

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XXIII ciclo

(2007-2010)

Tesi di Dottorato

Induzione delle Heat shock proteins (Hsp),  
Programmed Cell Death (PCD) e analisi proteomica  
di campioni vegetali sottoposti a stress abiotici

Tutore	PhD	Coordinatore
Ch.mo Prof.	Dott.ssa	Ch.mo Prof.
Sergio Esposito	Stefania Montanari	Ezio Ricca

INDICE	PAG. 2
CAP 1 INTRODUZIONE	6
STRESS ABIOTICI	9
Aspetti dello stress salino nelle piante	9
Conseguenze e risposte allo stress salino	14
Aspetti dello stress da metalli pesanti nelle piante	19
Metallo-tolleranza	24
HEAT SHOCK PROTEINS	29
Introduzione	29
Nomenclatura e principali caratteristiche	31
Hsp70	33
Hsp90	44
Hsp60 o chaperonine	47
Hsp100/Clp	50
sHsp	52
Validità delle Hsp come bioindicatori	53
MORTE PROGRAMMATA CELLULARE (PCD)	56
CAP 2: MATERIALI E METODI	60
Campioni biologici utilizzati:	60
<i>Hordeum vulgare</i> : coltivazione delle piante	60
<i>Leptodictyum riparium</i> (Hedw.) e <i>Conocephalum</i> <i>conicum</i> L.: allestimento e colture in vitro	62

<i>Leptodon smithii</i> e <i>Quercus ilex</i> : raccolta campioni	64
HEAT SHOCK PROTEIN (Hsp70)	68
Preparazione dei campioni:	68
<i>Hordeum vulgare</i>	68
<i>Leptodictyum riparium</i> e <i>Conocephalum conicum</i>	68
<i>Leptodon smithii</i> e <i>Quercus ilex</i>	69
Preparazione degli estratti	69
Determinazione delle proteine	70
Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)	70
Western blotting	73
Analisi del DNA genomico in <i>Hordeum vulgare</i>	74
Estrazione del DNA da radici e foglie di orzo mediante CTAB	74
Determinazione della concentrazione e della purezza del DNA estratto da orzo	76
Elettroforesi su gel d'agarosio	77
Analisi della DNasi in orzo	78
Estrazione del DNA da radici e foglie per saggio delle DNasi	80
ANALISI PROTEOMICA MEDIANTE ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE	81
Preparazione dei campioni:	81

<i>Hordeum vulgare</i>	81
<i>Leptodon smithii</i> e <i>Quercus ilex</i>	81
Preparazione degli estratti	82
Protocollo d'estrazione I per <i>Leptodon smithii</i> e <i>Quercus ilex</i>	82
Protocollo d'estrazione II per <i>Hordeum vulgare</i>	83
I dimensione: isoelectrofocusing (IEF)	84
II dimensione	85
Colorazione dei gel con nitrato d'argento	88
Colorazione con Sypro Ruby	89
Identificazione degli spots	89
<b>CAP 3:RISULTATI</b>	<b>92</b>
Hsp70	92
Analisi Western in <i>Hordeum vulgare</i>	92
Analisi Western <i>Leptodictyum riparium</i> e <i>Conocephalum conicum</i>	97
Analisi Western <i>Leptodon smithii</i>	102
<b>DNA LADDERING</b>	<b>105</b>
Concentrazione e purezza del DNA estratto	105
Effetti dello stress salino sul DNA estratto	108
<b>SAGGIO DNasi</b>	<b>111</b>
Dati spettrofotometrici	111

ANALISI PROTEOMICA	114
Elettroforesi bidimensionale dei campioni di <i>Leptodon smithii</i> e <i>Quercus ilex</i>	114
Elettroforesi bidimensionale dei campioni di <i>Hordeum vulgare</i>	121
CAP 4:DISCUSSIONE	136
CAP 5:BIBLIOGRAFIA	147

## **CAPITOLO 1:**

### **INTRODUZIONE**

Le piante sono legate al loro habitat, dove vivono naturalmente protette e dove sono in grado di concludere il loro ciclo vitale giungendo alla produzione. Tuttavia le piante sono esposte ad ampie modificazioni delle condizioni ambientali che rappresentano un problema per il normale sviluppo. Esse infatti, sono costantemente sottoposte a situazioni di stress, intese come fattori esterni che esercitano un'influenza svantaggiosa sulla loro crescita, sviluppo e produttività.

I fattori di stress sono numerosi, e a seconda della durata e dell'intensità, non solo riducono la vitalità delle piante ma recano loro consistenti danni.

Gli stress possono essere sia di natura biotica, se sono inferti da altri organismi viventi come l'attacco da parte di organismi patogeni quali funghi, batteri, nematodi ed insetti, e sia di natura abiotica se sono dovuti a carenze o eccessi dei fattori che determinano le caratteristiche fisiche o chimiche dell'ambiente naturale o derivate dall'attività umana, come siccità,

salinità o squilibrio dei nutrienti minerali nel suolo, metalli pesanti presenti nell'atmosfera, alte/basse temperature ecc.

Le piante, essendo organismi sessili, non hanno la possibilità di sfuggire ai vari fattori di stress, per cui risentono delle variazioni ambientali che possono divenire stressanti nell'arco di pochi minuti, giorni, settimane o mesi. A tal proposito esse hanno sviluppato, nel corso dell'evoluzione, dei meccanismi molecolari che consentono loro di adattarsi alle condizioni ambientali sfavorevoli.

Gli organismi vegetali sono in grado di percepire la presenza di un fattore di stress, di tradurre il segnale e di attivare un ampio ventaglio di risposte che comprendono, manifestazioni evidenti quali variazioni nella velocità di crescita e di sviluppo, e manifestazioni non appariscenti quali modificazioni dell'espressione genica e del metabolismo cellulare o la sintesi di nuove proteine. Questi cambiamenti sono tutti finalizzati ad acclimatare l'organismo per consentirne la sopravvivenza alle sopravvenute condizioni stressanti.

Fenomeni di acclimatemento si verificano ogni qual volta la pianta si trova esposta a variazioni non letali delle condizioni ambientali, che inducono modificazioni fisiologiche che consentono alla pianta di sopravvivere a condizioni di stress molto più intense.

Alcuni dei meccanismi che consentono alle piante di sopravvivere a condizioni avverse sono costitutivi, cioè presenti prima dell'esposizione allo stress, mentre altri sono inducibili per cui è necessario un periodo di acclimatemento affinché l'organismo acquisisca il massimo grado di tolleranza.

Le alterazioni a cui le piante sono sottoposte possono, quindi, essere "elastiche" se, una volta rimossa la causa dello stress, l'organismo recupera la condizione originaria, e "plastiche", se alcune condizioni rimangono definitivamente modificate.

Quando una pianta è in grado di sopravvivere a condizioni sfavorevoli si dice che essa è "resistente allo stress", caratteristica che attraverso l'evoluzione può diventare stabile. Quando le piante si organizzano internamente in modo da impedire alle cellule di subire lo stress evitando le condizioni sfavorevoli si verifica invece "l'elusione dello stress", ed infine, se esse sopravvivono con un normale funzionamento tollerando le condizioni sfavorevoli allora si dice che esse attuano la cosiddetta "tolleranza allo stress".

E' stato stimato che gli stress, sia abiotici e sia biotici, possono ridurre la produttività media del 65-87% a seconda del tipo di coltura. Lo stress inoltre gioca un ruolo principale nella determinazione del limite della distribuzione delle specie vegetali in funzione del suolo e del clima.

La crescente domanda della popolazione umana associata alla diminuzione delle risorse e delle terre coltivabili, ha alimentato l'interesse scientifico e commerciale verso la comprensione dei meccanismi attraverso i quali la piante rispondono allo stress, e verso l'intervento per modificare questi meccanismi, al fine di aumentare la produttività vegetale in condizioni ambientali non ottimali. L'applicazione di biotecnologie e di miglioramento genetico classico, potrebbero portare allo sviluppo di piante tolleranti lo stress che aumentino le riserve mondiali di cibo e forniscano consistenti benefici economici.

## **STRESS ABIOTICI**

### **Aspetti dello stress salino nelle piante**

Il termine salinità è applicato nella biologia vegetale soprattutto al suolo e indica l'accumulo di sali come Sodio (Na), Cloro (Cl), Calcio (Ca), Solfati ( $SO_4^{2-}$ ), Carbonati e molti altri elementi che si formano dal contatto dell'acqua piovana con la superficie della crosta terrestre. Un sostanziale contributo alla formazione di terreni salini è dato anche dall'uomo attraverso la pratica agricola dell'irrigazione. Quando l'acqua d'irrigazione contiene un'elevata concentrazione di soluti e non c'è opportunità di dilavare i sali accumulati in un sistema di drenaggio, questi possono raggiungere velocemente concentrazioni dannose per le specie sensibili. L'evaporazione e la traspirazione inoltre rimuovono dal terreno acqua pura, sotto forma di vapore, e questa perdita d'acqua concentra i soluti nel suolo.

Le proprietà del suolo influenzano significativamente la crescita e la produttività delle piante e, ovviamente, gli effetti della salinità del suolo varia a seconda della tipologia di pianta. I terreni affetti da salinità (salini, sodico-salini, sodici) hanno bassa attività biologica a causa degli effetti osmotici e ionici dei sali, nonché della riduzione dei substrati carboniosi, con conseguente riduzione della vita e dell'attività dei microrganismi.

I sali disciolti nel suolo, e assorbiti dalle radici delle piante terrestri per essere utilizzati nei vari processi biochimici che avvengono nella cellula vegetale, sono essenziali affinché le piante possano crescere e svilupparsi correttamente. Malgrado ciò, un eccesso di sali nella soluzione idrica del suolo può influire negativamente su aspetti fisiologici di vitale importanza per la pianta provocando danni consistenti, infatti, un suolo che accumula

una quantità eccessiva di sali minerali impedisce un normale sviluppo vegetativo e quindi, in termini agronomici, riduce la produttività.

Nei casi estremi, si verifica che le terre destinate alla produzione agricola non sono in grado di sostenere a lungo tale tipo di utilizzazione e devono essere abbandonate. Tale fenomeno può aver probabilmente influito sul declino di molte civiltà nel corso della storia.

Nelle aree costiere, il suolo viene arricchito di sali a causa delle periodiche inondazioni marine, mentre nei suoli delle regioni semi-aride o aride, soprattutto quelli caratterizzati da un drenaggio insufficiente, l'accumulo e il deposito di sali solubili si verifica in seguito all'evaporazione dell'acqua usata per l'irrigazione.

L'eccesso di sali porta alla formazione di suoli compatti che riducono la respirazione cellulare delle radici, ma anche il drenaggio dell'acqua e delle sostanze disciolte nella materia organica, inoltre esso altera il potenziale idrico del suolo e causa degli inconvenienti di natura osmotica alle radici.

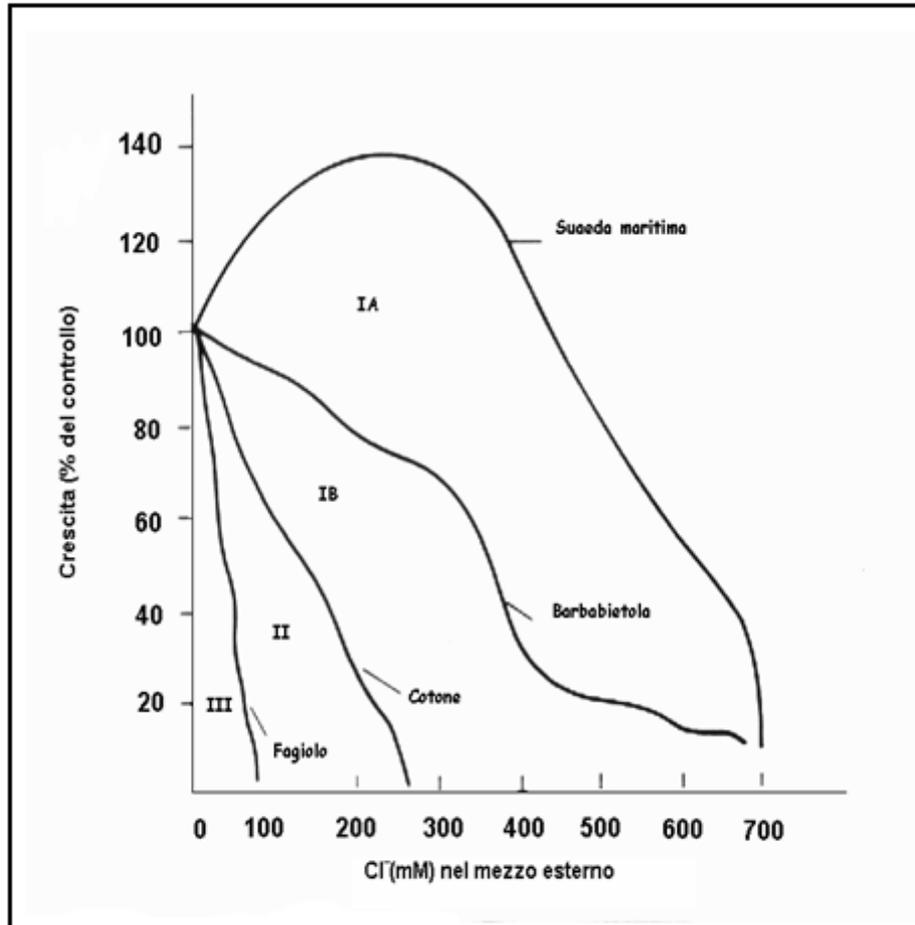
L'eccessiva salinità rappresenta dunque, una delle principali cause di stress limitanti la crescita e la produttività delle piante coltivate. È stato calcolato che circa il 23% della superficie mondiale coltivata è considerata salina (alte concentrazioni di sali totali), mentre un altro 37% sodica (alte concentrazioni di  $\text{Na}^+$ ) anche se spesso i due concetti sono correlati. E' stato inoltre stimato che una metà delle superfici irrigue è seriamente interessata da salinità e/o da alcalinità secondaria e che 10 milioni di ettari di terreno coltivato vengono abbandonati annualmente a causa degli effetti avversi della salinizzazione e dell'alcalinizzazione secondaria dovute all'irrigazione.

I terreni affetti da salinità presentano bassa attività biologica a causa degli effetti osmotici e ionici dei sali, nonché della riduzione dei substrati carboniosi, con conseguente riduzione della vita e attività dei microrganismi. Gli unici organismi capaci di vivere in condizioni di elevate concentrazioni di sali sono gli alobatteri. Tutti gli altri batteri, i funghi, le piante e gli animali preservano particolari condizioni a livello citoplasmatico, poiché non capaci di tollerare lo stress salino a livello molecolare.

In relazione alle risposte che le piante adottano in presenza di elevate concentrazioni di sali, esse possono essere suddivise in due grandi gruppi, le alofite e le gliofite. Le prime sono specializzate per vivere in ambienti fortemente salini, grazie ad aggiustamenti osmotici ottenuti mediante la presenza di particolari soluti (osmoliti) sintetizzati all'intero del citoplasma. Gli osmoliti sono composti organici altamente solubili che non interferiscono con il metabolismo cellulare anche se presenti in elevate concentrazioni. Essi presentano particolari proprietà biochimiche, essi inoltre sono stabilizzatori del guscio di idratazione delle proteine nella loro conformazione nativa, proteggono i macchinari proteici dal misfolding ed alleviano gli effetti tossici provocati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species), come la carbamilazione delle proteine e la perossidazione dei lipidi. La maggior parte delle piante però sono glicofite (letteralmente piante dolci), ovvero esse non tollerano le alte concentrazioni saline, e rispondono allo stress osmotico, causato in questo caso principalmente dallo ione sodio ( $\text{Na}^+$ ), mediante l'estrusione dell'eccesso di sali attraverso apposite strutture secernenti, oppure mediante la limitazione del trasporto di ioni sodio dalle radici alle parti aeree della

pianta sequestrando così gli ioni tossici nei vacuoli, un fenomeno noto come "compartimentazione del sodio". Quest'ultimo meccanismo contribuisce alla diminuzione del potenziale osmotico all'interno del citosol cellulare (stress osmotico), che impedisce alla pianta di assimilare l'acqua, provocando in essa uno stato di "sete fisiologica". Per le alofite che tollerano la tossicità del sodio, lo stress osmotico potrebbe essere la principale causa dell'inibizione della crescita. Ovviamente l'aggiustamento osmotico operato sia dalle alofite e sia dalle glicofite ha un determinato costo energetico che in taluni casi comporta una riduzione della produttività delle piante che lo attuano.

Alle glicofite appartengono la maggior parte delle piante coltivate, ad esempio mais, cipolle, agrumi, noce americano, lattuga e fagiolo che sono fortemente sensibili ai sali, invece cotone ed orzo sono moderatamente tolleranti. Le alofite possono essere succulente o xeromorfe e sono spesso dotate di ghiandole secernenti sali, addirittura alcune specie come per esempio la *Suaeda maritima* (una pianta di paludi salmastre) e l'*Atriplex nummularia* (un arbusto di zone saline), fortemente tolleranti al sale, mostrano una stimolazione di crescita a concentrazioni di  $Cl^-$  di diverse volte superiori alle concentrazioni letali per le specie sensibili. Sia le glicofite e sia le alofite, presentano un'elevata variabilità nel grado di tolleranza alla salinità, per cui risulta difficile tracciare una linea netta di demarcazione fra i due gruppi, infatti, la curva di risposta delle glicofite alla salinità si sovrappone a quella delle alofite.



**Fig. 1:** Andamento della crescita di diverse specie vegetali all'aumentare della concentrazione dello ione cloro (L. Taiz - E. Ziegher 2002).

Le specie sono classificabili in quattro gruppi:

gruppo IA alofite (*Suaeda maritima*, *Atriplex nummularia*);

gruppo IB, alofite tolleranti il sale con ritardo dell'accrescimento (*Spartina townsendii* e *Beta vulgaris*);

gruppo II, alofite e non alofite;

gruppo III, non alofite.

## **Conseguenze e risposte allo stress salino**

Molte delle risposte delle piante alla salinità sono correlate a quelle osservate per lo stress idrico ed osmotico, infatti, la salinità è causa di stress ionico, osmotico, nonché ossidativo.

A livello fisiologico le piante subiscono tre tipi di danni da salinità: osmotico, nutrizionale e tossico. A questi si aggiungono quelli derivanti da asfissia radicale causata dalla riduzione della permeabilità dei terreni, quando nell'acqua d'irrigazione il contenuto di sodio rispetto a quello del calcio e del magnesio è elevato (*SAR, sodium absorption ratio*). I danni osmotici, legati al basso potenziale idrico del terreno, sono dovuti ad una riduzione del turgore cellulare che comporta alterazione dei processi metabolici ed inibizione della crescita. Lo stress nutrizionale, invece, è dovuto alla competizione ionica nei processi di assorbimento radicale. Il danno tossico, infine, può influire sia sulla funzionalità di membrana, alterando la permeabilità ed il trasporto, e sia sulle attività enzimatiche danneggiando processi metabolici quali fotosintesi e respirazione. Il grado di tossicità dei diversi sali naturalmente varia con la specie e con il sistema di coltivazione.

Tuttavia è difficile formulare regole generali in quanto le piante mostrano un ampio range di sopravvivenza allo stress salino, perfino nelle stesse specie e cultivars, con dipendenza anche dallo stadio di crescita. Comunque molte colture, specialmente i cereali, sono sensibili alla maggior parte dei sali nei primi stadi di sviluppo della pianticella con influenza sulla produzione del seme, infatti di solito lo stress salino ritarda la germinazione e l'emergenza. La barbabietola da zucchero ad esempio è altamente

tollerante allo stress salino durante la maggior parte del ciclo, ma è sensibile durante la germinazione, al contrario, il riso, il pomodoro, il grano e l'orzo sono di solito più sensibili dopo la germinazione.

Si ritiene che lo stress osmotico e l'eccesso ionico non siano fenomeni alternativi, ma che avvengano in sequenza, per cui la crescita della pianta risponde alla salinità in due fasi distinte:

1. la riduzione della crescita è dovuta alla forza osmotica della soluzione esterna (risposta osmotica), considerata come "stress idrico secondario", probabilmente regolato da segnali inibitori della crescita derivanti dalle radici nella cui trasduzione potrebbe essere coinvolto l'ABA e/o il calcio che varia di molto in presenza di alti livelli di sodio.

2. accumulo di sale all'interno della pianta a livelli tossici tali da ridurre il passaggio degli assimilati verso le parti in accrescimento. Questa fase dovrebbe primariamente verificarsi nelle piante meno capaci a escludere o sequestrare il sale nel vacuolo.

E' ovvio che, una volta rimosso il fattore di stress senza che si verifichi danno ai tessuti meristemati, la crescita ricomincia sebbene con ritmo non propriamente fisiologico.

Sali differenti a differente concentrazione osmotica danneggiano le piante in modo diverso ma la presenza di calcio riduce gli effetti del sale. In alcuni casi i soluti organici, sebbene aumentino la concentrazione osmotica totale, sono in grado di aumentare la soglia di tossicità del sale. Questa tossicità può direttamente agire sul plasmalemma e altre membrane, come pure su processi metabolici come fotosintesi, respirazione, metabolismo

proteico, ecc. Così possiamo distinguere un effetto diretto primario (che include le biomembrane) e un effetto indiretto (effetti metabolici).

L'effetto diretto è generalmente molto veloce (shock da sale). La membrana plasmatica aumenta la permeabilità e l'efflusso ionico. Si verificano anche cambiamenti su lipidi e proteine di membrana. E' ormai accettato, infatti, che la conseguenza primaria dello stress da NaCl sia un'alterazione della funzionalità di membrana.

