



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dip. di Biomedicina Comparata ed Alimentazione  
Dip. di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e  
Ambiente

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie per  
l'alimentazione

Caratterizzazione di linee mutanti di *Arabidopsis thaliana*  
con diverso livello di espressione delle isoforme  
apoplastiche dell'enzima gamma-glutamyl-transferasi

Relatore:

Prof. Antonio Masi

Correlatori:

Dott.ssa Anna Rita Trentin

Dott.ssa Silvia Quaggiotti

Laureando:

Alessandro Sturaro

Matricola n. 1013977

ANNO ACCADEMICO 2012-2013



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1 Il glutatione	5
1.1.1 Strutture e forme omologhe	5
1.1.2 Biosintesi	6
1.1.3 Funzioni del glutatione	8
1.1.3.1 Glutatione e reazioni redox	9
1.1.3.2 Il ciclo del glutatione-ascorbato	10
1.1.3.3 Glutatione e l'assimilazione di zolfo	12
1.1.4 Compartimentazione e trasporto	12
1.1.5 Degradazione del glutatione	14
1.2 GGT ( $\gamma$ - glutamil transferasi)	17
1.3 GSH nei semi	21
1.3.1 Funzione antiossidante	21
1.3.2 <i>Delivery</i> di cisteina	24
<b>2. OBIETTIVO</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>29</b>
3.1 Materiale vegetale	29
3.2 Analisi di espressione genica: Real time PCR	30
3.2.1 Estrazione di RNA e sintesi del cDNA	30
3.2.2 Quantitative real-time PCR (qPCR)	31
3.3 Determinazione della proteina totale: Saggio BCA	32
3.3.1 Estrazione	32
3.3.2 Quantificazione delle proteine totali	33
3.4 Gel monodimensionale	34
3.5 Gel bidimensionale (2D)	35
3.5.1 Estrazione e quantificazione proteica	35
3.5.2 Isoelettrofocalizzazione (IEF)	35
3.5.3 Elettroforesi Bidimensionale (2D), fissaggio ed acquisizione	36

3.6 Saggio di attività GGTAasica	36
3.6.1 Estrazione	37
3.6.2 Saggio spettrofotometrico	37
3.7 Determinazione della componente tiolica (HPLC)	38
3.7.1 Estrazione	38
3.7.2 Riduzione e derivatizzazione	38
3.7.3 Analisi cromatografia	39
3.8 Enzimo-istochimica	39
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	41
4.1 Espressione attraverso real-time PCR	41
4.2 Contenuto in proteine totale	42
4.3 Profilo elettroforetico SDS-PAGE	43
4.4 Profilo elettroforetico 2D-PAGE	44
4.5 Misura dell'attività GGTAasica	45
4.6 Contenuto tiolico dei semi	46
4.7 Localizzazione istochimica dell'attività GGTAasica	48
<b>5. CONCLUSIONE</b>	49
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	51
6.1 Siti internet consultati	68
6.2 Acronimi ed abbreviazioni testuali	68

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il Glutazione

### 1.1.1 Struttura e forme omologhe

Il glutatione (GSH,  $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinglicina) è una molecola non proteica composta da tre aminoacidi (cisteina, acido glutammico e glicina). La cisteina è legata tramite legame peptidico alla glicina, il tutto è legato tramite un legame peptidico atipico tra il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato ed il gruppo amminico della cisteina.

Questa molecola gioca un ruolo importante nella regolazione del metabolismo cellulare, in particolare nel controllo degli stress biotici e abiotici, attraverso la reazione di ossido-riduzione del suo gruppo tiolico presente nella cisteina (agente riducente). Lo stato redox del Glutatione, e quindi l'alternarsi della forma ossidata (GSSG) e di quella ridotta (GSH) è un indicatore fondamentale per definire lo stato redox stesso della cellula (Schafer FQ, Buettner GR., 2001). Universalmente il glutatione riveste una elevata importanza nella prevenzione dei processi degenerativi scatenati da stress o normali reazioni metaboliche ma non risulta l'unica molecola tiolica con azione simile, infatti è stato dimostrato che in alcuni alobatteri e protozoi parassiti il controllo redox cellulare è mantenuto da altri composti solforati come i Tiosolfati (Newton and Javor, 1985) e il Tripanotione (Fairlamb *et al.*, 1985). Inoltre, in alcuni gruppi tassonomici del regno vegetale, oltre al GSH, sono presenti sue forme omologhe dove la glicina risulta sostituita da altri aminoacidi come serina,  $\beta$ -alanina o glutammato in posizione C-terminale (Rennenberg, 1982; Klapheck, 1988; Klapheck *et al.*, 1992; Meuwly *et al.*, 1993). Nei legumi, ad esempio, oltre al GSH è presente l'omoglutatione ( $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala) la cui sintesi è a carico di enzimi propri codificati da differenti geni (MacNicol, 1987; Frendo *et al.*, 2001), in cereali, invece, la sostituzione della glicina con la serina genera l'Idrossimetil-GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Ser) la cui via è poco chiara anche se si ritiene che questa molecola sia il risultato di una modificazione del GSH ad opera di enzimi con attività transpeptidasica come le carbossipeptidasi Y. 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.

### 1.1.2 Biosintesi

La pathway biosintetica del glutatione è essenzialmente simile a quelle riscontrata in altri organismi (Meister, 1988) ed è stata pubblicata e dimostrata da diversi anni.

Il glutatione viene sintetizzato da due passaggi ATP dipendenti:

- nel primo, l'intermedio gamma-glutamylcisteina ( $\gamma$ -EC) è sintetizzato a partire da glutammato e cisteina attraverso l'enzima  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi (o glutammato-cisteina ligasi,  $\gamma$ -EC sintetasi,  $\gamma$ -glutamyl-Cys sintetasi o GCL). Questa reazione è il fattore limitante nella sintesi del glutatione (Hell e Bergmann, 1990). Questo enzima è codificato dal gene *GSH1* (*At4g23100*) e l'attività di quest'ultimo, in foglie di grano, è strettamente associata ai cloroplasti (Noctor *et al.*, 2002) come dimostrato da studi sulla localizzazione subcellulare dell'enzima in *Arabidopsis* (Wachter *et al.*, 2005).
- Nel secondo, la glicina viene aggiunta al C-terminale della  $\gamma$ -glutamylcisteina tramite l'enzima glutatione sintetasi o GSH-S.

Entrambi gli enzimi della via metabolica sono codificati da 2 geni in singola copia in *Arabidopsis*, chiamati *GSH1* ( $\gamma$ -EC) e *GSH2* (glutatione sintetasi), il primo è localizzato nei plastidi mentre il secondo nel citosol. GSH è quindi sintetizzato mediante l'azione sequenziale dei 2 enzimi  $\gamma$ -glutamyl-Cys sintetasi e glutatione sintetasi. L'attività dell'enzima  $\gamma$ -EC sintetasi è regolata mediante feedback negativo dal glutatione (Hell and Bergmann, 1990; Jez and Cahoon., 2004) e l'espressione di *GSH1* e *GSH2* in *Arabidopsis* è regolata nella trascrizione e nella traduzione da metalli pesanti, acido jasmonico e dallo stress ossidativo (Xiang and Oliver, 1998, 2002). Inoltre questi due geni rispondono alla luce e a diversi stress come secco e patogeni.

In diverse specie eucariotiche una mutazione o un *knockout* del gene codificante la  $\gamma$ -glutamyl sintetasi è stato dimostrato essere letale, indicando che GSH è essenziale (Grant *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2005). Infatti mutanti di topo e *Arabidopsis* con eliminazione diretta del gene della  $\gamma$ -glutamyl-Cys sintetasi sono risultati non vitali allo stato embrionale (Cairns *et al.* 2006) mentre topi GSH-*deficient* dimostravano uno sviluppo anormale associato a una successiva morte precoce entro 8 settimane di vita (Will *et al.* 2000). In *Arabidopsis* mutanti *knockout* per il gene *GSH1*, precedentemente citati, risultano fenotipicamente diversi dai mutanti *Knockout* per il gene *GSH2*, mentre nei primi la morte sopraggiunge allo stadio embrionale nei mutati *gsh2* la morte è allo stadio di plantula.

Questa differenza sembra riflettere una probabile sostituzione del GSH mancante con la  $\gamma$ -EC, la quale si accumula ad alti livelli nei tessuti. Inoltre un'ulteriore distinzione dei due mutanti si basa sulla possibilità di ripristinare il fenotipo *wild-type* nei mutanti *gsh2* con un incremento di attività dell'enzima solo nel citosol (Pasternak *et al.*, 2008), ciò fornisce la prova che il GSH può essere importato dal citosol nei plastidi in linea coi studi di marcatura radioattiva dei cloroplasti in isolati di grano (Noctor *et al.*, 2002).

Sono stati fatti numerosi esperimenti anche per indagare sulla sovraespressione dei geni della biosintesi, in particolare di  $\gamma$ -ECS. La sovraespressione di questo gene incrementava in *Arabidopsis* il livello di glutatione e questo si traduceva in una maggior resistenza ai metalli pesanti e agli erbicidi (Zhu *et al.*, 1999). Inoltre in cloroplasti di cellule di pioppo la sovraespressione dello stesso gene portava non solo ad un aumento di GSH ma anche di alcuni amminoacidi come leucina, isoleucina, tirosina e lisina (Noctor *et al.*, 1998). Le cause di questo incremento di amminoacidi non è chiaro anche se è interessante notare che alcuni enzimi coinvolti nella sintesi o nel metabolismo di alcuni di questi amminoacidi sono tra quelli che sono stati identificati come potenziali TRX target attraverso approcci redox proteomici (Montrichard *et al.*, 2009). La sovraespressione della glutatione sintetasi generava molto meno GSH rispetto alla sovraespressione di  $\gamma$ -ECS, inoltre in pioppo non vi era aumento di attività della GSH-S (Foyer *et al.*, 1995; Noctor *et al.*, 1998) anche se incrementi di GSH erano indotti una volta aggiunto  $\gamma$ -ECS ai

tessuti fogliari. Molti sono stati gli studi per chiarire il controllo della biosintesi del GSH (Xiang and Oliver, 1998, 2002; Xiang *et al.*, 2001; Jez *et al.*, 2004), mentre molto poco è stato fatto per quanto riguarda la degradazione del glutatione nelle piante.

### **1.1.3 Funzioni del glutatione**

Il GSH, è una molecola che interviene inibendo l'azione di metaboliti tossici o di scarto che vengono prodotti in continuazione durante i normali processi metabolici o situazioni di stress. La sua funzione di forte antiossidante lo rende una barriera riducente che previene l'eccessiva ossidazione dei comparti cellulari da radicali liberi, benzoati, nitriti, nitrati, ecc.. Nel mondo animale, in particolare, si sono svolti molti lavori legati alla capacità del glutatione di intervenire beneficamente negli stress ossidativi del globulo rosso, nel modulare le risposte immunitarie, nella detossificazione da xenobiotici (Seidegård *et al.*, 1997), nell'invecchiamento cellulare, nell'avvelenamento da paracetamolo, nel contrasto alle patologie oncologiche (Balendiran *et al.*, 2004) e recentemente si è ipotizzato un ruolo nella cura dell'AIDS (Charles *et al.*, 2007).

C'è inoltre da dire, che la capacità della molecola di spostare ed eliminare ioni tossici (mercurio, cadmio, piombo, ecc.) formando solfuri coniugati, la rendono una molecola attiva contro l'avvelenamento da metalli pesanti. Inoltre la natura antiossidante lo rende utile non solo per la vita dei sistemi biologici ma anche per scopi industriali, ad esempio come conservante di cibi e cosmetici e inibitore nella degradazione di gomme e combustibili.

Nelle piante la impossibilità di fuga dalle condizioni sfavorevoli dell'ambiente esterno, ha reso questi sistemi antiossidanti indispensabili per la sopravvivenza, per esempio, un'ampia gamma di stress abiotici attiva la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), in taluni casi responsabile di seri danni ossidativi, che devono essere repressi da un sistema antiossidante affidabile. Le piante, quindi, sono provviste di numerosi meccanismi di difesa, basati sia su proteine che metaboliti con proprietà redox, che intervengono contro lo stress innescando una serie di risposte fisiologiche che in determinati casi si traducono in morte cellulare programmata (PCD).



La cellula vegetale deve quindi saper rispondere in maniera intelligente allo stimolo esterno mettendo in moto sistemi chimici di inibizione o promozione di risposte biologiche. In tutto questo universo metabolico, ancora in parte sconosciuto o poco chiaro, vi rientra anche il glutatione come per esempio in risposta alle basse temperature in mais (Kocsy *et al.*, 2001), in risposta allo stress da metalli pesanti (Cobbett e Goldsbrough, 2002), nei noduli radicali di leguminose i cui tessuti instaurano una comunicazione complessa con l'ospite simbiote, e in presenza di xenobiotici, dove l'azione coniugante dell'enzima GSH-transferasi permette l'inattivazione e il trasporto degli elementi tossici nel vacuolo (Marrs, 1996). Partecipa, inoltre, in molti altri processi tra cui la traduzione dell'mRNA, l'attività enzimatica, la trascrizione genica e il ciclo cellulare (Den Boer e Murray, 2000), funzioni orientate in maniera differenziale in diversi organi, tessuti, cellule e compartimenti cellulari a stadi fenologici differenti.

