



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Scienze MM.FF.NN.

Laurea di primo livello in Biotecnologie

Elaborato di Laurea

**Identificazione di un putativo canale per il potassio nella membrana
interna di cloroplasti di *Spinacia oleracea***

Tutor: Prof.^{ssa} Ildikò Szabò,
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott. Enrico Teardo,
Dipartimento di Biologia

Laureando: Alberto Mazzocco

Anno Accademico 2006/2007

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

APS: ammonio persolfato
ATP: adenosina trifosfato
BCA: acido bicinconinico
BSA: albumina di siero bovino
cTP: chloroplast transit peptide
DTT: ditioneitrato
EDTA: acido etilendiaminotetracetico
ET: estratto totale
kDa: chiloDalton
IE: Inner Envelope - membrana interna
MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
NADPH: nicotinammide-adeninduceotide-fosfato ridotto
BN: Blue Native
OE: Outer Envelope - membrana esterna
PAGE: elettroforesi su gel di poliacrilamide
PMSF: fluoruro di fenilmetansulfonile
PVDF: Poly(vinilidene difluoride)
SB: tampone di solubilizzazione
SDS: sodio dodecil solfato
TBS: Tris-Buffered Saline
TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine
THY: membrana tilacoidale
Tris: 2-amino-2-idrossi-metilpropano-1,3-diolo
TTBS: Tween-Tris-Buffered Saline

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. ABSTRACT | 5 |
| 2. INTRODUZIONE | 7 |
| 2.1 I CANALI IONICI | 8 |
| <i>2.1.1 Caratteri generali</i> | 8 |
| <i>2.1.2 Canali ionici per il potassio</i> | 9 |
| 2.2 PRODUZIONE DELL'ANTICORPO ANTI-KPORE | 10 |
| 3. MATERIALI E METODI | 11 |
| 3.1 PREPARAZIONE DI VESCICOLE DI MEMBRANA ESTERNA, INTERNA E TILACOIDALE DA CLOROPLASTI DI SPINACIO | 11 |
| 3.2 SDS - PAGE | 12 |
| 3.3 WESTERN BLOT | 13 |
| 3.4 SAGGIO IMMUNOLOGICO | 13 |
| 3.5 MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI CLOROFILLA | 14 |
| 3.6 DOSAGGIO PROTEICO MEDIANTE SAGGIO CON BCA | 15 |
| 3.7 ESTRAZIONE ALCALINA | 15 |
| 3.8 BLUE NATIVE - PAGE | 15 |
| 3.9 COLORAZIONE SILVER STAINING | 16 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 18 |
| 4.1 CONCLUSIONI | 25 |
| 5. BIBLIOGRAFIA | 27 |

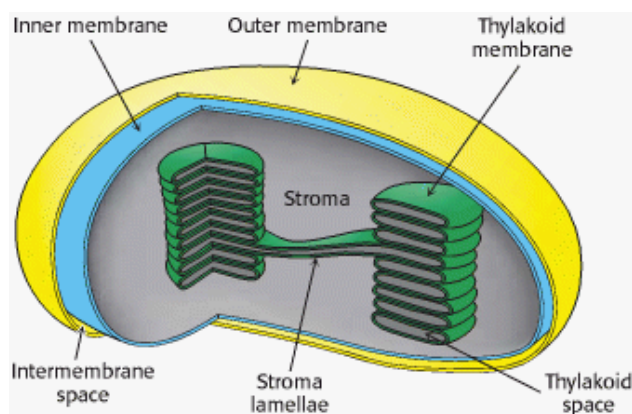
1. ABSTRACT

Una delle più vaste e fisiologicamente rilevanti categorie di canali ionici, tanto nelle piante quanto negli animali, è quella dei canali per il potassio. Lo scopo di questo lavoro è quello di identificare un putativo canale per il potassio nella membrana interna del cloroplasto di spinacio. Questa ricerca, interamente condotta su vescicole di membrana interna isolata da cloroplasti della foglia, ha fatto uso di tecniche classiche di indagine biochimica quali SDS-PAGE e Western Blot e si è basata in particolare sull'utilizzo dell'anticorpo anti-KPORE. Questo anticorpo è stato sviluppato *ad hoc* contro la sequenza amminoacidica TMTTVGYGD caratteristica del filtro di selettività dei canali del potassio, che risulta essere fortemente conservata nella maggior parte di questi canali in vari organismi.

2. INTRODUZIONE

Le piante verdi sono organismi autotrofi, riescono cioè a convertire l'energia luminosa in energia chimica necessaria al loro fabbisogno, per mezzo di un processo noto come *fotosintesi*.

Dal punto di vista stechiometrico, la fotosintesi è una reazione semplice: acqua e anidride carbonica si combinano a formare carboidrati e ossigeno molecolare, secondo la reazione: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2$. Nelle piante verdi questa reazione avviene in particolari organelli, i cloroplasti, al cui interno l'energia luminosa viene catturata da una classe di molecole, le clorofille, e utilizzata per generare elettroni ad alta energia sotto forma di NADPH, oltre che ATP, in una serie di reazioni durante la *fase luminosa*. Nella fase delle *reazioni al buio* o *ciclo di Calvin*, il NADPH e l'ATP appena formati sono utilizzati per ridurre il biossido di carbonio a 3-fosfoglicerato. In questa serie di reazioni l'ossigeno non è altro che un prodotto collaterale. Come detto, la fotosintesi nelle piante verdi avviene all'interno di organelli specializzati: i cloroplasti. Il cloroplasto possiede due membrane, una esterna e una interna separate da uno spazio intermembrana. La membrana interna racchiude uno *spazio stromale*, sito in cui avvengono le reazioni della fotosintesi. Nello stroma sono presenti strutture membranose dette *tilacoidi*, a forma di sacchi appiattiti o dischi. I tilacoidi sono impilati l'uno sull'altro a formare un *grano*. Differenti grani sono collegati da regioni della membrana tilacoidale dette *lamelle stromali*. Le membrane tilacoidali separano il lumen tilacoidale dallo spazio stromale; perciò i cloroplasti hanno tre differenti membrane e tre spazi distinti (intermembrana, stromale e lumenale).



2.1 I CANALI IONICI

2.1.1 Caratteri generali

La membrana plasmatica è l'unica parte della cellula a diretto contatto con il mezzo extracellulare, perciò attraverso di essa avvengono tutti gli scambi di materia, di energia e di informazione con l'ambiente esterno. Il passaggio di sostanze dall'esterno all'interno della cellula (e viceversa) è uno dei processi più delicati e selettivi che si verificano a livello della membrana plasmatica, in quanto da esso dipende l'entrata di sostanze nutritive (ad es. zuccheri e amminoacidi) e di gas respiratori, l'eliminazione dei prodotti di scarto e la regolazione della concentrazione intracellulare degli ioni (ad es. Na^+ , K^+ , Ca^{2+}).

