

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.  
LAUREA DI PRIMO LIVELLO  
IN BIOLOGIA MOLECOLARE

ELABORATO DI LAUREA

**Individuazione di una attività perossidasi  
nei tilacoidi di *Arabidopsis thaliana***

RELATORE: prof. Fernanda Rigoni (DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA)  
CORRELATORE: dott. Anna Segalla  
CORRELATORE: dott. Elisa Corteggiani

LAUREANDO: Alessandro Favretto

ANNO ACCADEMICO 2007 – 2008



# INDICE

|  |         |
|--|---------|
| <b>ABSTRACT</b>  | pag. 2  |
| <b>1 INTRODUZIONE</b>  | pag. 3  |
| 1.1 Il cloroplasto   | pag. 3  |
| 1.1.1 Fotosintesi e reazioni alla luce   | pag. 3  |
| 1.1.2 Fotoossidazione e produzione di ROS  | pag. 4  |
| 1.2 Il ruolo dei ROS nella cellula vegetale:<br>biosegnalazione e detossificazione               | pag. 5  |
| 1.3 Ricerca di attività perossidasiche nei tilacoidi<br>di <i>Arabidopsis thaliana</i>           | pag. 6  |
| <b>2 MATERIALI E METODI</b>  | pag. 7  |
| 2.1 Preparazione di membrane tilacoidali   | pag. 7  |
| 2.2 Determinazione della concentrazione di clorofilla  | pag. 7  |
| 2.3 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide<br>con sodio dodesilsolfato (SDS - PAGE) | pag. 7  |
| 2.4 Elettroforesi denaturante in gradiente su gel di<br>poliacrilammide con sodio dodecilsolfato | pag. 8  |
| 2.5 Elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide<br>(2-D PAGE)                         | pag. 9  |
| 2.5.1 Preparazione dei campioni per IEF  | pag. 9  |
| 2.5.2 Separazione in 2-D   | pag. 10 |
| 2.6 Colorazione dei gel di poliacrilammide   | pag. 11 |
| 2.6.1 Colorazione all'argento  | pag. 11 |
| 2.6.2 Colorazione al Coomassie Blue  | pag. 11 |
| 2.7 Western blot e saggio immunologico   | pag. 11 |
| 2.8 Saggio dell'attività perossidastica  | pag. 12 |
| <b>3 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>   | pag. 13 |
| <b>4 BIBLIOGRAFIA</b>  | pag. 20 |

## ABSTRACT

Nel corso del tirocinio ho partecipato alla caratterizzazione di un enzima con attività perossidasi che è presente nelle membrane tilacoidali di diversi organismi fotosintetici, tra cui *Arbidopsis thaliana*.

Nel laboratorio da me frequentato è in corso la caratterizzazione di questo enzima nella membrana tilacoidale di *A. thaliana* attraverso la separazione delle proteine in SDS-PAGE e in elettroforesi bidimensionale. L'attività perossidasi è stata determinata con il metodo basato sulla chemiluminescenza sviluppata dalla reazione di perossidazione dei substrati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luminolo.



# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Il cloroplasto

Le cellule vegetali contengono una classe importante di organelli che le rendono peculiari: i plastidi. Nelle piante superiori sono tre le forme di plastidi più importanti e specializzate: il cloroplasto, il cromoplasto e l'amiloplasto. Tutti questi organelli presentano alcune caratteristiche costanti come una doppia membrana delimitante, un DNA di tipo procariotico, ribosomi 70S e gli enzimi necessari alle diverse vie biosintetiche di una cellula vegetale.

Il plastidio specializzato nel processo fotosintetico è il cloroplasto che ha una forma ovoidale ed è delimitato da due membrane distinte, separate da uno spazio intermembrana. Nella parte interna del cloroplasto, lo stroma, è presente un sistema di membrane definito sistema tilacoidale, organizzato in vescicole appiattite densamente appressate (grana) e in lamelle stromatiche. Tutti i tilacoidi di un cloroplasto sono in continuità tra di loro e costituiscono un sistema di membrane chiuso, senza comunicazione tra l'ambiente interno (lume) dei tilacoidi e lo stroma. Nelle varie regioni dei tilacoidi sono diversamente distribuiti i due fotosistemi e gli altri componenti della catena di trasporto di elettroni fotosintetica, nonché il complesso dell'ATP sintasi.

### 1.1.1 Fotosintesi e reazioni alla luce

La fotosintesi è quel processo per cui l'energia solare viene convertita in energia chimica (sottoforma di ATP e NADPH) che viene poi utilizzata per produrre carboidrati e altri composti organici mediante la fissazione e riduzione della CO<sub>2</sub>. Si distinguono quindi una prima fase in cui l'energia luminosa viene assorbita e conservata in forma chimica (reazioni alla luce) e una seconda fase di organicazione del carbonio (reazioni al buio). Le reazioni alla luce avvengono in complessi multienzimatici inseriti vettorialmente nelle membrane tilacoidali, mentre le reazioni di organicazione del carbonio hanno luogo in un ambiente acquoso, lo stroma. Nelle piante superiori sia la fase luminosa che la fase al buio avvengono nei cloroplasti; in particolare nelle membrane tilacoidali sono collocati i fotosistemi, grandi complessi multiproteici costituiti dalle antenne e dal centro di reazione, che sono responsabili dell'assorbimento dell'energia radiante e della sua trasformazione in energia chimica: nel centro di reazione avviene la reazione fotochimica di separazione delle cariche mentre le antenne raccolgono l'energia luminosa. L'energia derivata dall'assorbimento della luce viene utilizzata per ridurre NADP<sup>+</sup> a NADPH a spese di una molecola d'acqua che viene idrolizzata. Parte dell'energia derivata dall'assorbimento della luce viene conservata sotto forma di ATP. Questa molecola viene prodotta da un enzima, l'ATP sintasi, collocato sulla membrana tilacoidale. Per convertire ADP e Pi in ATP, questo enzima sfrutta il gradiente di protoni che si è formato nel lume tilacoidale, durante il trasferimento di elettroni.

Tutte queste reazioni ossidoriduttive possono essere riassunte nella formula:



L'equazione complessiva della fotosintesi è una reazione di ossidoriduzione in cui partendo da carbonio inorganico (CO<sub>2</sub>) si arriva a carbonio organico (zuccheri) utilizzando il potenziale riducente e l'energia immagazzinati durante le reazioni alla luce. Se all'equazione precedente viene aggiunto anche il processo di assimilazione della CO<sub>2</sub> si ottiene la relazione generale:



### 1.1.2 Fotossidazione e produzione di ROS

L'assorbimento dell'energia radiante, da cui dipende la fotosintesi, avviene ad opera delle clorofille e dei carotenoidi. Dallo stato eccitato i pigmenti possono ritornare allo stato fondamentale trasferendo l'energia di eccitazione in modi utili per la fotosintesi: il trasferimento può avvenire per risonanza da un pigmento all'altro (come accade nelle antenne) o attraverso la perdita di un elettrone con conseguente separazione di carica (avviene solo nelle due clorofille del centro di reazione).

Quando però i cloroplasti subiscono un eccesso di luce, l'energia radiante che arriva è superiore alla capacità del resto dell'apparato fotosintetico: la sovraccitazione dei fotosistemi porta alla produzione di clorofilla nello stato di tripletto (<sup>3</sup>chl\*) e quindi di ossigeno singoletto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), una delle specie reattive dell'ossigeno.