#### **1.1.3.1 Glutazione e reazioni redox**

Alcune delle funzioni basilari del GSH sono legate alle reazioni del gruppo sulfidrilico della cisteina, che come altri tioli può subire numerose reazioni redox. La forma ossidata in particolare include i disolfidi (GSSG) composti da due molecole di GSH legato tramite i residui di cisteina, oppure i disolfidi misti dove il GSH lega con altri tioli. Il potenziale di formazione di GSH coniugati con specie xenobiotiche elettrofiliche è vasto. In particolare, il GSNO ha attirato l'attenzione per il suo significato fisiologico come molecola segnale e riserva di NO (Lindermayr *et al.*, 2005). Composti in grado di ossidare il GSH in larga misura sono i ROS come lo ione superossido e il radicale ossidrilico. Di conseguenza il glutatione agisce come molecola *scavenger* o nucleofilo "sacrificale" per evitare l'ossidazione dei componenti cellulari. Molti metaboliti cellulari possono agire in maniera simile, tuttavia a differenza del glutatione questi producono forme ossidate instabili o non riciclabili. Per mantenere la predominanza della forma ridotta del GSH esistono specifiche GR (Glutazione redattasi) localizzate nel citosol, nei plastidi, nei mitocondri e perossisomi, ed hanno una forte affinità per GSSG e per il NADPH (Halliwell and Foyer, 1978; Smith *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 1998; Chew *et al.*, 2003; Kataya and Reumann, 2010). L'ossidazione del glutatione è provocata anche

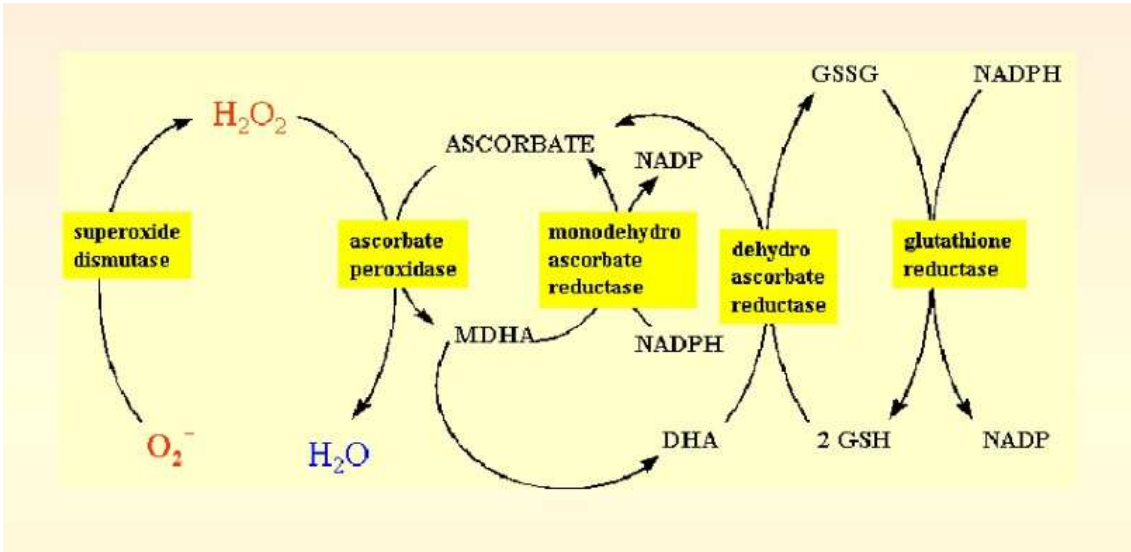
da enzimi che utilizzano il GSH per ridurre  $H_2O_2$  (ciclo del glutatione-ascorbato), o altri perossidi dell'acqua e i corrispondenti alcoli.

### **1.1.3.2 Il ciclo del glutatione-ascorbato**

E' una via metabolica che disintossica il perossido di idrogeno, prodotto di scarto del metabolismo cellulare. Il ciclo coinvolge diverse molecole antiossidanti con i rispettivi enzimi (Noctor and Foyer, 1998). Nella prima fase di questo percorso, il perossido di idrogeno è ridotto ad acqua tramite la Ascorbato Perossidasi (APX) utilizzando ascorbato come donatore di elettroni, successivamente l'ascorbato ossidato (monodeidroascorbato) viene rigenerato dalla MonoDeidroAscorbato Riduttasi (MDAR) (Wells and Xu, 1994).

Tuttavia, il monodeidroascorbato è un radicale e, se non ridotto rapidamente genera ascobato o deidroascorbato. Il Deidroascorbato si riduce ad ascorbato dalla deidroascorbato riduttasi a spese del GSH, producendo glutatione ossidato (GSSG) quest'ultimo è riconvertito a glutatione dalla glutatione reduttasi (GR) usando NADPH come donatore di elettroni, in questo modo sia l'ascorbato che il glutatione risultano rigenerati. Il ciclo quindi è un flusso di elettroni dall'acqua ossigenata al NADPH. La riduzione del deidroascorbato 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).

In piante, il ciclo del glutatione-ascorbato è sito nel citosol, nei mitocondri, nei plastidi e nei perossisomi (Meyer, 2009; Jimenez *et al.*, 1998) e poiché glutatione, ascorbato e NADPH sono presenti in concentrazioni elevate nelle cellule vegetali si può ipotizzare che il ciclo glutatione-ascorbato giochi un ruolo chiave per detossificare l' $H_2O_2$ . Tuttavia, altri enzimi (perossidasi) compresi perossiredossine e glutatione perossidasi, la quale utilizzano thioiredossine o glutaredossine come substrati riducenti, contribuiscono alla rimozione dell'acqua ossigenata in piante (Rouhier *et al.*, 2008).



Le glutaredoxine come le thioredoxine possono operare come ditioli riducenti e sono coinvolte in percorsi alternativi nella cellula come la formazione di deossiribonucleotidi per la sintesi di DNA, la generazione di zolfo ridotto, nella traduzione del segnale e nella difesa contro lo stress ossidativo.

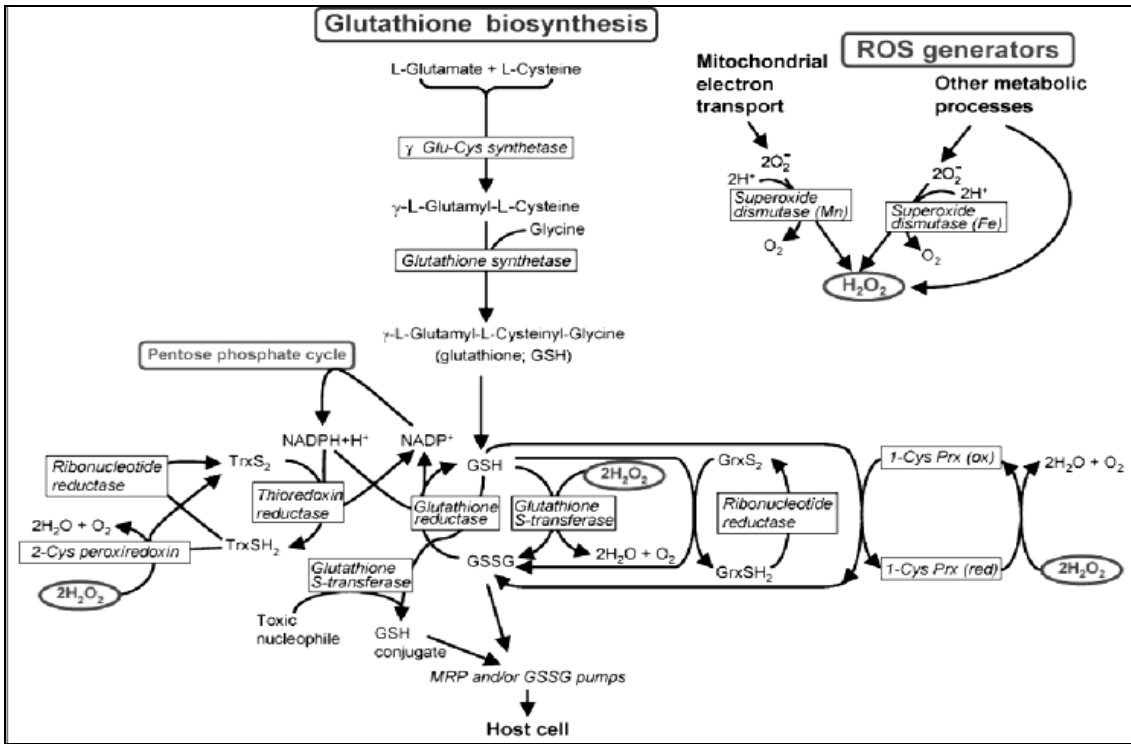


Fig.1 Biosintesi del GSH e ciclo del Glutathione-Ascorbato (Bozdech and Ginsburg, 2004).

### 1.1.3.3 Glutazione e l'assimilazione di zolfo

La cisteina è il primo prodotto dell'assimilazione dello zolfo in piante ed è impiegato per la sintesi di proteine e della metionina (Leustek *et al.*, 2000; Saito, 2000; Droux, 2004). Il GSH è una significativa sorgente non proteica di zolfo ridotto. Lo zolfo è stato positivamente correlato alla resistenza ai patogeni e questo fenomeno prende il nome di resistenza zolfo indotta o SIR (Bloem *et al.*, 2007). Sebbene le cause della SIR rimangano ancora da identificare, il contenuto di GSH o suoi precursori possono essere i fattori di collegamento tra la assimilazione di zolfo e la resistenza a funghi e virus (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 implicato nel metabolismo dello zolfo ed inibisce l'espressione del gene *AST68*, che codifica per un trasportatore dello zolfo, e *APS1* che codifica per una ATP sulfurilasi 1, ciò è accompagnato da una diminuzione dell'afflusso di zolfo e dell'attività del gene *APS1* in radici (Lappartient *et al.*, 1999).

L'indisponibilità di zolfo limita l'accumulo del GSH in piante (Nikiforova *et al.*, 2003) e ciò è stato dimostrato grazie a mutanti. In *Arabidopsis* un mutante *defective* nei geni *Sultr1;2*, che codificano per trasportatori di zolfo, hanno una diminuzione dei livelli di GSH (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003) mentre l'espressione costitutiva di un gene *APR* (Adenosina 5'-fosfosolfato redattasi) batterico, che sembra essere sensibile all'inibizione del GSH a livello trascrizionale e attività in radici su *Arabidopsis* (Vauclare *et al.*, 2002), incrementa sia il contenuto di cisteina che di GSH (Tsakraklides *et al.*, 2002). Infine stress ambientali da ozono aumentano i livelli di cisteina e GSH, associata con la attivazione post-trascrizione di *APR1*. (Bick *et al.*, 2001).

### 1.1.4 Compartimentazione e trasporto

Il glutatione è una molecola coinvolta in moltissimi processi cellulari ed il suo trasporto dal sito di sintesi agli organi bersaglio è fondamentale, infatti, una volta sintetizzato nei cloroplasti e citosol, è trasportato all'esterno delle cellule e veicolato in altri tessuti o organi, e una prova ne suggerisce il trasporto dai tessuti vegetativi maturi ai tessuti giovani e dai tessuti vegetativi al seme durante lo sviluppo (Sunarpi and Anderson, 1997). Il GSH grazie alla sua

elevata solubilità e stabilità è una delle maggiori forme di tiolo solubile trovato nelle cellule e può accumularsi a concentrazioni millimolari (Noctor e Foyer, 1998), inoltre la sua concentrazione è stata rilevata sia in floema che xilema (Rennenberg *et al.*, 1979; Rauser *et al.*, 1991) dove è stato considerato uno dei maggiori composti trasportanti zolfo ridotto (Leustek and Saito, 1999). Nel trasporto intercellulare sono state studiate un gruppo di proteine che potrebbero intervenire nel trasporto attraverso il plasmalemma sono gli oligopeptidi trasportatori (OPT). Inizialmente scoperti in lievito dove prendono il nome di HGT1, queste proteine sono in grado di trasportare il GSH, GSSG, GS-coniugati e altri piccoli peptidi (Bourbouloux *et al.*, 2000) come confermato da analisi di espressione eterologa in lievito con un gene omologo di *B. juncea* (*BjGT1*) che mostrava che la proteina era competente nell'assorbimento del GSH (Bogs *et al.*, 2003) mentre un gene omologo di riso (*OsGT1*) poteva trasportare il GSH, GSSG e GS-coniugati (Zhang *et al.*, 2004). *Arabidopsis* annota 9 geni per le proteine OPT, (Koh *et al.*, 2002) in particolare gli studi si sono concentrati su uno di questi chiamato *OPT6* (*Atg27730*) che sarebbe in grado di trasportare GS-coniugati, complessi GS-Cadmio nonché GSH e GSSG (Cagnac *et al.*, 2004). Analisi *knockout* del gene mediante mutanti *opt6* non hanno mostrato fenotipi particolari suggerendo un forte grado di ridondanza genica (Pike *et al.*, 2009).

Nel trasporto tra citosol e cloroplasti, recentemente sono state identificate una famiglia di proteine CLT, localizzate nella membrana plasmidiale e che trasportano sia  $\gamma$ -EC che GSH. Ciò è coerente con la posizione esclusiva della  $\gamma$ -EC nel plasmide e il percorso principale del GSH-S nel citosol (Wachter *et al.*, 2005). Il triplo mutante *knockout* *clt1 clt2 clt3* aveva il citosol impoverito di GSH diversamente dal cloroplasto che risultava arricchito (Maughan *et al.*, 2010).

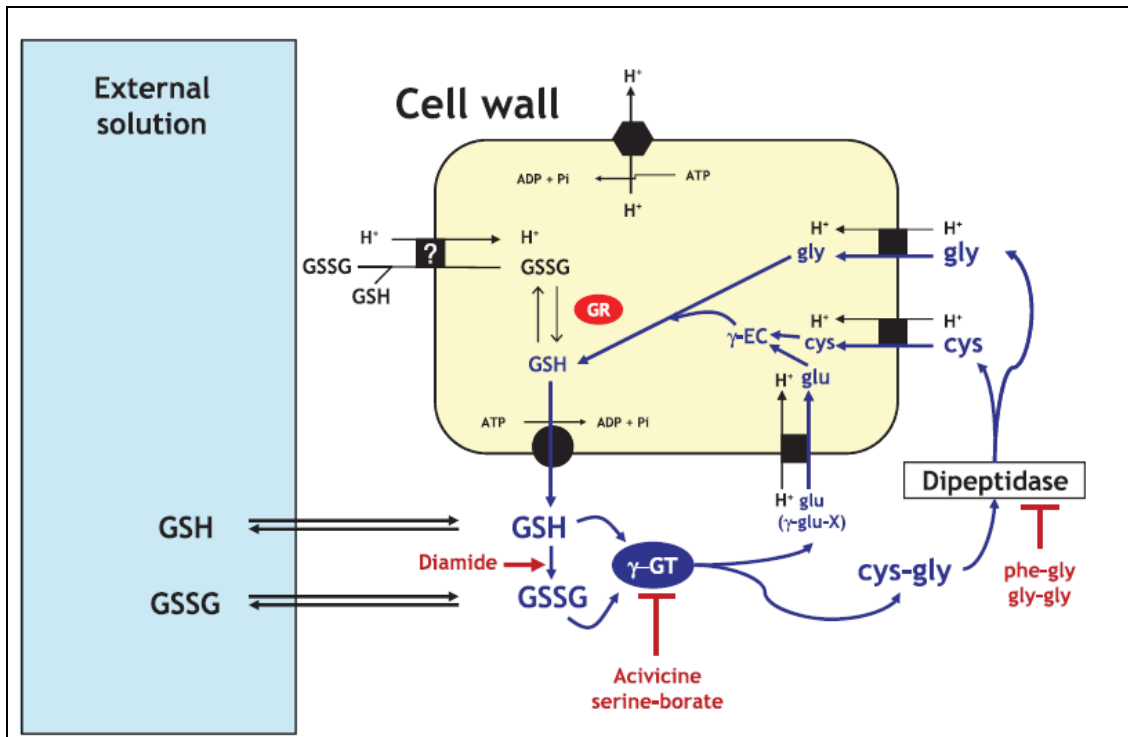
Il trasporto attraverso il nucleo è stato possibile grazie alla immunolocalizzazione (Zechmann *et al.*, 2007) ed ha permesso di chiarire il concetto di ciclo redox nucleare durante la fase G1. La localizzazione del GSH nel nucleo, nella fase G1, è accompagnata da un aumento di ROS e da un abbassamento della scudo ossidativo difensivo, come risulta dalle variazioni trascrittomiche (Diaz-Vivancos *et al.*, 2010). Il nucleo si carica di GSH e questo

grazie a proteine che aumentano la permeabilità della membrana nucleare, che però restano sconosciute.

