S.P. Mayfield. Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science*, 278:1954–1957, 1997.
- K. Liere and G. Link. Chloroplast endoribonucleasi p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Research*, 25:2403–2408, 1997.
- G. Link. **Redox regulation of chloroplast transcription.** *Antioxidants Redox Signaling*, 5:79–87, 2003.
- P. Maliga. Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Plant Science*, 3:4–6, 1998.
- P. Malnoë, S.P. Mayfield, and J.D. Rochaix. Comparative analysis of the biogenesis of photosystem II in the wild-type and Y-1 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biology*, 106:609–616, 1988.
- P. Martinsuo, S. Pursiheimo, E.M. Aro, and E. Rintamäki. Dithiol oxidant and disulfide reductant dynamically regulate the phosphorylation of light-harvesting complex II proteins in thylacoid membranes. *Plant Physiology*, 133:37–46, 2003.
- P.M. Mullineaux and T. Rausch. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, 86:459–474, 2005.
- J. Nickelsen and G. Link. The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplast mediates endonucleolytic transcript 3' end formation *in vitro*. *The Plant Journal*, 3:537–544, 1993.
- K. Ogrzewalla, M. Piotrowski, S. Reinbothe, and G. Link. The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.): a nuclear encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *European J. Biochemistry*, 269:3329–3337, 2002.
- T. Pfannschmidt and K. Liere. **Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression.** *Antioxidants Redox Signaling*, 7:607–618, 2005.
- T. Pfannschmidt, A. Nilsson, and J.F. Allen. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, 397:625–628, 1999a.

- T. Pfannschmidt, A. Nilsson, A. Tullberg, and Link G. Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life*, 48:271–276, 1999b.
- M. Piippo, Y. Allahverdiyeva, V. Paakkanen, U.M. Suoranta, N. Battchikova, and E.M. Aro. Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol Genomics*, 25:142–152, 2006.
- E. Rintamäki, P. Martinsuo, S. Pursiheimo, and E.M. Aro. Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:11644–11649, 2000.
- P. Romano, J. Gray, P. Horton, and S. Luan. Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytologist*, 166:753–769, 2005.
- M.L. Salvador and U. Klein. The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 121:1367–1374, 1999.
- M. Schubert, U.A. Petersson, B.J. Haas, C. Funk, W.P. Schröder, and T. Kieselbach. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biological Chemistry*, 277:8354–8365, 2002.
- P. Schürmann and J.P. Jacquot. Plant thioredoxin system revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:371–400, 2000.
- A. Shapiguzov, A. Edvardsson, and A.V. Vener. Profound redox sensitivity of peptidyl-prolyl isomerase activity in Arabidopsis thylakoid lumen. *FEBS Letters*, 580:3671–3676, 2006.
- L.N. Sokolov, J.R. Dominguez-Solis, A.L. Allary, B.B. Buchanan, and S. Luan. A redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:9732–9737, 2006.
- T. Terbitsh and A. Danon. Translation of chloroplast *psbA* mRNA is regulated by signals initiated by both photosystem II and I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:12289–12294, 2001.
- T. Terbitsh, A. Levitan, A. Sofer, and A. Danon. Translation of chloroplast *psbA* mRNA in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Molecular Cellular Biology*, 20:1116–1123, 2000.
- K. Tiller and G. Link. Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription system from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J.*, 12:1745–1753, 1993.

- J.P. Vainonen, M. Hansson, and A.V. Vener. STN8 protein kinase in *Arabidopsis thaliana* is specific in phosphorylation of photosystem II core proteins. *J. Biological Chemistry*, 280:33679–33686, 2005.
- C.B. Yohn, A. Cohen, A. Danon, and S.P. Mayfield. A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:2238–2243, 1998.
- W. Zerges. Translation in chloroplast. *Biochimie*, 82:583–601, 2000.
- W. Zerges and J.D. Rochaix. Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biology*, 140:101–110, 1998.
- F. Zito, G. Finazzi, R. Delosme, W. Nitschke, D. Picot, and F.A. Wollman. The q_0 site of cytochrome b_6f complexes controls the activation of the LHClI kinase. *EMBO J.*, 18:2961–2969, 1999.

Indice

Sommario	I
1 Introduzione	1
1.1 I Cloroplasti	1
1.2 La catena di trasporto fotosintetica degli elettroni	2
1.3 Fotosistemi e Fotoequilibrio	2
1.4 Glutazione, ROS e controllo redox	3
2 Controllo della fosforilazione di LHCII e PSII	6
2.1 Stt7, Stn7 e Stn8	7
2.2 Il ruolo del Plastochinone	7
2.3 Il ruolo della Tioredoxina	8
3 Controllo della trascrizione	10
3.1 Controllo della trascrizione dei geni plastidiali	10
3.1.1 TSP9	11
3.1.2 RNA Polimerasi plastidiali e PTK	11
3.2 Controllo della trascrizione dei geni nucleari codificanti proteine fotosintetiche	13
4 Controllo della Traduzione	14
4.1 p54	14
4.2 Controllo della fase di inizio della traduzione	15
5 Regolazione delle attività enzimatiche nello stroma	18
5.1 Regolazione degli enzimi del ciclo di Calvin	18
5.2 Regolazione redox della sintesi dell'amido	19
6 Ipotesi di regolazione delle attività enzimatiche nel lumen	21
6.1 Le Immunofiline	21
6.2 AtFKBP13	22
6.3 Ipotesi di controllo dell'attività enzimatica nel lumen	23
Bibliografia	25

Ringraziamenti

Ringrazio i miei genitori.

Ringrazio mio fratello, Matteo e mia cugina per i preziosi aiuti informatici e i pratici consigli per lo sviluppo di questo lavoro. Gli amici per le grandi risate e l'importante sostegno.

Ringrazio Elisabetta Bergantino per avermi dato la possibilità di svolgere questa interessante tesi.