I ROS (Reactive Oxygen Species) sono generati in tutti gli organismi aerobi e derivano dalla riduzione dell'ossigeno molecolare a ione superossido il quale si protona dando il radicale peridossile. Lo ione superossido e il radicale peridossile dismutano tra loro dando perossido di idrogeno e ossigeno. In certe condizioni superossido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possono anche portare alla produzione del radicale ossidrilico (•OH), la specie più reattiva tra i ROS. In molti processi, come la catena di trasporto mitocondriale, si ha una forte produzione di ROS ma la maggiore fonte potenziale di queste specie reattive nella cellula vegetale è la fotosintesi.

La pianta per prevenire i processi di fotossidazione ha sviluppato vari meccanismi fotoprotettivi; i più importanti comprendono l'uso di flussi elettronici alternativi di dissipazione, la modulazione delle dimensioni delle antenne, la rapida riparazione dei componenti fotodanneggiati e la dissipazione termica.

Nonostante i meccanismi di fotoprotezione appena descritti, il cloroplasto rimane la maggior fonte di ROS nella cellula vegetale a partire almeno da tre diversi meccanismi: la sovraccitazione, mediata dalla luce, della clorofilla a livello del fotosistema II (PSII); la reazione di Mehler a livello del fotosistema I (PSI), in cui l'O<sub>2</sub> viene ridotto direttamente dalla catena di trasporto elettronico ed infine la fotorespirazione. In questo terzo caso la RuBisCo, agendo come ossigenasi, porta alla sostanziale produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> attraverso il processo di riciclo del fosfoglicolato. L'aumento della concentrazione di ROS nella foglia associata ad una serie di stress biotici o abiotici è in effetti dovuta alle condizioni limitanti imposte al processo fotosintetico di fissazione del carbonio.

(Molineaux et al., 2006)

## 1.2 Il ruolo dei ROS nella cellula vegetale: biosegnalazione e detossificazione

Negli ultimi anni, è stato messo in evidenza il ruolo dei ROS come molecole di signaling in un gran numero di processi cellulari, in particolare in relazione alle interazioni della pianta con l'ambiente che la circonda. Segnali legati ai ROS sono continuamente coinvolti nelle fasi di crescita, sviluppo e riproduzione delle piante. Il coinvolgimento dei ROS nel metabolismo è da tempo ben conosciuto, ne sono buoni esempi le numerose ossidasi e perossidasi coinvolte nella produzione di composti fenolici, (poli) amine, ascorbato e ossalato. Inoltre il crosslinking ossidativo di componenti della parete cellulare, durante la normale crescita ma anche in risposta a patogeni, è un processo assolutamente importante nella vita della pianta. E' solo negli ultimi anni, tuttavia, che sono stati messi in evidenza vari meccanismi di segnalazione mediati dai ROS, in particolare associati all'apoptosi e in risposta a fitormoni. Una complessa rete di piccole molecole antiossidanti e di enzimi che controllano la loro concentrazione, è necessaria per controllare il livello di ROS in tutti i compartimenti subcellulari. La regolazione di questa rete, coordinata sia dai ROS stessi che dagli ormoni associati a stress come l'acido salicilico, l'acido abscissico e l'acido giasmonico, si è rivelata fondamentale nella trasduzione del segnale e nella sua regolazione. In più sta diventando evidente che molecole chiave come glutatione e ascorbato sono coinvolte nella regolazione di stress regolati da ormoni senza intervento diretto di specie reattive dell'ossigeno. I ROS e gli antiossidanti potrebbero essere delle molecole chiave nella coordinazione di diverse vie di segnalazione nelle cellule vegetali. (Molineaux et al., 2006)

Molto resta comunque ancora da chiarire a proposito della complessa rete di signaling e del controllo di varie molecole chiave basato sul loro stato redox.

Per quanto riguarda la detossificazione invece, nel cloroplasto intervengono diversi sistemi antiossidanti che comprendono anche specifici enzimi. Un ruolo importante è svolto dalla superossido dismutasi (SOD), enzima che accelera la reazione di dismutazione dello ione superossido in  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Ma il perossido di idrogeno, pur essendo piuttosto stabile, può reagire ulteriormente diventando substrato di enzimi come le catalasi e le perossidasi che lo riducono ad  $H_2O$ . Sono state studiate in modo particolare due classi di perossidasi: le ascorbato perossidasi (APX) e le perossiredossine (PRX).

Le APX sono una famiglia di perossidasi che presentano numerosi isoenzimi in vari compartimenti cellulari. Esse svolgono un ruolo chiave nella fotoinibizione sia nelle piante che nelle alghe eucariotiche perché partecipano all'eliminazione di specie reattive dell'ossigeno utilizzando l'ascorbato come donatore di elettroni. Analisi di tipo fisiologico hanno inoltre rivelato che le ascorbato perossidasi ed in particolare quelle citosoliche, sono coinvolte nella comunicazione cellulare perché modulano il livello di perossido d'idrogeno nella cellula; esiste infatti un livello fisiologico di ROS nelle cellule che serve nella biosegnalazione redox per la regolazione dell'espressione di proteine e geni come secondi messaggeri (T. Ishikawa e S. Shigeoka, 2008). L'APX ha quindi molti ruoli nel metabolismo cellulare: da un lato controlla lo stato redox della cellula regolando la concentrazione di  $H_2O_2$  e dall'altro previene la sovrapproduzione di ROS evitando così l'accumulo di specie tossiche e letali per la cellula.

Questo sistema antiossidativo mediato dall'ascorbato perossidasi, che da solo tuttavia non riuscirebbe a proteggere l'apparato fotosintetico dalla fotoinibizione, è affiancato da un'altra classe di perossidasi, le perossiredossine.

Queste proteine costituiscono un gruppo ancestrale di enzimi con un ruolo importante nella detossificazione della cellula; esse riducono infatti i perossidi nell'alcool corrispondente sfruttando dei residui cisteinici che sono localizzati in regioni altamente conservate della proteina: questo dominio funzionale è essenziale per l'attività catalitica delle perossiredossine (Dietz et al., 2002).

Tutti questi studi hanno rivelato l'esistenza di una serie di molecole antiossidanti e di enzimi che molto spesso cooperano tra loro integrando i loro effetti a favore della fotoprotezione dei siti di fotosintesi dai ROS e, allo stesso tempo, nel mantenimento di un livello ottimale di ROS per le numerose vie di biosegnalazione.

### **1.3 Ricerca di attività perossidasiche nei tilacoidi di *Arabidopsis thaliana***

Nel laboratorio presso il quale ho svolto il tirocinio, in base a recenti studi sul ruolo dei ROS nella cellula vegetale, è nato l'interesse per queste proteine con attività perossidasi presenti nel cloroplasto ed in particolare nella membrana tilacoidale.

Lo scopo della ricerca è stato perciò quello di verificare la presenza di attività perossidasi nelle membrane tilacoidali cercando poi di identificare l'enzima responsabile.

Lo studio è stato condotto su tilacoidi di *Arabidopsis thaliana*, utilizzando questo organismo come modello per il fatto che il suo genoma è stato sequenziato ed è quindi più semplice individuare i geni putativi di certe perossidasi.

Per avere un quadro generale sull'attività perossidasi presente nelle membrane tilacoidali, sono state eseguite separazioni di proteine in elettroforesi con gel nativi; l'attività perossidasi è stata poi rivelata tramite l'applicazione della soluzione di luminolo e perossido d'idrogeno ai supporti su cui erano state precedentemente trasferite le proteine separate sul gel (come descritto in Materiali e metodi). Per questo saggio si è fatto riferimento al lavoro di Mittler e Zilinskas (1993) i quali hanno rivelato l'attività di una specifica perossidasi (l'ascorbato perossidasi) dopo elettroforesi su gel nativi.