Nel trasporto vacuolare si conoscono proteine MRP (*Multidrug resistance-associated protein*) trasportatori del tipo ABC (Martinoia *et al.*, 1993; Rea, 1999; Foyer *et al.*, 2001), la quale in lievito possono trasportare GSSG e forme GSH-coniugate quando sono inseriti i geni *MRP* di *Arabidopsis* (Lu *et al.*, 1998). Questo trasporto gioca un ruolo chiave nel mantenere lo stato redox del GSH citosolico (Tommasini *et al.*, 1993) e suggerisce che l'accumulazione del GSSG sia una parte fisiologica importante per la risposta agli stress ossidativi (Queval *et al.*, 2011). Di conseguenza l'instaurarsi dello stress e quindi l'aumento di GSSG stimolerà le proteine MRP ad abbattere tale aumento trasportando le forme coniugate e ossidate all'interno del vacuolo da sempre considerato un serbatoio cellulare di metaboliti. Di conseguenza il vacuolo diviene sito destinato a concentrare e degradare molecole citotossiche, ad esempio l'isoforma vacuolare  $\gamma$ - glutamil transferasi 4 (*GGT4*) agisce in questo comparto detossificando le forme di GSH coniugato (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b).

### **1.1.5 Degradazione del glutatione**

Nella degradazione il legame  $\gamma$ -glutamilico tra cisteina e glutammato risulta resistente alle proteasi standard (Taniguchi and Ikeda, 1998), tranne all'enzima GGT, ovvero la  $\gamma$ -glutamyl transferasi (o transpeptidasi) che è divenuta un importante strumento per lo studio del glutatione. L'enzima idrolizza il GSH e trasferisce il gruppo  $\gamma$ -glutamile ad una serie di molecole riceventi o recuperato dalla cellula per sintetizzare nuovo glutatione. In questo processo, il glutatione è degradato fino a ottenere i suoi aminoacidi costituenti, i quali vengono trasportati all'interno della cellula; qui avviene la biosintesi del glutatione grazie all'enzima gamma-glutamylcisteina sintasi e glutatione sintasi.



**Fig.2** Il ciclo del  $\gamma$ -glutamile (Ferretti *et al.*, 2009).

Il ciclo del glutamile, come si evince da lavori su tessuti di cortex di radici di orzo (*Hordeum vulgare*), è simile a quello che si verifica in cellule animali (Ferretti *et al.*, 2009). Il glutatione viene sintetizzato all'interno della cellula (citosol) attraverso l'attività di 2 enzimi ATP-dipendenti, la gamma glutamil cisteina sintetasi e il glutatione sintetasi. L'estrusione del glutatione dalla cellula è mediato da un trasportatore attualmente indefinito ed è stimolata mediante trattamento con diamide (molecola tiolo-ossidante, che crea stress ossidativi rivelando la presenza del ciclo del glutatione nell'apoplasto) o aggiunta della forma ossidata GSSG. Nell'apoplasto il GSH è idrolizzato dall'enzima GGT, che è legato alla parete cellulare, e da dipeptidasi extracellulari nei suoi amminoacidi costituenti.

Esistono 2 vie possibili per l'iniziale degradazione del glutatione: la prima dalla porzione N-terminale tramite la rottura del legame  $\gamma$ -glutamilico che produce glutammato e cisteinil-glicina (Cys-Gly), questa reazione è catalizzata dalla GGT, mentre la seconda via è nella porzione C-terminale che produce  $\gamma$ -Ec e glicina, questa reazione è catalizzata da carbossipeptidasi o phitochelatine sintasi (Beck *et al.*, 2003). La localizzazione dell'enzima nella parete è stata

determinata mediante studi immunocitochimici in radici. Combinando questi risultati con i precedenti studi che vedevano l'attività di GGT localizzata nel vacuolo (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b) si può concludere che sia la parete cellulare che il vacuolo siano importanti siti di localizzazione della GGT. Il ciclo in cellule vegetali è dimostrato lavorare con modalità simili in cellule animali, la differenza principale tra i due regni è la localizzazione di GGT, che è legato alla membrana in cellule animali e ancorato alla parete cellulare nelle cellule vegetali.

Oltre alle GGT esistono altri enzimi che possono degradare il GSH. L'attività GGC degrada il GSH a 5-oxoprolina; i studi su questo enzima continuano in quanto non sono ancora stati trovati geni che codificano per questo enzima anche se un singolo gene (*OSP1*; *At5g37830*) dimostra un'alta similarità con l'enzima 5-Opassi degli animali e analogamente la proteina codificata è localizzata nel citosol (Ohkamu-Ohtsu *et al.*, 2008). E' stato proposto che GGC citosolica, piuttosto che GGT vacuolare o extracellulare, sia il principale enzima di iniziazione della degradazione del GSH e che questo percorso potrebbe essere particolarmente importante nella funzione di trasporto intracellulare del GSH (Ohkamu-Ohtsu *et al.*, 2008).

Le PCS sono enzimi che potrebbero essere particolarmente importanti per le forme S-coniugate (Blum *et al.*, 2007, 2010). In dischi fogliari non è stato provato che PCS contribuisca a questo tipo di metabolismo, a parte quando si è in presenza di metalli pesanti (Grzam *et al.*, 2006) o in particolari tessuti e tipi cellulari (Blum *et al.*, 2007; Brazier-Hicks *et al.*, 2006).

Altri percorsi degradativi sono svolti da carbossipeptidasi, in particolare le forme vacuolari degradano i GSH-coniugati in orzo (Wolf *et al.*, 1996); le proteine GGP1 sono enzimi con un putativo dominio glutammico-amidotransferasi, che sono implicate nel rimuovere il residuo di glutammato dai GSH-coniugati durante la sintesi di glucosinolati (Geu-Flores *et al.*, 2009).



## 1.2 GGT ( $\gamma$ - glutamil transferasi)

La Gamma glutamil transferasi (GGT o gamma GT) è un enzima appartenente alla classe delle transferasi, coinvolto nel trasferimento del gruppo gamma-glutamilico in posizione N-terminale di GSH o GSSG e di S-coniugati del glutatione ad accettori come amminoacidi (L-cisteina, L-glutamina, L-metionina), alcuni dipeptidi (L-glutaminilglicina, L-alanilglicina, L-serilglicina e la glicilglicina), acqua e al GSH stesso (Taniguchi e Ikeda, 1998). Questo enzima risulta importante nel trasferimento e nell'assorbimento degli amminoacidi, in particolare della cisteina, attraverso la membrana plasmatica, è inoltre implicato nel metabolismo del glutatione.

E' un enzima localizzato sulla membrana cellulare alla quale si ancora per mezzo di un dominio transmembrana N-terminale e nel vacuolo. L'azione della  $\gamma$ -GT è svolta nel dominio extracellulare attraverso una reazione di transpeptidazione che genera peptidi  $\gamma$ -glutamilici pronti per entrare nel ciclo del  $\gamma$ -glutamile che come risultato porta al recupero degli amminoacidi. Le dipeptidasi terminano la degradazione del glutatione rompendo la cistenilglicina nei due amminoacidi costituenti. Le GGT sono definite da un dominio conservato definito "firma molecolare della GGT" (*PROPOSITE documentation PDOC00404*; <http://www.expasy.ch>; Gasteiger *et al.*, 2003) ed allineando questo dominio in differenti specie è risultato corrispondere tranne una sostituzione di G (Glicina) con R (Arginina) in piante ed alcuni cianobatteri. Questa sostituzione sembra importante per l'interazione ionica con altre proteine nel sito attivo dell'enzima.

Inizialmente la degradazione del glutatione si riteneva diversificata in 2 vie in animali e piante, e in quest'ultimo regno, si credeva fosse l'azione di una carbossipeptidasi ad intervenire sulla degradazione del GSH (Bergmann and Rennenbeg, 1993), in quanto i precedenti studi si basavano sull'evidenza che la membrana cellulare delle piante mancasse di attività GGT, mentre nelle cellule dei mammiferi era già appurata la presenza dell'enzima come proteina di membrana con un sito catalitico localizzato sulla superficie esterna della cellula stessa (Tate and Meister, 1978). Questa GGT animale è composta da una catena pesante (55-60 kD), N terminale con funzione di ancoraggio alla

membrana plasmatica, e una leggera (21-30 kD), entrambe formatosi dalla rottura di un singolo precursore durante la biosintesi. Di conseguenza negli animali, in particolare negli organi secretori quali intestino e reni, le evidenze sulle GGT e sulle MDB (*membrane-bound Cys-Gly dipeptidase*) erano chiare e collegate alla impossibilità degli animali di sintetizzare amminoacidi essenziali come la cisteina. Nel regno animale questo enzima è stato ampiamente studiato mediante topi *knockout* per il gene della  $\gamma$ -GT, questi perdono cisteina perché non sono in grado di recuperare il GSH extracellulare (in eccesso ed espulso con le urine) e muoiono per carenza dell'amminoacido.

Altri studi su topi sono stati svolti tramite inibitori della GGT, come ad esempio L-(o D)  $\gamma$ -glutamyl-(o carbossi) fenilidrazina, o AT-125 (avicina) o vari  $\gamma$ -glutamyl amminoacidi (Anderson and Meister, 1986) portando a una sostanziale perdita urinaria di glutatione ed altri composti  $\gamma$ -glutamilici inducendo la Glutathionuria.

Successivi lavori suggerirono, invece, la presenza delle GGT e delle dipeptidasi anche nel regno vegetale, analogamente agli animali, attraverso esperimenti sul ruolo della GGT nella risposta antiossidante, come ad esempio in risposta allo stress foto-ossidativo da UV-B in foglie di mais (*Zea mays L.*) che dimostravano un incremento del contenuto di Cys-Gly apparentemente risultante dalla degradazione del glutatione per azione della GGT. La GGT oltre a recuperare il GSH intervengono nel formare metabolici 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 trascritti *GGT2* nei semi di *Arabidopsis* durante l'embriogenesi (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). Comunque le funzioni delle GGT apoplastiche sono numerose e legate alla specie, all'organo e allo stadio di sviluppo in cui sono espresse.

In aggiunta, un tentativo di isolare i geni coinvolti nella protezione delle piante contro il danno ossidativo ha portato all'isolamento di cDNA da *Arabidopsis* codificante a putative GGT, la cui espressione in lievito ha conferito una miglior tolleranza alla diamide una molecola che ossida i tioli (Kushnir *et al.*, 1995).

Negli ultimi anni, si sono svolte un numero di ricerche significative in questo argomento, portando a descrivere la localizzazione (Storozhenko *et al.*, 2002; Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a/b; Martin *et al.*, 2007), anche attraverso il rilevamento con enzimo-istochimica in diverse specie vegetali, e le

proprietà (Martin and Slovin, 2000) di questo enzima in piante. La localizzazione tramite enzimo-istochimica ha suggerito che i principali siti di attività della GGT sono i parenchimi dei fasci vascolari, gli apici radicali (Masi *et al.*, 2007) e le cellule di guardia degli stomi e ciò coincide, come osservato in *Arabidopsis*, con la colorazione provocata dal trasporto di costrutti di fusione *GGT:GUS* (Martin *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a/b). Attraverso analisi immunocitochimiche si è dimostrato che la parete cellulare risulta il maggior sito di localizzazione delle forme apoplastiche in radici, e ciò è stato dimostrato ulteriormente a livello di 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 o fungini nel terreno, potrebbe essere 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 del GSH come forma di zolfo ridotto attraverso questi elementi fino alle regioni dove l'attività della GGT è maggiore ovvero epidermidi e meristemi radicali. In questi organi il GSH verrebbe scomposto nei suoi amminoacidi divenendo nutrimento per l'attività mitotica in particolare dell'apparato radicale (Vernoux *et al.*, 2000).