L'effetto indiretto si manifesta in vario modo. Per quanto riguarda la crescita essa è significativamente ridotta, sebbene la osmoregolazione mantenga il turgore cellulare. In queste condizioni la pianta usa probabilmente l'energia necessaria per sostenere i processi di crescita per controllare le concentrazioni ioniche nelle cellule.

Quando la pianta cerca di contrastare la salinità richiede una maggiore quantità di energia (mantenimento della respirazione), così la velocità di respirazione può essere superiore alle condizioni normali. Di solito questo aumento è temporaneo ma successivamente la respirazione ritorna ai livelli. In molte piante tra cui il grano, il sale inibisce la sintesi proteica stimolandone l'idrolisi, probabilmente a causa di uno sbilanciamento  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ , o sensibilità al  $\text{Cl}^-$  della pianta.

Poiché i sali in soluzione sono in forma ionica, le cariche possono agire sulle proteine sia rompendo i legami elettrostatici e/o sia aumentando le interazioni idrofobiche.

Considerato che l'esposizione delle piante a concentrazioni eccessive di sali avviene nella soluzione del suolo, la radice rappresenta la principale barriera all'assorbimento dei numerosi elementi minerali, quindi l'ingresso

degli ioni nel simplasma radicale e lo scaricamento nello xilema sono dei processi altamente regolati.

Come è stato visto in piante di orzo, durante lo stress salino sono indotti diversi cambiamenti strutturali, per esempio nelle cellule meristematiche, presenti nella regione apicale della radice, si nota un aumento dei vacuoli che, probabilmente, consentono l'accumulo dell'eccesso di ioni che potrebbero raggiungere livelli tossici, proteggendo in questo modo il citoplasma. Nella regione corticale invece, i plastidi assumono una forma ameboide e racchiudono parte del citoplasma, meno denso rispetto al resto. Inoltre, i mitocondri dell'epidermide e del periciclo, subiscono consistenti danni strutturali, il citocromo c infatti, può essere rilasciato in seguito ai danni ossidativi dovuti ad una prolungata esposizione delle piante a stress salino, e la cromatina nei nuclei comincia a condensarsi. Tutto ciò è probabilmente causato da cambiamenti adattativi nella sintesi proteica e da alterazioni nella composizione del citoplasma durante lo stress salino.

Nell'orzo lo stress salino induce la riduzione dell'assimilazione della  $CO_2$ , della sintesi proteica e dell'attività della Rubisco. In generale l'assunzione di  $CO_2$  da parte delle piante in condizioni di salinità è ridotta, probabilmente per la chiusura degli stomi e per la riduzione della pressione parziale intercellulare del gas che così conduce allo stress ossidativo. Nella stessa pianta si può dimostrare che l'ormone inibitore ABA aumenta a seguito di esposizione a stress salino, infatti è stato notato che le piante trattate con ABA per alcuni giorni sono in grado di sopportare maggiormente lo stress salino, indicando un ruolo attivo dell'ormone nei meccanismi di resistenza (Xiong e Zhu, 2002).

Lo stress ionico e osmotico dovuti all'elevata salinità possono creare stress secondari (o derivati) nelle piante, essi includono per esempio, l'accumulo di composti tossici o indesiderati, perturbazioni nel metabolismo cellulare e disordini nutrizionali. Le specie ROS (Reactive Oxygen Species), come gli anioni superossido ed il perossido d'idrogeno, possono avere effetti dannosi per le strutture cellulari, per le macromolecole, per gli enzimi ed per il DNA. La detossificazione mediante enzimi quale la catalasi e la superossido dismutasi contribuisce quindi ai meccanismi di tolleranza. A tal riguardo i fenoli agirebbero come antiossidanti, donando un atomo di idrogeno ai radicali liberi, generati in seguito a stress ossidativi (Shetty et al. 2002).

Cambiamenti nell'espressione genica possono essere coinvolti nel meccanismo di resistenza allo stress o possono essere il risultato del danno provocato dallo stress stesso. È stato, individuato un ampio gruppo di geni la cui trascrizione risulta attivata nelle piante in condizioni di stress (Hare et al., 1996) e si assume che le proteine indotte dallo stress possano essere implicate nel conferire tolleranza. Durante lo stress salino l'espressione di alcuni geni è attenuata mentre quella di altri è aumentata, vi è quindi un cambiamento trascrizionale che provoca un accumulo di determinate proteine nelle piante in risposta a stimoli che inducono la disidratazione dei tessuti, come appunto avviene durante gli stress salini. I geni regolati dallo stress salino appartengono a gruppi diversi, essi codificano per le proteine LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins), per le osmotine, per le germin-like proteins (come recentemente visto in orzo), per le acquaporine, per le pompe ATPasi di membrana e per enzimi coinvolti nella detossificazione e nella biosintesi di soluti compatibili ed ormoni.

Nell'adattamento delle piante allo stress salino è nota l'implicazione di diverse classi ormonali quali citochinine, gibberelline, auxine ed etilene. Tuttavia, l'ormone per il quale sono state raccolte maggiori evidenze a riguardo, è l'acido abscissico (ABA) che assume un ruolo chiave nella tolleranza delle piante anche ad altri tipi di stress come quelli derivanti da freddo, congelamento, alta temperatura e deficit idrico. In condizioni di salinità si osserva un aumento dei livelli di ABA endogeno e se le cellule sono trattate con ABA prima di essere esposte alla salinità, la loro tolleranza aumenta in quanto esso è coinvolto in molti aspetti della risposta delle piante allo stress salino includendo anche l'induzione dell'espressione di geni responsivi al sale (Xiong e Zhu, 2002), la mancanza di ABA invece sembra essere responsabile del blocco dell'espressione di alcuni geni responsivi allo stress salino (Xiong et al., 2001).

### **Aspetti dello stress da metalli pesanti nelle piante**

Lo stress da metalli pesanti è strettamente legato alle attività industriali e di combustione che ne causano la movimentazione nell'ambiente. Benché siano elementi naturalmente presenti nell'ecosistema, la loro mobilitazione, determinata dalle attività umane, ne causa l'accumulo nella biosfera e l'ingresso nella catena alimentare con gravi danni sia per l'uomo e sia per animali e vegetali.

La definizione di metalli pesanti risulta difficile e suscettibile di critiche in quanto in letteratura sono riportate definizioni contrastanti. Quando si parla di inquinamento da metalli pesanti si sta parlando soprattutto di metalli di transizione.

Con il termine di metalli "pesanti" sono identificati quegli elementi chimici che presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- una densità superiore a  $5.0 \text{ g/cm}^3$  (per alcuni Autori il limite di riferimento é  $5.0$  o anche  $6.0 \text{ g/cm}^3$ ) (Bargagli, 1998a);
- si comportano come cationi, ossia come ioni dotati di carica positiva quando entrano in un campo elettromagnetico;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno una tendenza a dare vita a legami chimici complessi;
- hanno una grande affinità con i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi;
- hanno diversi stati d'ossidazione secondo le condizioni di pH.

Con l'eccezione del ferro e dell'alluminio i metalli pesanti appartengono ai cosiddetti "elementi in traccia", presenti nei più comuni suoli, nei sedimenti e nelle rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0.1%.

Nel corso della loro evoluzione gli organismi vegetali hanno sviluppato svariati adattamenti per contrastare la presenza di metalli nocivi. Ad alta concentrazione cellulare, i metalli essenziali (Cu e Zn) per la vita risultano tossici in quanto possono danneggiare la membrana cellulare, alterare le funzioni cellulari e danneggiare la struttura del DNA con effetti genotossici per la cellula. Altri metalli, non essenziali (Cd e Pb) per il metabolismo, sono potenzialmente dannosi per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni.

La tossicità dei metalli insorge a causa delle interazioni che essi stabiliscono con componenti cellulari essenziali tramite legami ionici e/o

covalenti generando alterazioni delle attività metaboliche cellulari (Bruins et al., 2000).

In letteratura sono ampiamente documentati gli effetti tossici prodotti dai metalli sulle piante, i principali riguardano:

1. La formazione di radicali liberi:

Il rame in eccesso, ad esempio, induce la formazione di perossido di idrogeno, ione idrossile ed altre specie di radicali liberi direttamente correlati col danno a proteine e lipidi (Upadhyay et al., 2009). Le cellule vegetali sono dotate di specifici meccanismi per la rimozione dei radicali liberi, prodotti da reazioni redox dei metalli (Hiramoto et al., 1996).

2. Diminuzione dell'attività fotosintetica e del contenuto della clorofilla:

Metalli come il rame e il mercurio hanno elevata affinità per i gruppi solfidrici e possono causare l'inibizione della biosintesi della clorofilla (Bargagli, 1998; Vasquez et al., 1987; Ouzounidou, 1994).

3. Inibizione della crescita radicale:

I danni a livello radicale determinano importanti effetti secondari, come per esempio la riduzione dell'assorbimento e la traslocazione degli elementi nutritivi e dell'acqua e, quindi, la riduzione della crescita del germoglio e la colorosi delle foglie (Leita et al., 1991).

4. Riduzione della crescita del germoglio:

La riduzione della crescita del germoglio, può essere la conseguenza degli effetti tossici secondari a livello dell'apparato radicale in seguito ad un ridotto apporto di elementi nutritivi ed acqua, a causa della competizione tra essi i metalli per l'assorbimento, e la traslocazione (Ouzounidou, 1994; Siedlecka, 1995). La riduzione dello sviluppo del germoglio può essere causata anche dall'inibizione, da parte dei metalli, della sintesi e/o traslocazione di citochinine, come in *Glicine max* in cui l'alluminio inibisce lo sviluppo dei rami laterali (Pan et al., 1989).

5. Riduzione dell'apporto e della traslocazione di elementi nutritivi e d'acqua:

L'assorbimento e la trasformazione dei metalli tossici all'interno della pianta può interferire con quella degli elementi chimici essenziali, per cui si determina una notevole alterazione della nutrizione minerale delle piante.

Per tale motivo c'è spesso una forte rassomiglianza tra alcuni effetti tossici causati dai metalli e quelli, per esempio, causati dalla mancanza di nutrienti essenziali, quali ferro, potassio e calcio (Siedlecka, 1995).

6. Inibizione dei movimenti fototattici e gravotattici:

Il rame ed il mercurio causano in *Euglena gracilis*, l'alterazione dei movimenti gravitattici che da positivi

diventano negativi, mentre il piombo provoca una forte riduzione della velocità di movimento (Stallwitz, 1994).

Nell'alga verde flagellata *Haematococcus lacustris* coltivata in vitro in presenza di  $\text{Cu}^{2+}$ , si osserva la perdita della capacità di rispondere fototatticamente agli stimoli luminosi in quanto si inibisce la traduzione di tale stimolo (Braune et al., 1994).

7. Alterazione della mitosi ed effetti clastogenici:

Il cromo VI, il piombo ed il cadmio, sono sostanze fortemente citotossiche, ed è stato spesso documentato il loro effetto mutagenico, clastogenico e carcinogenico, su cellule batteriche, vegetali, animali e umane, (Wierzbicka, 1988; Kasprzak, 1995).

I metalli di transizione sono genotossici in quanto sono capaci di legare il nucleo cellulare e di causare danni promutageni che includono la modificazioni delle basi azotate del DNA, la rottura della doppia elica del DNA, i riarrangiamenti e la depurinazione.

Tali alterazioni sono conseguenza dell'azione ossidante sul DNA esercitata dall'ossigeno attivo e altri radicali liberi prodotti in reazioni redox catalizzate dai metalli (Kasprzak, 1995).

8. Alterazioni delle strutture cellulari:

In *Hordeum vulgare* l'alluminio causa una variazione conformazionale della calmodulina, proteina essenziale

per la regolazione dell'attività enzimatica della  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi di membrana, che ne causa l'inattivazione e porta all'alterazione del potenziale di membrana (Sigel e Haug, 1983).

### **Metallo-tolleranza**

Alcune specie di piante, indipendentemente dalla loro specifica resistenza, reagiscono con un meccanismo di difesa ad un incremento della disponibilità dei metalli. Queste risposte consistono in diversi processi metabolici diretti a prevenire l'assorbimento dei metalli prevenendo gli effetti tossici metallo-indotti (Bargagli, 1998). La presenza di livelli tossici di metalli pesanti produce una serie di risposte cellulari inclusi cambiamenti nell'espressione genica per la sintesi di peptici per la detossicazione da metalli (Basile et al., 2001). Le piante possono mostrare tre differenti tipi di comportamento in presenza degli stessi elementi e sotto le stesse condizioni ambientali:

- 1) "Excluders": piante che hanno sviluppato il meccanismo "Avoidance" ossia di evitare lo stress, che consente di prevenire l'assorbimento e la traslocazione degli ioni metallici,
- 2) "Indicators": piante che assorbono ed accumulano metalli tramite meccanismi, come la chelazione, la localizzazione e l'inattivazione chimica, al fine di ridurre l'effetto tossico. Tali

specie sono utili per il biomonitoraggio in quanto la concentrazione dei metalli nei tessuti riflette la loro disponibilità ambientale.

3) "Accumulators": piante che tollerano e possono accumulare elevate concentrazioni di metalli nei loro tessuti, spesso indipendentemente dal ruolo fisiologico o dalla concentrazione di tali metalli (Bargagli, 1998).

I meccanismi di resistenza delle piante alla tossicità dei metalli sono riconducibili a due tipi essenziali di strategie che consistono nel tollerare o nell'evitare lo stress (Marchionni, 1999).

Si ritiene che la maggior parte delle piante "excluders" prevenga l'assorbimento e la traslocazione degli inquinanti presenti nel suolo immobilizzandoli nella membrana plasmatica delle radici o delle micorrize.

Nelle piante cosiddette "tolleranti", meccanismi fisiologici specifici permettono lo svolgersi delle funzioni metaboliche a concentrazioni interne di metalli potenzialmente tossiche (Marchionni, 1999). Tali piante hanno sviluppato, a livello cellulare, diversi meccanismi di metallo-resistenza, tra cui il sequestro a livello della parete cellulare, la presenza di membrane metallo-tolleranti e di pompe che trasportano attivamente metalli all'esterno della cellula, la detossificazione enzimatica, la compartimentazione, e la riduzione della sensibilità dei target cellulari degli ioni metallici (Bruins, 2000).

E' necessario sottolineare che la metallo-tolleranza può essere una proprietà costitutiva, indotta, oppure di natura mista, in

quanto dipende dall'influenza genetica e dalle condizioni ambientali. La prima forma di metallo-tolleranza non è influenzabile dai parametri ambientali in cui vive la pianta, ed è stabile dato che è determinata geneticamente. La si definisce invece inducibile, quando rappresenta una risposta fenotipica a particolari condizioni ambientali e la sua espressione termina nel momento in cui la condizione di stress che l'ha determinato viene meno (Backer et al., 1987; Rout et al., 2000).

In condizioni ambientali sfavorevoli, molte piante "accumulators" acquisiscono la capacità di accumulare i metalli pesanti fino a elevate concentrazioni, che di gran lunga superano quelle presenti nel suolo o nelle altre specie che crescono nel medesimo habitat. Spesso all'interno delle cellule si verifica la metallo-detossificazione che si realizza attraverso legami con specifici ligandi organici che porta alla formazione di complessi non dannosi per la cellula.

- Le fitochelatine (PC)

In specie sensibili e in specie metallo tolleranti, il maggiore apporto di determinati metalli, come per esempio il cadmio, può indurre, come meccanismo di difesa, la produzione di peptidi metallo-chelanti, ricchi di residui cisteinici definiti fitochelatine (PCs) (Grill et al., 1985; Morelli e Pratesi, 1997; Cobbet, 2000).

Le fitochelatine sono polipeptidi con struttura ( $\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly (con n compreso tra 2 e 11), che contribuiscono a rendere il metallo inefficace, formando dei complessi con esso, grazie alla

presenza dei gruppi tiolici di cisteina. La sintesi delle fitochelatine è indotta dalla presenza del metallo e termina quando nel citosol più presenti ioni tossici.

- Le metallotionine (Mts)

Le metallotionine sono proteine a basso peso molecolare ricche di residui di cisteina, che complessano i metalli pesanti mediante la formazione di legami metallo-tiolic. Le Mts, a differenza delle PCs non sono prodotti enzimatici ma prodotti dell'espressione genica. E' stata ipotizzata anche in alcune piante la presenza di specifiche Mts, implicate in processi di detossificazione da metalli pesanti (Cobbett, 2000; Rauser, 1999).

- Il glutatione-S-transferasi (GST)

Il tripeptide  $\gamma$ -glutamilsteinglicina o glutatione (GSH) è il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare ed è presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule a concentrazioni millimolari. Le GST sono enzimi che detossificano composti xenobiotici (sostanze estranee all'organismo) ed endobiotici mediante il legame covalente del glutatione (GSH) al substrato idrofobico (Mars, 1996). Nella cellula, in condizioni redox normali, la maggior parte del GSH è in forma ridotta ed è distribuito nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri. Oltre che in forma libera, il GSH, mediante un processo chiamato glutationilazione, può anche essere legato covalentemente a proteine, regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti. Il

GSH può quindi agire direttamente da scavenger di radicali liberi e di xenobiotici elettrofili, oppure da substrato per le glutatione perossidasi (GPxs) e glutatione S-transferasi (GSTs), durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno, di idroperossidi lipidici e di composti elettrofili.

## HEAT SHOCK PROTEINS

### Introduzione

Gli stress abiotici nella maggior parte dei casi provocano un'alterazione proteica. Le proteine che mantengono la loro conformazione funzionale e che evitano l'aggregazione di proteine non native, sono particolarmente importanti per la sopravvivenza della cellula in condizioni di stress (Wangxia wang et al., 2004).

Molti organismi sono capaci di sintetizzare proteine che proteggono dal danno cellulare (Hightower et al., 1985; Hightower,1993; Hartl,1996). Queste proteine furono descritte per la prima volta in cellule di *Drosophila melanogaster* durante l'esposizione ad elevate temperature (Ritossa, 1962), e da qui il nome "heat shock proteins" (Hsp). Da allora è stato dimostrato che numerosi stress ambientali inducono le heat shock proteins, pertanto, successivamente, per descrivere tali proteine, è stato utilizzato il termine di "Stress Protein" ad indicare il loro coinvolgimento durante qualsiasi situazione di stress. In particolare è possibile utilizzare anche il termine "Hsp cognates" (Hsc), per indicare quelle proteine, appartenenti alla stessa famiglia delle Hsp, indotte da altri fattori diversi dal calore (Prasad,1995).

I fattori ambientali coinvolti nell'induzione di tali proteine (Lewis et al.,1999) sono:

- esposizione di metalli in tracce
- inquinanti organici
- cambiamenti nella temperatura
- ipossia o anossia
- esposizione a radiazioni ultraviolette.

Le heat shock proteins sono tuttavia espresse costitutivamente, infatti molte di queste proteine sono chaperoni molecolari coinvolti in normali processi biochimici, esse infatti, non solo legano e stabilizzano le proteine negli stadi intermedi del folding assicurandone la corretta conformazione (Hartl, 1996), ma intervengono anche nella traslocazione cellulare attraverso le membrane, nell'assemblaggio e nella degradazione delle proteine. Non deve quindi sorprendere che le Hsp siano presenti in una ampia varietà di organismi, a partire dai batteri fino ad arrivare all'uomo. In condizioni di stress si pensa che esse siano over-espresse o che addirittura vengano indotte delle isoforme.

Gli chaperoni molecolari rappresentano quindi le principali componenti che contribuiscono a mantenere invariata l'omeostasi cellulare sia in condizioni fisiologiche di crescita e sia durante condizioni avverse di crescita. Essi infatti, giocano un ruolo cruciale nel proteggere le piante e di guidare il refolding di proteine che, sottoposte a condizioni di stress, presentano un folding errato (Wangxia wang et al., 2004).

## **Nomenclatura e principali caratteristiche**

In relazione al proprio peso molecolare è possibile suddividere le Heat shock proteins in cinque grandi famiglie, e classificarle quindi con il nome di:

- Hsp70 (Dna K).
- Chaperonine (GroEL e Hsp60)
- Hsp90
- Hsp100 (Clp)
- Piccole Hsp (sHsp)

Inoltre, in aggiunta a tali famiglie esistono poi, altre proteine con funzioni di chaperoni molecolari, come per esempio la disulfide isomerasi, e la calnexina/calreticulina, che in particolare assistono al folding delle proteine del reticolo endoplasmatico (ER). La maggior parte delle Hsp sono localizzate sia nel citoplasma e sia all'interno degli organelli cellulari come per esempio nei mitocondri, nei cloroplasti e nel reticolo endoplasmatico (Tab 1).

CLASSI	MEMBRI RAPPRESENTATIVI	LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE	PRINCIPALI FUNZIONI
Hsp70  Subfamiglia: - DnaK  -Hsp110/SSE	Hsp/Hsc70 Hsp70 Bip <sup>1</sup>  Hsp91	Citosol Cloroplasti e mitocondri Reticolo endoplasmatico  Citosol	Previene l'aggregazione, assiste al refolding, guida la traslocazione delle proteine attraverso le membrane, trasduce i segnali, è responsabile dell'attivazione trascrizionale.
<b>Chaperonine/Hsp60</b>  Subfamiglia: -Group I -Group II	Cpn60 CCT <sup>3</sup>	Cloroplasti e mitocondri Citosol	Assiste al folding e al refolding delle proteine
<b>Hsp90</b>	Hsp90  AtHsp90-1 AtHsp90-5 AtHsp90-6 AtHsp90-7	Citosol Cloroplasti Mitocondri Reticolo endoplasmatico	Facilita la maturazione delle molecole segnale, buffer genetico
<b>Hsp100/Clp</b>  Subfamiglia: -Class I  -Class II	Hsp100  ClpB, ClpA/C ClpD ClpM, ClpN ClpX, ClpY	Citosol, mitocondri Cloroplasti Cloroplasti	Disaggregazione, unfolding
<b>sHsp</b>  Subfamily: I II III  IV V VI	Hsp17.6 Hsp17.9 Hsp21 Hsp26.2 Hsp22 Hsp23 Hsp22.3	Citosol Citosol Cloroplasti  Reticolo endoplasmatico Mitocondri Membrane	Prevencono l'aggregazione, stabilizzano proteine non native

**Tab.1:** Classificazione, in relazione al peso molecolare, delle principali classi di chaperoni molecolari/Hsp e delle loro rispettive sub famiglie.