Noi abbiamo utilizzato questo tipo di analisi per evidenziare tutte le eventuali attività perossidasiche presenti nei tilacoidi e successivamente abbiamo cercato di caratterizzarle in elettroforesi denaturante e in elettroforesi bidimensionale.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Preparazione di membrane tilacoidali

Le foglie di *Arabidopsis thaliana* vengono lavate, sminuzzate e poi frullate (omogenate) in tampone P1 scartando le foglie gialle ed eliminando le nervature. L'omogenato viene filtrato attraverso due garze e successivamente centrifugato a 10.700 g a 4°C per 3 min. Viene eliminato il surnatante mentre il pellet viene risospeso in tampone P2 e successivamente centrifugato a 10.700 g a 4°C per 10 min. Il pellet viene risospeso poi con tampone P3 e viene determinata la concentrazione di clorofilla; infine il materiale ottenuto viene aliquotato, congelato in azoto liquido e conservato a - 80°C.

Le soluzioni utilizzate sono:

P1: 0.33 M sorbitolo, 50 mM tricina pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl;

P2: 50 mM tricina pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl;

P3: 100 mM sorbitolo, 50 mM tricina pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl.

I campioni di tilacoidi vengono preparati al buio e in ghiaccio per rallentare la reazione di eventuali enzimi di degradazione.

### 2.2 Determinazione della concentrazione di clorofilla

La concentrazione di clorofilla totale (clorofilla *a* più clorofilla *b*) viene misurata diluendo i tilacoidi in una soluzione di 80% acetone (v/v) che permette di estrarre i pigmenti.

La soluzione viene centrifugata per 2 min, successivamente il surnatante viene analizzato allo spettrofotometro misurando l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 645 nm, 663 nm e 720 nm, come proposto da Arnon (1949). La concentrazione di clorofille totali si ottiene dalla formula seguente che sottintende un cammino ottico pari ad 1 cm e che considera il valore di  $\epsilon$  del campione diluito in acetone alle lunghezze d'onda a cui si lavora:

$$[\text{chl } (\mu\text{g/ml})] = 20.2 (A_{645} - A_{720}) + 8.02 (A_{663} + A_{720})$$

### 2.3 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS - PAGE).

L' SDS-PAGE è un tipo di separazione elettroforetica in cui le proteine, prima di correre nel gel, vengono completamente denaturate e assumono tutte carica negativa grazie al sodio dodecilsolfato (SDS), un detergente ionico dotato di una coda apolare e una testa polare.

Le proteine si muovono unicamente in funzione del loro peso molecolare che può essere calcolato grazie al confronto con opportuni standard di pesi molecolari noti. Il gel di poliacrilammide viene fatto polimerizzare tra due vetri fissati su un

supporto e separati da spaziatori da 1.5 mm. L'elettroforesi viene condotta su gel discontinuo costituito da un primo tratto di impaccamento (stacking gel) seguito dal gel di corsa (running gel). Lo stacking gel, che viene fatto polimerizzare sopra al gel di corsa, serve a concentrare e ad allineare il campione in una sottile banda prima che abbia inizio la separazione vera e propria nel running gel.

Le composizioni dei due gel sono diverse:

#### *stacking gel*

- 6% acrilammide;
- 125 mM Tris/HCl pH 6.8;
- 0.03% TEMED;
- 0.05% APS.

#### *running gel*

- 12% acrilammide;
- 6 M urea;
- 0.8 M Tris/HCl pH 8.83 ;
- 0.03% TEMED;
- 0.05% APS.

Nella corsa viene usato una concentrazione di acrilammide pari al 12% che è un valore ottimale per la separazione di proteine con peso molecolare compreso tra 12 e 60 KDa. Prima di essere caricati i campioni sono solubilizzati per 15 min con il tampone di solubilizzazione standard (30% glicerolo, 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 9% SDS, 0.1 M DTT). Al tampone viene aggiunto anche un tracciante (blu di bromofenolo), una molecola colorata che non interferisce col campione o con la separazione elettroforetica ma che permette di seguire la corsa del campione nel gel perché è dotato della mobilità più alta.

Caricati i campioni nei pozzetti (presenti nello stacking gel), la parte superiore del gel viene immersa nel tampone di corsa superiore (25 mM Tris/HCl, 192 mM glicina, 1% SDS, pH 8.3) mentre la base del gel viene messa in contatto col tampone di corsa inferiore (25 mM Tris/HCl, 192 mM glicina, pH 8.3). L'elettroforesi viene condotta a temperatura ambiente applicando una corrente costante di 13 mA per ciascun gel per circa 12 ore, nel caso di minigel si usa un supporto diverso e la corsa elettroforetica viene condotta applicando 20 mA, raffreddando il gel ad acqua, per 2-4 ore a seconda dello spessore.

## **2.4 Elettroforesi denaturante in gradiente su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato**

Per avere una maggior risoluzione e possibilità di separare all'interno di un ampio intervallo di pesi molecolari, è stata utilizzata la tecnica dell' SDS-PAGE in gradiente di acrilammide in cui il running gel presenta un gradiente di acrilammide dal 12% al 17% mentre lo stacking gel è lo stesso.

Si utilizza un formatore di gradiente composto da due distinte camere in cui vengono versate le soluzioni di acrilammide a concentrazione diversa (light e

heavy); la velocità di uscita delle soluzioni è controllata attraverso una pompa peristaltica.

#### *running gel (light)*

- 0.8 M Tris/HCl pH 8.83;
- 12% acrilammide;
- 6 M urea;
- 0.03% TEMED;
- 0.05% APS.

#### *running gel (heavy)*

- 0.8 M Tris/HCl pH 8.83;
- 17% acrilammide;
- 6 M urea;
- 330 mM saccarosio;
- 0.03% TEMED;
- 0.05% APS.

Tutte le soluzioni sono state portate a volume con acqua mQ.

## **2.5 Elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide (2-D PAGE)**

Questa tecnica combina l'isoelettrofocalizzazione (IEF) che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico, con la SDS-PAGE, in cui la separazione avviene in base alla massa.

### **2.5.1 Preparazione dei campioni per IEF**

I tilacoidi da analizzare in elettroforesi bidimensionale sono trattati secondo due metodi diversi. Un metodo è stato modificato da un protocollo pubblicato (Caffarri et al., 1995). La procedura ha inizio con l'eliminazione delle proteine periferiche utilizzando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 11: al campione di tilacoidi (300  $\mu\text{g}$  di clorofilla totale) in tampone P3 (vedi Preparazione di membrane tilacoidali) viene aggiunto un volume tale di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  da ottenere una concentrazione finale di 100 mM. La soluzione viene incubata in ghiaccio per 1 h e successivamente centrifugata a 19.600 g per 15 min a 4°C. Il pellet di membrane tilacoidali che si ottiene viene risospeso in 200  $\mu\text{l}$  in NEBuffer3, viene aggiunto 1  $\mu\text{l}$  di CIP (fosfatasi alcalina) e incubato per 1.5 h a 37°C. Il surnatante viene conservato a -20°C. Successivamente il campione viene lavato con acqua e centrifugato a 19.600 g per 10 min a 4°C. Il surnatante viene eliminato e il pellet risospeso in 350  $\mu\text{l}$  di una soluzione 7 M urea e 2 M tiourea. Il campione viene poi ridotto con 5 mM tributilfosfato (TBP) saturando con azoto e alchilato con acrilammide (10 mM finale). Dopo aver lasciato 1 h il campione a temperatura ambiente,

la reazione viene bloccata con 10 mM DTT e si aggiungono 14 volumi di una miscela di tributilfosfato, acetone e metanolo (1:12:1). Il campione viene posto a  $-20^{\circ}\text{C}$  per almeno 1.5 h o over night. La soluzione viene poi centrifugata a 18.000 g per 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il pellet viene lasciato asciugare per 2 h e poi viene risospeso nel tampone di reidratazione (8 M urea, 2 M tiourea, 1% ASB14, 0.5% IPG buffer, blu di bromofenolo in tracce). Si esegue nuovamente la riduzione con TBP (5 mM finale) e l'alchilazione con acrilammide (10 mM finale); il tutto viene incubato a temperatura ambiente per 1 h dopo di che la reazione viene bloccata con 10 mM DTT e il campione è pronto per essere caricato nella prima dimensione.