Il trasporto transmembrana delle sostanze può avvenire per diffusione semplice attraverso il doppio strato fosfolipidico nel caso di piccole molecole apolari o scarsamente polari (compresi i gas respiratori O_2 e CO_2) e sostanze liposolubili in genere, o tramite proteine trasportatrici di membrana nel caso di sostanze idrosolubili. Gli scambi mediante proteine di membrana comprendono le proteine canale e le proteine *carrier* (trasporti mediati).

Le proteine-canale formano dei "pori" nella membrana attraverso i quali transitano a grande velocità ioni inorganici, interagendo solo blandamente con la superficie interna del canale. Questo tipo di trasporto prende il nome di trasporto passivo, poiché gli ioni seguono il loro gradiente elettrochimico.

Tutte le membrane cellulari possiedono un numero elevatissimo di canali ionici, ciascuno dei quali mostra una selettività più o meno spiccata verso una determinata specie ionica: i canali cationici per i diversi cationi (K^+ , Na^+ e Ca^{2+}) e i canali anionici per gli anioni (soprattutto per il Cl^-).

La struttura molecolare di un canale ionico, sostenuta oggi da studi di cristallografia ai raggi X, mostra la presenza di un "condotto" percorribile dallo ione, dove è situato un *filtro di selettività* che consente il transito solo degli ioni di una determinata specie.

La selettività è data, oltre che dal diametro del poro, anche dalla presenza di cariche elettriche fisse variamente distribuite sulla parete del canale; la capacità di passaggio di uno ione sarà influenzata dal segno, dalla densità e dalla intensità di queste cariche. Inoltre non si può ignorare che gli ioni sono particelle elettricamente cariche e che in soluzione acquosa si trovano in forma idratata. Un'ipotesi attendibile è che, per superare il filtro di selettività, lo ione debba essere reso anidro; perché ciò possa avvenire, i legami che lo vincolano ai dipoli idrici devono essere vinti da un opportuno anello di cariche elettriche di segno opposto.

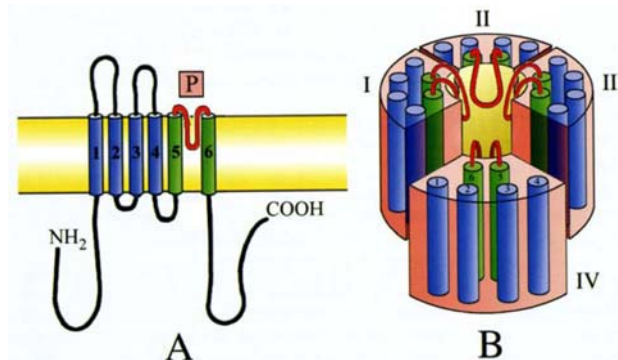
I canali ionici non mostrano solo possibilità di una selezione qualitativa degli ioni che devono attraversare la membrana grazie al filtro di selettività, ma permettono anche una discriminazione quantitativa dei singoli flussi ionici; infatti la maggioranza dei canali ionici gode della facoltà di passare, in risposta ad uno stimolo adeguato, da uno stato aperto (in cui c'è flusso di ioni) ad uno stato chiuso o ad uno stato inattivo in cui gli ioni non passano.

Questa facoltà dei canali ionici permette di regolare finemente ed in qualsiasi momento il flusso di ioni in entrata ed in uscita dalla cellula grazie alla presenza di un "gate" in grado di occludere o lasciar pervio il lume del canale; da qui deriva il nome di *gated channels*.

2.1.2 Canali ionici per il potassio

Una delle classi maggiormente diversificate tra i canali ionici è quella dei canali selettivi per il potassio (K^+). La struttura generale di un canale per il potassio mostra quattro subunità identiche tra loro, a formare un tetramero inserito nel doppio strato fosfolipidico della membrana, al centro del quale si trova il passaggio attraverso cui fluiscono gli ioni.

Ogni subunità del tetramero è formata da 6 eliche transmembrana (6STM), in cui riveste fondamentale importanza, ai fini della conduzione ionica, il loop che collega i segmenti transmembranari S5 e S6 (*loop del poro*); questo loop, che è rivolto all'interno della molecola, si trova affondato nello spessore della membrana, dove la giustapposizione in cerchio con altri tre *P-loop* va a costituire il filtro di selettività del canale (vedi figura). Il segmento transmembrana S4 è altrettanto importante in quanto, nella sua sequenza amminoacidica, un residuo ogni tre è carico positivamente (lisina o arginina). Si pensa che queste cariche positive siano essenziali per conferire voltaggio-dipendenza al processo di gating dei canali. In definitiva, la selettività di ciascun tipo di canale ionico è dovuta alla diversa natura e disposizione spaziale degli amminoacidi che compongono le quattro regioni P della molecola.

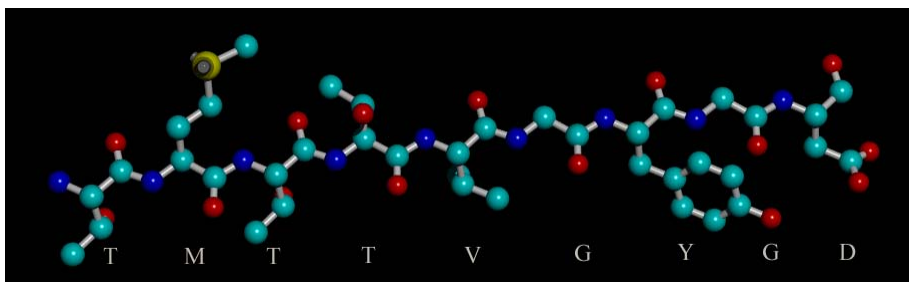


Come detto, la selettività per lo ione K^+ è data dalla composizione amminoacidica della regione del poro; questa regione contiene la sequenza di residui amminoacidici T-[M,V,L]-TT-[V,L,T]-G-[Y,F,L]-GD che risulta essere altamente conservata in vari organismi, dai procarioti fino ai più evoluti eucarioti, suggerendo un comune meccanismo di conduzione ionica selettiva per il potassio. La conformazione a 6STM, in cui quattro subunità si associano a formare il canale, è quella che caratterizza la maggior parte dei canali voltaggio-dipendenti; tuttavia non è l'unica esistente per i canali del potassio. Un gruppo numeroso è quello codificato dai geni K_{ir} , soprattutto nei mammiferi: come i canali voltaggio-dipendenti presentano quattro subunità ma ognuna di ha solo due STM separate da un P-loop (2STM). Sottofamiglie appartenenti a questo gruppo sono i canali IRK, GIRK e K_{ATP} .