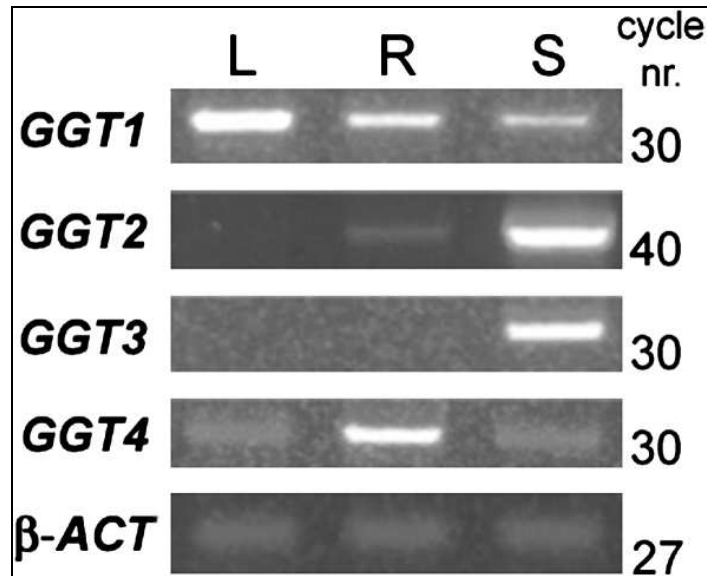
In *Arabidopsis*, esistono 4 geni omologhi alla GGT animali (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007; Storozhenko *et al.*, 2002), *GGT1* (*At4g39640*), *GGT2* (*At4g39650*), *GGT3* (*At4g29210*) e *GGT4* (*At1g69820*). Per molto tempo vi sono state discrepanze nella nomenclatura delle isoforme *GGT3* e *GGT4*. Le sequenze amminoacidiche delle isoforme *GGT1* e *GGT2* sono simili (83% identità e 90% similarità) e localizzate nel cromosoma 4 di *Arabidopsis*, mentre la sequenza di *GGT4* possiede una lunga estensione N-terminale idrofobica. *GGT3* si ipotizza sia uno pseudogene perché è un breve frammento probabilmente derivato dalla porzione C-terminale codificata da *GGT1* o *GGT2*, e recenti indagini suggeriscono una trascrizione a livelli molto limitati (Martin *et al.*, 2007).

*GGT1* e *GGT2* sono enzimi apoplastici associati alla membrana plasmatica e alla parete cellulare, la loro caratterizzazione è stata svolta mediante mutanti *knockout* e piante transgeniche portanti costrutti con promotore *GUS* (Ohkama-

Ohtsu *et al.* 2007). I mutanti *ggt1* dimostravano un perdita di attività di GGT del 90% e le foglie risultavano clorotiche a causa della perossidazione lipidica, inoltre nel mutante *knockout ggt1* la forma ossidata del glutatione (GSSG) risultava maggiore rispetto a quella misurata nella linea *wild-type*. Questi risultati dimostrano che un blocco del gene *GGT1* scatena uno stress ossidativo suggerendo che questa isoforma abbia una primaria responsabilità nel metabolizzare GSSG nell'apoplasto. Nella pianta *GGT1* è espresso in tutti i tessuti e principalmente nei tessuti vascolari in modo particolare nel floema mentre *GGT2* negli embrioni in formazione all'interno delle silique e in modo transiente negli altri tessuti come il polline.

*GGT4*, a differenza delle precedenti 2 isoforme, agisce a livello di vacuolo dove aiuta a degradare le forme coniugate del GSH che vengono continuamente prodotte dalla GSH S-transferasi per detossificare i xenobiotici, e trasportate nel vacuolo (vedi paragrafo 1.1.4). I mutanti *ggt4* sono caratterizzati da una riduzione drastica della degradazione delle forme S-coniugate in foglia, mentre in radice la riduzione dell'attività è compensata da un meccanismo di degradazione sconosciuto (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b, Grzam *et al.*, 2007).

L'espressione di *GGT2* nel funicolo unito ad un alto livello di GSH (Cairns *et al.* 2006) suggeriscono che questa isoforma è coinvolta nel trasporto di GSH all'interno dei semi in formazione, infatti mutanti *knockout ggt2* presentavano metà contenuto di GSH nelle silique. Inoltre, ulteriori informazioni provenienti da uno studio incrociato con prove di espressione attraverso RT-PCR semiquantitativa e analisi *in silico* (Destro *et al.*, 2010), ha dimostrato che l'isoforma *GGT1* è espressa in tutti i tessuti e specialmente in foglie, *GGT2* e *GGT3* esclusivamente in siliqua e *GGT4* in radici.



**Fig.3** Analisi di espressione delle isoforme GGT in differenti tessuti (L, foglia; R, radice; S, siliqua) mediante PCR-semiquantitativa (Destro *et al.*, 2010).

### 1.3 GSH nei semi

Durante lo sviluppo del seme, il GSH interviene in tutti i processi di sviluppo, dalla divisione cellulare nei semi in formazione fino all'essiccazione variando il suo contenuto a seconda dello stadio.

#### 1.3.1 Funzione antiossidante

Come gli altri tessuti della pianta anche i semi producono ROS attraverso la fotosintesi (nei primi stadi) e la respirazione ma anche durante l'essiccazione. Per difendere i tessuti dal deleterio aumento di ROS il seme analogamente agli altri tessuti vegetali produce molecole antiossidanti (GSH, ascorbato e tocoferoli) ed enzimi come superossido dismutasi, catalasi e perossidasi (Noctor *et al.*, 1998; 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, lo stato redox del GSH si sporge verso la forma ossidata, perciò il suo più alto rapporto era trovato alla fine del periodo di essiccazione (De gara *et al.*, 2003).

Inoltre nel grano l'incremento nel numero di gruppi proteici-SH era osservato nei primi 21 giorni della maturazione, ma diminuiva dopo il 28°giorno. La transizione di gruppi sulfidrilici a ponti disolfuro può spiegare la diminuzione gruppi-SH proteici e in seguito suggeriscono che lo stato redox del GSH, insieme con l'ascorbato, partecipano al ripiegamento delle proteine, oltre 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. Un ulteriore prova dell'attività antiossidante del GSH 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 (Kranner and Grill 1996; Noctor *et al.*, 2002; De Gara *et al.*, 2003).

La glutationalizzazione, ovvero l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici dei disolfidi misti, avviene con la reazione di molecole di GSSG con gruppi tiolici liberi di proteine producendo un complesso glutatione-proteina e una molecola di GSH (Knanner and Grill, 1996; Noctor *et al.*, 2002; De Gara *et al.*, 2003).

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

In semi di fagiolo, l'instaurarsi di tolleranza all'essiccazione era accompagnata da un'alta attività delle GR e catalasi. L'attività GR era osservata rimanere costante nei primi stadi poi improvvisamente diminuiva durante l'essiccazione in semi di *Triticum durum* (De gara *et al.*, 2003).

Lo stoccaggio prolungato in genere riduce la germinabilità delle sementi, anche se il tasso di deterioramento varia tra specie. Il deterioramento 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; Mc Donald, 1999). 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 3 volte nei 18 mesi di stoccaggio (Goel *et al.*, 2003; Goel and Sheoran 2003) 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 *Azardacta indica* se stoccati 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 e si è notato che una diminuzione di germinabilità in semi immagazzinati era 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 la germinazione, e quindi l'assorbimento di acqua, si instaurano metabolismi aerobi. Durante le 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. Invece 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 GSH aumentava significativamente 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. Nei semi di *Chenopodium rubrum* l'aumento di GSH e del glutatione totale

coincideva con la protusione della radichetta (Ducic *et al.*, 2003). Tuttavia è evidente che anche i ROS partecipano all'induzione della germinazione come dimostrato da diversi esperimenti che attraverso applicazioni esogene di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducevano la protusione della radichetta (Fontaine *et al.*, 1994). Il trattamento era accompagnato da un incremento dei livelli di GSH (Fontaine *et al.*, 1994).

### **1.3.2 Delivery di cisteina**

I semi, durante lo sviluppo, sono principali organi di assorbimento dello zolfo sia ossidato che ridotto e in essi avviene la riduzione del solfato (Sexton e Shibles, 1999) nei bacelli di soia (*Glycine 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 aestivum*; Fitzgerald *et al.*, 2001). L'esigenza di zolfo da parte del seme è soddisfatta tramite solfato o, in alternativa sottoforma 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 e di riserva. L'assimilazione dello zolfo parte dal 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 (Tabe 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 del glutatione 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; Fitzgerald *et al.*, 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* vi è trasporto 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 e Touraine, 1997. Lappartient *et al.*, 1999), anche se, alcune prove suggeriscono un'azione principale della cisteina (Bolchi *et al.*, 1999).



## 2. OBIETTIVO

Studi precedenti condotti presso il laboratorio dove è stata svolta l'attività sperimentale di tesi hanno dimostrato l'importanza dell'enzima gamma-glutamyl transferasi nella degradazione del glutatione. Questa molecola è trasportata per via floematica fino ai semi, dove può svolgere sia funzione antiossidante come nel resto della pianta, sia come molecola trasportatrice di zolfo e azoto ridotto, e in quanto tale può contribuire alla sintesi di proteine di riserva.

Poiché nei semi sono presenti due forme apoplastiche di GGT, presso questo laboratorio sono state ottenute in anni recenti diverse linee mutanti di *A. thaliana* con grado diverso di espressione. L'obiettivo di questo lavoro è stato quindi di caratterizzare tali linee mutanti allo scopo di chiarire il ruolo di questo enzima nei semi.

Lo studio è stato condotto in 7 linee diverse per le quali è stato valutato il grado di espressione delle isoforme apoplastiche di GGT attraverso real-time PCR; è stato quindi misurato il contenuto di tioli a basso peso molecolare, di proteina, il profilo elettroforetico delle proteine solubili, l'attività enzimatica GGTA<sub>sica</sub>. Su alcune linee è stato effettuato un saggio di enzimo-istochimica allo scopo di visualizzare eventuali differenze a livello tissutale.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Materiale vegetale

Per la sperimentazione sono stati utilizzati semi e silique immature (circa 1 settimana dall'antesi) di :

- *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo *Columbia 0* utilizzato come controllo o reference (*WT*);
- linee mutanti *knockout ggt1* (polimorfismo SALK\_004694) e *ggt2* di *A. thaliana* ecotipo 0 (Alonso *et al.*, 2003), provenienti dalla collezione di mutanti del NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, <http://nasc.nott.ac.uk/>), ed ottenute per inserzione sotto vuoto di T-DNA in vettore pROK2 tramite *A. tumefaciens*;
- linee F1, trasformate con T-Dna (*L1*, *L2*, *L3* e *L4*) ottenute e già prodotte nel laboratorio del dipartimento di biotecnologie dell'università di padova da *Arabidopsis thaliana* L., ecotipo *Columbia 0*;

#### **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'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAAAACGCTAACGCTGT  
GA 3'

### **Primer Reverse:**

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGCCGTGTATAGACCC  
GC 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 Analisi di espressione genica: Real time PCR**

### **3.2.1 Estrazione di RNA da silique e sintesi del cDNA**

50 mg di tessuto dei 7 genotipi (*WT*, *ggt1*, *ggt2*, *L1*, *L2*, *L3* e *L4*) è stato finemente macinato in un mortaio sterile in presenza di azoto liquido. L'RNA

totale è stato isolato usando il kit Nucleo<sup>®</sup>Spin RNA II (Machery-Nagel, <http://www.mn-net.com>) seguendo le indicazioni del produttore.

La quantità di RNA totale ottenuto è stata determinata usando Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Nanodrop Products, Wilmington, DE, USA). e la qualità della preparazione è stata valutata mediante comparazione delle letture spettrofotometriche a 230, 260 e 280 nm ed analisi elettroforetica, su gel di agarosio all'1%, per verificare l'assenza di degradazione.

Il cDNA è stato sintetizzato partendo da 500 ng di RNA totale secondo quanto riportato da Trevisan *et al.*, 2011.

### 3.2.2 Quantitative real-time PCR (qPCR)

I primer sono stati disegnati con il Software Primer 3 (ver. 0.4.0; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ed i migliori risultati sono stati selezionati con il Software PRATO (<http://prato.daapv.unipd.it/>).

I primer utilizzati sono riportati in tabella 1.

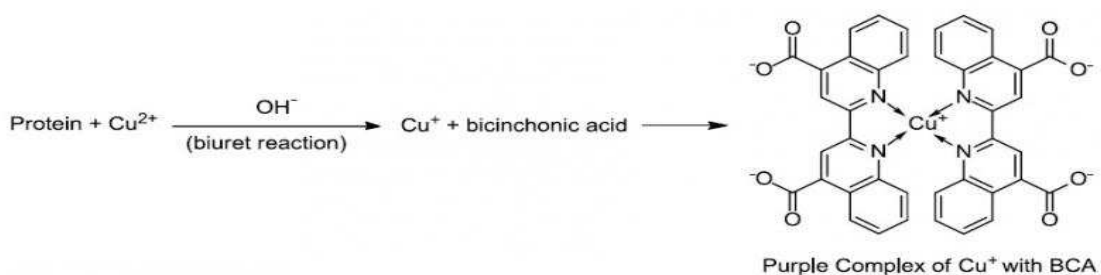
Gene name	NCIB Acession ID	Primer name	Primer (Forward/reverse)	GC(%)
TIM44	At2G36070	Fw-timNS	5'-GGTTCCAAACGCAAGAAATC-3'	45
		Rev-timNS	5'-CTGAGCCTCCAAATGGGATA-3'	50
GGT1	At4g39640	Fw ggt1	5'-TAAATGACTTGGCCTCAACG-3'	45
		Rev ggt1	5'-ACTGTTCGAACCAGCGACAT-3'	50
GGT2	At4g39650	Fw-g2-II	5'-GAGGGTTCCCTTCAGGATATTG-3'	50
		Rev-g2-II	5'-GGTTCATACTAGTACATCACAAAGTTCG-3'	40,7
GGT3	At4g29210	Fw ggt3	5'-AACACCCACGAAAATCACTC-3'	50
		Rev ggt3	5'-TGAAGCACCGCTGGAATTAT-3'	45
GGT4	At1g69820	Rev ggt4	5'-TCCTCTTTCTTCCGTTTTGG-3'	45
		Rev ggt4	5'-CAATCGTTAGGCGTTAGGACA-3'	47,6

**Tab.1** Elenco dei primer impiegati per l'analisi.

I campioni sono stati caricati sulla StepOnePlus (Applied Biosystems, Monza, Italy). Il caricamento in piastra è manuale usando 5 µl di Power SYBR Green PCR Master Mix, 0.2 µl di ogni primer e 2.5 µl di cDNA in un volume finale di 10 µl. Ogni campione è stato corso in 3 repliche tecniche. Il ciclo termico è composto da un primo step di denaturazione a 95°C per 10 minuti e 40 cicli di denaturazione (95°C, 15 sec) e annealing/extension (60°C, 1 min). Questo protocollo Real time PCR è tratto da Manoli *et al.*, 2012.