## Hsp70

È la famiglia maggiormente conservata, è stata identificata in archeobatteri, in molte specie di alghe, in molti invertebrati marini, e in tutte le classi dei cordati (Hightower et al., 1985; Hightower, 1993).

Le Hsp70 sono costituite da due principali domini funzionali, il primo presente nella porzione N-terminale della proteina di circa 40 kDa con funzione ATPasica, e il secondo presente nella porzione C-terminale della proteina di circa 25 kDa peptide-binding (Fig.1). I due domini sono separati da una regione cardine suscettibile al taglio delle proteasi.

Poichè le Hsp70 sono localizzate nel citosol, nel reticolo endoplasmatico (ER), nei mitocondri e nei plastidi, nei precursori dei membri destinati ad essere trasportati all'interno di tali organelli, è presente, all'estremità N-terminale, un peptide di transito con una sequenza variabile. Per molte Hsp70, la presenza di un subdominio al C-terminale di circa 5kDa, è indispensabile per consentire l'interazione con i propri co-chaperoni.

Il sito che lega l'ATP, presente nel dominio all'N-terminale, è situato alla base di una sacca profonda posizionata tra i due lobi strutturali, e il nucleotide che lega il core del dominio dell'ATPasi ha una struttura terziaria simile a quella dell'esochinasi (Flaherty et al. 1990), per cui il meccanismo di fosfotransferasi e il cambiamento conformazionale indotto dal substrato delle due proteine potrebbe essere simile.

Il dominio che lega il peptide contiene un subdominio  $\beta$ -sandwich dove risiede la sacca che lega il peptide, e i residui che rivestono la sacca, interagiscono con il tratto idrofobico esposto delle catene polipeptidiche unfolded.

Un'estensione ad  $\alpha$ -elica, presente al C-terminale, funge da porta per intrappolare il peptide legato nella sacca di legame, tale meccanismo consente di mantenere i complessi per un lungo tempo (Zhu et al. 1996).

Il legame con l'ATP provoca un movimento conformazionale all'interno del dominio dell'ATPasi che viene trasdotto al dominio che lega il peptide, con conseguente apertura della sacca di legame mediante il sollevamento della porta ad  $\alpha$ -elica.

In seguito a tale arrangiamento strutturale aperto, il legame e il rilascio del peptide può avvenire rapidamente.

L'idrolisi dell'ATP, provoca la chiusura della porta sulla sacca di legame, intrappolando il peptide legato (Zhu et al. 1996).

In generale, dato l'alto livello di conservazione delle sequenze delle Hsp70 in natura, e dei membri della famiglia delle Hsp70 nelle piante, gran parte di ciò che è stato scoperto sulla DnaK di *E. coli* è valido anche per l'Hsp70 nelle piante.

L'ampio spettro di funzioni delle Hsp70 è dovuto all'intervento di co-chaperoni che, originati durante l'evoluzione dalla diversificazione dei geni delle Hsp70, svolgono specifiche funzioni cellulari in cooperazione con le Hsp70.

Il co-chaperone DnaJ di *E. coli* è un attivatore della funzione ATPasica della DnaK, e l'idrolisi dell'ATP sembra essere associato con il legame del substrato.

Infatti, quando l'ATP è legato alla DnaK, il dominio che lega il substrato presenta una bassa affinità di legame per il polipeptide substrato, in tale

forma i peptidi substrati possono essere legati o rilasciati dalla DnaK con maggiore libertà.

L'idrolisi dell'ATP, stimolata dalla DnaJ (Suh et al. 1999), provoca un cambiamento conformazionale del dominio che lega il peptide, che porta la DnaK in una forma in cui l'affinità di legame per il peptide substrato è alta.

GrpE di *E. coli* è un altro regolatore delle Hsp70, esso legandosi al dominio che lega l'ATP della DnaK, stimola lo scambio nucleotidico spostando la DnaJ e l'ADP, consentendo un altro ciclo di legame dell'ATP (Banecki and Zylicz 1996). Il substrato è simultaneamente rilasciato, e il ciclo in cui il peptide si lega e viene rilasciato può riprendere. Molto probabilmente Hip è una proteina oligomerica che si lega al dominio delle Hsc70 degli eucarioti che lega l'ADP (Höhfeld et al. 1995) attraverso l'interazione con il suo peptide tetraterico ripetuto (Irmer and Höhfeld 1997) e stabilizza lo stato dell'ADP delle Hsc70, mantenendo alta l'affinità ed è un attivatore dell'attività di folding (Luders et al. 1998).

BAG-1 è un regolatore negativo delle Hsc70 (Bimston et al. 1998, Shinichi et al. 1999) che interagisce, con alta affinità, con il dominio dell'ATPasi delle Hsc70 attraverso una regione di 45 amminoacidi (dominio BAG) vicino al suo C-terminale. Tale interazione stimola l'idrolisi dell'ATP e accelera il rilascio dell'ADP in modo simile a ciò che fa GrpE con la DnaK anche se sono strutturalmente differenti (Höhfeld and Jentsch 1997). Anche BAG-1 inibisce l'attività dello chaperone e agisce come un antagonista competitivo al legame di Hip.

Hop è una proteina eucariotica che presenta ripetizioni di un peptide tetraterico, e ha la capacità di legare fra loro le Hsp70 e le Hsp90 per

formare un complesso chaperonico multi funzionale (Johnson et al. 1998) creando un legame fisico tra i due chaperoni. Hop promuove un ottimo refolding quando sono presenti le Hsp70 e le Hsp90, formando preferenzialmente un complesso con le Hsp70 che legano l'ADP. Hop non ha effetto sull'attività dell'ATPasi o sulla dissociazione dell'ADP, ciò indica che esso non agisce come fattore per lo scambio di nucleotidi.

Sembra che sia Hip e sia Hop interagiscano con il dominio C-terminale delle Hsp70 localizzate nel citosol, e tale interazione dipende dalla presenza al C-terminale di quattro specifici amminoacidi EEVD (Liu et al. 1999). Hip interagisce anche con il dominio dell'ATPasi delle Hsp70 attraverso le ripetizioni del suo peptide tetraterico (Irmer and Höhfeld 1997).

Un altro peptide con ripetizioni tetraterico è CHIP, che interagendo con l'Hsc70, agisce come un regolatore negativo mediante l'inibizione dell'attività ATPasica delle Hsp40.

In eucarioti i cognates delle Hsp70 e delle Hsc70, si associano in dimeri, trimeri e oligomeri, i quali potrebbero essere forme conservate inattive di chaperoni. Durante i periodi di stress, gli oligomeri sono riconvertiti in monomeri attivi. Questa associazione richiede determinanti al C-terminale ed è inteso come un meccanismo di autoregolazione quando i peptidi substrato sono presenti in concentrazioni non saturanti (Benaroudj et al. 1997).

Nelle piante i geni delle Hsp70 sono codificate da una famiglia multi genica ampiamente conservata. In Arabidopsis 14 geni codificano per le Hsp70 e almeno 12 sono presenti in spinacio (Guy and Li 1998, Sung et al. 2001).

Le sequenze analizzate delle famiglie dei geni delle Hsp70 indicano l'esistenza di 4 maggiori subgruppi (Guy and Li 1998, Sung et al. 2001), localizzati nel citosol, ER, plastidi, e mitocondri. Le Hsp70 sono anche localizzate in altri compartimenti subcellulari come per esempio nei gliossisomi e nei corpi proteici (Wimmer et al. 1997).

Una caratteristica delle Hsp70 delle piante riguarda la presenza di motivi identificabili al C-terminale che possono essere utilizzati per distinguere la localizzazione delle proteine subcellulari, il C-terminale di ogni subgruppo è unico e altamente conservato.

Nelle piante, anche la struttura dei geni delle Hsp70 è unica con 4 subgruppi della famiglia. I geni che codificano le Hsp70 citosoliche, di solito hanno uno o addirittura nessun introne, mentre i geni che codificano le Hsp70 degli organelli hanno introni multipli.

Anche se le strutture geniche delle Hsp70 degli organelli sono distintamente differenti e caratteristici per ogni localizzazione subcellulare, tra le piante gli arrangiamenti individuali introni/esoni non sono assolutamente conservati.

Questa diversità della struttura genica delle Hsp70 degli organelli o riflette i processi evolutivi di come essi sono stati trasferiti dal genoma dell'endosimbionte al genoma nucleare delle cellule delle piante, oppure tale diversità gioca un ruolo importante nei meccanismi di regolazione negli più complessi ambiente delle cellule eucariotiche.

Un caratteristica di molti geni delle Hsp70 è la forte e universale induzione in risposta allo shock termico, le Hsp70 delle piante mostrano una

forte e rapida induzione dopo 30 minuti fino a 2 ore a 37-45°C (Li et al. 1999, Sung et al. 2001).

Nelle piante molte Hsp70 sono indotte dallo shock da freddo (Li et al. 1999), in particolare tale induzione, in pomodoro, spinacio e Arabidopsis, riguarda principalmente i membri citosolici e mitocondriali (Guy and Li 1998).

L'induzione al calore delle Hsp70 è mediata dai fattori di trascrizione heat shock (HSF) e che corrispondono agli elementi heat shock (HSE) nei promotori. Gli HSF attivi trimerici si legano agli HSE presenti nei promotori di molti geni inducibili dal calore, tra cui le Hsp70.

In condizioni in cui non è presente uno shock termico, l'Hsp70 o si lega all'HSF inattivo o rimane come Hsp70 libera. Durante lo shock da calore, il pool di Hsp70 libere è ridotto dal legame con le proteine denaturate dal calore, le quali liberano l'HSF dall'Hsp70.

La presenza dell'HSF trimerica attiva nel nucleo promuove la trascrizione dell'Hsp70 aumentandone quindi la quantità. Le Hsp70 in eccesso catturano gli HSF neo sintetizzati prima che essi siano portati al nucleo e formino una struttura trimerica, per cui di volta in volta si attenua l'espressione delle Hsp70 indotte dal calore e di altre Hsp.

Le Hsp70 di piante rispondono anche ad altri tipi di segnali ambientali, per esempio diversi membri della famiglia delle Hsp70 di spinacio sono regolate dai segnali di luce e buio indipendenti dal ritmo circadiano (Li and Guy 2001), e nel pomodoro un alto livello di acido salicilico (SA) induce l'espressione delle Hsp70/Hsc70, mentre un basso livello di SA

potenzia l'induzione delle Hsp70/Hsc70 da shock da calore (Cronje' and Bornman 1999).

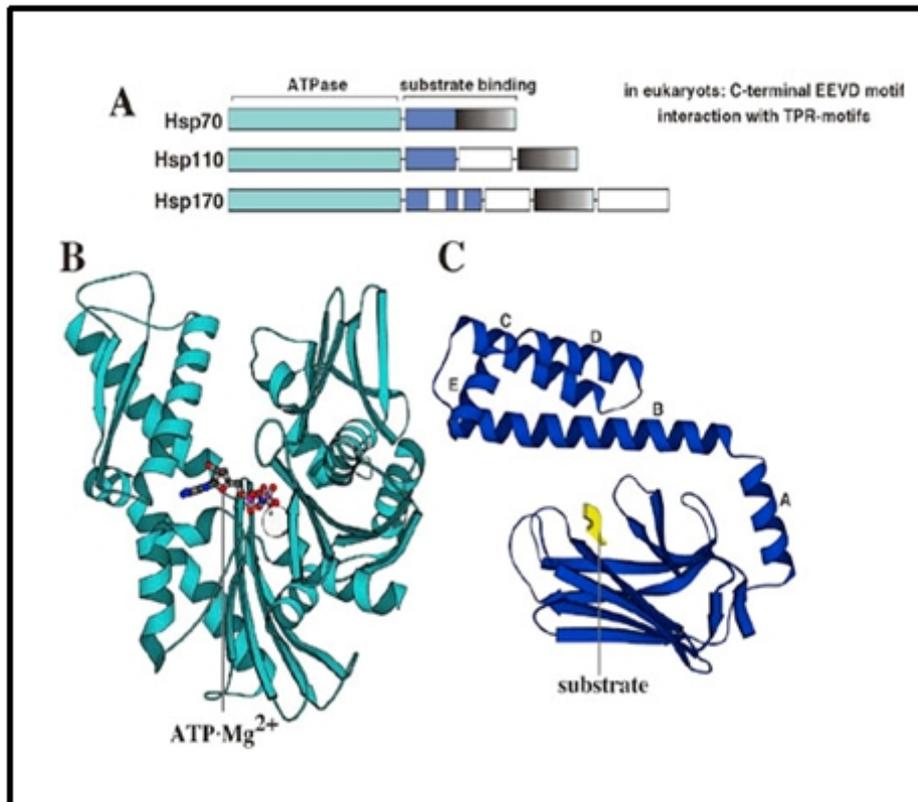
Le Hsp70 delle piante sono state trovate nel citosol, nel ER, nei mitocondri, nei cloroplasti e nei perossisomi. Le Hsp70 esercitano la loro influenza in molti processi cellulari che comprendono il legame ai residui idrofobici esposti di proteine non native durante il folding, il prevenire l'aggregazione delle proteine, il facilitare la rinaturazione delle proteine aggregate e il tenere le proteine in uno stato di importo competente per la traslocazione nei compartimenti cellulari (Boston et al. 1996, Miernyk 1997). Le Hsp70 partecipano al folding delle proteine attraverso i cicli degli chaperoni che comprendono cicli ripetuti di legame al peptide, idrolisi dell'ATP e rilascio del peptide (Miernyk 1997).

Le Hsp70 citosoliche sono coinvolte in processi cellulari, come il folding delle proteine, il refolding delle proteine denaturate, la prevenzione dell'aggregazione delle proteine e il mantenere le proteine in uno stato di importo competente negli eucarioti. Gli studi in vitro hanno mostrato che le Hsp70 citosoliche delle piante si associano con i polipeptidi nascenti dei precursori di secrezione (Miernyk et al. 1992). Inoltre, quando gli estratti di germe di grano sono stati svuotati delle Hsp70 citosoliche, la traslocazione co-traduzionale e il processamento dei precursori delle proteine diventavano inefficienti, e l'aggiunta delle Hsp70 citosoliche ripristinava la traslocazione e il processamento dei precursori (Miernyk et al. 1992). È stato quindi suggerito che le Hsp70 citoplasmatiche sono coinvolte nella traslocazione al ER dei precursori delle proteine.

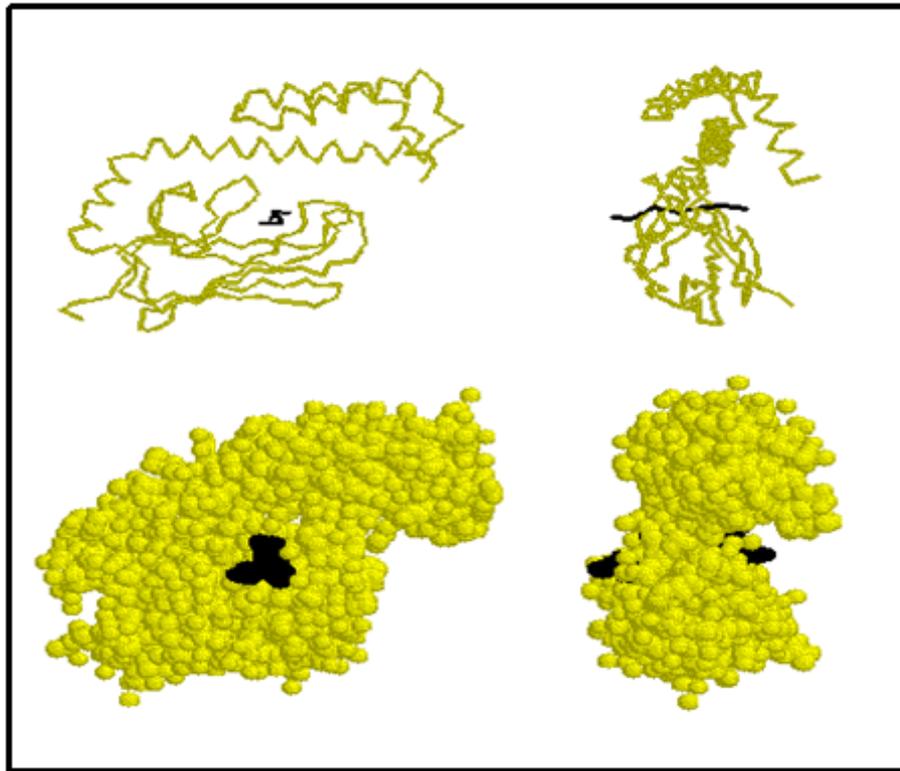
Al lume del ER, dove i pathways dei precursori delle proteine di secrezione sono generalmente co-traslocati, appartiene un membro della famiglia delle Hsp70, BiP. Esso è considerato uno dei diversi chaperoni ad essere coinvolto nella traslocazione dei precursori delle proteine attraverso la membrana del ER, nel folding delle proteine, nell'assemblaggio e nel legame a proteine con folding errato nel lume del ER. L'espressione di BiP è indotta da condizioni di stress che portano le proteine ad avere un folding errato (Denecke et al. 1991). Recenti studi hanno mostrato che l'overespressione di BiP allevia lo stress al ER mediante il ripristino del processamento delle proteine secrete e il folding (Leborgne-Castel et al. 1999). A differenza del ER, la traslocazione dei precursori delle proteine nei cloroplasti avviene dopo la traduzione e richiede proteine unfolded. I precursori delle proteine sintetizzate nel citoplasma sono mantenute in uno stato di importo competente con l'aiuto delle Hsp70 citosoliche (Miernyk 1997). È stato suggerito che i precursori delle proteine sono trasferiti dalle Hsp70 citosoliche alle Hsp70 cloroplastiche (Kourtz and Ko 1997). Anche la traslocazione del precursore della proteina mitocondriale avviene dopo la traduzione e i precursori delle proteine sono ancora mantenuto in uno stato di importo competente con l'aiuto delle Hsp70 citosoliche (Miernyk 1997).

Nei perossisomi, l'importo delle proteine avviene dopo la traduzione e non richiede che le proteine siano unfolded durante la traslocazione. È stato suggerito che le Hsp70 perossisomali potrebbero essere coinvolte nella traslocazione delle proteine del perossisoma, come un recettore o come un

motore di trasporto, in modo simile agli altri organelli subcellulari, così come i plastidi e i mitocondri (Crookes and Olsen 1998).



**Fig. 2:** Struttura di Hsp 70. Le proteine della classe Hsp 70 sono costituite da due domini: uno N-terminale con funzione ATPasica ed uno C-terminale binding-protein, a sua volta suddiviso in un subdominio  $\beta$ -sheet ed e un subdominio  $\alpha$ -elica, ai quali si lega un peptide di sette residui.



**Fig. 3:** Hsp 70, legame al substrato. Due o tre residui idrofobici del peptide legato (in nero) sono nascosti nelle tasche del subdominio  $\beta$ , mentre le estremità del substrato peptidico si estendono fuori da entrambi i lati del dominio binding-protein. Il dominio  $\alpha$  spinge in giù i loops del dominio  $\beta$ , fissando nel posto la proteina.

## Hsp90

Spesso è conosciuta con il nome di Hsp83 o Hsp89, a seconda della specie considerata.

La famiglia della Hsp90 si distingue rispetto agli altri chaperoni molecolari in quanto molti dei propri substrati noti risultano essere segnali di trasduzione proteici come per esempio i recettori per gli ormoni steroidei e segnali per le chinasi (Young, J.C. et al. 2001).

Il compito principale delle Hsp90 è di stabilizzare le proteine prima che sia completato il loro folding o che avvenga la loro attivazione, ma esse giocano anche un ruolo chiave nella fitta rete di trasduzione dei segnali, nel controllo del ciclo cellulare, nella degradazione delle proteine e nella circolazione proteica (Pratt, W.B. et al. 2001).

L'associazione dell'Hsp90 con numerose proteine cellulari sembra che induca o inibisca la normale funzione di queste proteine, inoltre esse formano dei complessi stabili con i fattori di trascrizione.

Le Hsp90 sono espresse nel pesce zebra, nello *Xenopus* e nell'embrione di pollo dove sembra avere un ruolo fondamentale nel normale sviluppo embrionale (Ali et al., 1996).

Inoltre, esse potrebbero avere, sia in *Drosophila* e sia in *Arabidopsis*, un'importante funzione durante l'evoluzione morfologica e durante l'adattamento agli stress (Rutherford, S.L. et al. 1998; Queitsch, C. et al. 2002).

Dati recenti (Imai, J. et al. 2003) mostrano non solo che le Hsp90 interagiscono con la subunità 26S del proteosoma, ma che esse abbiano un ruolo fondamentale nel suo assemblaggio e mantenimento. Le Hsp90

rappresentano una delle principali specie di chaperoni molecolari che necessitano di ATP per svolgere le proprie funzioni. Esse sono fra le proteine più abbondanti presenti nelle cellule, infatti rappresentano 1-2% delle proteine cellulari totali (Frydman, J. 2001). In particolare le Hsp90 risultano essere molto abbondanti nel citosol e nel reticolo endoplasmatico, e la loro naturale abbondanza può rendere difficile l'identificazione delle altre classi di heat shock proteins la cui sintesi può essere indotta esclusivamente dall'esposizione allo stress.