L'ultimo gruppo di canali è formato da subunità dotate di 4STM e di 2 P-loop, da cui la denominazione di "canali K2P"; le quattro subunità di questi canali, per riuscire a realizzare l'usuale modulo di quattro elementi transmembranari disposti attorno ad un poro centrale, si assemblano come proteine dimeriche e non tetrameriche come avviene per le subunità 6STM o 2STM. A questa classe di canali appartengono i cosiddetti canali di "leakage" del K^+ .

2.2 PRODUZIONE DELL'ANTICORPO ANTI-KPORE

La spiccata conservazione di questa sequenza caratteristica del filtro di selettività di tutti i canali per il potassio, ha permesso lo sviluppo di un anticorpo primario specifico contro tale sequenza: l'anticorpo anti-KPORE.



Questo anticorpo è stato fornito dalla ditta SIGMA, che lo ha prodotto immunizzando conigli adulti attraverso l'iniezione di un aptene-carrier formato dal peptide sintetico (TMTTVGYGD) coniugato alla emocianina. In questo lavoro, l'utilizzo dell'anticorpo anti-KPORE è volto ad identificare la presenza di un canale per il potassio nella membrana interna di cloroplasti di spinacio.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PREPARAZIONE DI VESICOLE DI MEMBRANA ESTERNA, INTERNA E TILACOIDALE DA CLOROPLASTI DI SPINACIO

Questa preparazione di vescicole di membrana interna, esterna e tilacoidale da spinacio, rappresenta la fonte di materiale primaria su cui condurre tutti i successivi esperimenti. Il protocollo viene di seguito illustrato per punti:

- Lavare, asciugare e snervare 1 Kg di spinaci (circa 3 Kg non curati) e dividerli in 10 mucchietti da 100 g ciascuno.

Da adesso in avanti si lavora in camera fredda a 4° C:

- Frullare le foglie con la soluzione 1 (20 mM MOPS, 13 mM Tris, 0,1 mM MgCl₂, 330 mM Sorbitolo, 0,02% BSA w/v, 1mM β-mercaptoetanololo, 0,3 mM PMSF, pH 7,9/KOH).
- Filtrare la miscela attraverso 4 strati di garza e poi attraverso una garza di nylon da 25 μm.
- Centrifugare a 1500 g per 5' a 4° C.
- Risospendere il pellet con soluzione 1.
- Stratificare 15 mL di miscela in 8 gradienti di Percoll (8 mL 80% v/v sotto e 13 mL 40% v/v sopra, in 330 mM Sorbitolo, 50 mM MOPS, 1mM β-mercaptoetanololo, 0,3 mM PMSF, pH 7,9/KOH).
- Centrifugare a 5100 rpm (rotore Swing-out TS-5.1-500) per 15' a 4° C con decelerazione lenta.
- Rimuovere la banda superiore, togliendo la metà sopra della parte verde.
- Recuperare la banda inferiore e trasferirla in tubi da riempire con soluzione 2 (330 mM Sorbitolo, 1mM β-mercaptoetanololo, 0,3 mM PMSF, pH 7,6/10 mM Tris-Base).
- Centrifugare a 1700 g (rotore TA-10-250) per 5' a 4° C.
- Risospendere il pellet in soluzione 2 e ricentrifugare come prima. Dopo la centrifugazione rimuovere il surnatante quasi completamente e risospendere nuovamente il pellet.
- Misurare la concentrazione di clorofilla. Diluire i cloroplasti con soluzione 2 e 3 (0,7 M Saccarosio, 10 mM Tricina, 1mM EDTA, 1mM β-mercaptoetanololo, 0,3 mM PMSF, pH 7,9/KOH) in modo da avere concentrazioni finali di 1 mg/mL di clorofilla e 0,5 M di saccarosio.
- Lasciare tutto in ghiaccio e al buio per 20'.
- Potterare 50 volte in ghiaccio.
- Aggiungere lentamente e mescolando continuamente la soluzione 4 (10 mM Tricina, 1 mM EDTA, 1mM β-mercaptoetanololo, 0,3 mM PMSF, pH 7,9/KOH) in rapporto 1:1.

- Centrifugare a 2600 g (rotore TA-10-250) per 10' a 4° C.
- Tenere il surnatante.
- Aggiungere soluzione 4.
- Dividere in 8 tubi per Ultra e centrifugare a 44600 rpm (rotore 70-Ti) per 1 ora a 4° C.
- Rimuovere il surnatante (contiene lo stroma).
- Rimuovere delicatamente con una pasteur le vescicole di envelope (verde chiaro-giallo) presenti sopra il pellet (verde scuro).
- Aggiungere al pellet soluzione 4 fino ad un volume di 65 mL circa e stratificarne 11 mL per ciascun gradiente di saccarosio composto da 7 mL 0,996 M sotto, 10 mL 0,8 M in mezzo e 8 mL 0,465 M sopra, in 10 mM Na₂PO₄, 1 mM EDTA, pH = 7,9.
- Centrifugare in Ultra a 26000 rpm (rotore Swinging-bucket SW28) per 3 ore a 4° C (accelerazione massima, decelerazione lenta).
- Rimuovere il liquido sopra la seconda banda (contiene membrana esterna contaminata da Rubisco).
- Recuperare separatamente con pasteur la membrana interna ed esterna.
- Diluire le vescicole di membrana esterna, interna e tilacoidale in soluzione 5 (10 mM Na₂PO₄, 1mM β-mercaptoetanolo, 0,3 mM PMSF, pH = 7,9) nel rapporto di almeno 1:3 e centrifugare in Ultra a 26400 rpm (rotore Swinging-bucket SW28) per 1 ora a 4° C.
- Rimuovere il surnatante e riunire i pellet.
- Risospendere in poca soluzione 5, potterare 5 volte, aliquotare e congelare in azoto liquido. Conservare a – 80° C.