### 3.3 Determinazione della proteina totale: Saggio BCA

Metodo che consente di percepire possibili differenze tra i genotipi attraverso quantificazione spettrofotometrica delle proteine totali nella soluzione di interesse. Il primo step dell'analisi è l'estrazione con esano usato in campioni vegetali e animali, dove la percentuale di sostanze grasse è in contrasto con i normali metodi estrattivi. I semi, in modo particolare, contenendo lipidi come riserva di energia, hanno problemi in molte analisi chimiche, per cui l'impiego dell'esano diviene di vitale importanza per la rimozione dei grassi essendo un solvente sgrassante. L'estratto ottenuto è poi sciolto in tampone fosfato-SDS e quindi pronto per il saggio dell'acido Bicinconinico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).



Questa metodica, è usata per determinare, in modo sensibile e preciso, la concentrazione proteica in una soluzione, può infatti rilevare quantità di proteina inferiori a 0.5ug/ml. Si basa su 2 reazioni: in condizioni alcaline gli ioni rame  $\text{Cu}^{2+}$  formano un complesso con i legami peptidici della proteina e vengono ridotti a  $\text{Cu}^+$  (reazione del biureto), successivamente 2 molecole di BCA chelano con uno ione  $\text{Cu}^+$ , e formano con esso un composto color porpora di intensità variabile a seconda della quantità di proteina. L'intensità è determinata mediante misure di assorbanza a  $\lambda$  562 nm. Il valore della concentrazione viene quindi determinato da una retta di taratura costruita utilizzando campioni a concentrazione nota di albumina di siero bovino (BSA).

#### 3.3.1 Estrazione

L' esperimento è stato svolto con 4 repliche biologiche dei 7 genotipi di *A. thaliana* (*WT*, *ggt1*, *ggt2*, *L1*, *L2*, *L3*, *L4*), ripetute in doppio, per un totale di 8



repliche per genotipo. Sono stati pesati 5 mg di semi ed estratti con macinazione meccanica con biglia di acciaio nell'apposito mulino (Tissue Lyser2 QIAGEN ). Ogni ciclo di macinazione era seguita da un lavaggio in esano e successiva centrifugazione a 10000 rpm per 3 minuti per un totale di 3 lavaggi. Il pellet così ottenuto è lasciato seccare sotto cappa.

Il pellet seccato è quindi risospeso in 150  $\mu$ l di tampone fosfato-SDS (Fosfato 50 mM pH 7.0, SDS 0.1%) e vortexato allo scopo di solubilizzare.

### **3.3.2 Quantificazione delle proteine totali**

Alla quantificazione dei campioni è stata associata la retta di taratura con BSA (Albumin Bovine Serum).

Per la taratura sono stati necessari 7 punti di concentrazione (0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24  $\mu$ l) di BSA (1 mg/ml) con l'aggiunta di 50  $\mu$ l di acqua deionizzata e tampone fosfato-SDS fino al volume finale di 100  $\mu$ l.

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  $\mu$ l estratto, 45  $\mu$ l di tampone fosfato e 50  $\mu$ l di acqua deionizzata), seguendo il tempo per 15 minuti a 60°C.

La lettura è stata svolta allo spettrofotometro a  $\lambda$  562 nm.

### 3.4 Gel monodimensionale

Per l'analisi sono stati impiegati semi dei 7 genotipi di *A. thaliana*, estratti con esano (paragrafo 3.3.1) e risospesi in 150  $\mu$ l di Laemly (0.625 M Tris-HCl, 20% Glicerolo e 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol). I Gel contenevano:

	Running Gel (4%)	Stacking Gel (11%)
<b>Acqua dist.</b>	4,1 ml	3,9 ml
<b>SOL1</b>	2,8 ml	/
<b>SOL2</b>	4,1 ml	1 ml
<b>SOL4</b>	/	1,25 ml
<b>APS 10%</b>	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<b>SDS 10%</b>	300 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<b>Temed</b>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tab.2** Composizione dei gel della corsa monodimensionale:

SOL1 (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8); SOL2 (Acrilamide 29.2%, Bis-acrilamide 0.8%);

SOL4 (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8).

Nei pozzetti sono stati caricati 50  $\mu$ g di proteina quantificata, 4  $\mu$ l di marcatore di peso molecolare e 4  $\mu$ l di blu di bromofenolo. Il gel è stato caricato con tampone di corsa 1X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%). La corsa è stata inizialmente impostata a 20 mA per permettere la corretta uscita dallo stacking gel e poi condotta a 50 mA per circa 1 ora e mezza.

Terminata la corsa i gel sono stati colorati con Coomassie blue e lasciati in destaining solution (acqua deionizzata, 100 ml etanolo e 150 ml Ac. acetico). I gel sono stati acquisiti con la macchina fotografica BIORAD Molecular imager® (ChemiDOC™ XRS+) e analizzati con Image Lab™ Software per calcolare la densitometria delle bande.

## 3.5 Gel bidimensionale (2D)

### 3.5.1 estrazione e quantificazione proteica

Per l'estrazione sono stati pesati 5 mg di semi dei 7 genotipi (*WT*, *ggt1*, *ggt2*, *L1*, *L2*, *L3* e *L4*) ed estratti meccanicamente con 3 lavaggi successivi in esano (vedi paragrafo 3.3.1). I pellet ottenuti sono stati solubilizzati con Tampone 2D (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%) e lasciati in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore.

Per la quantificazione proteica dell'estratto è stato usato il reattivo di Bradford. Per la retta di taratura è stata usata BSA sciolta in acqua (100 µg/ml) a concentrazioni scalari, mentre per i campioni sono stati utilizzati 3 µl di campione sciolto in tampone 2D in un volume finale d'acqua. A tutte le soluzioni, comprese la taratura, è stato aggiunto 1 ml di reattivo di Bradford. Si è lasciato reagire per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi è stata determinata l'assorbanza allo spettrofotometro a  $\lambda$  595 nm. I dati sono poi stati normalizzati a partire dal peso iniziale dei campioni.

La quantificazione ha lo scopo di caricare sulla strip, per la focalizzazione, la stessa quantità di proteina per genotipo (100 µg).

### 3.5.2 Isoelettrofocalizzazione (IEF)

La focalizzazione delle proteine è stata svolta utilizzando IPG strip (GE healthcare Immobiline™ Dry Strip, pH 3-11 NL, 11 cm). Le strip sono state inserite nell'apposito adattatore insieme alla soluzione campione (campione 100 µg, 10 µl DTT, 2.5 µl anfoline, 2.5 µl Blu di bromofenolo, Tampone 2D, volume finale 250 µl) e ad olio minerale, poi è stato impostato il focalizzatore (ETTAN IPGphor). Per la reazione è stato necessario un step di reidrazione attiva a 50 V, un successivo step a voltaggio crescente fino a 6000 V per 30 minuti ed un'ultimo step a 50 V (previene il diffondersi delle proteine).

Tempo	Voltaggio
12 h	50 V
1 h	500 V
1 h	1000 V
2 h	6000 V
30 min	6000 V
6 h	50 V

**Tab.3** Voltaggi focalizzatore.

### 3.5.3 Elettroforesi Bidimensionale (2D), fissaggio ed acquisizione

Una volta terminata la isoelettrofocalizzazione le IPG strip sono state asciugate dall'eccesso di olio minerale; successivamente è stata svolta una fase di riduzione con Equilibration Buffer (Tris-HCl pH 8.8 50mM, Urea 6M, Glicerolo 30%, SDS 2%) e 1% DTT per 15 minuti e una fase di alchilazione sempre con Equilibration Buffer e 2.5% Iodoacetamide per 15 minuti.

Per la corsa bidimensionale sono stati utilizzati Gels precast (Criterion gel BIORAD), tampone di corsa (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) e il marcatore di peso molecolare (Colorbust Electrophoresis marker, www.Sigmaaldrich.com); la corsa è stata condotta a 30 mA per circa 3 ore.

I gel risultanti dalla corsa 2D sono stati immersi in soluzione di fissaggio (acido acetico 7%, metanolo 10%) per 30 minuti e successivamente in colorante Coomassie Blue.

I gel sono stati acquisiti con la macchina fotografica BIORAD Molecular imager® (ChemiDOC™ XRS+) utilizzando il programma Image Lab™ Software.

### 3.6 Saggio di attività GGTAlica

La GGT catalizza il trasferimento del gruppo glutamile dal substrato alla glicil-glicina formando L- $\gamma$ -glutamil-glicil-glicina e 4-nitroanilina, questa reazione transpeptidasica è favorita rispetto alla idrolasica (L- $\gamma$ -glutamil-4-nitroanilide + H<sub>2</sub>O = L- $\gamma$ -glutammato + 4-nitroanilina) a pH 8. La formazione dei 2 prodotti è proporzionale alla attività dell'enzima e misurata tramite saggio spettrofotometrico ad una lunghezza d'onda di 407 nm.

### 3.6.1 Estrazione

Il saggio di attività enzimatica è stato svolto in 4 repliche biologiche. Sono stati pesati 10 mg di semi dei 7 genotipi di *A. thaliana* (*WT*, *ggt1*, *ggt2*, *L1*, *L2*, *L3* e *L4*) ed estratti meccanicamente (vedi paragrafo 3.3.1). Al pellet seccato sono stati aggiunti 500  $\mu$ l di tampone di estrazione (Tris 40 mM, triton 3%, NaCl 1M, PMSF 1mM, benzamidina hydrochloride 1mM, pH 8). Successivamente il tutto è stato lasciato ad incubare per 2 ore a temperatura ambiente.

Il tampone è composto da NaCl, che aumenta la forza ionica del mezzo e riesce a rimuovere l'enzima dalla parete solubilizzandolo; la PMSF e la benzamidina hydrochloride sono inibitori di proteasi. Terminata l'incubazione l'estratto è stato centrifugato per 5 minuti a 12000 giri per eliminare il debris.

### 3.6.2 Saggio spettrofotometrico

Il saggio di attività si avvale dell'uso dello spettrofotometro allo scopo di determinare una variazione lineare dell'assorbanza a 407 nm provocata dall'incremento di assorbanza causata dalla reazione enzima-substrato in determinati intervalli di tempo. Perché possa avvenire la reazione sono state necessarie 2 soluzioni (A e B) e l'estratto, inseriti in cuvetta nel seguente ordine: 1 ml di **soluzione A** (Tris-HCl, L- $\gamma$ -glutamyl-4-nitroanilide 4.6 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, pH 8), 100  $\mu$ l di **soluzione B** (glicin-glicina 575 mM sciolta in H<sub>2</sub>O, NaOH 1M, pH 8) e 100  $\mu$ l di estratto. L'assorbanza a  $\lambda$  407.0 nm è stata misurata ad intervalli regolari per circa 60/70 minuti. La reazione è stata fermata con soluzione serina-borato (inibitore della  $\gamma$ -GT) dopo 65 minuti. I dati sono stati analizzati secondo la formula:

$$U/gpf = Abs/min * (2000*10^3/7400) * V_{fin}/V_{estr}$$

Dove:

U = nmoli/min;

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

10<sup>3</sup> = fattore di conversione da  $\mu$ moli a nmoli;

7400 =  $\epsilon$  (assorbimento di una mol/l di 4-nitroanilina a 407 nm);

V<sub>fin</sub> = Volume finale in cuvetta;

V<sub>estr</sub> = Volume estratto (100  $\mu$ l);

### 3.7 Determinazione della componente tiolica (HPLC)

La determinazione del contenuto dei tioli a basso peso molecolare è stata effettuata tramite analisi cromatografica dopo la derivatizzazione con un marcatore fluorescente.

L'ammonio 7-fluoro-2,1,3-benzoossadiazolo-4-sulfonato (SBD-F) reagisce specificatamente con i gruppi –SH del glutatione (GSH) e di altri tioli, come  $\gamma$ -glutamilsteina ( $\gamma$ -EC), cisteina (cys) e cisteinilglicina (cys-gly) dando prodotti fluorescenti. Le molecole derivate sono poi separate in HPLC e quantificate usando un rivelatore fluorimetrico.

#### 3.7.1 Estrazione

La determinazione del contenuto dei tioli è stata effettuata pesando 5 mg di semi dei 7 genotipi di *A. thaliana* (*WT*, *ggt1*, *ggt2*, *L1*, *L2*, *L3* e *L4*), estratti meccanicamente con successivi lavaggi in esano. Al pellet seccato sono stati aggiunti 0.5 ml di Tampone di Estrazione Acido (HCl 0,1 M, EDTA 1 mM). La miscela è poi stata centrifugata a 10000 rpm per 5 minuti allo scopo di prelevare il surnatante.

#### 3.7.2 Riduzione e derivatizzazione

Nella reazione è stata preparata la seguente soluzione:

Estratto	15 $\mu$ l
Tampone borato 1 M (pH 10.3)	195 $\mu$ l
Tributil-fosfina ( <b>TBP</b> ) 1%	10 $\mu$ l
<b>SBD-F</b>	10 $\mu$ l

La TBP è dotata di forte potere riducente in ambiente alcalino e dopo 10 minuti d'incubazione determina la rottura dei ponti disolfuro di tutti i tioli in soluzione, così facendo i gruppi –SH liberi formati saranno poi in grado di legarsi all'SBD-F. A tal fine la miscela così ottenuta, è stata incubata per 60 minuti in bagno termostatico Dubnoff a 60°C ( $\pm$  1°C) e mantenuta in agitazione. Le provette sono state quindi trasferite in ghiaccio e dopo 2-3 minuti addizionate

con 25 µl di HCl 4 M allo scopo di bloccare la reazione di derivatizzazione e stabilizzare i coniugati fluorescenti.

### 3.7.3 Analisi cromatografica

Aliquote dei campioni derivatizzati (20 µl) sono state iniettate in un sistema HPLC (Beckman Coulter System Gold 126) ed i composti sono stati separati attraverso una colonna RP C18 (250 mm x 4,6 mm I.D., dimensione delle particelle 5 µm: Luna, Phenomenex) utilizzando come fase mobile un tampone NH<sub>4</sub>-formiato 75 mM (pH 2.9) – metanolo (97:3). Il metodo prevede una eluizione isocratica a temperatura ambiente con flusso di 1ml/minuto.

I derivati fluorescenti sono stati rivelati con un fluorimetro Yasco 821 FP (λ 386 nm; λ 516 nm) e identificati confrontando i tempi di ritenzione con quelli di composti standard. La quantificazione dei derivati fluorescenti di cisteina, γ-glutamylcisteina, cisteinilglicina e glutatione è stata ottenuta attraverso una curva di calibrazione.