L'altro metodo che è stato applicato (metodo "classico") è molto più veloce e si basa su una estrazione delle proteine con 100% acetone (v/v) in rapporto 1:5 per una notte a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le proteine della membrana tilacoidale vengono raccolte per centrifugazione e risospese nel tampone di reidratazione (8 M urea, 2 M tiourea, 1% ASB14, 0.5% IPG buffer, tracce di bromofenolo) più 2% CHAPS e 18.6 mM DTT. A questo punto il campione può essere caricato nella prima dimensione. In questo caso la riduzione e l'alchilazione vengono condotte dopo la corsa della prima dimensione.

## 2.5.2 Separazione in 2-D

La tecnica che viene utilizzata nella prima dimensione è l'isoelettrofocalizzazione che separa le proteine in presenza di un gradiente di pH: esse migrano fino a quando non raggiungono un valore di pH per cui la proteina ha carica zero (il suo punto isoelettrico). La focalizzazione isoelettrica viene svolta su un gradiente immobilizzato nel gel di poliacrilammide, polimerizzato sul supporto di plastica. Il gradiente di pH è formato da molecole cariche (immobiline) legate covalentemente al supporto (Görg et al. 1988, Bjellqvist et al. 1993). L'isoelettrofocalizzazione è stata eseguita con IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham - Pharmacia - Biotech) utilizzando supporti con un gradiente lineare da 3 a 10 unità di pH. Le strisce (con il gradiente immobilizzato) vengono messe in contatto con la soluzione di reidratazione (in cui è sciolto il campione) tramite appositi supporti che vengono poi depositati sul piatto dello strumento. La focalizzazione isoelettrica è stata quindi condotta come segue:

- 1 h senza corrente per la reidratazione;
- 13 h a 30 V per la reidratazione;
- 1 h a 200 V;
- 10 min a 300 V;
- un gradiente da 300 V a 3500 V in 30 min;
- 3 h a 3500 V;
- un gradiente da 3500 V a 8000 V in 30 min;
- 4 h a 8000 V, tempo necessario a raggiungere l'equilibrio.

Terminata la prima dimensione, le proteine vengono separate in SDS-PAGE (come descritto in 2.3); in questo caso lo stacking gel è sostituito da uno strato di 0.5% agar in tampone superiore. Prima della corsa le strips devono essere



equilibrate (Bjellqvist et al. 1993) usando il tampone di equilibratura (6 M urea, 30% glicerolo v/v, 2% SDS w/v, 0.05 M Tris/HCl pH 6.8) che ha lo scopo di rivestire le proteine di SDS per poterle separare esclusivamente in base alla massa relativa.

Quando i campioni vengono preparati col primo metodo descritto (Caffarri et al., 1995), la strip così trattata viene caricata direttamente in seconda dimensione; col metodo classico invece il campione viene ridotto e alchilato come segue:

- riduzione dei ponti disolfuro aggiungendo al tampone di equilibratura 2% DTT (w/v) per 12 min;
- alchilazione delle funzioni -SH utilizzando tampone di equilibratura contenente 2.5% iodoacetamide (w/v) per 5 min.

## **2.6 Colorazione dei gel di poliacrilammide.**

### **2.6.1 Colorazione all'argento**

Il gel viene incubato per almeno 4 ore in una soluzione di fissaggio (50% metanolo, 12% acido acetico, 0.05% formaldeide) e poi lavato tre volte per 10 min in 50% etanolo. Si esegue per 1 min il pretrattamento con 0.02%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e, dopo aver risciacquato per tre volte con acqua mQ, il gel viene incubato per 20 min nella soluzione di colorazione contenente 0.2%  $\text{AgNO}_3$  (w/v) e 0.075% formaldeide (v/v). Si esegue poi lo sviluppo con una soluzione contenente 6%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.05% formaldeide e soluzione di pretrattamento al 2%. Quando la colorazione è soddisfacente lo sviluppo viene bloccato utilizzando una soluzione contenente 50% metanolo e 12% acido acetico. Il gel può essere conservato in 50% metanolo.

### **2.6.2 Colorazione al Coomassie Blue**

Il gel viene colorato immergendolo in una soluzione 50% metanolo, 10% acido acetico e 0.1% Coomassie Brilliant Blue. Segue poi la decolorazione con una soluzione contenente 10% metanolo e 7.5% acido acetico.

## **2.7 Western blot e saggio immunologico**

I polipeptidi separati mediante SDS-PAGE vengono trasferiti dal gel alla membrana di PVDF (polivinilidene difluoruro). Il trasferimento avviene utilizzando un sistema per blot (Amersham Bioscience) in cui la membrana, a contatto col gel, viene compressa in un supporto di plastica e immersa nel tampone tra due elettrodi paralleli; il tampone (pH 9.7) contiene 3 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  e 10% metanolo. L'elettroblot viene condotto per 4 ore in camera fredda (4°C) applicando una differenza di potenziale di 25 V.

Prima dell'uso la membrana di PVDF deve essere attivata mediante un lavaggio in metanolo ed uno in acqua (in alternativa può essere usata una membrana di

nitrocellulosa che essendo già abbastanza idrofilica, non deve essere trattata con metanolo).

Al termine del trasferimento viene eseguito il saggio immunologico sulla membrana di PVDF: la membrana viene saturata per 45 min con latte in polvere 10% in TBS (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl). Dopo 30 min di lavaggi con TBS viene incubato per 1.5 h con l'anticorpo primario diluito in TTBS (TBS + 0.25% Tween). L'anticorpo primario viene rimosso con lavaggi in TTBS; successivamente viene incubato per un'ora con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi. Al termine si eseguono 30 min di lavaggi con TTBS.

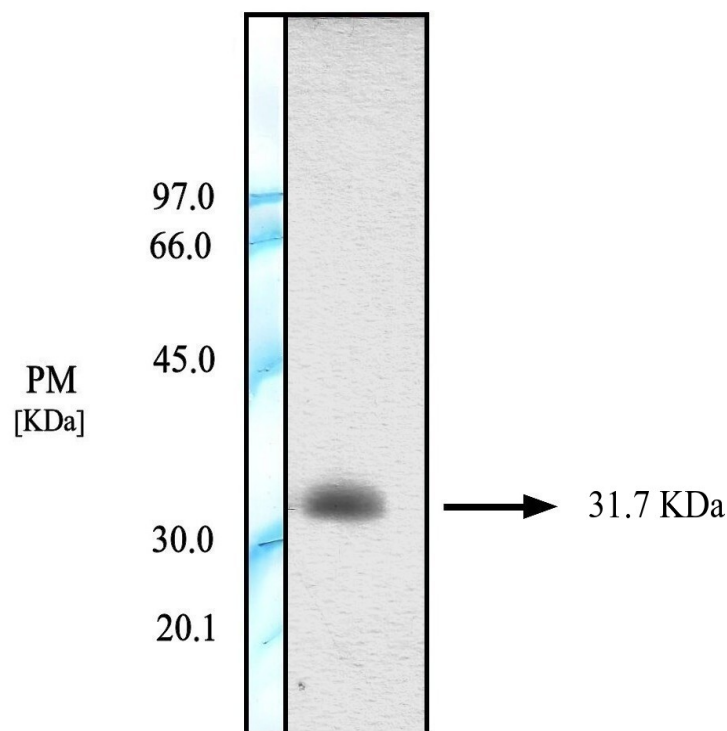
La membrana viene posta in agitazione per 5 min nella soluzione di sviluppo costituita da luminolo e perossido d'idrogeno (1:1); ha luogo una reazione di ossidoriduzione in presenza di un catalizzatore (nel nostro caso la perossidasi coniugata all'anticorpo secondario): l'ossidazione del luminolo porta alla formazione di una specie chemioluminescente che, emettendo a 425 nm, può impressionare le lastre fotografiche. Si procede perciò con l'esposizione della membrana alle lastre fotografiche ed allo sviluppo (questi passaggi devono essere eseguiti in camera oscura).