Per adempiere al proprio ruolo all'interno della cellula, le Hsp90 agiscono come parte di un macchinario multi-chaperonico in associazione con le Hsp70 e cooperano con una serie di co-chaperoni, che comprendono le Hip (proteine che interagiscono con le Hsp70), le Hop (proteine che organizzano il rapporto Hsp70/Hsp90), la p23 e le Hsp40 (un omologo della DnaJ), le immunofiline FKBP51/54 e FKBP52, e Cdc37/p50.

In numerose piante sono stati isolati i geni delle Hsp90 localizzati nel citosol, nel reticolo endoplasmatico e nei plastidi, ed è stato osservato che essi presentano il 63-71% di identità con le Hsp90 di lievito e di origine animale.

In *Arabidopsis*, alla famiglia delle Hsp90 appartengono sette diversi membri: le Hsp90 da 1 a 4 localizzate nel citosol, le Hsp90-5 presenti nei plastidi, le Hsp90-6 presenti nei mitocondri ed infine le Hsp90-7 presenti nel reticolo endoplasmatico (Krishna, P. and Gloor, G. 2001).

Anche se nella maggior parte degli organismi le Hsp90 sono costitutivamente espresse, la loro espressione, sia in procarioti e sia in eucarioti, aumenta in risposta agli stress.

L'espressione delle Hsp90 in *Arabidopsis* è regolata evolutivamente e risponde al calore, al freddo, allo stress salino, ai metalli pesanti, ai fitormoni, e alla transizione della luce e del buio (Milioni, D. and Hatzopoulos, P. 1997).

In *Drosophila*, i livelli funzionali di Hsp90 tendono a diminuire in seguito a mutazioni genetiche o in seguito a trattamenti con geldanamicina, un inibitore delle Hsp90, che provoca lo sviluppo di anomalie e di cambiamenti morfologici (Rutherford, S.L. et al. 1998).

Per la prima volta è stata associata la funzione delle Hsp90 all'evoluzione morfologica, un processo che spesso richiede gli effetti di cambiamenti genetici indipendenti. È stato suggerito che le Hsp90 possono agire come un "buffer" per sostenere le funzioni di queste proteine mutate che partecipano nei pathways dei segnali di sviluppo e morfogenesi. L'effetto "buffering" delle Hsp90 consente quindi l'esistenza di mutanti dello sviluppo e morfologici che controllano le proteine.

In condizioni fisiologiche normali, le variazioni dell'espressione genetica, nascoste grazie all'effetto "buffer" delle Hsp90, sono soppresse o silenziate. Quando invece l'organismo si trova improvvisamente in condizioni ambientali sfavorevoli in cui avrebbe bisogno di chaperoni fondamentali per la propria vitalità, e quando per esempio la sorveglianza delle Hsp90 è compromessa, l'esistenza di mutazioni o varianti, normalmente nascoste dal sistema Hsp90 buffer, è inevitabilmente manifestata (Wangxia Wang et al. 2004).

È stato proposto inoltre suggerito un potente meccanismo evolutivo attraverso il quale le Hsp90 giocano un importante ruolo assicurando una

stabilità genetica in normali condizioni fisiologiche permettendo l'accumularsi di mutazioni che potrebbero manifestarsi in condizioni di stress (Wangxia Wang et.al 2004).

La scoperta della funzione "buffer" della Hsp90 in relazione all'evoluzione morfologica è stata dimostrata in *Arabidopsis*. In seguito all'utilizzo della geldanamicina, che inibisce la normale funzione delle Hsp90, è stata riscontrata la presenza di numerosi fenotipi morfologici normalmente assenti in condizioni naturali perché nascosti dalle Hsp90 (Queitsch, C. et al. 2002).

Quindi le Hsp90 contribuiscono attivamente all'adattamento evolutivo delle piante controllandone la crescita e lo sviluppo oltre che fungendo da chaperoni molecolari per le proteine di segnale (Rutherford, S.L. et al. 1998).

### **Hsp60 o chaperonine**

Le proteine appartenenti a tale classe presentano un'attività ATPasica, e inoltre sono in grado di promuovere un efficiente folding e di facilitare la traslocazione cellulare e l'assemblaggio delle proteine oligomeriche all'interno degli organelli. Le Hsp60 sono costituite da 14 subunità suddivise in due cerchi da sette subunità ciascuno. La cavità centrale rappresenta la regione idrofobica della proteina, ed è qui che si lega la proteina unfolding. Il legame dell'ATP induce la rotazione delle singole subunità delle Hsp60, cosicché la parte idrofobica si trovi a contatto con la subunità adiacente. Tale cambiamento conformazionale è

coordinato dal legame dell'Hsp10 che chiude così la cavità con all'interno il substrato, in modo da creare una camera ed evitare quindi alla proteina racchiusa di aggregarsi con altre proteine unfolding. Anche la sintesi delle Hsp60 tende ad aumentare durante condizioni ambientali avverse in cui si ha un incremento della denaturazione delle proteine. Le Hsp60 sono altamente conservate e la loro sintesi è indotta da situazioni di stress.

Le chaperonine o Hsp60, il cui termine è stato usato per la prima volta per descrivere una classe di chaperoni molecolari evolutivamente omologhi al complesso GroEL presente in *E. coli*, sono una classe di chaperoni molecolari ritrovati nei procarioti, e nei mitocondri e plastidi degli eucarioti (Boston, R.S. et al. 1996; Hartl, F.U. 1996). I principali rappresentanti di tale classe di Hsp/chaperoni comprendono sia il complesso GroEL presente nei procarioti e sia l'equivalente Hsp60 presente nei eucarioti, pertanto essi sono classificati in due subfamiglie indicate con il nome di Gruppo I a cui appartengono le chaperonine GroE e chCpn60 ritrovate nei batteri nei mitocondri e nei cloroplasti, e con il nome di Gruppo II a cui appartengono le chaperonine CCT ossia le chaperonine che contengono il polipeptide del complesso T, ritrovati in Archea e nel citosol degli eucarioti (Ranson, N.A. et al. 1998).

Le chaperonine offrono assistenza ad una grande varietà di proteine neo sintetizzate e neo traslocate, garantendo loro una corretta forma nativa.

Soprattutto per quanto riguarda le chaperonine del gruppo I, la struttura e la funzione è stata ampiamente studiata (Bukau, B. and Horwich, A.L. 1998; Gutsche, I. et al. 1999).

Nei procarioti ed in particolare in *E. coli* infatti, alle chaperonine del gruppo I appartengono due diversi membri ossia le chaperonine 60 (Cpn60) e le chaperonine 10 (Cpn10) che associate in modo dipendente all'ATP, hanno la funzione di co-chaperoni.

Data l'alta conservazione della sequenza primaria tra gli chaperoni del gruppo I, si assume che la funzione degli chaperoni degli organelli sia simile a quella presente nei batteri. Tuttavia, studi recenti hanno indicato che gli chaperoni plastidiali posseggono proprietà strutturali e funzionali uniche che li distinguono dai loro omologhi presenti nei batteri (Levy-Rimler, G. et al. 2002).

Gli chaperoni presenti nei cloroplasti delle piante sono costituiti da due differenti polipeptidi denominati Cpn60 $\alpha$  e Cpn60 $\beta$ , che tra loro hanno solo il 50% di amminoacidi identici (Boston, R.S. et al. 1996).

Un'altra differenza che caratterizza gli chaperoni dei cloroplasti riguarda la struttura dei loro co-chaperoni, essi infatti, sono costituiti da due domini simili al GroES la cui massa molecolare è approssimativamente il doppio di quella batterica Cpn10 (20kDa) (Bertsch, U. et al. 1992). In aggiunta al doppio dominio degli chaperoni, il genoma di *Arabidopsis* ne possiede almeno con la stessa grandezza di Cpn10 (Hill, J.E. and Hemmingsen, S.M. 2001).

Gli chaperoni del gruppo II rispetto a quelli del gruppo I formano anelli di otto/nove membri, e ciascun membro è codificato da due differenti geni, e loro sono indipendenti da un comune co-chaperone. È stato indicato che gli chaperoni CCT assistono in modo specifico il folding della tubulina e dell'actina (Gutsche, I. et al. 1999).

In *Arabidopsis* sono state identificate sette sequenze genomiche che potenzialmente possono codificare le proteine Cpn60 $\beta$  dei plastidi. Due di queste sembra che codifichino le subunità di Cpn60 $\alpha$ , e quattro codificano le subunità di Cpn60 $\beta$ . La settima sequenza genomica invece sembra essere un pseudo gene della subunità di Cpn60 $\beta$ . Si ipotizza che nove sequenze in *Arabidopsis* codifichino proteine simili alle subunità  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ , e  $\theta$  delle proteine di CCT, con due di esse che corrispondono a CCT- $\zeta$  (Hill, J.E. and Hemmingsen, S.M. 2001).

### **Hsp100/Clp**

I membri appartenenti alla famiglia degli chaperoni delle Hsp100/Clp in realtà appartengono alla grande superfamiglia dell'AAA ATPasi che possiede un ampio spettro di differenti proprietà funzionali (Schirmer, E.C. et al. 1996; Agarwal, M. et al. 2001). Le proteine appartenenti alla famiglia delle Hsp100/Clp hanno la funzione di disaggregare e/o degradare le proteine.

La rimozione di polipeptidi non funzionali ma potenzialmente dannosi che derivano dal misfolding, dalla denaturazione o dall'aggregazione è importante per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

I membri della famiglia delle Hsp100, furono inizialmente descritti come i componenti delle due subunità del sistema di proteasi di Clp batterico (Gottesman, S. et al. 1990), che consiste sia di chaperoni con subunità ATPasiche regolatorie, come ClpA e ClpX, e sia di chaperoni con subunità proteolitiche come ClpP.

La famiglia è quindi divisa in due principali classi a cui appartengono otto distinte subfamiglie.

I membri della prima classe indicati con le lettere da A a D contengono due domini per il legame dei nucleotidi, essi sono anche denominati ATP-binding domains, mentre i membri della seconda classe indicati con le lettere M, N, X, e Y, hanno solo un dominio per il legame del nucleotide (Schirmer, E.C. et al. 1996).

Le proteine Hsp100/Clp solitamente sono costituite da anelli esamerici.

Il meccanismo per liberare le proteine dall'aggregazione richiede anche la cooperazione di altri sistemi di chaperoni ATP dipendenti, le Hsp70.

La famiglia delle Hsp100/Clp solubilizza la proteina aggregata e la rilascia in uno stato tale da consentirle, grazie all'assistenza del sistema delle Hsp70, di avere un folding corretto (Glover, J.R. and Lindquist, S. 1998; Goloubinoff, P. et al. 1999).

Quando la proteina Hsp100 è associata alla proteina ClpP, si forma un chaperone con una duplice attività regolatoria, che influenza l'eventuale destino dei substrati proteici selezionati, che possono quindi essere completamente degradati (Beuron, M.R. et al. 1998) oppure non subire il folding ed essere rilasciati (Weber-Ban, E.U. et al. 1999).

Le proteine Hsp100/Clp sono state ritrovate in molte specie di piante come per esempio in *Arabidopsis*, in soia, in tabacco, in riso, in mais (*Zea mays*), in fagiolo di Lima (*Phaseolus lunatus*), e in grano.

Come molti altri chaperoni Hsp, anche gli chaperoni della famiglia delle Hsp100/Clp sono spesso costitutivamente espresse in piante, ma la loro

espressione è evolutivamente regolata ed è indotta da diverse condizioni ambientali avverse, come il caldo, il freddo, la siccità, le alte concentrazioni di sale e l'eziolamento indotto dal buio (Agarwal, M. et al. 2001).

In particolare ci sono evidenze genetiche che indicano che tale famiglia di proteine ha un ruolo importante durante la termoprotezione (Schirmer, E.C. et al. 1994).

In un recente studio, la produzione in riso delle proteine Hsp100, è stata correlata con la scomparsa di granuli proteici nelle cellule del lievito. Infatti è stato osservato che la dissoluzione dei granuli è dovuta alle Hsp100 che aumentano durante la fase di post stress, implicando quindi un ruolo delle Hsp100 nel recupero della cellula stressata (Agarwal, M. et al. 2003).

### **sHsp**

A tale famiglia appartengono le proteine con una massa molecolare compresa tra i 15 e i 42 kDa. Tra le stress proteins risultano essere le meno conservate, mostrando così delle significative variazioni anche all'interno di organismi che appartengono alla stessa classe. Nelle piante, in relazione alla loro localizzazione intracellulare e della loro sequenza, sono state identificate sei diverse classi. È stato osservato che, sia in cellule procarioti che e sia in cellule eucariotiche, in condizioni fisiologiche di crescita, esse non vengono sintetizzate, la loro induzione avviene in seguito all'esposizione al calore, in presenza di qualsiasi condizione di stress e in particolari stadi di sviluppo (Sun et al., 2002). L'induzione dell'espressione genica e l'accumulo di queste proteine esclusivamente in condizioni di stress,

fanno ipotizzare che esse abbiano un ruolo fondamentale nella tolleranza agli stress (Sun et al., 2002).

Le sHsp, inoltre, formano delle strutture oligomeriche mediante il dominio carbossi-terminale (ACD), e la regione ammino-terminale. Alcuni membri di tale famiglia, hanno la funzione di chaperoni molecolari, essi infatti non solo legano e stabilizzano proteine con conformazioni instabili, ma, controllandone il legame ed il rilascio, ne determinano il corretto folding, l'assemblaggio oligomerico, ed il trasporto in un particolare compartimento cellulare nonché la degradazione.

### **Validità delle Hsp come bioindicatori**

Le analisi chimiche di complessi campioni ambientali sono costosi e richiedono molto tempo, inoltre hanno l'inconveniente di non poter predire la definitiva validità (o disponibilità) biologica di un composto chimico. Per tale motivo i test di tossicità sono stati a lungo usati per integrare analisi chimiche. Considerato che la mortalità è una misura troppo grossolana per essere utilizzata come indice di tossicità, sono stati adottati dei sistemi di test in vitro, il cui principale vantaggio è quello di consentire l'osservazione di significative alterazioni morfologiche o fisiologiche a livello cellulare o di tessuti.

Un differente approccio consiste nel porre l'attenzione sull'interazione dei composti chimici con le differenti macromolecole che si trovano all'interno delle cellule. Quando la molecola target fa parte del macchinario di difesa, di riparo o di detossificazione della cellula essa

diventa marker specifico e diretto dell'esposizione e degli effetti (Stegeman et al., 1992). Le stress proteins soddisfano la maggior parte, se non tutte, le caratteristiche necessarie per entrare a far parte del gruppo dei biomarcatori. Esse, infatti, rivestono un ruolo fondamentale nella difesa cellulare sotto avverse condizioni ambientali, contrastano infatti gli effetti proteotossici prevenendo la denaturazione delle proteine e, trattenendole nello stato di folding ne facilitano il riparo (Bierkens et al., 1998). Sono stati effettuati numerosi studi sulle Hsp (in particolare hsp60 e hsp70) da utilizzare come biomarcatori ed è stato dimostrato che la loro induzione può essere causata da molti inquinanti a livelli riscontrabili nella realtà ambientale (Sanders, 1990). Per tale motivo le Hsp possono migliorare il biomonitoraggio, aumentando la sensibilità dei test biologici e complementando i test di tossicità esistenti.

Numerosi studi sono stati effettuati per meglio comprendere la relazione esistente tra l'induzione delle stress proteins e le avverse condizioni ambientali. Un esempio è dato da *Raphidocelis subcapitata*, alga verde, nella quale è stata determinata la presenza di Hsp70, in risposta ad una varietà di inquinanti:  $ZnCl_2$ ,  $SeO_2$  (metalli pesanti), lindane (pesticida organico contenente cloro), pentaclorofenolo (PCP, idrocarburo clorurato insetticida e fungicida), carbaryl (pesticida carbammato) e sodio-dodecilsolfato (SDS).

In tale studio i risultati hanno dimostrato che Hsp70, in risposta alla maggior parte degli agenti chimici testati (eccetto PCP), è prodotta in modo dose-dipendente e a concentrazioni di uno o due ordini di grandezza inferiori a quelle dei test citotossici che inibiscono la crescita o

determinano la letalità. Inoltre i metalli pesanti sono risultati i più forti induttori di Hsp70 (Bierkens et al., 1998). La sensibilità della risposta da stress è stata evidenziata anche in studi sull'embrione di riccio di mare trattato con rame dove, come in *Raphidocelis subcapitata*, si è mostrata molto più sensibile di un saggio che misurava il grado di sviluppo (Bierkens et al., 1998).

L'induzione da cadmio di una proteina di 70KDa, precipitata con anticorpi Hsp70, è stata riscontrata anche nelle radici di *Zea mays* L. (Prasad, 1995). L'importanza di tali proteine è riscontrabile anche nel grado di conservazione filogenetica tra isoforme di differenti organismi, dai batteri, alle piante, all'uomo (Bierkens et al., 1998).

## **MORTE PROGRAMMATA CELLULARE (PCD)**

La morte cellulare programmata (Programmed cell death, PCD), è un processo geneticamente controllato coinvolto nella rimozione di cellule ridondanti, collocate erroneamente, o danneggiate, ed è associato ad un cambiamento morfologico e biochimico durante lo sviluppo di organismi cellulari (Hoeberichts and Woltering, 2002; Gunawardena et al., 2004; Swidzinski et al., 2004). È un processo attivato in specifiche cellule sia in risposta a stress ambientali e sia in seguito a stimoli sviluppo dipendenti. La PCD è parte integrante del ciclo vitale degli organismi multicellulari, inclusi animali e piante (Green, 1998), infatti essa è attiva durante i processi di sviluppo, come l'embriogenesi, lo sviluppo di tessuti vascolari, la senescenza, e la determinazione del sesso in piante unisessuali. La morte cellulare programmata può partecipare nelle risposte ai patogeni, come nel caso della risposta ipersensibile (HR: hypersensitive response) (Lam et al., 2001). La risposta ipersensibile è caratterizzata dalla morte delle cellule nel punto di attacco di un patogeno e provoca la formazione di un'area di cellule morte circondate da tessuto sano. La morte cellulare associata alla risposta ipersensibile è molto rapida e ha lo scopo di limitare la diffusione del patogeno nelle cellule adiacenti.

Il processo di morte programmata cellulare avviene in due fasi: nella prima si decide sulla vita o sulla morte della cellula, segue poi una fase esecutiva caratterizzata da cambiamenti morfologici nella cellula e nella struttura nucleare (Green & Kroemer 1998, O'Brien et al. 1998).

Durante la PCD si assiste alla condensazione della cromatina nucleare, ed alla successiva frammentazione del DNA in frammenti di dsDNA di 180

bp, la presenza di una parete cellulare rigida nelle cellule vegetali impedisce la formazione di corpi apoptotici. La degradazione cellulare può quindi avvenire per autolisi, per rottura del vacuolo, come durante la differenziazione di elementi tracheali (Fukuda, 1996).

Sono stati identificati diversi geni coinvolti nella PCD vegetale. Tra i prodotti di questi geni troviamo le aspartato endopeptidasi, le metalloendopeptidasi, le serin-proteasi, le cistein-proteasi ed papaina-simili (Beers et al., 2000). Sono state identificate due classi di endonucleasi (Sugiyama et al., 2000) coinvolte nelle vie della PCD: quelle  $Zn^{2+}$  dipendenti, identificate durante la senescenza fogliare in frumento (Blank e McKeon, 1989) e quelle  $Ca^{2+}$  dipendenti, coinvolte nella risposta ipersensibile in tabacco e nella senescenza in orzo (Mittler e Lam, 1997; Wood et al., 1998).

In genere la risposta delle piante ad uno stress, come quello salino, varia a seconda dell'intensità di quest'ultimo, infatti, un moderato stress determina prevalentemente PCD, mentre l'incremento dello stesso stress, produce per lo più " necrosi ", ovvero una morte caotica ed incontrollata in cui il DNA viene frammentato a random.

Da studi condotti su *Arabidopsis* (Reape et al.2008) si assume che questi due processi coesistano, e che lo switch tra i due, in diverse condizioni, potrebbe essere regolato dai mitocondri. Infatti sulla membrana mitocondriale sono presenti i pori mitocondriali, la cui apertura può determinare il rilascio del citocromo c verso il citosol, come riportato sia in una sospensione di cellule di *Zea mais* trattate con D-mannosio (Stein and Hansen, 1999), e sia in colture di cellule di *Arabidopsis* dopo stress salino (Tiwari et al., 2002).

Il citocromo *c* è deputato a guidare l'assemblaggio dell'apoptosoma, ossia, un complesso localizzato nel citoplasma, il cui ruolo è quello di attivare sia le caspasi, sia altre proteine apoptogeniche che indurrebbero l'uno o l'altro processo.

Le caspasi, definite come i cruciali effettori biochimici di PCD sono una famiglia di proteasi a cisteina, capaci di tagliare motivi contenenti acido aspartico. Questi enzimi sono attivati durante la PCD e sono responsabili dei cambiamenti morfologici osservati e della morte cellulare.

In particolare, la PCD avverrebbe quando un gran numero di mitocondri, probabilmente attivati dal rilascio di fattori apoptogenici, rilasciano citocromo *c* in elevate quantità.