3.2 SDS - PAGE

Principale tecnica di separazione di proteine in base al loro peso molecolare secondo Laemmli (1970), sotto l'effetto di un campo elettrico, con alcune modifiche introdotte da Gournaris (1998); il gel di poliacrilamide è formato da una matrice chimicamente inerte di acrilamide e N,N'-metilenbisacrilamide (agente di cross-linking) che vengono fatti polimerizzare assieme. Il processo di polimerizzazione necessita di un iniziatore, il persolfato d'ammonio, e di un catalizzatore, il TEMED. È importante ricordare che più è elevata la concentrazione di acrilamide tanto maggiore sarà la capacità del gel di separare proteine di piccola taglia. Le condizioni denaturanti sono conferite dalla presenza dell'SDS, un detergente anionico, che serve a spezzare tutte le interazioni non covalenti nelle proteine native. L'SDS si lega alle catene polipeptidiche in un rapporto di circa una molecola di detergente per ogni 2 residui amminoacidici. Il complesso tra l'SDS e la proteina denaturata viene così ad assumere una carica

netta approssimativamente proporzionale alla massa della proteina. La composizione del gel di risoluzione è la seguente:

- acrilamide 10%
- 6 M urea
- 0,8 M Tris/HCl pH 8,83
- H₂O mQ
- 0,03% APS
- 0,05% TEMED

Lo stacking gel (spaziatore) è composto invece da:

- acrilamide 6%
- 125 mM Tris/HCl pH 6,8
- H₂O mQ
- 0,03% APS
- 0,05% TEMED

Affinché ci sia passaggio di corrente, il gel deve essere immerso in un tampone di corsa composto da 25 mM Tris, 192 mM glicina (inferiore), mentre quello superiore contiene anche 0,1% SDS w/v.

I campioni prima di essere caricati nel gel vengono trattati per circa 15' con un tampone di solubilizzazione SB (30% glicerolo w/v, Tris 125 mM pH 6,8, 9% SDS w/v, 0,1 M DTT, tracciante blu di bromofenolo) in rapporto 1:3 rispetto al campione per denaturare le proteine e ridurre eventuali ponti disolfuro.

3.3 WESTERN BLOT

Tecnica che consente il trasferimento di proteine da un gel di poliacrilammide ad una membrana di PVDF (o nitrocellulosa), sotto l'azione di un campo elettrico che spinge le proteine cariche negativamente (perché solubilizzate in SDS) verso il polo positivo, rispecchiando precisamente il grado di risoluzione ottenuto nel gel. Il trasferimento avviene applicando una corrente di 200 mA over-night a 4° C, sotto agitazione magnetica in un tampone di trasferimento composto da 3 mM Na₂CO₃, 10 mM NaHCO₃ e 10% metanolo v/v (Dunn, 1986).

3.4 SAGGIO IMMUNOLOGICO

Tecnica che consente di rivelare la presenza di proteine sulla membrana di PVDF, utilizzando un anticorpo specifico (primario) per la proteina di interesse o, quantomeno, per un suo dominio o sequenza amminoacidica; l'anticorpo primario viene poi riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato con l'enzima

perossidasi. Fornendo all'enzima una soluzione composta dai suoi substrati (perossido di idrogeno e luminolo), questi vengono ossidati con emissione di fotoni che impressionano una lastra autoradiografica. Segue il protocollo:

- 5' in metanolo;
- 15' di lavaggi con TBS sotto agitazione (10 mM Tris pH = 7,4, 150 mM NaCl);
- 60' in incubazione con latte in polvere al 10% w/v in TBS per saturare tutti i siti idrofobici non occupati del PVDF;
- 20' di lavaggi sotto agitazione con TBS sostituendo la soluzione ogni 5';
- Incubazione per 90' con l'anticorpo primario (riutilizzabile) opportunamente diluito in TTBS (TBS + 0,05% TWEEN 20 v/v): per l'anticorpo anti-KPORE la diluizione utilizzata è 1:10000 in 1% latte; per l'anticorpo anti-P45 1:5000; per l'anticorpo anti-OEP21 1:500 in 1% latte w/v.
- 30' di lavaggi con TTBS sostituendo la soluzione ogni 5';
- Incubazione per 60' con anticorpo secondario (anti-RABBIT IgG) coniugato alla perossidasi, alla diluizione di 1:20000 in TTBS; nel caso sia stato utilizzato l'anticorpo primario anti-KPORE o anti-OEP21, l'anticorpo secondario va diluito in latte 2,5% w/v in TTBS;
- 30' di lavaggi con TTBS;
- 5' di incubazione con la soluzione contenente perossido di idrogeno luminolo in rapporto 1:1;

La reazione chemiluminescente della perossidasi procede per circa 30 minuti. La reazione che avviene nel sito attivo dell'enzima è l'ossidazione di due molecole d'acqua ossigenata a cui è accoppiata l'ossidazione del luminolo ad acido aminoftalico, con emissione di fotoni. La radiazione emessa viene catturata da una pellicola autoradiografica che si impressiona, registrando precisamente la posizione della proteina di interesse.

3.5 MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI CLOROFILLA

La concentrazione di clorofilla viene determinata utilizzando una soluzione di acetone 80% v/v, che estrae la clorofilla e precipita le proteine, consentendo in questo modo una lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 645 nm, 663 nm e 720 nm, secondo quanto proposto da Arnon (1949). Il campione viene diluito in acetone, quindi centrifugato alla massima velocità per 2' in centrifuga da banco. La concentrazione viene poi determinata con la seguente formula:

$$[\text{Chl}] = 20,2(A_{645} - A_{720}) + 8,02(A_{663} - A_{720})$$

La concentrazione è espressa in mg/mL.

3.6 DOSAGGIO PROTEICO MEDIANTE SAGGIO CON BCA

Questa metodica per determinare la concentrazione proteica in una soluzione è estremamente precisa e sensibile; può infatti rivelare quantità di proteina inferiori a 0,5 µg/mL, e si basa sul fatto che in condizioni alcaline gli ioni rame Cu^{2+} formano un complesso con i legami peptidici delle proteine e vengono ridotti a Cu^+ . L'acido bicinconinico in condizioni alcaline è un reagente altamente sensibile, stabile e specifico per il Cu^+ , e forma con esso un composto di color porpora la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteina presente. La variazione di intensità è determinata mediante misure di assorbanza allo spettrofotometro a 562 nm. Il valore della concentrazione viene quindi estrapolato da una retta di taratura precedentemente costruita utilizzando campioni di albumina di siero bovino a concentrazione nota.

3.7 ESTRAZIONE ALCALINA

Questa tecnica si basa sul fatto che in ambiente alcalino le proteine periferiche vengono staccate dalla membrana; generalmente questo viene fatto incubando il campione per 10' in una soluzione di 0,1 M Na_2CO_3 a temperatura ambiente.