## 3.8 Enzimo- istochimica

Questa tecnica permette di rilevare a livello citologico, il risultato della reazione substrato-enzima che si manifesta come una reazione colorimetrica che prevede la formazione di sali di Diazonio. I vetrini, già disponibili in laboratorio, contenevano più sezioni di siliqua dei genotipi *WT*, *ggt1*, *ggt2* e *L3*. Per fare i vetrini era stato necessario includere le silique congelate in OCT, sezionare il campione con microtomo a 20 µm e fissare le sezioni ottenute con acetone al supporto.

Reazione colorimetrica:

- sono stati sciolti 5 mg di substrato (GGMN, Sigma g5008) con 100 µl di DMSO (Dimetilsolfossido) e NaOH (1M) fino allo scioglimento della soluzione; poi è stato aggiunto 1.8 ml di acqua deionizzata prima dell'immersione dei vetrini;

- a parte sono stati pesati 30 mg di GlyGly ed aggiunti a 36 ml di PBS (Tampone fosfato salino: 14.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 g NaCl, 0.6 g KCl, pH 7.4);
- sono state sommate le 2 soluzioni precedenti con il colorante FAST GARNET GBC (4.2 mg dello stock al 90%).

La soluzione risultante è stata versata nel supporto per i vetrini. La reazione è stata condotta in leggera agitazione per 1 ora.

I vetrini colorati sono stati asciugati, protetti con olio minerale e copri vetrino e visualizzati al microscopio (Leica, DM 4000B) con diversi ingrandimenti (5x, 10x, 20x, 100x).



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Espressione attraverso real-time PCR

L'analisi qPCR è stata condotta su silique verdi di *Arabidopsis thaliana*, con l'obiettivo di studiare l'espressione delle quattro isoforme di GGT nei 7 genotipi (Fig.4). In silique di *Arabidopsis thaliana*, l'isoforma principalmente espressa è la *GGT2*, che è presente anche nel funicolo e nell'embrione in particolare durante lo stoccaggio di proteine di riserva, durante la disidratazione del seme; il gene *GGT1* è espresso in tutti gli organi specialmente nei tessuti floematici; l'isoforma *GGT3* è espressa in modo residuale (Martin *et al.*, 2007); e l'isoforma *GGT4* vacuolare risulta espressa in tutti i tessuti.

I genotipi *knockout ggt1* e *ggt2* sono mutanti di sottoespressione per gli omonimi e rispettivi geni *GGT1* e *GGT2*.

Le linee (*L1*, *L2*, *L3* ed *L4*) sono, invece, state trasformate con un costrutto interferenza che aveva come target i geni *GGT1* e *GGT2*.

I dati ottenuti permettono di evidenziare livelli differenti di espressione dei quattro geni nel tessuto in esame. In particolare l'isoforma *GGT1* risulta essere espressa a livelli bassissimi rispetto alla isoforma *GGT2*. Ciò la rende difficilmente quantificabile con il metodo utilizzato e richiederà ulteriori esperimenti con altri tessuti.

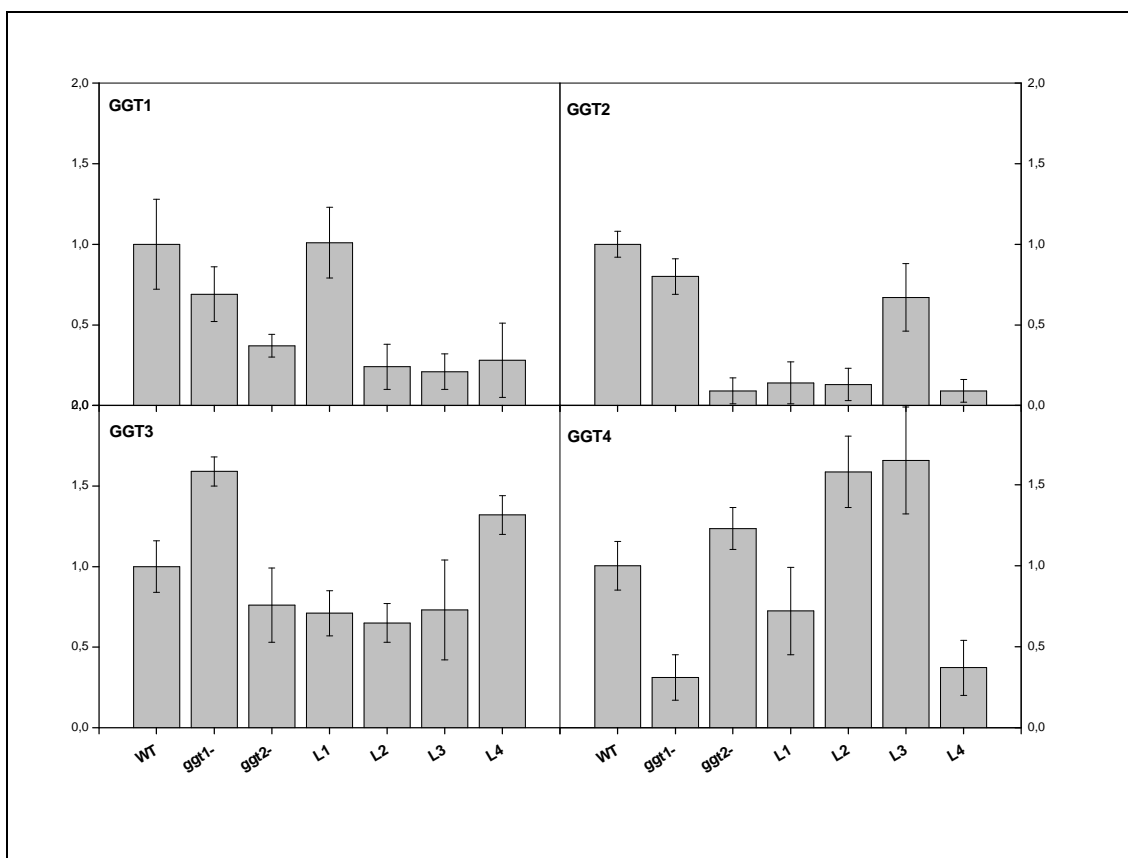
Da questi dati preliminari, comunque, l'accumulo di trascritti del gene *GGT1* sembrerebbe non significativamente inferiore rispetto a quello evidenziato dal *WT* nel mutante *ggt1*. Ciò può accadere e dipende dal sito in cui si posiziona il T-DNA, che evidentemente, in questo caso non inibisce la trascrizione, anche se a valle verrà prodotto un RNA non funzionale.

Nelle linee *ggt2*, *L2*, *L3* ed *L4* il gene *GGT1* invece mostra un'espressione inferiore rispetto a quella misurata nel genotipo *WT* (37-21%).

L'isoforma *GGT2* risulta, invece, drasticamente sottoespressa nel mutante omonimo (9%) e nelle linee *L1*, *L2* ed *L4* (9-14%), mentre nei rimanenti genotipi il livello di trascrizione è dell'80% nel genotipo *ggt1* e 67% nel genotipo *L3*, rispetto a quello misurato per il controllo (*WT*).

L'espressione delle isoforme *GGT3* e *GGT4* ha evidenziato differenze nei diversi genotipi. I trascritti del gene *GGT3* risultano più abbondanti nel mutante *ggt1* (+59% rispetto il controllo) e nella linea *L4* (+32%), mentre linee negli altri genotipi hanno evidenziato livelli di espressione inferiori rispetto al controllo (tra 65 e 76%). il gene *GGT4*, invece, ha mostrato livelli di espressione maggiori nei genotipi *ggt2* (+23%), *L2* (+58%) ed *L3* (+65%) mentre nei rimanenti genotipi oscilla tra il 65 e 76%.

La sovraespressione di queste 2 isoforme in siliqua potrebbe suggerire una compensazione dovuta alla mancanza delle isoforme apoplastiche.

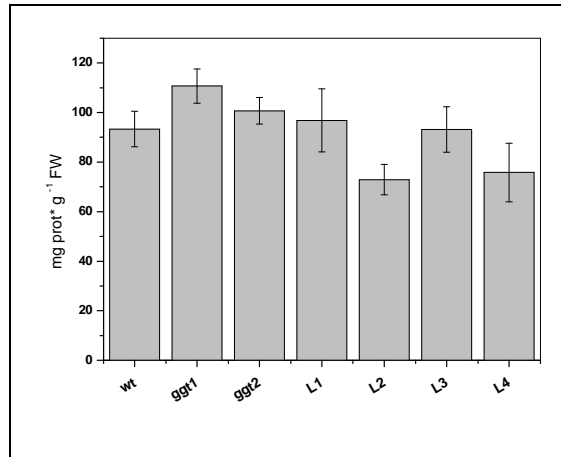


**Fig.4** Livello di espressione delle 4 isoforme GGT in silique di *A. thaliana*.

#### 4.2 Contenuto in proteina totale

La quantificazione proteica dei 7 genotipi ha permesso di rilevare differenze significative nel contenuto proteico dei semi di *Arabidopsis* (Fig.5). In particolare, le linee silenziante *L2* ed *L4* contengono rispettivamente il 22 e il 20% in meno di proteina totale rispetto al controllo (*WT*); dato che indica e conferma la partecipazione dell'enzima nel incremento del contenuto proteico

dei semi. Al contrario, nelle linee *knockout ggt1* e *ggt2*, la quantità di proteina sembra aumentare specialmente nel genotipo mutante *ggt1* di circa il 19%.

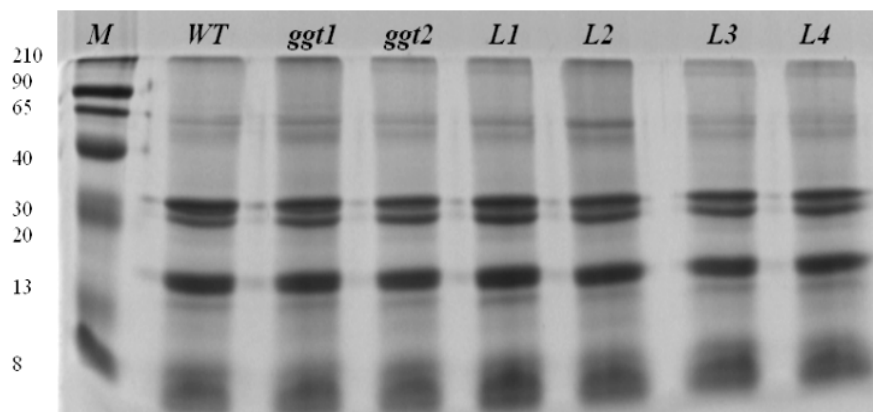


**Fig.5** Contenuto di proteina totale di semi di *A. thaliana*.

### 4.3 Profilo elettroforetico SDS-PAGE

E' stato dimostrato che la GGT interviene nell'accumulo di proteine nei semi di frumento (Fitzgerald *et al*, 2001) degradando il GSH negli amminoacidi che lo costituiscono; questo risultato è confermato somministrando GSH a cotiledoni immaturi che incrementano la quantità di proteina. L'ipotesi di partenza era che un'alterazione del livello di enzima potesse influire sulla composizione proteica, in particolar modo nell'accumulo di proteine di riserva del seme (albumine 2S, circa 12 KD).

I gel monodimensionali sono stati prodotti tramite corsa elettroforetica degli estratti proteici ottenuti dai semi di Arabidopsis. Ad un'analisi visiva, i gel non presentavano differenze importanti tra le linee (Fig.6).



**Fig.6** Profilo elettroforetico Monodimensionale; gel 11% acrilamide-bis-acrilamide.

Inoltre l'analisi densitometrica (Tab.4), ovvero l'acquisizione percentuale delle diverse bande nei genotipi, non ha riportato differenze significative in accordo con l'analisi visiva.

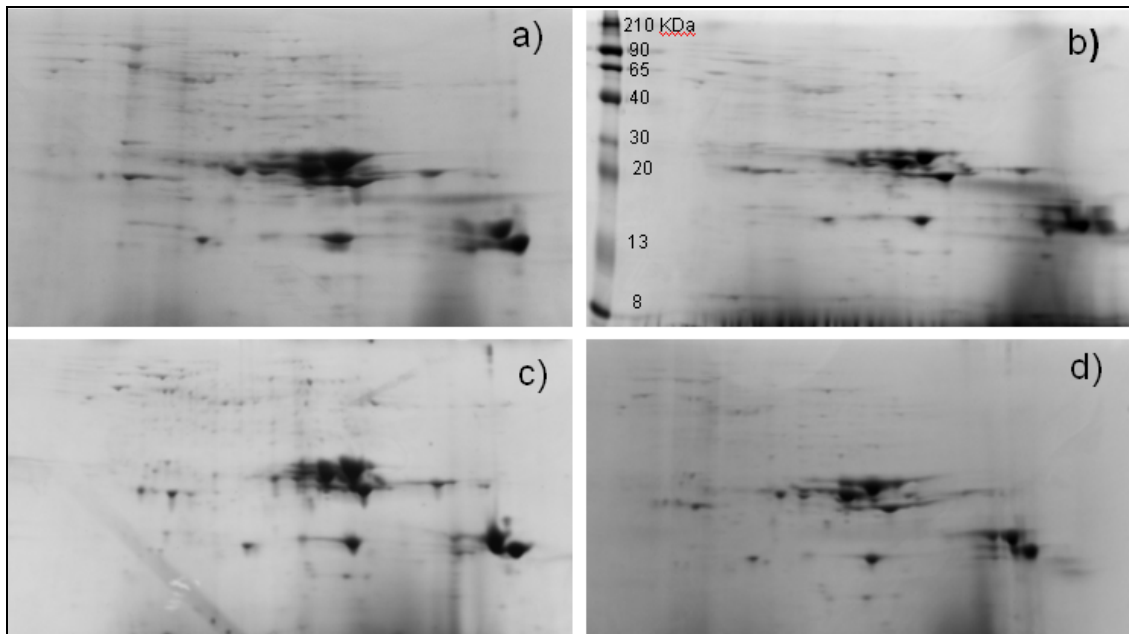
<b>Band</b>	<b>WT</b>	<b>ggt1</b>	<b>ggt2</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>
<b>1</b>	27,6	44,66	44,6	39,07	14,7	40,77	15,08
<b>2</b>	5,76	5,56	3,39	4,46	7,12	4,36	7,79
<b>3</b>	3,05	1,9	2,37	1,31	4,9	1,98	2,57
<b>4</b>	1,18	2,03	0,77	2,12	3,23	1,72	3,35
<b>5</b>	10,82	6,68	6,79	6,95	8,48	6,04	4,57
<b>6</b>	7,62	4,39	5,72	5,38	9,15	5,63	9,8
<b>7</b>	15,71	11,78	11,79	12,55	17,17	10,12	20,42
<b>8</b>	2,63	1,21	<b>2,15</b>	2,09	1,83	2,8	2,28
<b>9</b>	25,84	21,78	22,43	26,07	33,42	26,59	34,12

**Tab.4** Valori percentuali ottenuti mediante densitometria dei gel.

Le albumine 2S sono costituite da 2 subunità di circa 4 e 8 KD, per tale motivo ulteriori analisi si focalizzeranno sull'uso di gel di tris-tricina che è più specifico per la separazione di peptidi a bassi pesi molecolari.