Recenti esperimenti, basati sull'utilizzo degli inibitori delle caspasi (del Pozo e Lam, 1998; De Jong et al., 2000), avvalorano l'ipotesi che le cistein-proteasi presenti nelle piante siano delle "caspasi-like" (CLPs), definite anche metacaspasi (Lam, 2004), in grado di regolare alcune forme di PCD. Questi risultati indicano che strategie simili e molecole funzionalmente analoghe sono state conservate tra animali e piante, al fine di controllare il processo di morte.

Recentemente nelle cellule vegetali, così come nelle cellule animali, è stato riconosciuto il ruolo del reticolo endoplasmatico (ER) nell'attivazione della PCD (Crosti et al., 2001), inoltre, tra gli organelli coinvolti nella PCD un ruolo sempre più importante lo si sta attribuendo al cloroplasto (Zapata et al., 2005; Yao e Greenberg, 2006). Piante di tabacco trasformate con geni che codificano per membri anti-apoptotici della famiglia delle Bcl-2 animale,

sono in grado inibire la PCD quando trattate con erbicidi, diretti contro il cloroplasto (Chen e Dickman, 2004).

Studi effettuati su orzo hanno mostrato che lo stress salino causa degradazione del DNA nucleare già dopo 8 ore ("laddering", ovvero "scalinata" del DNA) e porta alla morte cellulare (Katsuhara et al., 1997). Lo stress salino, infatti come altre forme di stress, causa anche genotossicità, cioè danni al DNA suggerendo che i segnali di pathways dello stress salino e della genotossicità presentano alcune componenti in comune. L'iperosmolarità dovuta ad un'eccessiva presenza di sale provoca la comparsa di frammenti di DNA a doppio filamento (dsDNA). L'indagine elettroforetica del DNA estratto dalle cellule della cuffia radicale in piante d'orzo sottoposte a stress salino, mostra la tipica "scalinata" del DNA, dovuta alle nucleasi indotte dallo stress che producono una digestione random nelle regioni linker tra i "cores" nucleosomali, provocando la comparsa di frammenti oligonucleosomali di circa 200 bp, tipici della morte cellulare programmata (PCD).

## CAPITOLO 2:

### MATERIALI E METODI

#### Campioni biologici utilizzati:

- *Hordeum vulgare*: coltivazione delle piante

I semi d'orzo (*Hordeum vulgare* L., var. Nure e Tidone) sono stati forniti dall'Istituto Sperimentale di Cerealicoltura di Fiorenzuola d'Arda (PC).

I semi sono stati pretrattati con un antifungino e sono stati conservati alla temperatura di 4°C.

Al momento della semina, i semi sono stati immersi in una soluzione di  $\text{CaSO}_4$  2mM per 20 minuti per scarificare il tegumento, in seguito sono stati lavati in acqua deionizzata e infine sono stati lasciati ad imbibire in acqua per 60 minuti.

A questo punto i semi sono stati distribuiti, in cassette di plastica preparate opportunamente con carta da filtro imbevuta d'acqua deionizzata. La germinazione dei semi è avvenuta al buio, in una camera termostata alla temperatura di 21°C. Dopo 5 giorni dalla semina, le plantule sono state

trasferite in coltura idroponica su un terreno a pH 6.5 modificato di tipo Long Ashton, avente la seguente composizione:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1M
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0.125M
$\text{CaCl}_2$	0.1M
$\text{MgCl}_2$	0.1M
$\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$	3.5g/l
Oligoelementi	

La soluzione di oligoelementi, da aggiungere al terreno preparato come sopra indicato, aveva la seguente composizione:

Kcl	2.5mM
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.25mM
$\text{CuSO}_4$	0.025mM
$\text{MnSO}_4$	0.25mM
$\text{ZnSO}_4$	0.1mM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.007mM

I recipienti di coltura erano rappresentati da bottigliette di plastica scura aventi un volume di 500ml. Gruppi di 10-12 plantule, sorrette da sottili strisce di gommapiuma, sono state posizionate con le radici immerse nel terreno liquido continuamente aerato.

Infine le piante sono state illuminate con un flusso di fotoni di  $300\text{nmol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  e sottoposte ad un fotoperiodo di 16 h di luce/8 h di buio, in una camera termoregolata a  $20^{\circ}\text{C}$  con il 50% di umidità relativa.

- *Leptodictyum riparium* (Hedw.) e *Conocephalum conicum* L.:

#### **allestimento e colture in vitro**

I campioni di *Leptodictyum riparium* (Hedw.) e di *Conocephalum conicum* L., raccolti all'interno dell'Orto Botanico di Napoli nella Sezione di Biologia Vegetale del Dipartimento delle Scienze Biologiche, sono stati, lavati più volte con acqua distillata al fine di eliminare eventuali impurità. I gametofiti sono stati poi trattati con alcool 70% per due secondi e in soluzione di NaClO al 2% con aggiunta di alcune gocce di Triton-X 100 (Sigma) per eliminare eventuali contaminanti. Sono stati quindi allestiti beker per il muschio e capsule Petri per l'epatica. Il terreno di coltura utilizzato è stato il Mohr a pH 7.5 la cui composizione, per litro di soluzione, era:

$\text{KNO}_3$	100mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10mg
$\text{MgSO}_4$	10mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136mg
$\text{FeSO}_4$	0.4mg
B.B.M.	1ml

A tali macronutrienti è stato addizionato 1 ml di soluzione di oligoelementi o micronutrienti, la cui composizione, per litro di soluzione 1000x, era:

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7.0g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.04g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0736g
$\text{CuSO}_4$	0.0394g
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.238g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.572g
$\text{NaVO}_4 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	0.0463g
Acido 5-sulfosalicilico	0.05%

Il terreno così preparato è stato sterilizzato in autoclave alla temperatura di 120°C per 30 minuti.

Una volta posto i campioni di *Leptodictyum riparium* (Hedw.) nei rispettivi beker e i campioni di *Conocephalum conicum* L. nelle rispettive capsule opportunamente sigillati, i campioni sono stati posti in una cella climatica ad una temperatura di 13°C ± 1°C (temperatura notturna) e 20°C ± 1°C (temperatura diurna), con un fotoperiodo di 16 ore luce (da 200 a 5000 lux) e 8 ore di buio, e con un umidità relativa costante del 70%.

#### - *Leptodon smithii* e *Quercus ilex*: raccolta campioni

I campioni di muschio e di leccio da analizzare sono stati raccolti in diverse aree esposte all'impatto diretto delle precipitazioni, e il campionamento è avvenuto in primavera inoltrata.

Tutti i campioni sono stati raccolti da punti situati a circa 300 metri da strade o abitazioni in cui precedentemente è stato monitorato il regime di piogge e l'altitudine. Per ogni sito sono stati prelevati da 5 a 10 sottocampioni della specie indagata entro un'area di campionamento di 50 x 50m.

I siti in esame, concentrati in Toscana e in Campania (Fig. 1), sono stati scelti in modo tale da rappresentare una più probabile distribuzione dell'inquinamento in Italia.

Per ognuna di queste regioni sono stati prelevati organismi vegetali sia in punti definiti di "controllo", ovvero zone in cui il tasso di inquinamento risulta essere molto basso, e sia in zone esposte costantemente all'inquinamento.

I siti di campionamento in Campania sono stati:

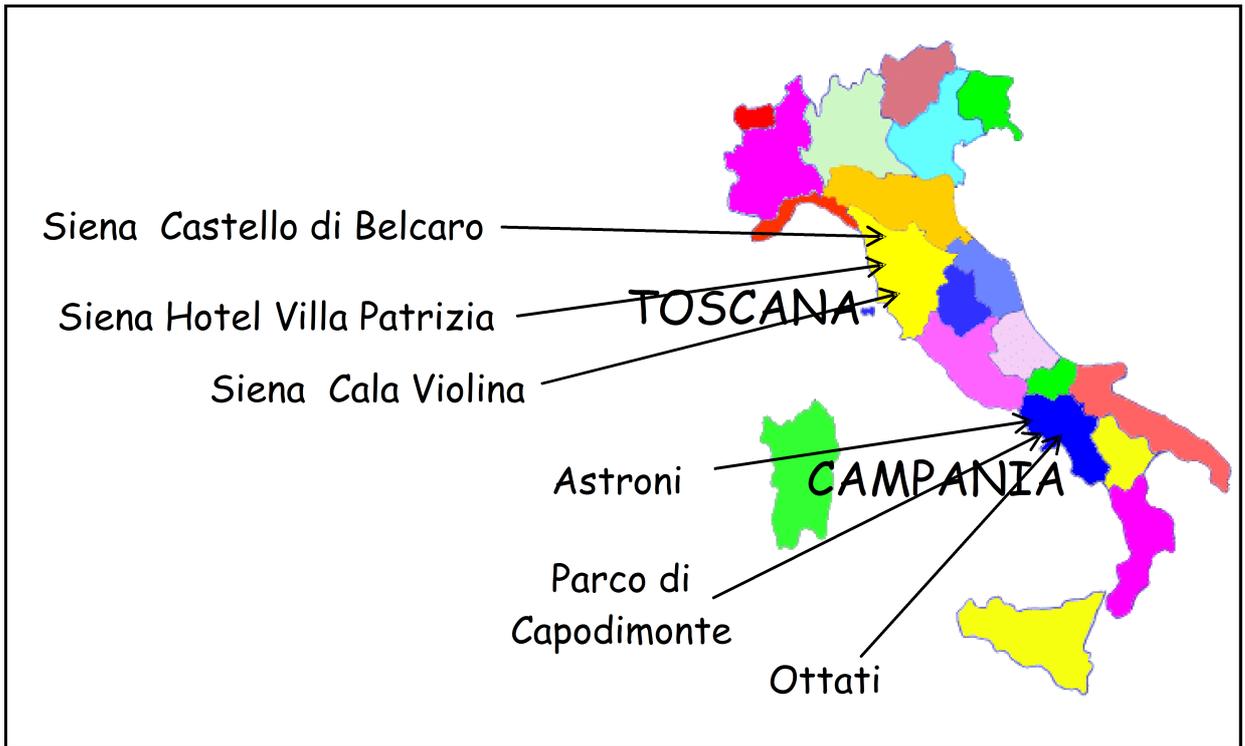
1. La lecceta di Ottati (Ott), come sito di controllo, localizzata nel parco Nazionale del Cilento, in provincia di Salerno, a circa 529 metri sul livello del mare, appartenente alla comunità montana degli alburni (monte alburno).
2. Il bosco di lecci del Parco di Capodimonte (CDM), nell'area urbana di Napoli. Per la tipologia del parco i campioni prelevati erano rappresentativi di una vegetazione costantemente sottoposta ad alti livelli di inquinamento.
3. Il Parco degli Astroni, un'area protetta molto vicina alla periferia occidentali di Napoli, e vicina al centro urbano, fortemente antropizzato, di Pozzuoli.

I siti di campionamento in Toscana sono stati :

1. Siena urbano (SU), una lussureggiante vegetazione immersa all'interno dell' Hotel Villa Patrizia, nei pressi di un centro urbano fortemente esposta ad inquinamento.
2. Siena remoto (SR), in particolare un fitto bosco nei pressi del Castello di Belcaro, che rappresenta una zona lontana dagli insediamenti antropici.
3. Siena Cala Violina (SCV), un'insenatura del golfo di Follonica, nel cuore della riserva naturale delle Bandite di Scarlino in provincia di Grosseto. Tale zona è ben lontana dal traffico cittadino per cui con un livello di inquinamento molto basso.

Il campionamento è stato eseguito su muschi e lecci nello stesso stato fenologico indossando guanti monouso di polietilene preventivamente lavati e

senza utilizzare strumenti metallici per evitare contaminazioni del materiale vegetale. Dopo la raccolta il materiale è stato accuratamente ripulito e conservato ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Fig. 1:** Siti del campionamento di *Leptodon smithii* e *Quercus ilex*.

## HEAT SHOCK PROTEIN (Hsp70)

### Preparazione dei campioni:

#### - *Hordeum vulgare*

Dopo 5-7 giorni di idrocoltura ogni bottiglia, contenente le piante di orzo, è stata trattata in modo differente. Ad un gruppo di piante, infatti, sono stati aggiunti 5 mM di ammonio fosfato bibasico  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  al terreno di coltura, ed i prelievi delle piante venivano eseguiti a distanza di sette giorni dall'aggiunta. Ad un altro gruppo di piante invece, come fonte di azoto, sono stati 5mM di nitrato di potassio ( $\text{KNO}_3$ ) al terreno di coltura e anche in questo caso i prelievi sono stati effettuati dopo sette giorni dall'aggiunta. Un altro gruppo di piante, infine, è stato lasciato in condizione di N-deprivazione.

#### - *Leptodictyum riparium* e *Conocephalum conicum*

Nei beker e nelle capsule petri contenenti il terreno di coltura dei campioni di *Leptodictyum* e di *Conocephalum* da trattare sono stati aggiunti sali di  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{CdCl}_2$  alle concentrazioni di  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}\text{M}$ , e  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  alla concentrazione di  $10^{-6}\text{M}$ , mentre i controlli sono stati lasciati in terreno di coltura sterile.

I prelievi sono stati effettuati fino a 15 giorni dopo l'aggiunta dei diversi metalli.

Le prove sono state condotte in triplice copia e per tre volte, inoltre tutti i passaggi sono stati effettuati sotto cappa sterile a flusso laminare, in modo da preservare le condizioni di sterilità delle colture stesse.

- *Leptodon smithii* e *Quercus ilex*

Dovendo studiare l'inquinamento, i campioni di *Leptodon smithii* e di *Quercus ilex*, dopo essere stati raccolti nei rispettivi siti, e, dopo esser stati ripuliti e conservati ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ , non hanno subito ulteriori trattamenti.

### **Preparazione degli estratti**

Il protocollo per l'estrazione delle Heat shock proteins utilizzato, era comune per tutti gli organismi esaminati.

I campioni sono stati prima polverizzati in azoto liquido, e poi diluiti con un tampone d'estrazione specifico per le Hsp70 (rapporto peso/volume 1:2) a  $4^{\circ}\text{C}$ , contenente: 32mM Tris-HCL a pH 7.8, 10% glicerolo, 0.05% Triton X-100, 5mM ditiotreitolo (DTT), e protease inhibitor cocktail (Sigma P9599).

L'omogenato così ottenuto è stato inizialmente centrifugato a  $4^{\circ}\text{C}$  per 20 minuti a 13000rpm (centrifuga Sorvall RC5C plus con rotore Sorvall SS34). Successivamente, il supernatante recuperato è stato nuovamente centrifugato a  $4^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti a 13000 rpm. Una volta allontanato il precipitato, il supernatante, definito estratto grezzo, è stato posto in eppendorf e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  pronto per essere analizzato.

## **Determinazione delle proteine**

La concentrazione delle proteine (espressa come  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) presenti nell'estratto grezzo è stata determinata mediante spettrofotometria, usando il saggio basato sulla colorazione con blu Coomassie R-250 (Bradford 1976). Il blu Coomassie legandosi alle proteine in soluzione acida provoca una variazione dell'assorbanza da 465nm a 595nm. I dati di assorbanza possono quindi essere utilizzati nella legge di Beer per determinare la concentrazione delle proteine di interesse.

La concentrazione delle proteine solubili presenti negli estratti è stata determinata utilizzando un coefficiente di estinzione calcolato su una retta di taratura attenuata con albumina di siero bovina (BSA).

## **Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)**

Prima di sottoporre gli estratti ottenuti ad una elettroforesi denaturante SDS-PAGE, è stato necessario denaturarli. A tale scopo i campioni sono stati aggiunti ad una soluzione denaturante appositamente preparata, riscaldati in acqua a  $100^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti e successivamente raffreddati in ghiaccio.

La soluzione denaturante per i campioni, in proporzione 1:1 aveva la seguente composizione:

Tris- HCl pH 6.8	0.125M
SDS*	4%
Glicerolo	20%
DTT**	0.2M
Blu di Bromofenolo	0.02%

(\*): Sodiodecilsolfato

(\*\*): Ditiotreitolo

Per l'analisi è stato utilizzato un gel di poliacrilammide 10 x 10.5cm con un "running gel" al 12%, e con uno "stacking gel" al 4%.

La soluzione del running gel al 12% aveva la seguente composizione:

1.5M Tris-HCl pH 8.8	5ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	8.7ml
30% Acryl/Bis	6ml
10% SDS	200 $\mu$ l
10% APS*	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

(\*): Ammonio persolfato

La soluzione dello stacking gel al 4% aveva la seguente composizione:

0.5M Tris-HCl pH 6.8	1.89ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	4.77ml
40%Acryl/Bis	750 $\mu$ l
10%SDS	75 $\mu$ l
10%APS	37.5 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l

I campioni denaturati sono stati caricati negli appositi pozzetti e sottoposti a un campo elettrico costante di 40mA e 180V per circa 120 minuti, in una vasca per elettroforesi (Hoefer miniVE system) contenente un opportuno tampone di corsa.

La corrente veniva erogata da un alimentatore (Pharmacia E301 power supply).

Il tampone di corsa aveva la seguente composizione:

Tris-HCl pH 8.3	25mM
Glicina	0.192mM
SDS	0.1%

## Western blotting

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine presenti all'interno dei gel sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa Amersham Hybond-ECL, mediante l'utilizzo di un opportuno sistema di trasferimento (Hoefer miniVE blot module), e applicando inizialmente una voltaggio di 25V ed una corrente di 300mA per circa 2.5 ore per poi terminare con un voltaggio a 50V e una corrente di 300mA per 30 min. Per il trasferimento è stato preparato un tampone simile a quello utilizzato per la corsa elettroforetica con l'aggiunta del 20% di metanolo per migliorare il trasferimento delle proteine.

Per verificare l'avvenuto trasferimento, il filtro è stato incubato nel colorante rosso Ponceau, eliminato facilmente mediante semplici lavaggi in una soluzione salina di TBS (tris buffer saline) a pH 7.5.

I peptidi di interesse sono stati rivelati secondo due diversi metodi. Il primo prevedeva l'incubazione del filtro in anticorpo secondario (anti-mouse IgG, sviluppato in capra, coniugato con fosfatasi alcalina, Sigma A3562) e i peptidi visualizzati mediante i sali di tetrazolio (soluzione 0.48mM nitro blu di tetrazolio, 0.56mM 5-bromo-4cloro-3-indolo fosfato in 10mM Tris-HCl, pH 9.2 e 60mM MgCl<sub>2</sub>, Sigma B6404).

Il secondo metodo prevedeva l'incubazione del filtro in anticorpo secondario (anti-mouse IgG, sviluppato in capra, coniugato con la perossidasi di rafano, Sigma A3562) e i peptidi visualizzati mediante ECL (Enhanced Chemio Luminescence) attraverso l'utilizzo del ChemiDoc XRS (Biorad).

### ***Analisi del DNA genomico in *Hordeum vulgare****

Dopo 5 giorni di idrocoltura in un terreno privo di fonti azotate, le piantine d'orzo sono state preparate per le successive analisi sul genoma di radici e foglie. A tale proposito, al terreno di coltura sono stati aggiunti 5mM di ammonio fosfato  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  come unica fonte azotata e, dopo 6 giorni dall'aggiunta di azoto, al terreno di coltura di alcuni gruppi di piante, sono state aggiunte concentrazioni crescenti (150mM, 300mM e 500mM) di cloruro di sodio (NaCl). Per ogni condizione sono stati eseguiti dei prelievi a tempi differenti (3,6,9, e 12 ore).

### ***Estrazione del DNA da radici e foglie di orzo mediante CTAB***

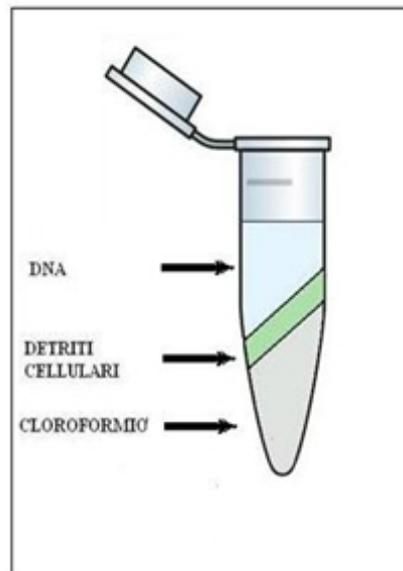
Il DNA genomico da foglie e radici d'orzo è stato estratto mediante il CTAB (esadecil-trimetil-ammonio bromuro).

Le radici sono state separate dalle foglie, asciugate accuratamente e pesate con una bilancia analitica (0.2gr di peso fresco). In seguito anche le foglie, dopo essere state separate dal fusticino, sono state pesate con una bilancia analitica (0.1gr di peso fresco).

Separatamente le radici e le foglie sono state polverizzate con azoto liquido, diluite con una soluzione contenente CTAB al 2% (1ml/0.1gr), e le provette contenenti i campioni sono state poste in un bagnetto a 60°C per circa 30 minuti. La soluzione di CTAB al 2% è stata preparata sciogliendo la polvere ad elevate temperature (circa 65°C per 10 minuti) in presenza di 100mM Tris-HCl a pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol.

Dopo 30 minuti a 60°C, ad ogni campione sono stati aggiunti 2ml di cloroformio e alcool isoamilico (24:1) e i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 13000rpm a 4°C in una centrifuga eppendorf 5415c.

In seguito alla centrifugazione in ogni eppendorf, contenenti i campioni, è stato possibile distinguere tre diverse fasi: una inferiore rappresentante la fase apolare del cloroformio contenente le proteine precipitate, una centrale contenente i detriti cellulari, ed infine una fase superiore, definita fase acquosa, rappresentante la fase polare contenente gli acidi nucleici (Fig. 2).



**Fig. 2:** Rappresentazione schematica delle fasi presenti nelle eppendorf in seguito a centrifugazione con cloroformio:alcool isoamilico (24:1).