3.8 BLUE NATIVE - PAGE

BN-PAGE è un gel di acrilamide in gradiente continuo non denaturante che viene utilizzato per separare grandi complessi proteici interi e in conformazione nativa. Il gel di acrilamide di risoluzione (il rapporto tra acrilamide e bisacrilamide è 32:1) è composto da:

- Acrilamide in gradiente di concentrazione dal 6 al 15%
- Gel buffer 1X (250 mM acido aminocaproico, 250 mM Bis-Tris pH 7)
- Glicerolo
- H_2O mQ
- 0,03% APS
- 0,05% TEMED

L'aggiunta di glicerolo, anch'esso in gradiente, serve a stabilizzare il gel.

Il gel spaziatore è invece composto da:

- Acrilamide 5%
- Gel buffer 1X
- H_2O mQ

- 0,03% APS
- 0,05% TEMED

Il tampone di corsa inferiore, anche detto anode buffer, è composto da 50 mM Bis-Tris/HCl a pH 7, mentre quello superiore, o cathode buffer, contiene 50 mM Tricina, 15 mM Bis-Tris pH 7 e 0,02% w/v Coomassie Blue G250.

Prima di caricare il gel, i campioni vengono trattati con un detergente non ionico molto blando, nel nostro caso dodecil maltoside, per solubilizzare solo i complessi interi. Contrariamente a quanto accade nell'SDS-PAGE, in cui l'SDS contribuisce sia alla denaturazione e solubilizzazione che a fornire la carica negativa alle proteine e quindi unidirezionalità alla corsa elettroforetica, nel BN-PAGE la carica negativa è data dall'aggiunta di Coomassie Blue G250 che si lega alle proteine e le fa correre nel gel.

Ai fini dell'esperimento è stato necessario caricare 100 µg di proteina che, nota la concentrazione iniziale di IE dal saggio con BCA (771,7 µg/mL), equivalgono a 130 µL della soluzione madre. Il campione viene centrifugato in centrifuga refrigerata (4° C) per 10' a 30000 g; il pellet che si ottiene viene quindi risospeso in 100 µL di soluzione B₁ (50 mM Bis-Tris/HCl a pH 7, 750 mM acido aminocaproico, 0,5 mM EDTA) e 1,3% β-dodecil maltoside, quindi incubato in ghiaccio per 10'. Segue una centrifugata per 10' a 20000 g in centrifuga refrigerata. Al surnatante quindi si aggiungono 30 µL di soluzione B₂ (5% Coomassie Blue G250, 750 mM acido aminocaproico), che è ora pronto per essere caricato nel gel.

La corsa elettroforetica avviene a 4° C overnight applicando un amperaggio costante di 13 mA per un gel di dimensioni 16x18 cm. Una volta terminata la corsa in prima dimensione, il gel viene smontato e tagliato in corrispondenza delle corsie di interesse; queste vengono quindi trattate per 60' con SB in modo da denaturare i complessi appena separati.

Il gel per la seconda dimensione, sul quale vengono poste orizzontalmente le corsie ottenute - vale a dire a 90° rispetto alla direzione della prima separazione elettroforetica - è un normale gel denaturante ad un'unica percentuale di acrilamide (10%).

Una volta terminata la corsa in seconda dimensione, il gel può essere sottoposto a western blot o a Silver staining.

3.9 COLORAZIONE SILVER STAINING

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

Il protocollo per la colorazione è il seguente:

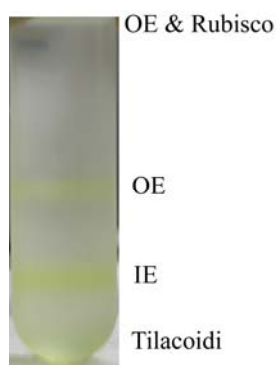
- fissazione delle proteine in metanolo 50% per un tempo compreso tra 2 ore e overnight
- 30' in acqua mQ
- 30' in etanolo 10%
- due lavaggi per 5' in acqua mQ
- 30' nella soluzione di AgNO_3 0,1%
- 1' in acqua mQ
- 15/20' in soluzione di sviluppo (283 mM Na_2CO_3 , 0,05% formaldeide v/v)
- una volta che le bande sono ben visibili, 10' in acido acetico 1%
- lavaggio finale in acqua mQ

Poiché molto spesso alla prima colorazione, in particolare dopo la soluzione di sviluppo, non compare nessuna banda, è necessario decolorare il gel con una soluzione decolorante (30 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 64 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); si lascia quindi il gel in questa soluzione per 15/20' fino a quando il gel non è ben giallo, a cui seguono dei lavaggi in acqua fino a quando il gel torna trasparente.

A questo punto si ripete la colorazione a partire dall'incubazione del gel nella soluzione di AgNO_3 0,1%.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Come detto, lo scopo di questo lavoro è quello di identificare un ipotetico canale per il potassio localizzato nella membrana interna del cloroplasto di *Spinacia oleracea*, utilizzando in primo luogo l'anticorpo anti-KPORE, sviluppato contro la sequenza amminoacidica del filtro di selettività comune alla maggior parte dei canali del potassio. Il primo passo, nonché uno dei più cruciali, è la preparazione di vescicole di membrana interna (IE), membrana esterna (OE) e tilacoidale (THY) da cloroplasti, come mostrato in figura.



Il primo passaggio per riuscire a separare vescicole di IE, OE e THY è la centrifugazione dei cloroplasti in gradiente discontinuo di Percoll, grazie alla quale si ottengono due frazioni: una di cloroplasti integri e una di cloroplasti rotti. La frazione di cloroplasti intatti viene prelevata, e su questi viene fatta la misurazione della concentrazione di clorofilla allo spettrofotometro (vedere Materiali e Metodi). Poiché la membrana interna ed esterna del cloroplasto sono molto ravvicinate, per poterle separare l'una dall'altra è necessario trattare i cloroplasti con una soluzione ipertonica che permetta il raggrinzimento della membrana interna; a questo punto, rompendo i cloroplasti e le membrane (utilizzando un potter), si formano in soluzione vescicole di IE, OE e di membrana tilacoidale. La separazione vera e propria dei tre tipi di vescicole avviene attraverso ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio, in cui queste vengono separate in base alla resistenza che incontrano man mano che sono spinte verso la parte più densa del gradiente; in questo modo le vescicole più pesanti (THY) si sono depositate sul fondo e poi via via quelle di IE e OE, come mostrato nella figura precedente.

Il parametro più importante per valutare la bontà di una preparazione è la purezza delle frazioni ottenute mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio.