#### **4.4 Profilo elettroforetico 2D-PAGE**

Analogamente al profilo elettroforetico SDS-PAGE, anche l'acquisizione dei gel 2D, ad una analisi visiva, non ha permesso di individuare differenze tra i genotipi (Fig.7). Tutte le linee risultano simili (immagini L1, L2 e L4 non riportate); al momento si sta investigando, attraverso la densitometria, sulla quantificazione precisa degli spot proteici. La densitometria permetterà di rilevare il contributo percentuale e la presenza, dei singoli spot per genotipo, uniformando eventuali variazioni di caricamento.



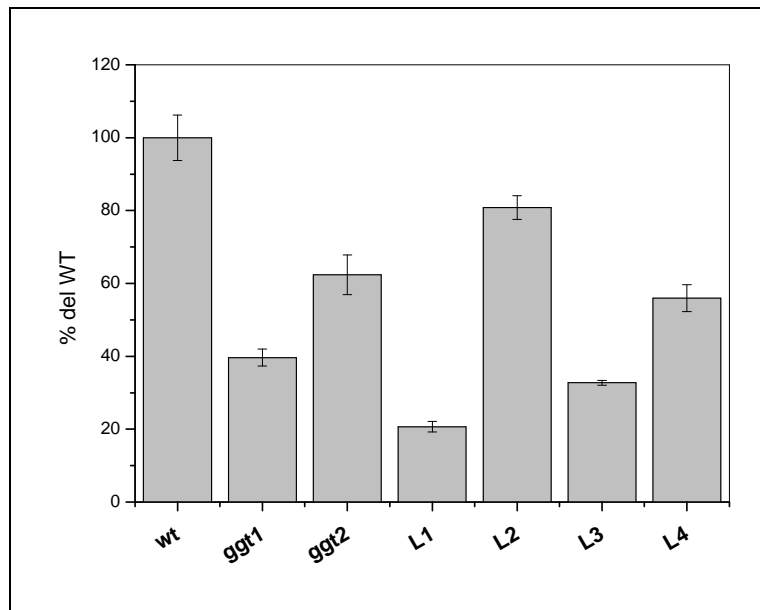
**Fig.7** Profili elettroforetici di estratti proteici di semi di *A. thaliana*; **a)** genotipo *WT*, **b)** genotipo *ggt1*, **c)** genotipo *ggt2*, **d)** genotipo *L3*.

Allo stato dell'arte, la ridotta espressione del gene *GGT1* e *GGT2* non ha consentito di evidenziare, tramite indagini elettroforetiche, variazioni nel contenuto e nella composizione delle proteine dei semi di *Arabidopsis*. Tuttavia, altre indagini in corso tramite marcatura iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) delle proteine, indicano che nella linea *L3* il livello di espressione di alcune proteine di riserva (es. albumina 2S, cruciferina) sia effettivamente ridotto del 30-40%. Pertanto occorrerà approfondire tale apparente discrepanza, andando a realizzarle, ad esempio, una separazione elettroforetica più dettagliata nella regione contenente le proteine alterate.

#### 4.5 Misura dell'attività GGTAstica

Questo saggio ha permesso di misurare la formazione di prodotti originati dall'attività dell'enzima GGT, misurata nel tempo a 407 nm. Nella pianta il gene *GGT1* è espresso in tutti i tessuti e principalmente nei tessuti vascolari, in modo particolare nel floema, mentre *GGT2* è espresso negli embrioni in formazione all'interno delle silique e in modo transiente negli altri tessuti come il polline. Il silenziamento delle isoforme apoplastiche GGT nelle linee mutanti si dovrebbe tradurre con una perdita di attività nel seme. Le

indagini sull'attività enzimatica della GGT nelle diverse linee, ha mostrato una certa variabilità (Fig.8). 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 che varia dal 60 al 80%; anche le altre linee mutanti dimostrano un calo di attività GGTAica variabile, compresa tra il 20% ed il 40% circa.



**Fig.8** Saggio di attività GGTAica condotta su semi di *A. thaliana*.

#### 4.6 Contenuto tiolico dei semi

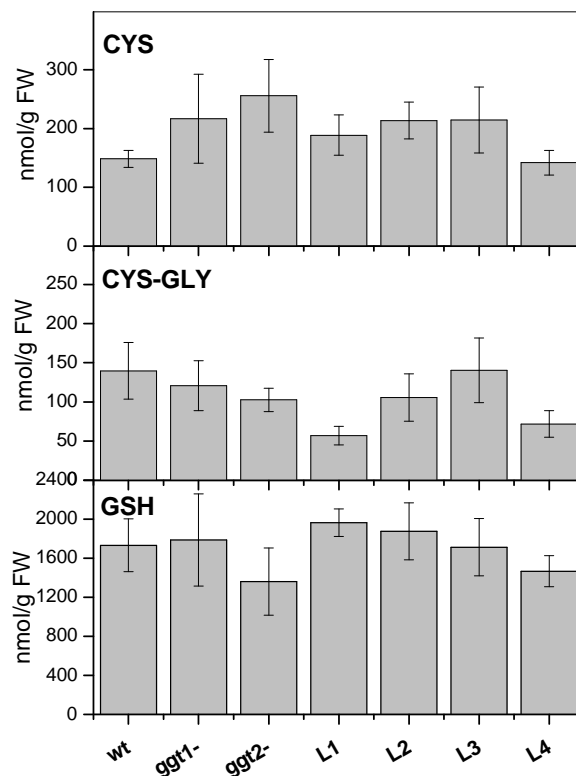
Lo scopo dell'analisi era di determinare il contenuto di tioli a basso peso molecolare nei semi. Studi precedenti hanno dimostrato che l'enzima GGT catalizza la rottura del legame  $\gamma$ -glutamilico del GSH producendo cisteinil-glicina e acido glutammico (Ferretti *et al.*, 2009); di conseguenza la cys-gly diviene in questa analisi, una molecola utile per studiare l'effetto della mutazione sull'enzima GGT nei semi.

Le differenze più importanti si notano nel contenuto di cisteina e cisteinil-glicina (Fig.9); rispetto al controllo tutte le linee dimostrano un incremento variabile di cisteina, specialmente nei genotipi *ggt1*, *ggt2*, *L2* e *L4*; l'andamento è invece ribaltato nel contenuto di cys-gly dove le linee mutanti risultano carenti; in particolare i genotipi *L1* e *L4*.

E' noto che l'isoforma apoplastica *GGT2* risulta maggiormente espressa negli embrioni e nel funicolo di *Arabidopsis* (Cairns *et al.* 2006), mentre l'isoforma

*GGT1* è espressa in tutti gli organi specialmente nei fasci floematici. Questo potrebbe spiegare il motivo per cui la linea *knockout ggt2* si differenzia dalla linea *ggt1* per il minor contenuto di cys-gly. Il contenuto di cys-gly nelle linee silenziate è mediamente inferiore al controllo e la variazione rispecchia il diverso grado di silenziamento genico.

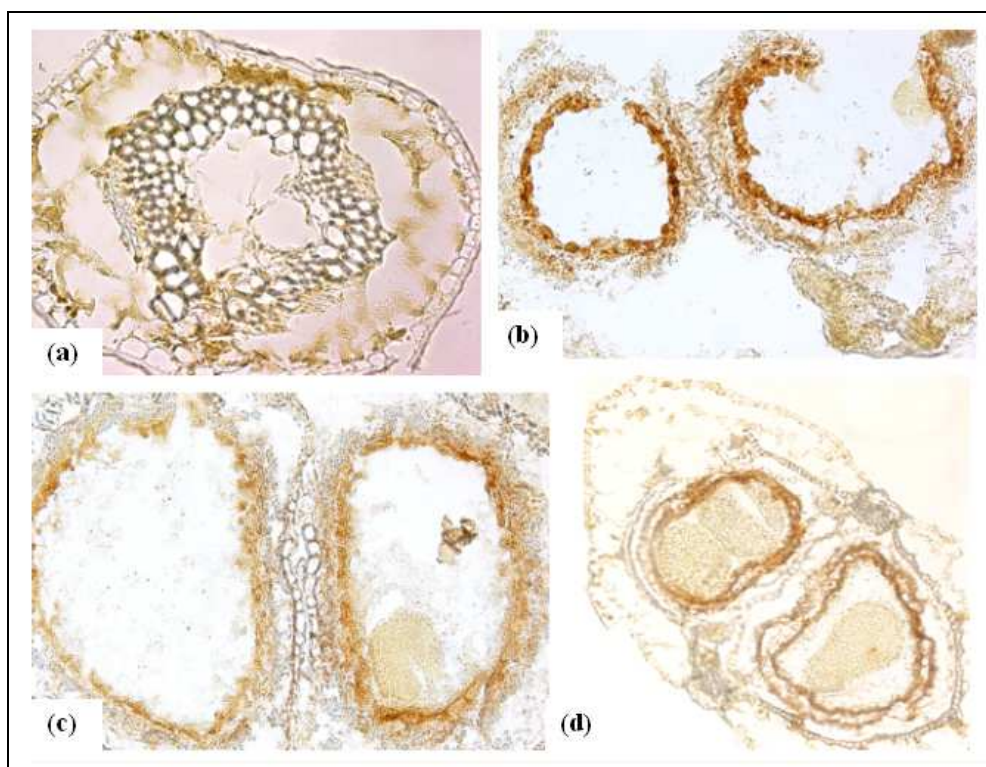
Un'altra ipotesi potrebbe concentrarsi sul ruolo delle altre 2 isoforme *GGT3* e *GGT4* che in questo studio non sono state soggette a blocco o silenziamento; *GGT3* e *GGT4* normalmente, non risultano particolarmente espresse nel seme ma un'alterazione delle 2 isoforme apoplastiche potrebbe portare ad una loro sovraespressione ed quindi ad un meccanismo alternativo di degradazione del GSH producendo comunque livelli inattesi di cys-gly. Il contenuto di GSH risulta uniforme e non presenta differenze significative nei diversi genotipi.



**Fig.9** Contenuto di cisteina (cys), cisteinil-glicina (cys-gly) e GSH (glutazione) nei semi di *A. thaliana*.

#### 4.7 Localizzazione istochimica dell'attività GGtasica

L'attività della gamma-glutamyl transferasi nelle silique è stata determinata istochimicamente attraverso la formazione di macchie brune provocate dal deposito di sali insolubili di diazonio (fig.10). L'attività dell'enzima in tutti i genotipi è intensa specialmente nel tegumento interno della siliqua, a livello dei fasci vascolari; una leggera pigmentazione è presente anche a livello dei semi (qualora presenti). Le sezioni dei 3 genotipi mutanti (*ggt1*, *ggt2* e *L3*) non hanno mostrato particolari differenze in intensità rispetto al controllo (*WT*).



**Fig.10** Localizzazione enzimo-istochimica della gamma-glutamyl transferasi (GGT) in sezioni di siliqua di *A. thaliana*. **(a)** genotipo *WT*, **(b)** genotipo *ggt1*, **(c)** genotipo *ggt2*, **(d)** genotipo *L3*.



## 5. CONCLUSIONI

L'enzima GGT è riconosciuto agire nei semi e nelle silique svolgendo una 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.

In questo studio si volevano valutare gli effetti della sottoespressione dei geni che codificano per le due isoforme apoplastiche di GGT, *GGT1* e *GGT2*, sul contenuto proteico, sui profili elettroforetici e sul contenuto di composti tiolici, in relazione con l'attività e la localizzazione dell'enzima.

La PCR quantitativa ha evidenziato un livello di sottoespressione dei geni *GGT1* e *GGT2* più significativo nelle linee L2 ed L4.

L'attività dell'enzima è ridotta nei genotipi mutati in modo particolare in alcune linee interferenza e probabilmente ciò è dovuto alla sottoespressione di entrambe le isoforme apoplastiche che si riscontra nel livello di espressione genica.

L'analisi sulla quantificazione delle proteine totali ha sottolineato una leggera variazione in 2 genotipi silenziati *L2* e *L4*; differenza che non si riscontra nè a livello di profilo elettroforetico (SDS-PAGE e 2D-PAGE) nè a livello di densiometria del gel monodimensionale. Questi dati non sembrerebbero in relazione con il grado di trascrizione ed attività dell'enzima.

Nella composizione tiolica degli estratti è stata rilevata una variazione nel contenuto di cys-gly ovvero del prodotto dell'attività GGTAse che in tutti i genotipi era in calo. Infine la localizzazione immuno-istochimica non ha permesso di rilevare differenze nei tessuti di 4 genotipi a causa probabilmente dell'intervento dell'isoforma vacuolare *GGT4* che ha reso la colorazione uniforme.

Complessivamente, i dati ottenuti in questo lavoro indicano che la riduzione di espressione dei geni *GGT1* e *GGT2* comporta effettivamente variazioni nel livello di attività enzimatica, di proteina totale, di composizione tiolica; altre analisi in corso indicano invece un effetto a livello di espressione di alcune proteine di riserva. I risultati analitici ottenuti non si prestano ad una immediata interpretazione, anche perché le due isoforme *GGT1* e *GGT2*, sebbene molto

simili, svolgono una diversa funzione a livello tissutale. Saranno pertanto necessarie ulteriori indagini per chiarire il ruolo di questi geni nel rifornimento di cisteina al seme.