Successivamente alla fase acquosa, recuperata in seguito ad un secondo passaggio in cloroformio-alcool isoamilico, è stato aggiunto l'isopropanolo (2/3 del volume), e i campioni sono stati incubati overnight a -20°C in modo da favorire la precipitazione degli acidi nucleici.

Dopo la precipitazione i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti alla massima velocità e i pellet sono stati lavati prima con etanolo freddo al 70%, e poi con etanolo freddo al 100% per concentrare ulteriormente gli acidi nucleici estratti.

Infine, per eliminare completamente ogni residuo di alcool, i pellet sono asciugati in una centrifuga a vuoto (centrifuga Univapo 100H con pompa aspirante refrigerata Unijet II) per 20 minuti, risospesi in TE (Tris-HCl 10mM pH 8.4, EDTA 1mM), e trattati con RNasi di tipo A prima di essere sottoposti ad analisi elettroforetica.

#### ***Determinazione della concentrazione e della purezza del DNA estratto da orzo.***

La concentrazione e la purezza del DNA genomico estratto dai vari campioni di radici e foglie di orzo sono state determinate mediante letture agli UV con spettrofotometro Beckman DU-65 in cuvette di quarzo (Hellma QS) a 260 e 280nm.

La concentrazione del DNA estratto ( $\mu\text{g/ml}$ ) è stata calcolata mediante la formula:  $A_{260} \times 50 \times \text{fattore di diluizione}$ .

Un'assorbanza di 1.0 a 260nm corrisponde approssimativamente ad una concentrazione di 50 $\mu$ g/ml per un doppio filamento di DNA, o 40 $\mu$ g/ml per un singolo filamento di DNA.

Il rapporto delle assorbanze a 260nm e 280nm ha permesso di stimare la purezza del DNA. DNA puro non contaminato dalle proteine presenta un rapporto  $OD_{260}/OD_{280}$  di circa 1.8, un valore inferiore indica contaminazione da parte di proteine o fenoli mentre un valore più alto indica la presenza di RNA.

I campioni di DNA da analizzare allo spettrofotometro sono stati diluiti in TE (Tris-HCl 10mM pH 8.4, EDTA 0.1mM). Per ogni campione è stata effettuata una diluizione di 1:100 per un volume totale di 2ml, mentre il bianco era costituito da 2ml di TE. Il valore è stato ricavato mediante sottrazione del bianco dal valore letto per ognuno dei campioni.

I campioni così diluiti (con un fattore di diluizione 100) sono stati posizionati nelle rispettive cuvette di quarzo e lette agli UV.

### **Elettroforesi su gel d'agarosio**

Prima di effettuare la corsa elettroforetica è stato necessario preparare il gel d'agarosio allo 0.8% sul quale caricare i diversi campioni di DNA estratto.

L'agarosio in polvere è stato sciolto in TBE un opportuno tampone costituito da Tris, acido borico, EDTA, e sterilizzato portandolo all'ebollizione in una beuta in un forno a microonde. Lo stesso tampone è stato poi utilizzato come buffer di corsa. Il volume del tampone da

utilizzare in cui sciogliere l'agarosio è stato calcolato moltiplicando la larghezza, la lunghezza e lo spessore del lettino sul quale è stato in seguito adagiare il gel durante la corsa. Una volta che l'agarosio è stato sciolto nel TBE, è stato aggiunto il bromuro d'etidio, un composto che intercalandosi tra le basi del DNA, ne consente la visualizzazione quando è irradiato con una luce UV.

Prima del caricamento ogni campione è stato preparato addizionando a 10 $\mu$ l di DNA estratto 3 $\mu$ l di un tampone costituito da blu di bromofenolo xilene cianolo (BBF), glicerolo e acqua distillata.

I campioni così preparati sono stati caricati sul gel e fatti migrare per circa 60 minuti a 60V.

Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato posizionato su di un transilluminatore, irradiato con raggi U.V. e fotografato su di un film polaroid.

### **Analisi della DNasi in orzo**

Dopo 5 giorni di idrocoltura in un terreno di coltura privo di fonti azotate, sono stati aggiunti 5mM di ammonio fosfato (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e i prelievi sono stati effettuati da 24 ore fino a 10 giorni dall'aggiunta. Infine, dopo 10 giorni in un terreno di coltura con ammonio fosfato è stato aggiunto del cloruro di sodio (NaCl) con una concentrazione di 150mM, e dopo 24 ore dall'aggiunta sono stati effettuati i prelievi.

Per valutare l'attività della DNasi, è stata costruita una curva di taratura con DNA di sperma di salmone come riferimento, in cui sono state riportate le concentrazioni di DNA in funzione dell'assorbanza (Fig. 3).

Dalla curva di taratura, in relazione ai valori d'assorbanza ottenuti mediante letture spettrofotometriche dei vari campioni, sono stati estrapolati i corrispondenti valori delle attività delle DNasi.

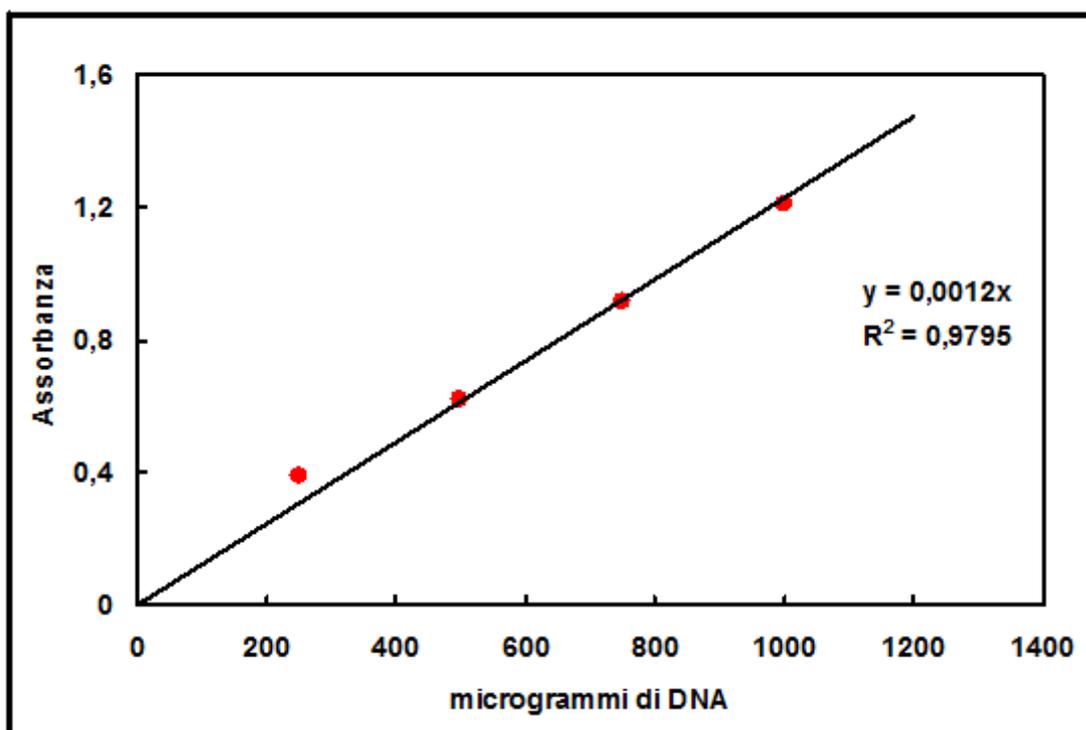


Fig. 3: Curva di Taratura dell'attività della DNasi.

### ***Estrazione del DNA da radici e foglie per saggio delle DNasi***

Le radici e le foglie di orzo, sono state separate e pesate (0.2gr di peso fresco). I differenti campioni sono stati polverizzati con azoto liquido e diluiti con un tampone preparato appositamente per l'estrazione delle DNasi.

Il tampone era costituito da: 50mM Tris-HCl pH 7.54, 2mM DTT (dithiothreitol), 0.5mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.05mM leupeptina.

Ad ogni campione così preparato è stato poi aggiunto polivinil polipirrolidone ed amberlite X AD-2 ed è stato lasciato in agitazione a 4°C per circa 15 minuti.

Dopo centrifugazione a 13000rpm per 10 minuti a 4°C, e filtrazione mediante filtro Millex-GS 0.22 µm (Millipore, USA), a 10µl di estratto grezzo sono stati aggiunti 0.3ml di buffer di reazione costituito da: 1000µg/ml calf thymus DNA, 50µM DTT, 100mM NaCl, 25mM Na-acetato, pH 5.5.

Tale mix di reazione è stato poi incubato a 45°C per 60 minuti, e, dopo un breve raffreddamento in ghiaccio, è stato aggiunto 0.7ml di acido perclorico al 3.4%. infine dopo una rapida centrifugazione a 13000rpm per circa 5 minuti a 4°C, il supernatante è stato prelevato e sottoposto ad analisi spettrofotometrica utilizzando cuvette di quarzo.

**ANALISI            PROTEOMICA            MEDIANTE            ELETTROFORESI  
BIDIMENSIONALE**

**Preparazione dei campioni:**

- *Hordeum vulgare*

Per la comparazione dei pattern proteici di due diverse varietà di orzo (Nure e Tidone), sono state preparate 4 bottiglie contenenti ciascuna circa 20 piantine della varietà Nure e 4 bottiglie contenenti circa 20 piantine della varietà Tidone. Dopo 4 giorni di idrocoltura in un terreno privo di ogni fonte azotata, sono stati aggiunti, in tutte le bottiglie, 5mM di ammonio fosfato bibasico  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ . Infine dopo 5 giorni nel terreno di coltura di 3 delle 4 bottiglie di Nure sono state aggiunte concentrazioni crescenti di cloruro di sodio (NaCl) (50mM, 150mM e 300Mm) e lo stesso è stato fatto per la varietà Tidone. I prelievi sono stati eseguiti a distanza di 4, 8, 10, 12, 24 ore dall'aggiunta di NaCl. Il controllo era rappresentato dalle piantine cresciute in un terreno di coltura con la sola fonte azotata.

- *Leptodon smithii e Quercus ilex*

Per l'analisi dei pattern proteici, i campioni di *Leptodon smithii* e di *Quercus ilex*, dopo essere stati raccolti nei rispettivi siti, e, dopo esser stati ripuliti e conservati ad una temperatura di  $-80^\circ\text{C}$ , non hanno subito ulteriori trattamenti.

## Preparazione degli estratti

### Protocollo d'estrazione I per *Leptodon smithii* e *Quercus ilex*

Per l'estrazione proteica sono stati pesati 500mg di tessuto vegetale, polverizzati in azoto liquido e diluiti con uno specifico tampone di estrazione costituito da: acido tricloroacetico 20% DTT 0.2%, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) 1 $\mu$ l/1ml, il tutto in acetone freddo conservato a -20°C.

Dopo una centrifugazione di 15 minuti a 4°C a 13000rpm, al supernatante recuperato, è stato aggiunto acetone freddo, ed i campioni sono stati lasciati in precipitazione overnight a -20°C.

Il giorno seguente dopo una centrifugazione di 60 minuti a 4°C a 13000rpm, i pellet sono stati lavati con un opportuno tampone costituito da: DTT 0.2% in acetone freddo conservato a -20°C, e lasciati in precipitazione per circa 60 minuti a -20°C.

Dopo una centrifugazione di 30 minuti a 4°C a 13000rpm, i pellet sono stati asciugati in una centrifuga a vuoto (centrifuga Univapo 100H con pompa aspirante refrigerata Unijet II) per 10 minuti e infine, risospesi con un tampone di lisi costituito da: UREA 9M, CHAPS 4%, IPG buffer 0.8% (pH 3-10), DTT 1%.

Sui campioni così preparati sono stati effettuati, mediante lo spettrofotometro, i saggi proteici con il metodo di Bradford, per la determinazione delle concentrazioni proteiche.

Infine i campioni sono stati conservati a -80°C.

## **Protocollo d'estrazione II per *Hordeum vulgare***

Per ogni campione è stato pesato 1g di tessuto vegetale, polverizzato in azoto liquido e diluito con uno specifico tampone di estrazione costituito da: Tris-HCl 40mM pH 8.0 e Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) 10 $\mu$ l/1ml.

Successivamente ai campioni sono stato aggiunti 2.5ml di fenolo, e lasciati ad incubare per circa 30 minuti in continua agitazione.

Sono state poi effettuate 3 centrifugazioni di 10 minuti ciascuna a 4°C a 10000rpm, e, alle fasi fenoliche recuperate sono stati aggiunti 5ml di acetone freddo 100% e il tutto è stato lasciato in precipitazione per 2 ore a -20°C.

Dopo una centrifugazione di 60 minuti a 4°C a 15000 rpm, i pellet sono stati lavati, per 2 minuti, prima con acetone freddo 100% e successivamente con acetone freddo 80%. Infine, dopo aver lasciato asciugare i pellet per qualche minuto in modo da eliminare completamente ogni residuo di alcool, è stato aggiunto in ogni campione un opportuno tampone di lisi costituito da: Urea 9M, CHAPS 4%, IPG buffer 0.8% (pH 3-10), DTT 1%.

Sui campioni così preparati sono stati effettuati, mediante lo spettrofotometro, i saggi proteici con il metodo di Bradford, per la determinazione delle concentrazioni proteiche.

Infine i campioni sono stati conservati a -80°C prima dell'analisi elettroforetica.

## I dimensione: isoelectrofocusing (IEF)

Prima di effettuare la corsa elettroforetica in prima dimensione è stato necessario reidratare le strip, ossia le matrici poliacrilammidiche a gradiente di pH immobilizzato su cui le diverse miscele proteiche sono state separate in relazione al proprio punto isoelettrico (pI).

Sono state utilizzate strip a gradiente non lineare, con una lunghezza di 13 e 17cm, e con un range di pH compreso tra 3-10 (Amersham Biosciences).

Nella fase di reidratazione le strip sono state lasciate ad incubare, nell'apposita vaschetta, overnight a temperatura ambiente, in una soluzione di reidratazione, opportunamente preparata, costituita da:

UREA	8M
CHAPS	2%
DTT	20mM
Marker	10 $\mu$ l
IPG Buffer	0.5%
Campione	100 $\mu$ g
BBF	Tracce

Una volta terminata la fase di reidratazione, le strip sono state sottoposte alla prima dimensione, mediante l'utilizzo del sistema Multiphor II horizontal (Amersham Biosciences), collegato ad un sistema termostatico per mantenere una temperatura costante di 20°C (thermomix Amersham Multitemp III). Il sistema è stato poi collegato all'alimentatore opportunamente programmato in relazione alla lunghezza delle strip e al range di pH utilizzato. La corsa elettroforetica in prima dimensione è avvenuta in 3 differenti step:

1. 300V per un minuto
2. 3500V per 90 minuti
3. 3500V per 5 ore e 10 minuti.

Al termine della corsa elettroforetica le strip sono state conservate a -80°C.

## **II dimensione**

Prima di effettuare la corsa elettroforetica in seconda dimensione, è stato necessario equilibrare le strip precedentemente conservate a -80°C con una opportuna soluzione di idratazione costituita da: Urea 6M, SDS 2%, TRIS/HCl pH 8.8 0.5M, Glicerolo 30%.

La fase di equilibratura consiste in un primo passaggio, di 10 minuti, in cui le strip sono immerse nella soluzione di equilibratura contenente DTT 0.5%, e in un successivo passaggio di 10 minuti in cui le strip sono immerse nella soluzione di euilibratura contenente Iodoacetammide (IAA) 4.5%.

Ogni strip è stata poi posizionata su di un gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 12% (16 cm x 16,5 cm), la cui composizione per 100ml era:

1.5M Tris-HCl pH 8.8	25ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	42.9ml
40% Acryl/Bis	30ml
10% SDS	1ml
10% APS*	1ml
TEMED	100 $\mu$ l
BBF	Tracce

Infine, dopo aver aggiunto nella camera elettroforetica il tampone di corsa SDS (precedentemente descritto), è iniziata la corsa elettroforetica in seconda dimensione, secondo la quale le proteine sono state separate in relazione al proprio peso molecolare. La corsa in seconda dimensione è durata circa 4 ore e ai gel è stata applicata una corrente di 50mA, un voltaggio di 600V e una potenza di 30W (Fig. 4).

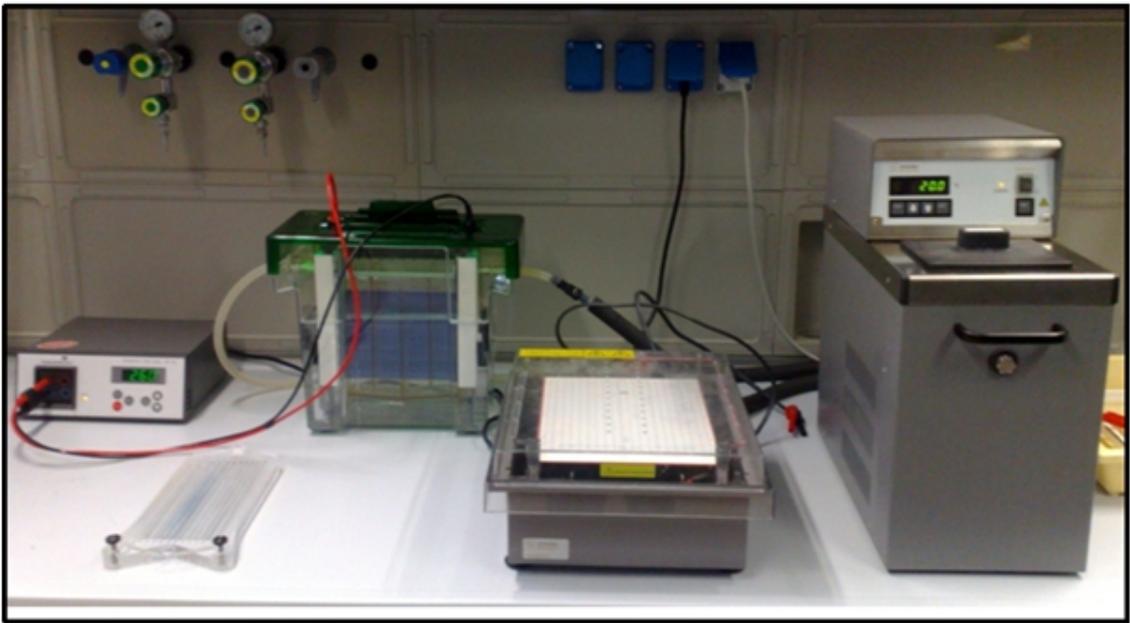


Fig. 4: Apparecchiatura per l'elettroforesi bidimensionale

### ***Colorazione dei gel con nitrato d'argento***

Al termine della corsa elettroforetica in seconda dimensione i gel sono stati colorati con nitrato d'argento.

Inizialmente i gel sono stati immersi overnight nella soluzione di fissaggio costituita da: etanolo 50%, acido acetico 12%, formaldeide (37%) 0.05%.

Successivamente i gel sono stati lavati due volte per 20 minuti con etanolo al 30%, e una volta per 20 minuti con acqua distillata.

A questo punto i gel sono stati immersi, per 1 minuto, in una soluzione di sensibilizzazione costituita da sodio tiosolfato 0.02%, lavati per tre volte in acqua distillata per soli 20 secondi, e immersi per 20 minuti in una soluzione di nitrato d'argento 0.2%, e formaldeide 0.02%.

Infine, dopo un veloce lavaggio di 20 secondi in acqua distillata i gel sono stati immersi in una soluzione di sviluppo costituita da carbonato di sodico 3%, e formaldeide 0.05%, per un tempo che varia dai 3 ai 5 minuti, dopodiché ai gel è stata aggiunta per 5 minuti la soluzione di stop costituita da glicina 0.5%.

Dopo un rapido lavaggio in acqua distillata i gel venivano posizionati su uno scanner e le immagini analizzate mediante software Image J ver. 1.29 ( NIH - USA ).

I gel sono stati essiccati su carta Whatman n°3, in un essiccatore di gel Scie-Plas GD 4534 gel Dryer collegato ad una pompa da vuoto Univapo 100H - Uniequip per 1.5 ore a 80°C.

## **Colorazione con Sypro Ruby**

Per una migliore risoluzione i gel sono stati colorati anche con una diversa colorazione.

In questo caso al termina della corsa elettroforetica i gel sono stati immersi per 30 minuti in una soluzione di fissaggio costituita da metanolo 10% e acido acetico 7%.

Successivamente dopo un rapido lavaggio in acqua distillata i gel sono stati immersi overnight nella soluzione Sypro Ruby (Bio-Rad).

Infine i gel sono stati immersi nuovamente, per 1 ora, nella soluzione di fissaggio e, dopo 2 lavaggi di 5 minuti ciascuno in acqua distillata, i gel sono stati posti su scanner ad alta risoluzione, e le immagini sono state analizzate mediante il programma PDQuest (Bio-Rad).

## **Identificazione degli spots**

In seguito alla corsa elettroforetica in seconda dimensione dei campioni di orzo della varietà di Nure e Tidone, e dopo la colorazione dei gel con nitrato d'argento, sono stati analizzati gli spot per l'identificazione delle proteine che durante lo stress salino subiscono una down-regolazione ed una up-regolazione.

A tale scopo sono stati tagliati dal gel gli spot di interesse e sono stati conservati a 4°C overnight.

Successivamente è stata effettuata l'estrazione delle proteine dai rispettivi spot.

Inizialmente sono stati effettuati 2 lavaggi di 20 minuti con una soluzione contenente ammonio bicarbonato 50% e aceto nitrile 50%.