## **2.8 Saggio dell'attività perossidasi.**

Questa tecnica permette di testare direttamente l'attività perossidasi delle proteine presenti sul supporto (PVDF o nitrocellulosa). Terminato l'elettroblot la membrana viene messa subito in agitazione nella soluzione composta da luminolo e perossido d'idrogeno (1:1); in questo modo viene fornito il substrato necessario a favorire la reazione enzimatica delle perossidasi presenti sul supporto; l'ossidazione del luminolo porta alla formazione di una specie chemioluminescente che può impressionare le lastre fotografiche.

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel laboratorio dove ho svolto il tirocinio, già da tempo era iniziata la ricerca di attività perossidasiche nelle membrane tilacoidali di *Arabidopsis thaliana*. Sono stati fatti diversi esperimenti di analisi delle proteine della membrana tilacoidale in elettroforesi denaturante ed è stata osservata un'attività perossidastica che aumenta proporzionalmente con l'aumentare della concentrazione di riducente. Inoltre è stato dimostrato che l'attività perossidastica individuata usa probabilmente come cofattori dei gruppi cisteinici. È stato anche visto che questa attività perossidastica è presente in altri organismi fotosintetici, sempre nelle membrane tilacoidali: sono stati analizzati i tilacoidi di mais, spinacio e tabacco. Il mio lavoro è iniziato a questo punto con l'obiettivo di cercare di caratterizzare l'enzima. I tilacoidi di *A. thaliana* sono stati analizzati in SDS-PAGE in gradiente di poliacrilammide; il gel è stato trasferito su un supporto di PVDF e l'attività perossidastica è stata determinata utilizzando come substrato la soluzione di luminolo e perossido d'idrogeno. I risultati sono riportati in figura 3.1.



**Figura 3.1 Determinazione del peso molecolare dall'attività perossidastica.** Nel gel in gradiente 12-17% di poliacrilammide, trasferito su PVDF, sono stati caricati 15  $\mu\text{g}$  di clorofilla; sullo stesso gel sono stati caricati anche dei marcatori di peso molecolare messi in evidenza tramite colorazione con Coomassie Brilliant Blue.

L'uso dei marcatori di peso molecolare ha permesso di determinare la taglia della perossidasi tramite la costruzione di una retta di taratura (figura 3.2); il valore ottenuto è di circa 31.7 KDa.

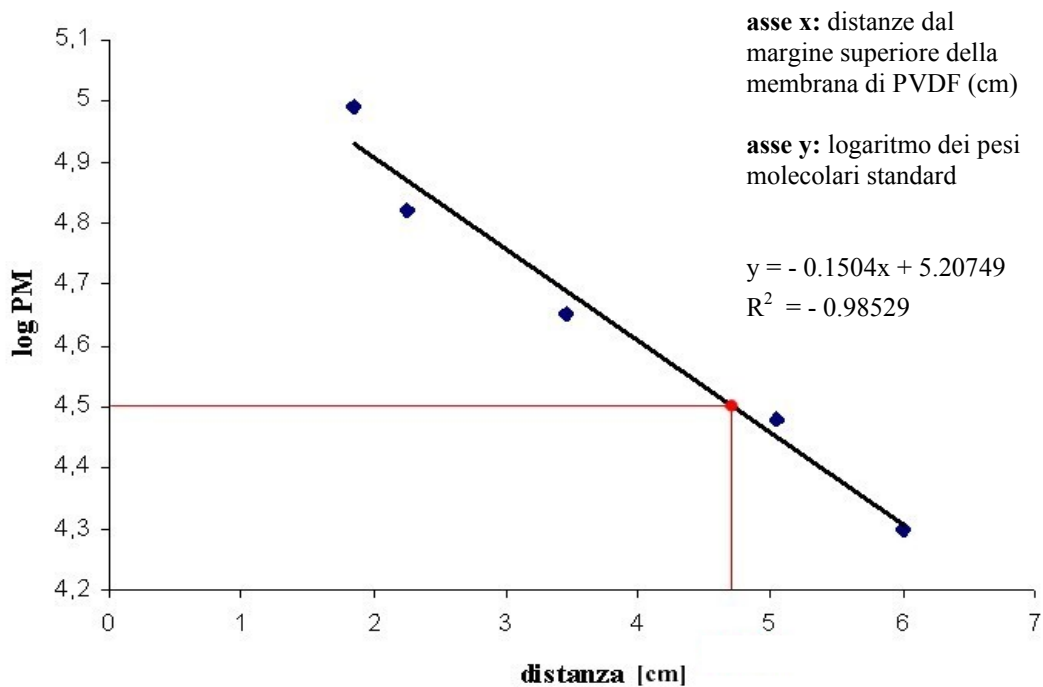


Figura 3.2 Retta di taratura costruita con i pesi molecolari standard.

A questo punto sono state effettuate varie prove per trovare quali fossero le condizioni migliori per determinare l'attività perossidasi. Si è voluto vedere innanzitutto quale supporto permettesse di rivelare meglio l'attività perossidasi: sono state usate membrane di PVDF e di nitrocellulosa; abbiamo inoltre voluto verificare per quanto tempo questa attività permane sul supporto. Dopo una settimana circa il segnale non è più presente su entrambi i supporti però, come si vede nella figura 3.3, già dopo quattro giorni, sulla membrana di PVDF il segnale è quasi completamente assente mentre è ancora abbastanza intenso sul supporto di nitrocellulosa.