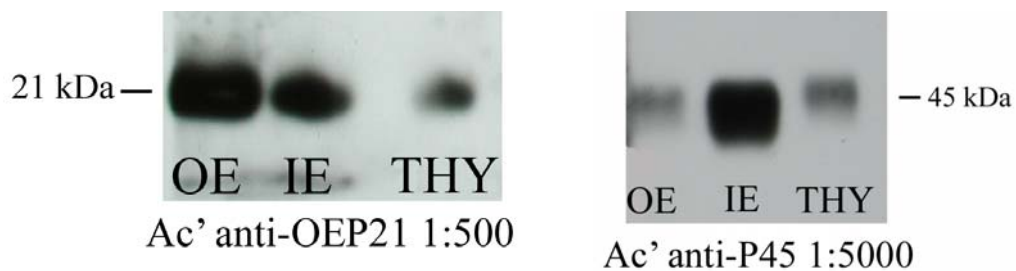
Tuttavia la prima cosa da fare, una volta terminata la preparazione, è determinare la concentrazione proteica delle frazioni. Poiché nelle vescicole di IE ed OE non c'è clorofilla, presente esclusivamente nei tilacoidi, per determinare la concentrazione di proteine al loro interno è stato necessario eseguire un dosaggio

proteico; questo passaggio è molto importante per avere un dato quantitativo sulla concentrazione del materiale di partenza e per calcolare successivamente quanta proteina caricare nei gels.

Il dosaggio proteico con BCA ha fornito i seguenti risultati di concentrazione di proteina totale:

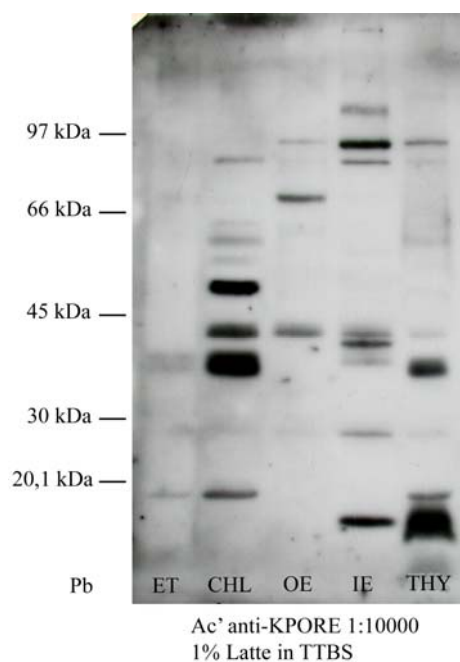
- [OE] = 854,62 $\mu\text{g/mL}$
- [IE] = 771,7 $\mu\text{g/mL}$
- [THY] = 1393,2 $\mu\text{g/mL}$

Per valutare il grado di purezza è necessario separare mediante SDS-PAGE al 10% le proteine contenute nelle vescicole di IE, OE e TYL in doppio, e sviluppare i due blot con anticorpi diversi, uno specifico per una proteina della membrana interna (P45) e l'altro per una proteina della membrana esterna (OEP21 - complesso di import); nello specifico, è stato utilizzato l'anticorpo anti-P45 (diluizione 1:5000) per verificare se vi fossero contaminazioni di membrana interna nella frazione dell'esterna, mentre si è usato l'anticorpo anti-OEP21 (diluizione 1:500 + 1% latte w/v) per stabilire l'eventuale presenza di contaminazioni da OE nella frazione di membrana interna. In questo gel sono stati caricati 5 μg di proteina per pozzetto. In figura è presentato il risultato di questo blot di "controllo":



Come si può osservare dalla figura di sinistra, nella frazione di IE sono presenti consistenti contaminazioni da OE, mentre il blot sviluppato con l'anticorpo anti-P45 mostra che le vescicole di membrana interna hanno contaminato lievemente sia la frazione di OE che quella di THY.

Parallelamente al blot sviluppato con gli anticorpi OEP21 e P45, ne è stato sviluppato un altro con l'anticorpo anti-KPORE, che ha evidenziato il seguente profilo:



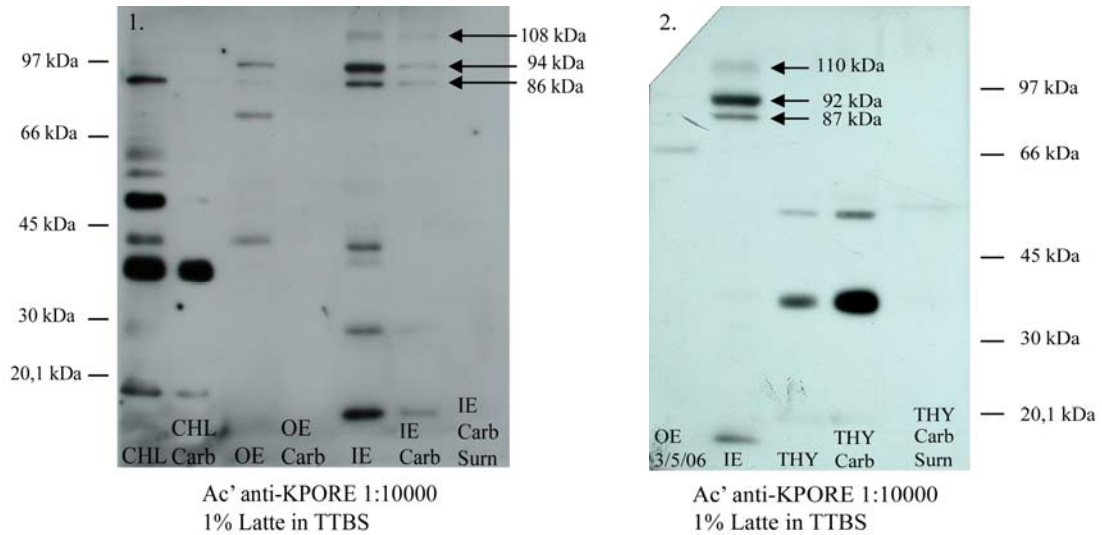
Nel primo pozzetto, a partire da sinistra, è stata caricata un'aliquota di estratto totale (ET), mentre nel secondo sono stati caricati cloroplasti (CHL). Come si può vedere, l'anticorpo ha riconosciuto molte proteine in tutte le frazioni, indice di un legame aspecifico, probabilmente dovuto al problema delle contaminazioni cui si faceva riferimento sopra o alla presenza di frammenti proteolitici - in alcuni passaggi della preparazione non sono stati usati inibitori di proteasi.

Tuttavia, risulta possibile riconoscere alcune bande che potrebbero essere potenzialmente identificabili con la forma monomerica o dimerica del canale, attorno ai 100 kDa. In particolare, è presente una tripletta di bande, del peso rispettivamente di 108, 94 e 86 kDa, che si ritroveranno anche nei blot successivi.