Dopo aver centrifugato per 2 minuti a 24° a 200rpm i pellet sono stati lavati per 10 minuti con aceto nitrile 100% e, dopo aver allontanato il supernatante mediante un'ulteriore centrifuga, è stato eseguito un lavaggio per 45 minuti a 56°C con una soluzione contenente DTT 10mM e ammonio bicarbonato 20mM (1:100 v/v).

In seguito ad un'ulteriore centrifugazione di 2 minuti a 2000rpm a 24°C, è stato effettuato un lavaggio di 30 minuti a 24°C con una soluzione contenente iodoacetamide 55mM e ammonio bicarbonato 20mM (1:10 v/v).

Dopo aver eliminato il supernatante sono stati effettuati 2 lavaggi di 20 minuti con una soluzione contenente ammonio bicarbonato 50% e acetonitrile 50%.

Infine ai pellet, dopo un lavaggio di 10 minuti con una soluzione di acetonitrile 100%, è stata aggiunta una soluzione costituita da ammonio bicarbonato 20mM e 10µl di tripsina. I campioni sono stati lasciati overnight a 37°C.

Il giorno seguente, dopo un lavaggio di 2 minuti a 2000rpm a 24°C, ai pellet è stata aggiunta per 30 minuti una soluzione contenente acetonitrile 30% e acido trifluoroacetico 3%.

In questo caso dopo la centrifugazione i diversi supernatanti sono stati recuperati e conservati, mentre ai pellet è stata aggiunta, per 30 minuti, una soluzione costituita da acetonitrile 80% e acido acetico 0.5%. dopo centrifugazione i supernatanti sono stati recuperati ed addizionati ai precedenti. Infine ai pellet è stato aggiunto, per 30 minuti, acetonitrile

100%, e, dopo centrifugazione, sono stati recuperati i supernatanti e addizionati ai precedenti.

I supernatanti così ottenuti sono stati posti in una centrifuga vacuum per allontanare l'acetonitrile e per ridurre i volumi (40 $\mu$ l).

A questo punto i campioni sono stati trasferiti su puntali muniti di filtro dove verranno intrappolate le proteine estratte del gel.

Inizialmente è stato necessario far passare attraverso i filtri una soluzione di metanolo, dopodiché è stata fatta fluire una soluzione costituita da acetonitrile 2% e acido trifluoroacetico 1%. Infine, dopo aver caricato i campioni sui rispettivi filtri, è stato fatto fluire attraverso i filtri acido acetico 0.5%.

I puntali contenenti i campioni sono stati conservati a 4°C e successivamente analizzati mediante spettrometria di massa mediante MALDI-TOF.

## CAPITOLO 3:

# RISULTATI

## Hsp70

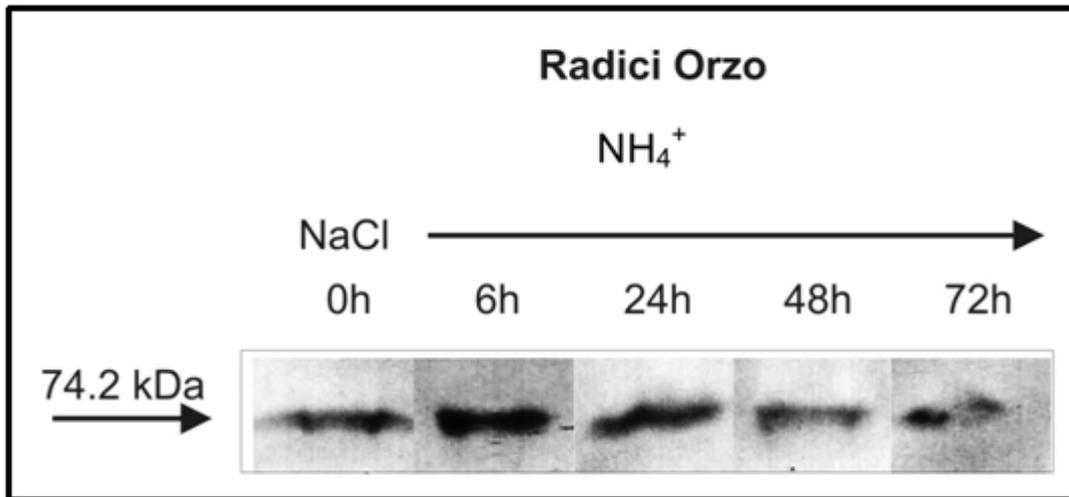
### *Analisi Western in Hordeum vulgare*

Gli estratti grezzi di radici di piante d'orzo cresciute in condizioni di assenza di azoto (-N), ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) 5 mM, e ammonio 5 mM/cloruro di sodio 150 mM ( $\text{NH}_4^+ + \text{NaCl}$ ), sono stati sottoposti a SDS-PAGE e poi trasferiti su membrana di nitrocellulosa dove, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici per l'Hsp 70 bovina, è stato possibile l'identificazione delle Hsp 70.

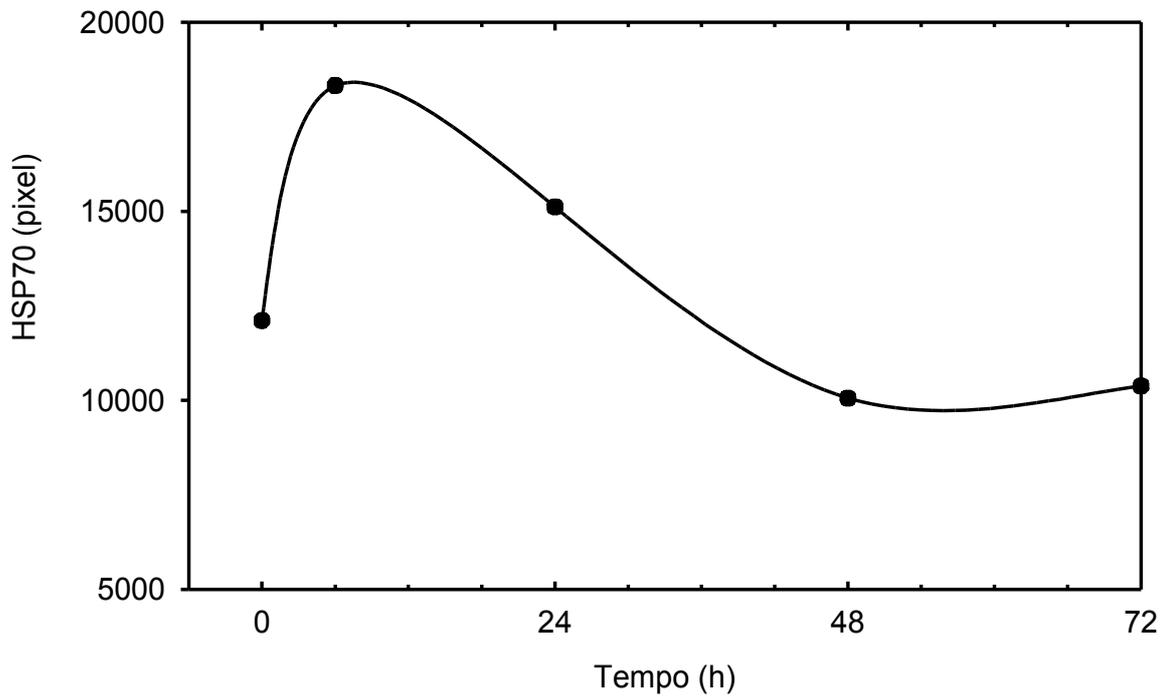
L'analisi Western in radici di piante di orzo, ha evidenziato la presenza di polipeptidi reagenti contro gli anticorpi per le Hsp70 (Fig. 1). Dopo 6 ore dell'aggiunta del sale è stato notato, rispetto al controllo, un aumento delle proteine Hsp70, ma dopo 48-72 ore tali valori erano comparabili con quelli iniziali. In seguito all'analisi densitometrica, effettuata con il software Image J (NIH - National Institute of Health -

USA), è stato possibile quantificare più accuratamente l'entità di tali variazioni. È stato quindi possibile affermare che dopo 6 ore dall'inizio dell'esposizione al sale il livello delle Hsp70 è aumentato del 51% rispetto al valore iniziale, e che a 24 ore era diminuito al 125%, per tornare, dopo 48-72 ore, ai valori paragonabili a quelli di partenza (85%) (Fig. 2).

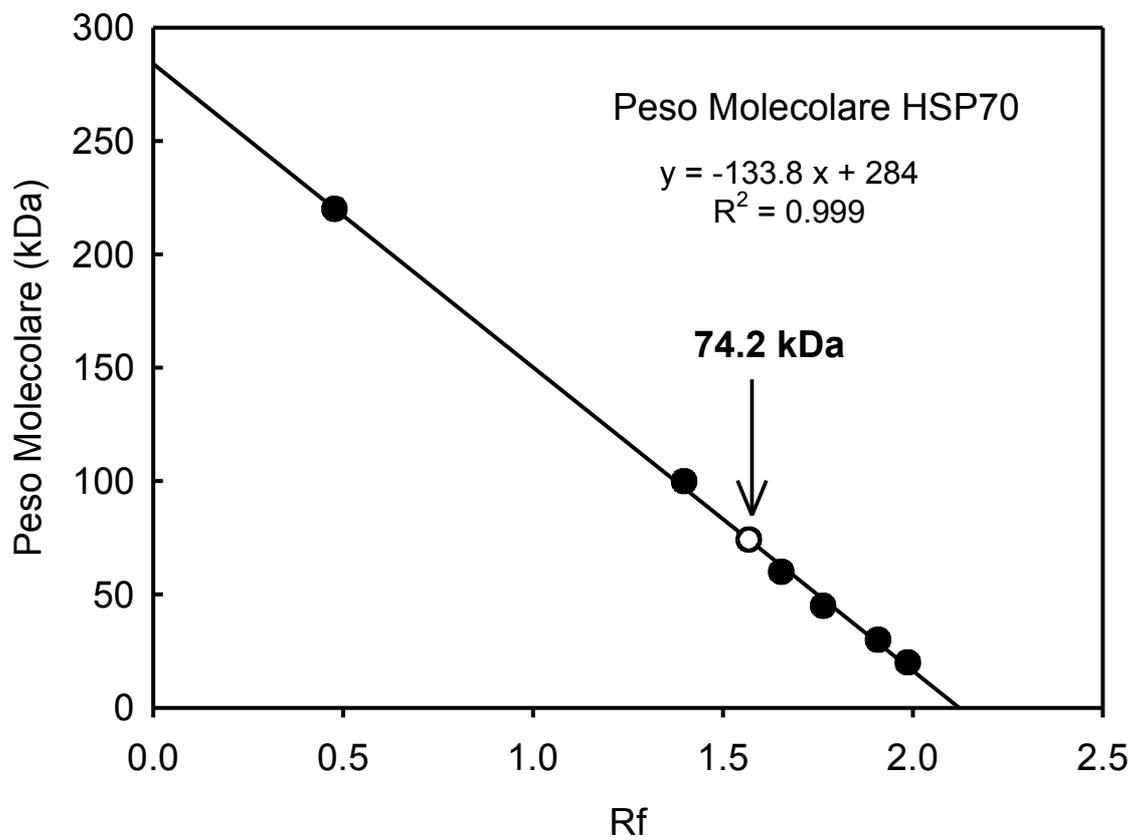
Con il metodo della mobilità relativa (peso molecolare in funzione del logaritmo della distanza di migrazione sulla membrana trasferita), è stato possibile calcolare il peso molecolare delle proteine, che, in accordo con i dati di letteratura, era pari a 74.2 kDa (Fig. 3).



**Fig. 1:** Analisi Western dei polipeptidi reagenti contro gli anticorpi monoclonali per l'Hsp70 bovina in radici di piante di orzo sottoposte a stress salino (150mM NaCl) ed analizzate a differenti tempi di esposizione.



**Fig. 2:** Analisi densitometrica sul western blotting precedente dei polipeptidi reagenti contro gli anticorpi monoclonali per l'Hsp70 bovina in radici di piante di orzo sottoposte a stress salino. La quantità di proteina reagente è stata misurata in unità arbitrarie (pixel) mediante il software Image J (NIH - USA).



**Fig. 3:** Determinazione del peso molecolare dei polipeptidi reagenti contro gli anticorpi monoclonali per l'Hsp70 bovina in radici di piante di orzo. Il calcolo è stato effettuato con il metodo della mobilità relativa (Rf).

### **Analisi Western *Leptodictyum riparium* e *Conocephalum conicum***

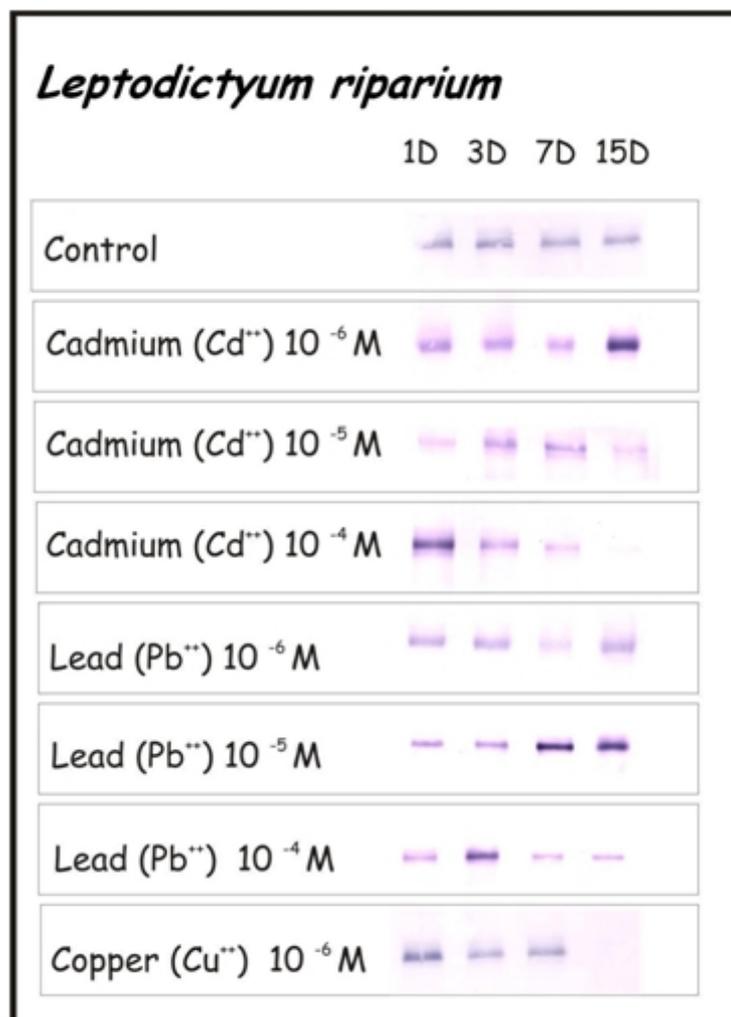
L'utilizzo di anticorpi monoclonali per le Hsp 70 ha permesso di valutare la presenza di tale proteina negli estratti di campioni di *Leptodictyum riparium* e di *Conocephalum conicum* esposti ai metalli pesanti (cadmio, piombo e rame) a differenti concentrazioni, e analizzati a diversi tempi di esposizione (1, 3, 7 e 15 giorni) dall'inizio del trattamento.

L'analisi mediante western blot delle Hsp70 in *L.riparium* ha mostrato, in tutti i campioni analizzati, la presenza di una sola banda che ha interagito con l'anticorpo specifico per le Hsp70 (Fig. 4).

Il muschio esposto a cadmio alla concentrazione di  $10^{-6}$  M ha mostrato un aumento dei livelli di Hsp70 dopo 15 giorni di trattamento. Alla concentrazione di  $10^{-5}$  M è stato osservato un aumento dei livelli di Hsp70 dopo 7 giorni di trattamento. Aumentando la concentrazione di cadmio a  $10^{-4}$  M è stato osservato un livello di Hsp70 elevato dopo 24 ore dall'esposizione, manifestando quindi per il cadmio un andamento tempo e dose-dipendente.

Per quanto riguarda l'esposizione di *L. riparium* al piombo, ad una concentrazione di Pb  $10^{-6}$  M, con il passar del tempo, non sono state osservate variazioni significative dei livelli di Hsp70. Tuttavia aumentando la concentrazione di piombo a  $10^{-5}$  M, dopo 7 giorni è stato possibile osservare un incremento dei livelli di Hsp70 mantenuti costanti fino al quindicesimo giorno di esposizione. Infine nei campioni trattati con Pb  $10^{-4}$  M l'incremento dei livelli di Hsp70 erano evidenti dopo 3 giorni di esposizione, confermando che l'aumento dei livelli di Hsp70 erano tempo e dose dipendente.

Per i campioni di muschio esposti al rame con concentrazione di  $10^{-6}$  M, è stato osservato un lieve incremento dei livelli di Hsp70 nei primi 3 giorni di trattamento, indicando così che, già a basse concentrazioni, il rame è un forte induttore delle Hsp70.



**Fig. 4:** Analisi Western dei polipeptidi reagenti contro gli anticorpi monoclonali per l'Hsp70 bovina in *Leptodictyum riparium* sottoposto a stress da metalli pesanti (Cd 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> M; Pb 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> M; Cu 10<sup>-6</sup> M), ed analizzate a differenti tempi di esposizione.

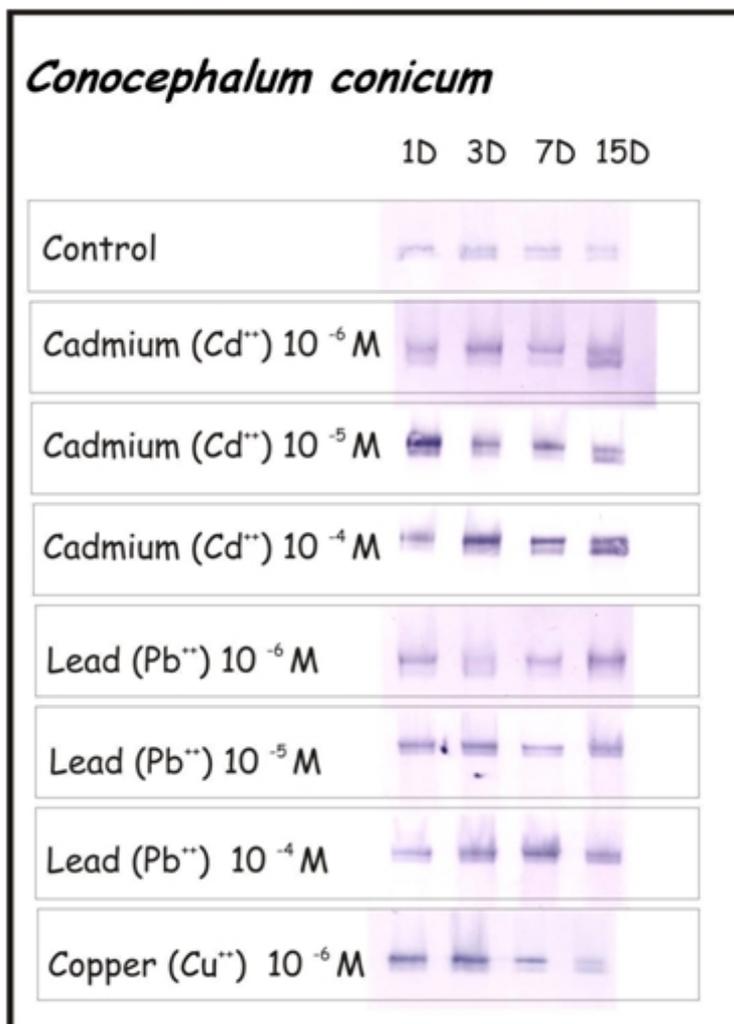
In tutti i campioni analizzati di *Conocephalum conicum* è stata riscontrata la presenza di due bande, corrispondenti alla medesima proteina, che hanno interagito con l'anticorpo specifico per le Hsp70 (Fig. 5).

Nei campioni dell'epatica trattati con Cd  $10^{-6}$  M è stato osservato un livello elevato di Hsp70 già dopo 3 giorni dall'inizio dell'esposizione al metallo pesante.

Aumentando la concentrazione di cadmio a  $10^{-5}$  M l'incremento dei livelli di Hsp70 era evidente dopo 24 ore di trattamento ma, con il passare dei giorni, tali valori tendevano a diminuire. Nei campioni esposti al cadmio con una concentrazione di  $10^{-4}$  M l'aumento di livelli di Hsp70 erano elevati solo dopo 3 giorni di trattamento, ma, tendono a rimanere tali fino al quindicesimo giorno d'esposizione.

Un comportamento simile, ma con effetto minore è stato possibile osservarlo in campioni esposti al piombo anche in questo caso è stato osservato un rapido incremento delle Hsp70 in campioni trattati con una concentrazione di piombo elevata. È stato possibile affermare anche in *Conocephalum conicum*, che i livelli di Hsp70, di campioni esposti a differenti tempi e a differenti concentrazioni di metalli pesanti, seguono un andamento tempo e dose dipendente.

Infine, anche nei campioni di *Conocephalum conicum*, l'esposizione al rame ad una concentrazione di  $10^{-6}$  M, ha mostrato un incremento dei livelli di Hsp70 già nei primi giorni di trattamento, registrando un picco dopo soli 3 giorni.



**Fig. 5:** Analisi Western dei polipeptidi reagenti contro gli anticorpi monoclonali per l'Hsp70 bovina in *Conocephalum conicum* sottoposto a stress da metalli pesanti (Cd 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> M; Pb 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> M; Cu 10<sup>-6</sup> M), ed analizzate a differenti tempi di esposizione.

### **Analisi Western *Leptodon smithii***

Analisi western di estratti grezzi di *Leptodon smithii* provenienti da differenti siti distribuiti in Campania e in Toscana, hanno evidenziato la presenza di bande corrispondenti alle Hsp70.