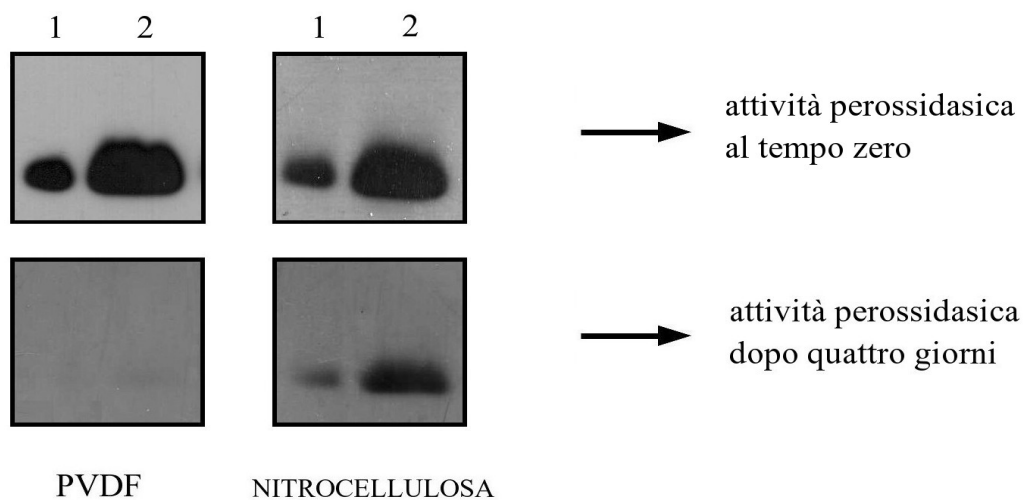
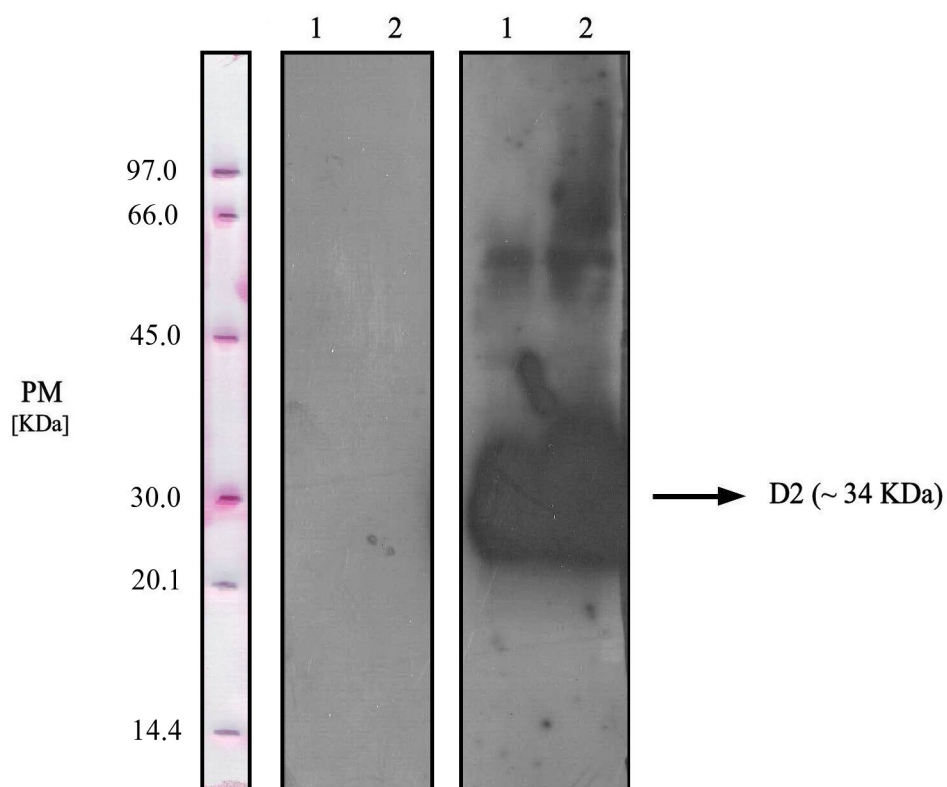


Figura 3.3 Determinazione dell'attività perossidasi dopo trasferimento su PVDF e nitrocellulosa. Il gel al 12% di poliaccrilammide, in cui sono stati caricati 5 µg e 15 µg di clorofilla nei pozzetti 1 e 2 rispettivamente, è stato trasferito sui supporti ed è stata determinata l'attività perossidasi.

Il fatto che l'attività sia ancora presente su nitrocellulosa dopo qualche giorno diversamente da quanto succede su PVDF, è da ricondurre probabilmente al trattamento subito dai due supporti ed in particolare all'applicazione di metanolo sulla membrana di PVDF per il saggio di attività perossidasi. Per verificare che fosse proprio questa la ragione della perdita di attività e che ciò non fosse dovuto piuttosto ad un danneggiamento del supporto o alla perdita delle proteine, si è deciso di eseguire un saggio immunologico contro D2, proteina del fotosistema II molto abbondante nelle membrane tilacoidali. La stessa membrana di PVDF dell'esperimento precedente è stata immunodecorata con un anticorpo contro D2 e rivelata con il metodo basato su luminolo e perossido d'idrogeno; la banda ottenuta in corrispondenza del peso molecolare di D2 ha dimostrato che le proteine non erano state perse ma erano ancora presenti sul supporto.

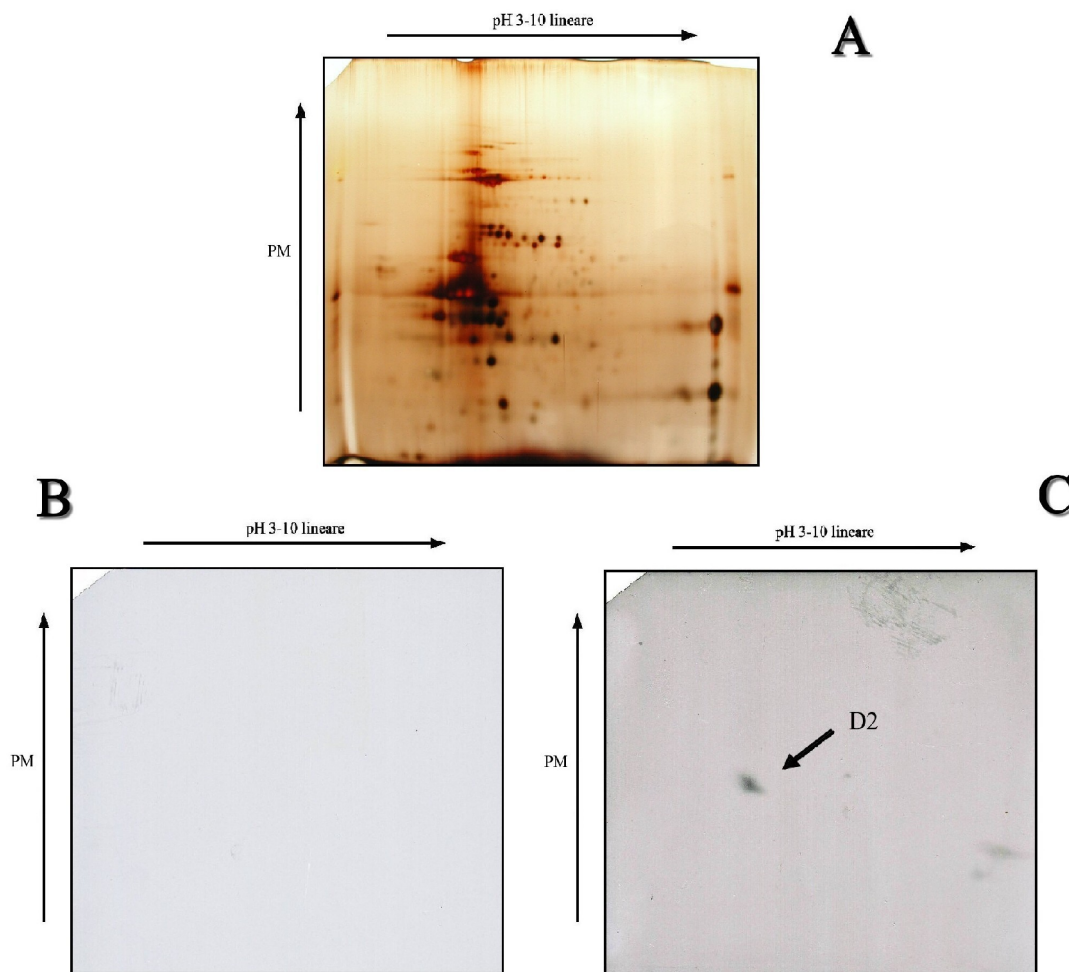


**Figura 3.4 Saggio immunologico con anticorpo contro D2.** Dopo la scomparsa del segnale di attività perossidasi, la membrana di PVDF dell'esperimento precedente è stata immunodecorata con un anticorpo contro D2, diluito 1:2000 in TTBS (membrana a destra). A sinistra viene riportata la stessa membrana prima del saggio immunologico. Nei pozzetti 1 e 2 sono stati caricati rispettivamente 5 e 15  $\mu$ g di clorofilla.