Per cercare di chiarire quali delle bande riconosciute dall'anticorpo potessero essere una proteina intrinseca, sono stati allestiti due minigel (10% acrilamide) in cui i campioni sono stati sottoposti ad estrazione alcalina. L'estrazione alcalina è una tecnica che permette di staccare le proteine estrinseche delle membrane, lasciando inalterate quelle integrali come ad esempio i canali; l'eliminazione delle proteine non integrali avviene per centrifugazione in apposite provette, denominate Centricon, provviste di un filtro con cut-off di 100 kDa. Durante la centrifugazione, tutte le proteine solubili estratte dalle vescicole e con peso molecolare inferiore ai 100 kDa attraversano il filtro e vengono eliminate.

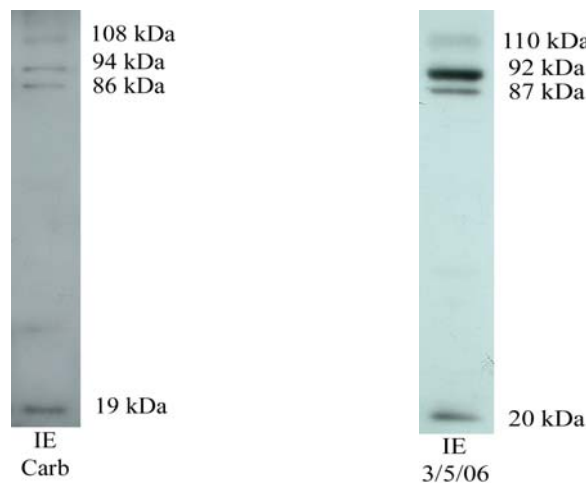
Inoltre sono state caricate anche campioni di vescicole di IE ed OE appartenenti ad una preparazione precedente (03/05/2006), più pura rispetto a quella su cui è stato condotto questo lavoro, come ulteriore controllo.

Il primo blot (1), a sinistra, mostra i campioni sottoposti ad estrazione alcalina (CHL, OE ed IE), mentre quello a destra (2) contiene campioni della preparazione del '06 e TYL con estrazione alcalina:



I campioni di THY sottoposti ad estrazione alcalina sono stati caricati nel gel 2 per mancanza di spazio nel primo gel.

Ciò che si può affermare a prima vista è che il trattamento con estrazione alcalina, quantomeno nel blot n° 1, è stato efficace; infatti nei pozzetti in cui sono stati caricati i campioni trattati con carbonato di sodio, molte bande, corrispondenti a proteine periferiche o a contaminazioni, non sono più presenti. Tuttavia, nei campioni trattati con estrazione alcalina si nota una diminuzione dell'intensità delle bande, indice di una perdita di materiale durante il passaggio in Centricon. Il profilo mostrato nel blot n° 1 in corrispondenza delle IE trattate con carbonato è infatti molto simile a quello nel blot n° 2 della preparazione di IE del 3/5/06, come si può notare dalle seguenti immagini:



Questo comune profilo elettroforetico indica con buona probabilità che le bande marcate dall'anticorpo sono proteine transmembrana; ora rimane da chiarire se qualcuna delle bande rappresenti effettivamente il canale del potassio oggetto dello studio. Per poter chiarire ulteriormente la natura di tali proteine saranno necessarie analisi di spettrometria di massa ed elettrofisiologiche.

Per avere dei dati confrontabili con quelli ottenuti dai vari blot è stata eseguita una semplice ricerca bioinformatica, mediante il programma di allineamento Blast (Basic Local Alignment Search Tool), su canali del potassio in *Arabidopsis thaliana*. In questa ricerca si è lanciato contro i vari database proteici presenti sul server dell'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) la sequenza sonda TMTTVGYGD propria del filtro di selettività dei canali per il potassio. Inizialmente il programma ha estratto 28 proteine (di cui 27 identificate sperimentalmente e soltanto una predetta da programmi bioinformatici) contenenti la sequenza "sonda". Tuttavia questa ricerca non ha permesso di conoscere la localizzazione subcellulare delle proteine identificate.

Per questo motivo sulle sequenze estratte dal database si è fatta una ulteriore ricerca con gli algoritmi predittivi ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/) e TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) per verificare quali presentassero il segnale di import nel cloroplasto, requisito necessario per essere una proteina localizzata nella membrana interna del cloroplasto.

In tabella sono mostrati gli ipotetici canali per il K^+ , pesati per la probabilità di essere localizzati nel cloroplasto (score). Per la precisione il canale KCO è di tipo outward rectifying, KCO1 è un outward rectifier attivato da ioni calcio, mentre i canali ATKC1 sono inward rectifying con un sito di legame per i nucleotidi ciclici (le tre versioni in tabella sono probabilmente isoforme di splicing) e KAT2 è una K^+ ATPasi inward rectifier.

| Gene | Accession Number (gi) | M.W. intera (kDa) | M.W. matura (kDa) | ChloroP (score) | TargetP (score) | Lunghezza cTP (aa) | pI |
|-------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------|
| KCO | 21592756 | 40,679 | 35,945 | 0,526 | 0,772 | 41 | 5,21 |
| KCO1 | 2181186 | 40,741 | 36,007 | 0,526 | 0,772 | 41 | 5,21 |
| ATKC1 | 79326141 | 75,484 | 69,383 | 0,550 | 0,818 | 56 | 6,34 |
| ATKC1 | 42573137 | 68,393 | 62,292 | 0,550 | 0,818 | 56 | 6,26 |
| ATKC1 | 15233870 | 75,598 | 69,497 | 0,550 | 0,818 | 56 | 6,14 |
| KAT2 | 818865 | 64,634 | 57,795 | 0,531 | 0,140 | 58 | 5,59 |

Bisogna comunque ricordare che le proteine identificate mediante Blast in *A. thaliana* servono solo come confronto per avere un'idea sulla taglia molecolare di

possibili canali del K^+ , ma che i risultati ottenuti dai vari blot nello spinacio possono essere anche molto diversi da quanto predetto, come in effetti si è verificato in alcune occasioni. Ad esempio nel blot della preparazione del 3/5/06 non è presente nessuna banda che abbia un peso molecolare confrontabile con quelli ricavati dall'allineamento con Blast.