## 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.

**Balendiran GK, Dabur R, Fraser D, (2004).** *The role of glutathione in cancer.* Cell Biochem Funct. Nov-Dec;22(6):343-52.

**Beck A, Lenzian K, Oven M, Christmann A, Grill E, (2003).** *Phytochelatins synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates.* Phytochemistry. Feb;62(3):423-31.

- 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.
- Blum R, Beck A, Korfte A, Stengel A, Letzel T, Lenzian K, Grill E**, (2007). *Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates*. *Plant J*.;49:740–749.
- Blum R, Meyer KC, Wünschmann J, Lenzian KJ, Grill E**, (2010). *Cytosolic action of phytochelatin synthase*. *Plant Physiol*;153:159–169.
- 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.
- Bolchi A, Petrucco S, Tenca PL, Foroni C, Ottonello S**, (1999). *Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in*

*response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by l-cysteine.* Plant Mol Biol 39: 527–537.

**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).** *S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase.* Plant Cell 11: 1485–1498.

**Bozdech Z, Ginsburg H, (2004).** *Antioxidant defense in Plasmodium falciparum – data mining of the transcriptome.* Malaria Journal 3:23.

**Brazier-Hicks M, Evans KM, Cunningham OD, Hodgson DRW, Steel PG, Edwards R, (2006).** *Catabolism of glutathione-conjugates in Arabidopsis thaliana. Role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenchlorim.* J. Biol. Chem. 2006;283:21102–21112.

**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.

**Charles B Stephensen, Grace S Marquis, Steven D Douglas, Laurie A Kruzich, and Craig M Wilson, (2007).** *Glutathione, glutathione peroxidase, and selenium status in HIV-positive and HIV-negative*

*adolescents and young adults*<sup>1,2,3</sup>. © American Society for Clinical Nutrition.

**Chew O, Whelan J, Millar AH**, (2003). *Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants*. J. Biol. Chem. 2003;278:46869–46877.

**Cobbett C, Goldsbrough P**, (2002). *Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis*. Annu Rev Plant Biol.;53:159-82.

**Den Boer BGW, Murray JAH**, (2000). *Triggering the cell cycle in plants*. Trends Cell Biol 10:245–250.

**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 CJ-Honduvilla**, (1996). *Function of the ascorbate-glutathione cycle in aged 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  $\gamma$ -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.

**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*

*Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J.* 2010a;64:825–838.

**Droux M**, (2004). *Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey.* *Photosynth. Res.* 2004;79:331–348.

**Ducic T, Liric I-Rajlic, Mitrovic A, Radotic K**, (2003). *Activities of antioxidant systems during germination of *Chenopodium rubrum* seeds.* *Biol Plant* 47: 527-533.

**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.

**Fontaine O, Huault C, Pavis N, Billard J**, (1994). *Dormancy breakage of *Hordeum vulgare* seeds: effects of hydrogen peroxide and scarification on glutathione level and glutathione reductase activity.* *Plant Physiol Biochem*32: 677-683.

- 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.
- Geu-Flores F, Nielsen MT, Nafisi M, Møldrup ME, Olsen CE, Motawia MS, Halkier BA, (2009).** *Glucosinolate engineering identifies a  $\gamma$ -glutamyl peptidase.* Nat. Chem. Biol.;5:575–577.
- 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.
- Grant CM, Maclver FH, Dawes IW, (1996).** *Gluthatione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Curr Genet 29: 511-515.
- 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.



- Grzam A, Martin MN, Hell R, Meyer AJ, (2007).**  *$\gamma$ -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.
- Hell R, Bergmann L, (1990).**  *$\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization.* Planta.;180:603–612.
- 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 H<sub>2</sub>S.* Plant Physiol 124: 461–473.
- Höller K, Király L, Künstler A, Müller M, Gullner G, Fattinger M, and Zechmann B, (2010).** *Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur-induced resistance in tobacco mosaic virus-infected genetically susceptible Nicotiana tabacum plants.* Mol. Plant Microb. Int. 2010;23:1448–1459.
- 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* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *Biol Chem.* Aug 6;279(32):33463-70. Epub Jun 4.
- Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F, (1998).** *Role of the ascorbate- glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves.* *Plant Physiol.* 118, 1327-1335. Karpinski.
- 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.
- Kim Bj, Choi CH, Lee CH, Jeong SY, Kim JS, Kim BJ, Yim HS, Kang SO, (2005).** *Gluthatione is required for growth and prespore cell differentiaction in Dictyostelium.* *Dev Biol* 284: 387-398.
- Klapheck S, (1988).** *Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes.* *Physiol. Plant.;*74:727–732.
- Klapheck S, Chrost B, Starke J, Zimmermann H, (1992).**  *$\gamma$ -Glutamylcysteinylserine a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae.* *Bot. Acta.;*105:174–179.
- Kocsy G, Galiba G, Brunold C, (2001).** *Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants.* *Physiol Plant.* Oct;113(2):158-164.

- 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.
- Kushnir S, Babychuk E, Kampfenkel K, Belles-Boix E, Van Montagu M, Inzé D**, (1995). *Characterization of Arabidopsis thaliana cDNAs that render yeasts tolerant toward the thiol-oxidizing drug diamide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995;92:10580–10584.
- 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,  $SO_4^{2-}$  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). *Inter-organ 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 Physiol Mar;137(3):921-30. Epub 2005 Feb 25.
- Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hörtensteiner S, Martinoia E, Rea PA, (1998).** *AtMRP2. an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1* Plant Cell. 1998;10:267–282.
- MacNicol PK, (1987).** *Homoglutathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification and substrate specificity.* Plant Sci.;53:229–235.
- Manoli A, Sturaro A, Trevisan S, Quaggiotti S, Nonis A, (2012).** *Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize.* Journal of Plant Physiology, Volume 169, Issue 8, 15 May 2012, Pages 807–815.
- Marrs KA, (1996).** *The function and regulation of glutathione S-transferases in plants.* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 127-158.
- Martin MN, Slovin JP, (2000).** *Purified  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates.* Plant Physiology 122: 1417-1426.
- Martin MN, Saladores PH, Lambert E, Hudson AO, Leustek T, (2007).** *Localization of members of the  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase family identifies sites glutathione and glutathione S-conjugates hydrolysis.* Plant Physiology 144: 1715-1732.

- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N, (1993).** *ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants.* Nature. 1993;364:247–249.
- 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, 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.
- Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Müller C, Salcedo-Sora E, Kruse C, Orsel M, Hell R, Miller AJ, Bray P, Foyer CH, Murray JAH, Meyer AJ, Cobbett CS, (2010).** *Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquinone-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:2331–2336.
- 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.
- 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.
- Ohkama-Ohtsu N, Radwan S, Peterson A, Zhao P, Badr A, Xiang C, Oliver D, (2007a).** *Characterization of the extracellular  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis.* Plant Journal 49: 865-877.

- Ohkama-Ohtsu N, Zhao P, Xiang C, Oliver DJ, (2007b).** *Glutathione-conjugates in the vacuole are degraded by  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis.* Plant Journal 49: 878-888.
- Ohkamu-Ohtsu N, Oikawa A, Zhao P, Xiang C, Saito K, Oliver D, (2008).** *A  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in Arabidopsis.* Plant Physiol. 2008;148:1603–1613.
- 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.
- Pike S, Patel A, Stacey G, Gassmann W, (2009).** *Arabidopsis OPT6 is an oligopeptide transporter with exceptionally broad substrate specificity.* Plant Cell Physiol. 2009;50:1923–1932.
- Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G, (2011).** *Increased intracellular  $H_2O_2$  availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts.* Plant Cell Environ. 2011;34:21–32.
- Rauser WE, Schupp R, Rennenberg H, (1991).** *Cysteine,  $\gamma$ -glutamylcysteine and glutathione levels in maize seedlings.* Plant Physiol. 1991;97:128–134.
- Rea PA, (1999).** *MRP subfamily transporters from plants and yeast.* J. Exp. Bot. 1999;50:895–913.
- Rennenberg H, Schmitz K, Bergmann L, (1979)** *Long distance transport of sulfur in Nicotiana tabacum.* Planta 176:68–74.

- 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, Gelhaye E, Jacquot JP, (2002).** *Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis.* FEBS Lett. 2002 Jan 30;511(1-3):145-9.
- 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.
- 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.
- Seidegård J and Ekström G, (1997).** *The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics.* Environ Health Perspect. June; 105(Suppl 4): 791–799.
- Sexton P, Shibles R, (1999).** *Activity of ATP sulfurylase in reproductive soybean.* Crop Sci 39: 131–135.
- Simontacchi M, Lsadovsky, puntarlo S, (2003).** *Profile of antioxidant content upon developing of Sorghum bicolorseeds.* Plant Sci 164: 709-715.



- Smith, PK, et al.,** (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Analytical Biochem..150 (1): 76–85.
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA,** (1989). *Properties and functions of glutathione reductase in plants.* Physiol. Plant. 1989;77:449–456.
- 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).  *$\gamma$ -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.
- 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  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 75: 4806-4809.

- 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.
- Tommasini R, Martinoia E, Grill E, Dietz KJ, Amrhein N**, (1993). *Transport of oxidized glutathione into barley vacuoles: evidence for the involvement of the glutathione-S-conjugate ATPase*. Z. Naturforsch.;48c:867–871.
- Trevisan S, Manoli A, Begheldo M, Nonis A, Enna M, Vaccaro S, Caporale G, Ruperti B, Quaggiotti S** (2011). *Transcriptome analysis reveals coordinated spatiotemporal regulation of hemoglobin and nitrate reductase in response to nitrate in maize roots*. New Phytologist 2011;192:338-352.
- 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.
- Wells WW, Xu DP, (1994).** *Dehydroascorbate reduction.* J Bioenerg Biomembr. Aug;26(4):369-77.
- Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG, (2005).** *Characterization of the omega class of glutathione transferases.* Methods Enzymol.;401:78-99.
- Will Y, Fischer KA, Horton RA, Kaetzel RS, Brown MK, Hedstrom O, Lieberman MW, Reed Dj, (2000).** *Gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function, and cellular function.* Hepatology 32: 740-749.
- Wolf AE, Dietz KJ, Schroder P, (1996).** *Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole.* FEBS Lett.;384:31–34.
- Zechmann B, Zellnig G, Urbanek-Krajnc A, Müller M, (2007).** *Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected Cucurbita pepo. L. plant.* Arch. Virol. 2007;152:747–762.
- 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.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N, (1999).** *Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced*

by overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 1999a;121:1169–1177.

**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* (Pessaraki M, ed.), New York: Marcel Dekker, Inc., Pages 539-548.

### **6.1 Siti internet consultati**

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>

<http://www.mn-net.com>

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

<http://prato.daapv.unipd.it>

<http://www.Sigmaaldrich.com>

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

### **6.2 Acronimi ed abbreviazioni testuali**

ABC- ATP Binding Cassette

Abs- assorbanza

ATP- Adenosina Trifosfato

CLT- Chloroquine Resistance Transporter (CRT) -like Transporter

DTT- DiThioThreitol

GGC- Gamma-glutamylcysteine

GGMN- Glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide

GR- Glutathione riduttasi  
GSNO- S-nitrosoglutatione  
GGP1- Gamma-glutamyl peptidase 1  
HPLC- high performance liquid *chromatography*  
NL- Non Linear  
NO- Ossido nitrico  
PCS- Phytochelatin synthase  
PMSF- Phenylmethanesulfonyl fluoride  
SDS- Sodium dodecyl sulfate  
TRX- Tioredoxina



## RINGRAZIAMENTI

Non mi è facile ammettere quando mi trovo di fronte a delle difficoltà. In questi due anni ho vissuto un'esperienza particolare fatta di alti e bassi, di dolori e gioie che mi hanno portato molto spesso a pensare un finale diverso da quello che stò realizzando. Molte sono state le persone che voglio ringraziare di avermi spinto a continuare anche quando era più facile mollare la presa. Quando realizzai che non era possibile laurearsi ad ottobre 2012, pur essendo stato sempre perfetto ed avendo rincorso il tempo e molte difficoltà, pensai se valesse veramente la pena di riprovarci, infatti chi mi conosce sa che quando un mio progetto è "compromesso" mi è più facile eliminarlo in quanto finisco per disprezzarlo. Dopo tutto ciò che è accaduto la prima persona che vorrei ringraziare è "me stesso", ovvero quella persona che è partita da zero, da solo, 5 anni fa con l'ingenuità di un ragazzino di 19 anni, e che ha saputo ritagliarsi uno spazio senza mai disturbare nessuno. Ringrazio i miei genitori per il sostegno economico, i miei fratelli per la forte presenza e mia nonna Maria per la spinta che mi ha dato.

Ringrazio mia zia Anna per essersi sempre interessata come mia zia Neris dall'Alabama.

Un ringraziamento forte va a mia zia Patrizia che un giorno non molto bello mi ha detto "continua che sei bravo" e questa frase, più di qualunque altra, mi ha portato qua oggi (e non esagero). Ringrazio anche mio zio Daniele, mia zia Daniela, mio cugino Luca e Fashion Genny che quando mi sono laureato nel 2010 mi hanno riempito di complimenti.

Ringrazio le compagne di corso grandiose nonché membre onorarie del gruppo "Gravistimolazione" ovvero Sabrina, per aver sopportato le mie parodie in laboratorio, Maria, come grandissima amica piena di allegria, Ilaria, con il suo spirito ironico, Chiara e "i Journal Club", Costanza, Elisa e la mitica Giovanna.

Un grazie va ad Anna Rita Trentin, Antonio Masi, Diego, Mara, Michela, Marta (che mi sta insegnando un po' di spagnolo) e tutti gli altri membri del laboratorio.

Ma un grande GRAZIE va ad Alessandro Manoli in arte Manoli *et al.* 2012 o Ale-real-time che ha dovuto subirmi da aprile 2012 specialmente quando faceva

piastre. Un ringraziamento va a Silvia Quaggiotti per aver speso del tempo prezioso nel nostro progetto.

Ringrazio anche coloro, fuori dall'università, che sono più bravi a parlare male dietro le spalle e che spero si ricredano.

Ringrazio tutti coloro che ho dimenticato scrivendo queste poche righe....

*Alessandro Sturaro, 7 marzo 2013.*