Nella seconda parte del mio lavoro le proteine delle membrane tilacoidali sono state separate in elettroforesi bidimensionale, la tecnica che permette di separare il campione tramite una focalizzazione isoelettrica e successivamente una elettroforesi denaturante.

Per la preparazione del campione di membrane tilacoidali di *A. thaliana* da analizzare, sono state usate diverse metodiche riportate in Materiali e metodi. La prima ad essere applicata è stata quella "classica".

Due aliquote di tilacoidi, trattate secondo quanto descritto nella sezione Materiali e metodi, sono state analizzate in 2-D: uno dei due gel è stato colorato all'argento ottenendo un pattern di proteine ben risolto, con spots presenti a diversi pH; l'altro invece è stato trasferito su PVDF ma, eseguito il saggio di attività perossidasi, non si è visto nessun segnale (figura 3.5). Come nell'elettroforesi in monodimensione, per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine, è stato eseguito il controllo sul supporto che, dopo esser stato immunodecorato con un anticorpo contro D2, ha mostrato la presenza della proteina.

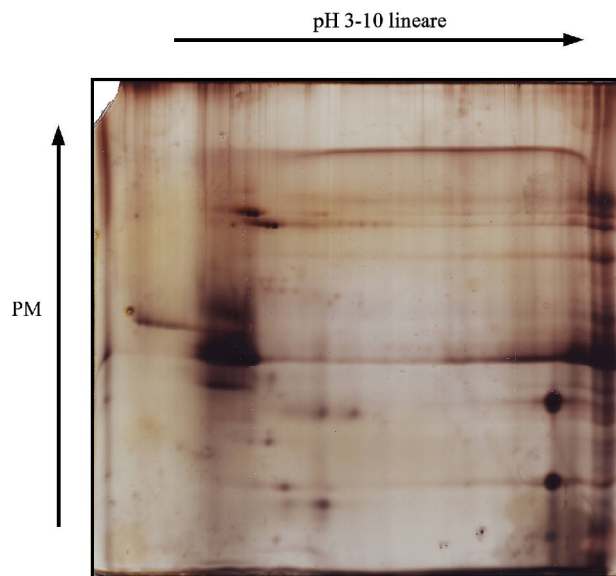


**Figura 3.5** Analisi bidimensionale delle membrane tilacoidali di *Arabidopsis thaliana* secondo il protocollo “classico”. Gel colorato all'argento (A); attività perossidasi su PVDF (B); saggio immunologico con anticorpo anti D2 diluito 1:2000 in TTBS (C). Sono stati caricati 33  $\mu$ g di clorofilla.

Nelle analisi in elettroforesi bidimensionale effettuate, i gel sono sempre stati trasferiti usando supporti di PVDF perché, rispetto ai supporti di nitrocellulosa, offrono una maggior sensibilità alla quantità di proteina.

Poiché non è stata evidenziata nessuna attività perossidasi (figura 3.5, pannello B), si è pensato di riprovare l'analisi in elettroforesi bidimensionale seguendo una procedura diversa nella preparazione del campione. I tilacoidi sono stati trattati

seguendo il protocollo di Caffarri et al. (1995), leggermente modificato ed adattato al nostro tipo di analisi. Al termine dell'elettroforesi bidimensionale si sono ottenuti due gel: uno è stato colorato all'argento mentre l'altro è stato trasferito su PVDF. Anche in questo caso però non c'è stata evidenza di attività perossidasi sulla membrana di PVDF (dato non mostrato) mentre il gel colorato all'argento (figura 3.6) ha mostrato un pattern poco risolto, forse per il fatto che è stata caricata una maggior quantità di proteine.



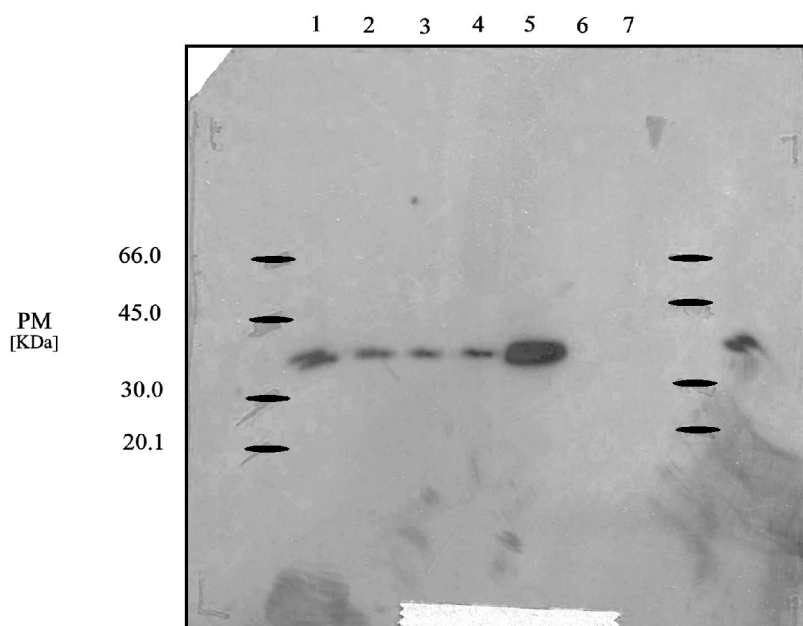
**Figura 3.6** Gel colorato all'argento ottenuto dall'analisi bidimensionale delle proteine tilacoidali di *Arabidopsis thaliana* secondo il protocollo di Caffarri et al. (1995). Sono stati caricati 300 µg di clorofilla.

Dopo questi risultati si è ragionato sul motivo per cui l'analisi bidimensionale non permetteva di evidenziare l'attività perossidasi. In questi esperimenti è sempre stato usato un ampio intervallo di pH (3-10) quindi si può escludere che la proteina sia al di fuori di questo intervallo. Si è provato poi ad aumentare la quantità iniziale di proteine da caricare (protocollo di Caffarri et al., 1995) ma il saggio di attività perossidasi ha continuato a dare risultati negativi.

Si è cominciato a pensare allora che la perossidasi potesse perdere la sua attività nel corso dei vari passaggi necessari alla preparazione del campione. È per questo che si è deciso di analizzare ogni singolo passaggio della procedura, cercando di individuare quel trattamento che potrebbe far perdere l'attività dell'enzima.

Sono stati preparati sette campioni di membrane tilacoidali di *A. thaliana* che differivano per il trattamento subito. Questi campioni sono stati caricati e separati in un minigel al 12% di poliacrilammide; il gel è stato poi trasferito su PVDF ed è stato eseguito il saggio di attività con luminolo e perossido d'idrogeno.

I risultati riportati in figura 3.7 indicano la presenza di attività perossidasi in tutti i campioni tranne quelli trattati con tampone contenente iodoacetamide (pozzetti 6 e 7).