Tuttavia, tra le sequenze identificate da Blast contenenti la sequenza amminoacidica caratteristica del filtro di selettività dei canali per il K^+ ma che non presentano la sequenza di importo nel cloroplasto, sono presenti alcune proteine che hanno un peso molecolare confrontabile con quello ottenuto dai nostri blot, come mostrato in tabella:

| Gene | Accession Number (gi) | M.W. (kDa) | pI |
|-------------|------------------------------|-------------------|-----------|
| AKT1 | 15225768 | 96,989 | 6,92 |
| AKT2 | 18415864 | 91,308 | 6,09 |
| AKT3 | 1172218 | 89,655 | 6,13 |
| GORK | 30693099 | 94,460 | 6,19 |
| SKOR | 3810676 | 93,871 | 6,27 |
| SKOR | 15232991 | 93,899 | 6,27 |
| KAT1 | 15237407 | 78,270 | 7,58 |
| KAT2 | 145340378 | 80,149 | 6,44 |

I canali AKT (1,2 e 3) sono K^+ transporter inward rectifiers; GORK è un gated outwardly-rectifying potassium channel; SKOR è uno stelar K^+ outward rectifier; KAT1 e KAT2 sono K^+ ATPasi inward rectifier.

Non è tuttavia possibile escludere queste proteine dall'essere dei possibili candidati, in quanto l'algoritmo ChloroP fornisce solo delle predizioni che non implicano di necessità l'appartenenza o meno della proteina al cloroplasto.

Nell'ottica di sottoporre in futuro le bande riconosciute dall'anticorpo ad analisi di spettrometria di massa, l'ultimo esperimento con cui si è cercato di caratterizzare con maggior precisione il putativo canale per il potassio oggetto dello studio, è stato una BN-PAGE.

Questa tecnica, che è di fatto un'elettroforesi bidimensionale, è un mezzo molto potente per separare grossi complessi multiproteici (es. proteine della catena di trasporto degli elettroni o proteine dei fotosistemi), ed in particolare set di proteine estremamente idrofobiche, come molte proteine di membrana, con un intervallo di separazione che va da poche a qualche centinaia di kDa in base alla percentuale di acrilamide che si utilizza. Il protocollo per il trattamento dei campioni è stato descritto nella sezione "Materiali e metodi". Nella prima

dimensione sono stati caricati solo campioni di IE, per la precisione 50 µg di proteina per pozzetto.

Al termine della prima corsa elettroforetica (1^a dimensione) il gel si presenta colorato di blu per la presenza del Blue Coomassie nel tampone di corsa superiore, come mostrato in figura:



Poiché anche i campioni sono stati trattati con Blue Coomassie G250, si riescono ad intravedere delle bande colorate che rappresentano i complessi proteici in conformazione nativa. Nella seconda dimensione, le corsie su cui hanno corso le vescicole di IE, sono state tagliate e poste, nel senso della lunghezza, su due gel denaturanti separati; di questi due gel uno è stato sottoposto a colorazione Silver Staining per avere una visione d'insieme del profilo proteico all'interno delle IE, mentre l'altro gel è stato sottoposto a Western Blot per poi essere sviluppato con l'anticorpo anti-KPORE. Qui di seguito viene riportato come si presenta il gel colorato all'argento:



Generalmente nei gel bidimensionali si dovrebbero osservare degli spot più o meno definiti; in questo gel tuttavia si presentano alcuni spot nella parte superiore e nella parte destra, ma ci sono anche delle bande molto allargate; la presenza di

tali “strisciate” è probabilmente dovuta alla co-migrazione di complessi, o subunità di complessi, di massa molecolare comparabile.

Evidenziate dal cerchio rosso ci sono le proteine di maggior interesse per questo lavoro e che si troveranno poi nel successivo blot sviluppato con l’anticorpo anti-KPORE.

Il secondo gel, come detto, è stato blottato e quindi sviluppato con l’anticorpo anti-KPORE. Il risultato è mostrato in figura:



Ac' anti-KPORE 1:2000 in TTBS

Si può affermare qualitativamente che il profilo che si presentava nei blot di IE precedenti sviluppati con lo stesso anticorpo, si è all’incirca mantenuto; è infatti possibile osservare delle bande (evidenziate in figura) di peso comparabile con quello calcolato nei gel monodimensionali, che si aggirano attorno ai 100 kDa; in particolare, queste bande sono riscontrabili sia nel blot delle IE trattate con estrazione alcalina, sia in quello delle IE del 3/5/06.

4.1 CONCLUSIONI

Il lavoro svolto durante questo tirocinio rappresenta solo una fase preliminare dell’identificazione e caratterizzazione di un putativo canale per il potassio.

In questo tipo di studi occorre tenere conto del fatto che i sistemi biologici sono estremamente complessi, poiché presentano un’elevata eterogeneità di proteine e complessi proteici; in particolare le proteine di membrana, quali i canali, sono estremamente idrofobiche e risultano molto difficili da trattare e separare nei gel.

Un ulteriore problema è costituito dal livello di espressione; può infatti capitare che il livello di espressione di una proteina sia talmente basso da non essere rivelabile.

Nella fattispecie, i risultati ottenuti dai vari esperimenti ci dicono con buona probabilità che le proteine riconosciute dall'anticorpo sono proteine transmembrinarie, ma non è assolutamente possibile affermare con certezza che si tratti di un canale per il potassio;

In un lavoro del 1994 condotto da Mi, Berkowitz e Peters è stato individuato un canale per il potassio di 62 kDa nella membrana interna del cloroplasto attraverso l'utilizzo di un anticorpo specifico contro la sequenza TMTTVGYGD del filtro di selettività del canale. Tuttavia nel nostro lavoro non è stata individuata alcuna proteina transmembrana di massa molecolare comparabile con quella riportata nell'articolo di Berkowitz. Questo fatto tuttavia non stupisce, in quanto, come si è visto, i canali per il potassio rappresentano una classe molto vasta ed eterogenea, rendendo la loro identificazione e caratterizzazione un processo molto complesso e laborioso.

Come detto, il lavoro fin qui svolto non rappresenta che una fase iniziale dell'identificazione univoca e completa di un canale per il potassio; ricerca, questa, che necessita di ulteriori e più approfondite analisi di tipo funzionale e strutturale.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Biologia molecolare della cellula*, quarta edizione.
- Arnon D.J. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24,1-14.
- Dunn S.D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of protein in gel on the recognition of protein on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, 157, 144-153.
- Eubel, H., Braun, H.P., Millar, H. (2005) Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* 2005, 1:11
- Gounaris F., Chapman D.J. and Barber J. (1998) Reconstitution of plastoquinone in the isolated D1/D2/cytochrome b559 reaction centre complex. *FEBS Lett.*, 143, 143-147.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Mi, F., Peters, J.S., Berkowitz, G.A. (1994) Characterization of a chloroplast inner envelope K⁺ channel. *Plant Physiol.* 105, 955-964.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., *Biochimica*, quinta edizione
- Taglietti, V., Casella, C. *Principi di fisiologia e biofisica della cellula*, Vol. 2
- Waagemann, K., and Soll, J. (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1, 149-158.