**Figura 3.7 Test di attività perossidasi su tilacoidi di *Arabidopsis thaliana* diversamente trattati.** Nel minigel al 12% di poliacrilammide sono stati caricati in ciascun pozzetto 15  $\mu$ g di clorofilla; lo schema di caricamento è il seguente:

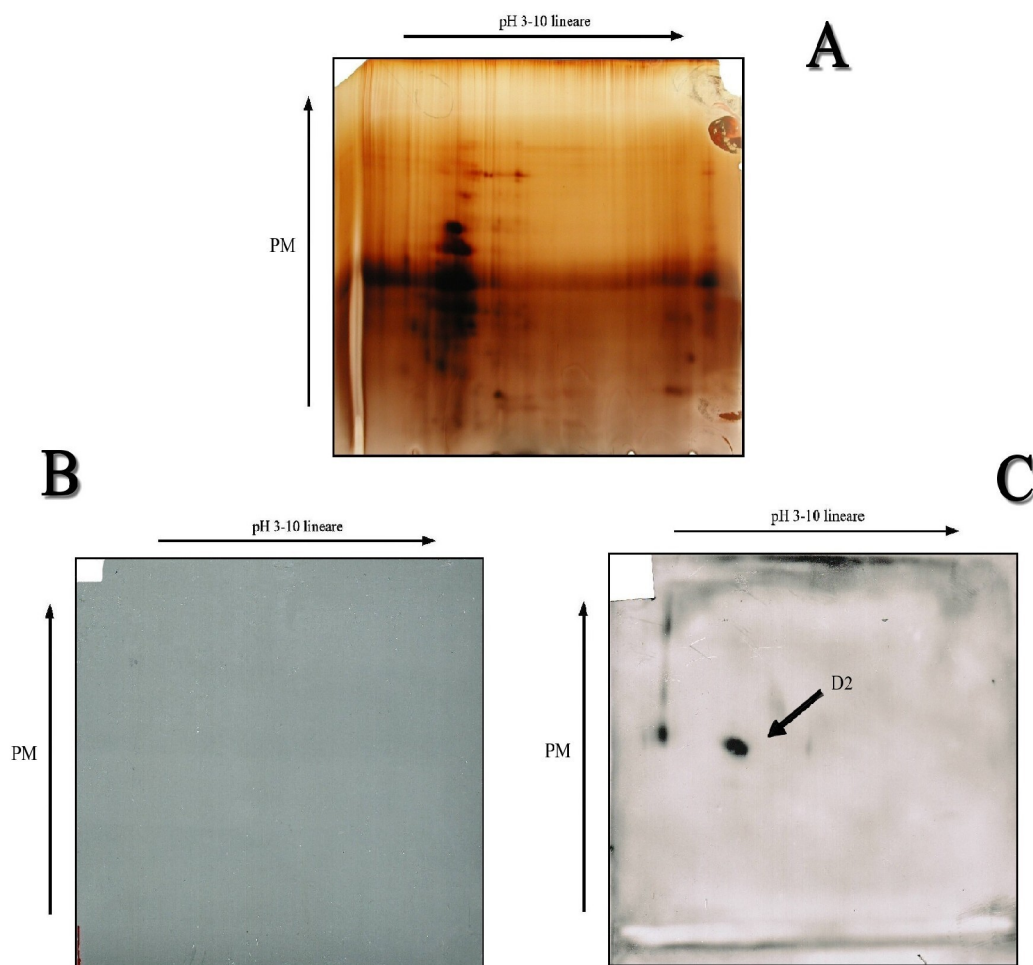
|   |   |
|---|---|
| 1 | solubilizzazione con SB (40 min).   |
| 2 | precipitazione con acetone (over night), solubilizzazione con SB (40 min).  |
| 3 | precipitazione con acetone (over night), solubilizzazione con t. reidratazione (senza tiourea) + 2% CHAPS + 100 mM DTT (20 min).  |
| 4 | precipitazione con acetone (over night), solubilizzazione con t. reidratazione + 2% CHAPS + 100 mM DTT (20 min).  |
| 5 | precipitazione con acetone (over night), solubilizzazione con t. equilibratura + 2% DTT (20 min).   |
| 6 | precipitazione con acetone (over night), solubilizzazione con t. equilibratura + 2% DTT (20 min), solubilizzazione con t. equilibratura + 2.5% IAA (20 min).  |
| 7 | precipitazione con acetone (over night), solubilizzazione con t. reidratazione (senza tiourea) + 2% CHAPS (20 min), solubilizzazione con t. equilibratura + 2% DTT (20 min), solubilizzazione con t. equilibratura + 2.5% IAA (20 min). |

Questo risultato è stato importante perché ci ha permesso di capire qual era il probabile reagente responsabile della perdita di attività perossidasi e cioè la iodoacetammide. Il passo successivo è stato perciò quello di ripetere l'analisi bidimensionale apportando le giuste modifiche, alla luce dei risultati ottenuti.

Sono stati preparati tilacoidi utilizzando tampone di equilibratura privo di iodoacetammide; i tilacoidi sono stati poi analizzati in elettroforesi bidimensionale: un gel è stato colorato all'argento e l'altro trasferito su PVDF.

I risultati ottenuti sono stati però deludenti visto che il gel colorato all'argento è poco risolto (figura 3.8, pannello A) e di nuovo l'attività saggiata su PVDF non è presente (figura 3.8, pannello B). Anche in questo caso è stato eseguito il controllo della membrana immunodecorandola con anticorpo contro D2 e, come ci si aspettava, è stata evidenziata la presenza della proteina (figura 3.8, pannello C).





**Figura 3.8 Analisi bidimensionale modificata.** Sono stati preparati due gel al 12% di poliacrilammide, caricati con la stessa quantità di campione (33  $\mu\text{g}$  di clorofilla) ed aventi ciascuno un gradiente lineare da 3 a 10 unità di pH; uno è stato colorato all'argento (A) mentre l'altro è stato trasferito su PVDF e poi sottoposto alla soluzione di luminolo e perossido d'idrogeno, non mostrando però attività perossidasi (B). Quest'ultima membrana è stata successivamente immunodecorata contro D2 con un anticorpo primario diluito 1:2000 in TTBS (C).

Questi risultati, non molto incoraggianti, ci hanno fatto riflettere sull'utilità di continuare a studiare questa perossidasi con la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale. Questo tipo di analisi aveva lo scopo di cercare di caratterizzare l'enzima assegnandogli, oltre un peso molecolare, anche un punto isoelettrico; questo non è stato possibile perché il gel della 2-D, trasferito sul supporto, non ha evidenziato nessuna attività, nonostante le diverse condizioni sperimentali utilizzate. Probabilmente l'elettroforesi bidimensionale non è la tecnica migliore per questo studio perché prevede trattamenti che risultano dannosi per l'attività della perossidasi stessa. Come si vede nell'ultima analisi bidimensionale eseguita, sul gel colorato all'argento la presenza di marcate strisce orizzontali e la bassa risoluzione fanno pensare ad un problema di un'inadeguata solubilizzazione del campione nella prima dimensione o a una conseguenza della mancata acetilazione. In prospettiva sarà opportuno eseguire l'isoelettrofocalizzazione su un supporto diverso che permetta una più semplice migrazione delle proteine e sperimentare anche altre metodiche per cercare di caratterizzare la perossidasi.

## 4 BIBLIOGRAFIA

- **Arnon DJ:** Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 1949, **24**: 1-14.
- **Bjelloqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutiger S, Huger GJ, Hochstrasser D:** Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* 1993, **14**: 1375-1378.
- **Caffarri S, Frigerio S, Olivieri E, Righetti PG, Bassi R:** Differential accumulation of Lhcb gene products in thylakoid membranes of *Zea mays* plant grown under contrasting light and temperature conditions. *Proteomics* 2005, **5**: 758-768.
- **Diez KJ, Horling F, Köning J, Baier M:** The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *Journal of experimental botany* 2002, **53(372)**: 1321-1329.
- **Görg A, Postel W, Günther S:** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient. *Electrophoresis* 1988, **9**: 531-546.
- **Ishikawa T, Shigeoka S:** Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, **72(5)**: 1143-1154.
- **Mittler R, Zilinskas BA:** Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem.* 1993, **212(2)**: 540-6.
- **Mullineaux PM, Karpinski S, Creissen GP:** Integration of signaling in antioxidant defenses (cap. 15) in *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*, Demming-Adams B, Adams III WW, Mattoo AK (eds), 2006, **21**: 223-239.