In particolare è stato osservato che nei campioni di muschio provenienti dal sito campano di Capodimonte (CDM) il livello di Hsp70 era superiore al livello di Hsp70 misurato nei campioni derivanti dal sito campano di Ottati (Ott). Il motivo di tale differenza è probabilmente dovuto alla localizzazione del parco di Capodimonte, esso infatti è situato all'interno di un centro urbano densamente popolato. Tale posizione, ovviamente, espone costantemente gli alberi del Parco ad elevati livelli di inquinamento atmosferico dovuto alle attività antropiche, e principalmente al traffico cittadino. Ottati invece è un parco naturale localizzato in una zona rurale lontana da rilevanti insediamenti antropici per cui i livelli di inquinamento sono ridotti (Fig. 6 ).

Nei campioni provenienti dai siti toscani in generale è stato possibile osservare un livello di Hsp70 paragonabili a valori costitutivi e inferiori ai livelli riscontrati nei campioni provenienti dai siti campani.

In particolare è stato osservato che i campioni provenienti dall'insenatura di Siena Cala Violina, nonostante derivino da una zona a basso inquinamento antropico, presentano livelli di Hsp70 superiori ai valori evidenziati negli altri campioni toscani. Tale risultato può essere giustificato dalla presenza del mare, infatti, in questo caso, gli elevati livelli di Hsp70 potrebbero non essere dovuti all'inquinamento antropico

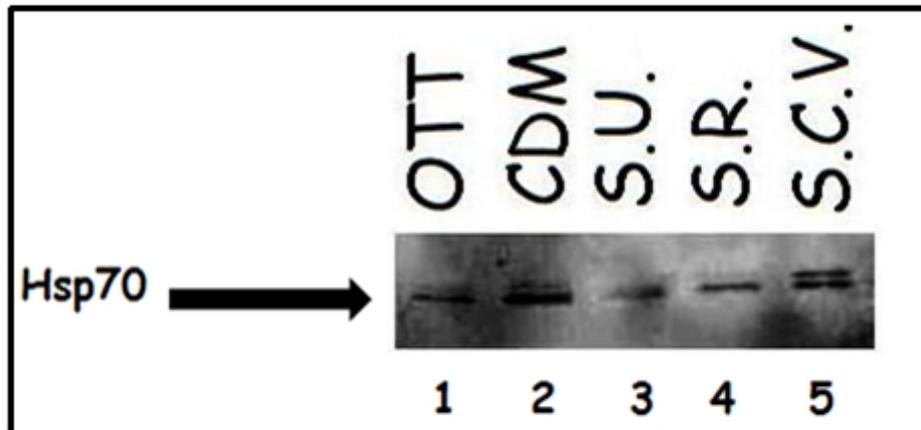
bensì alla presenza di correnti marine che sottopongono tali organismi continuamente ad uno stress salino (Fig. 6).

Anche in questo caso è stato possibile osservare, in seguito all'interazione con anticorpi specifici per le Hsp70, la presenza di 2 bande corrispondenti a tale proteina dovute probabilmente all'induzione di due isoforme della stessa proteina aventi pesi molecolari molto simili.

In relazione ai dati ottenuti mediante analisi western blotting con anticorpi specifici per le Hsp70, è stato possibile confermare il coinvolgimento delle Hsp70 nella risposta degli organismi analizzati allo stress.

L'aumentata sintesi delle Hsp 70 avviene per preservare le proteine dal danno cellulare impedendone in tal modo il mis-folding.

In particolare, tale risposta rappresenta non solo un'importante caratteristica adattativa, ma conferma la validità dei muschi come bioindicatori dei livelli di inquinamento antropico.



**Fig. 6:** Western Blotting con anticorpi specifici per Hsp70 (Sigma ) effettuati su estratti di muschio provenienti da:

1. Ottati (Ott), sito rurale
2. Capodimonte (CDM), sito urbano
3. Siena Hotel Villa Patrizia (S.U.), sito urbano
4. Siena Castello di Belcaro (S.R.), sito extraurbano
5. Siena Cala Violina (S.C.V.), sito rurale

## DNA LADDERING

### Concentrazione e purezza del DNA estratto

A piante di orzo cresciute per 5 giorni in assenza di azoto sono stati aggiunti 5 mM di ammonio fosfato, e dopo 4 giorni alcune piante sono state sottoposte a stress salino mediante l'aggiunta di cloruro di sodio a 150 mM e 500 mM. Il DNA è stato estratto con il metodo CTAB. Per ogni campione è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro negli UV ad una lunghezza d'onda di 260nm. I valori di assorbanza ottenuti sono stati utilizzati per determinare la concentrazione del DNA, mediante la formula:  $A_{260} \times 50 \times \text{fattore di diluizione (100)}$ .

L'utilizzo di CTAB per l'estrazione del DNA dalle radici d'orzo ha permesso di ottenere campioni caratterizzati da una elevata concentrazione e purezza del DNA.

Nelle radici la concentrazione del DNA estratto era compresa tra 0.06 e 0.69  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con una purezza compresa tra 1.30 e 1.75 ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) (Tab. 1). Nelle foglie la concentrazione del DNA estratto era compreso tra 0.08 e 1.61  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con una purezza compresa tra 1.36 e 1.86 ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) (Tab. 2).

CONDIZIONE RADICI	[DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	PUREZZA ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ )
$\text{NH}_4^+$ 4D	0.3347	1.46
$\text{NH}_4^+$ 4D / $\text{NaCl}_{150\text{mM}}$ 1D	0,1381	1.40
$\text{NH}_4^+$ 4D / $\text{NaCl}_{500\text{mM}}$ 1D	0.6927	1.37
$\text{NH}_4^+$ 6D	0.4699	1.30
$\text{NH}_4^+$ 6D / $\text{NaCl}_{150\text{mM}}$ 3D	0.1582	1.33
$\text{NH}_4^+$ 6D / $\text{NaCl}_{500\text{mM}}$ 3D	0.5580	1.40
$\text{NH}_4^+$ 11D	0.1988	1.52
$\text{NH}_4^+$ 11D / $\text{NaCl}_{150\text{mM}}$ 8D	0.1417	1.45
$\text{NH}_4^+$ 11D / $\text{NaCl}_{500\text{mM}}$ 8D	0.0612	1.75

**Tab.1:** lettura spettrofotometrica relativa alla concentrazione di DNA estratto dalle radici ed al grado di purezza dei campioni ad una lunghezza d'onda di 260 nm ( $A_{260}$ ).

CONDIZIONE FOGLIE	[DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	PUREZZA ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ )
$\text{NH}_4^+$ 4D	0.1358	1.60
$\text{NH}_4^+$ 4D / $\text{NaCl}_{150\text{mM}}$ 1D	0.2873	1.61
$\text{NH}_4^+$ 4D / $\text{NaCl}_{500\text{mM}}$ 1D	0.4069	1.47
$\text{NH}_4^+$ 6D	1.6169	1.36
$\text{NH}_4^+$ 6D / $\text{NaCl}_{150\text{mM}}$ 3D	0.0835	1.86
$\text{NH}_4^+$ 6D / $\text{NaCl}_{500\text{mM}}$ 3D	0.1697	1.74
$\text{NH}_4^+$ 11D	0.1721	1.38
$\text{NH}_4^+$ 11D / $\text{NaCl}_{150\text{mM}}$ 8D	0.2046	1.65
$\text{NH}_4^+$ 11D / $\text{NaCl}_{500\text{mM}}$ 8D	0.1762	1.60

**Tab. 2:** lettura spettrofotometrica relativa alla concentrazione di DNA estratto dalle foglie ed al grado di purezza dei campioni ad una lunghezza d'onda di 260 nm ( $A_{260}$ ).

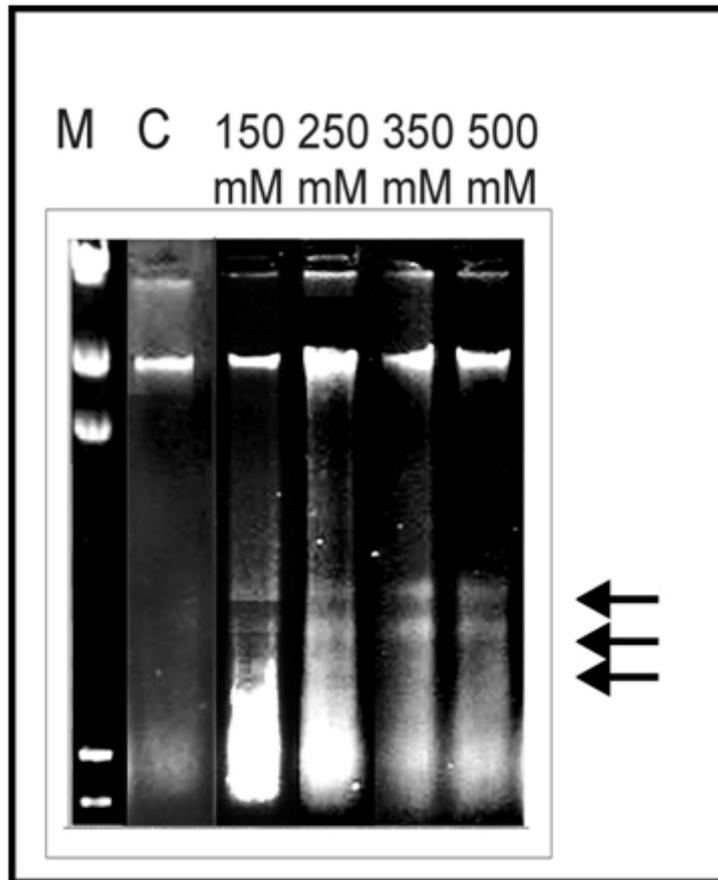
## **Effetti dello stress salino sul DNA estratto**

Dall'analisi elettroforetica su gel d'agarosio del DNA estratto da radici d'orzo sottoposto a stress da salino, è stato possibile osservare la presenza di alcune bande di DNA degradato (Fig. 7).

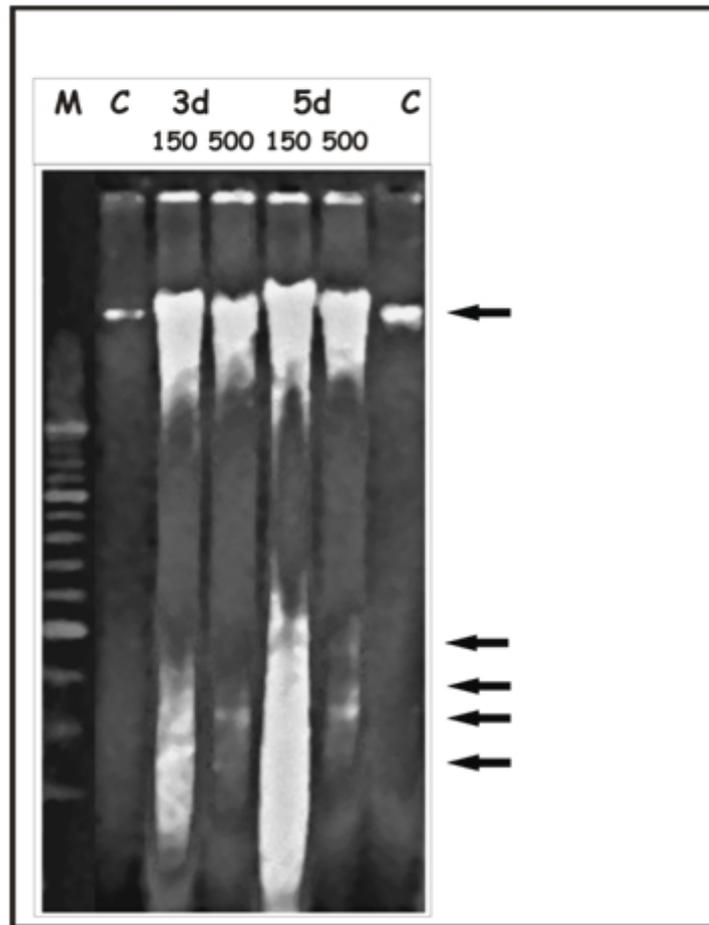
In particolare è stato osservato che per le radici di piante esposte per 3 giorni a 150 mM di NaCl il DNA è stato degradato in maniera disordinata (smear). Dopo 8 giorni di esposizione al sale tale disorganizzazione è diventata più evidente.

Nelle radici d'orzo sottoposte ad stress salino intenso (500 mM NaCl) invece è stato possibile osservare una degradazione del DNA più ordinata in cui è stato possibile distinguere la presenza di bande nette riconducibile al caratteristico effetto laddering in cui il DNA viene degradato in frammenti che differiscono fra loro di 200 bp. Tali bande, dopo tre e fino ad otto giorni di esposizione allo stress diventavano sempre più evidenti mostrando in modo chiaro quattro bande nette di DNA degradato (Fig. 7).

Nelle foglie di campioni sottoposti a stress salino è stato possibile osservare, indipendentemente dalla concentrazione e dal tempo di esposizione, la presenza prevalente di DNA degradato in maniera disordinata (Fig. 8), l'effetto laddering infatti non è molto evidente.



**Fig. 7:** DNA "laddering" nelle radici di orzo cresciute per 3 giorni in presenza di ammonio fosfato 5 mM ed in presenza di NaCl per 3-8 d. L'NaCl è stato aggiunto al terreno di crescita alle concentrazioni di 150 e 500 mM. Le frecce indicano la presenza di frammenti mono-oligonucleosomali rilevati mediante fluorescenza del bromuro di etidio aggiunto ad un gel di agarosio allo 0.8%. M = markers, C = DNA estratto dalle radici di controllo (senza NaCl).



**Fig. 8:** DNA "laddering" nelle foglie di orzo cresciute per 3 giorni in presenza di ammonio fosfato 5 mM ed in presenza di NaCl per 3-8 d. L'NaCl è stato aggiunto al terreno di crescita alle concentrazioni di 150 e 500 mM. Le frecce indicano la presenza di frammenti mono-oligonucleosomali rilevati mediante fluorescenza del bromuro di etidio aggiunto ad un gel di agarosio allo 0.8%. M = markers, C = DNA estratto dalle foglie di controllo (senza NaCl).

## SAGGIO DNasi

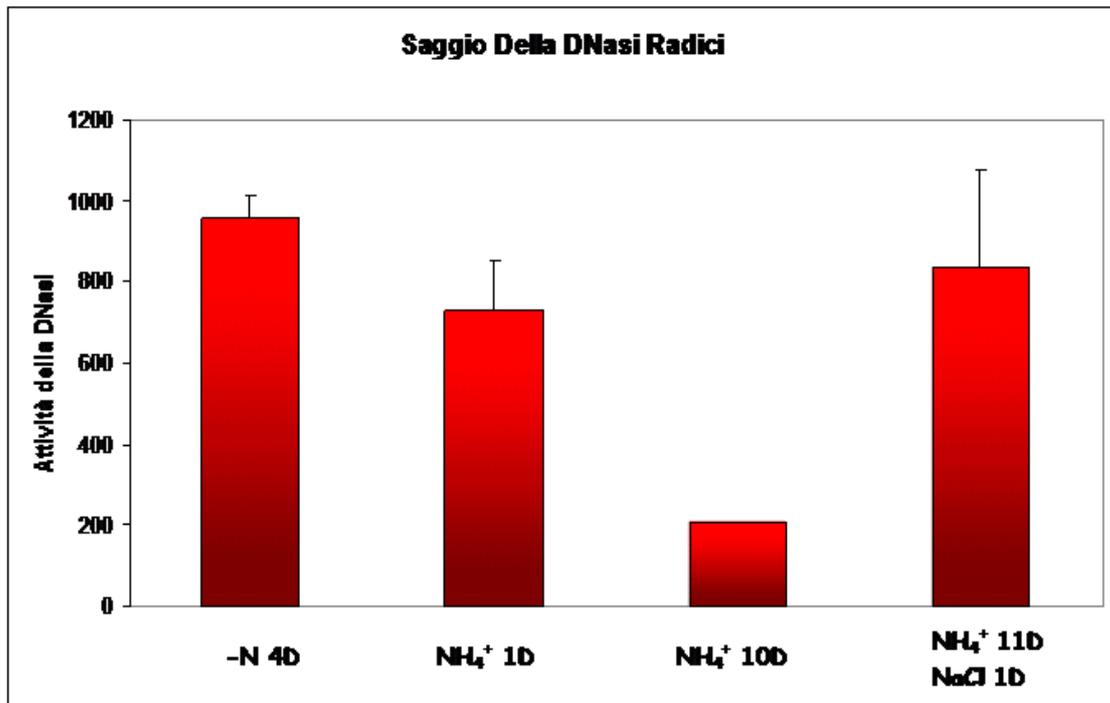
### Dati spettrofotometrici

L'attività della DNasi negli estratti di radici di piante d'orzo cresciute in assenza di azoto per 4 giorni era di  $65 \mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{g}$ . Tale attività, dopo 24 ore dall'aggiunta di ammonio fosfato, decresceva del 23% dal valore iniziale, e diminuiva ulteriormente con il passare del tempo, fino a raggiungere, dopo 10 giorni, un valore di attività pari al 22% del valore di partenza.

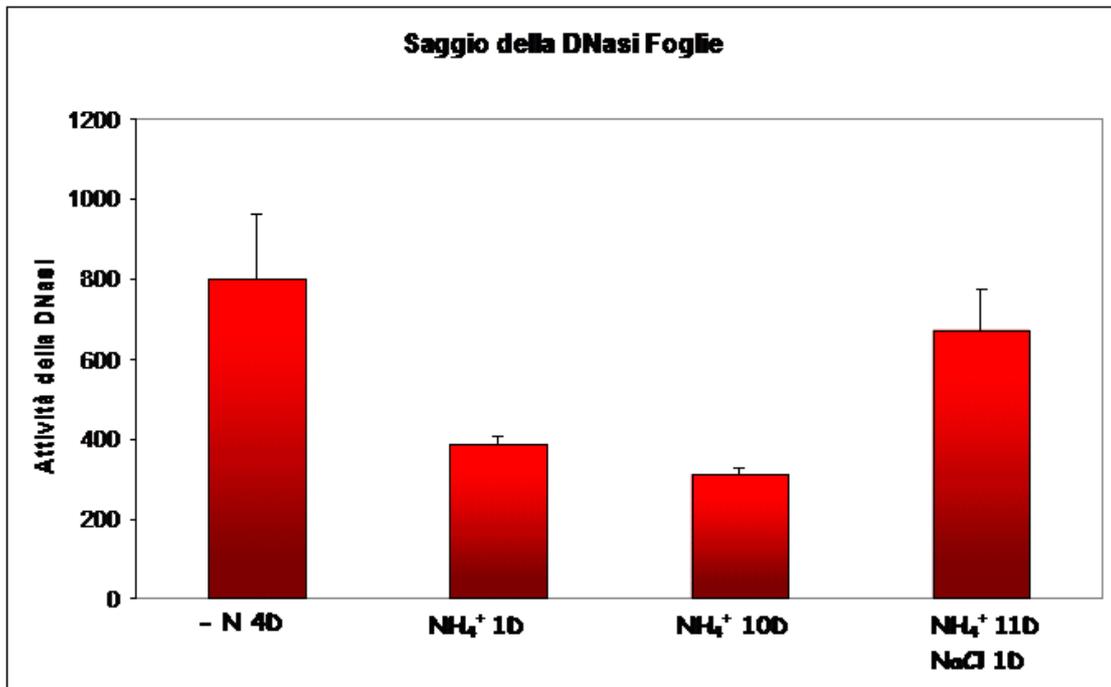
Dopo 24 ore di esposizione, lo stress salino provocava un aumento dell'attività della DNasi del 65% rispetto all'attività di piante cresciute per 10 giorni in presenza di ammonio fosfato. L'aumentata attività della DNasi di piante sottoposte a stress salino, era paragonabile ai valori di attività dell'enzima misurato in piante cresciute in assenza di ammonio (-N) (Fig. 9).

Un comportamento simile è stato osservato negli estratti di foglie di orzo, infatti in piante cresciute in assenza d'azoto per 4 giorni l'attività nucleasica era di  $50 \mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{g}$ , attività che tendeva a diminuire del 52% dopo 24 ore dall'aggiunta di ammonio fosfato, e tendeva a diminuire ulteriormente del 62% dopo 10 giorni dall'aggiunta della fonte azotata.

Infine, l'aggiunta di NaCl provocava un immediato aumento dell'attività dell'enzima del 45% già dopo 24 ore dall'inizio dello stress salino, riportando tale attività a valori comparabili a quelli misurati nelle piante cresciute in assenza di azoto (Fig. 10).



**Fig. 9:** Attività della DNasi estratta da radici di piante di orzo cresciute in idrocoltura per 4 giorni (-N 4d), e in seguito all'aggiunta di una fonte azotata sotto forma di 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Le piante venivano successivamente sottoposte a stress salino mediante l'aggiunta al terreno liquido di 150 mM NaCl.



**Fig. 10:** Attività della DNasi estratta da foglie di piante di orzo cresciute in idrocoltura per 4 giorni (-N 4 d), e in seguito all'aggiunta di una fonte azotata sotto forma di 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Le piante venivano successivamente sottoposte a stress salino mediante l'aggiunta al terreno liquido di 150 mM NaCl.

## ANALISI PROTEOMICA

### Elettroforesi bidimensionale dei campioni di *Leptodon smithii* e *Quercus ilex*

Mediante l'elettroforesi bidimensionale è stato possibile eseguire, con buona risoluzione degli spot proteici, la separazione della miscela proteica degli estratti di muschio e di leccio provenienti da diversi siti di campionamento.

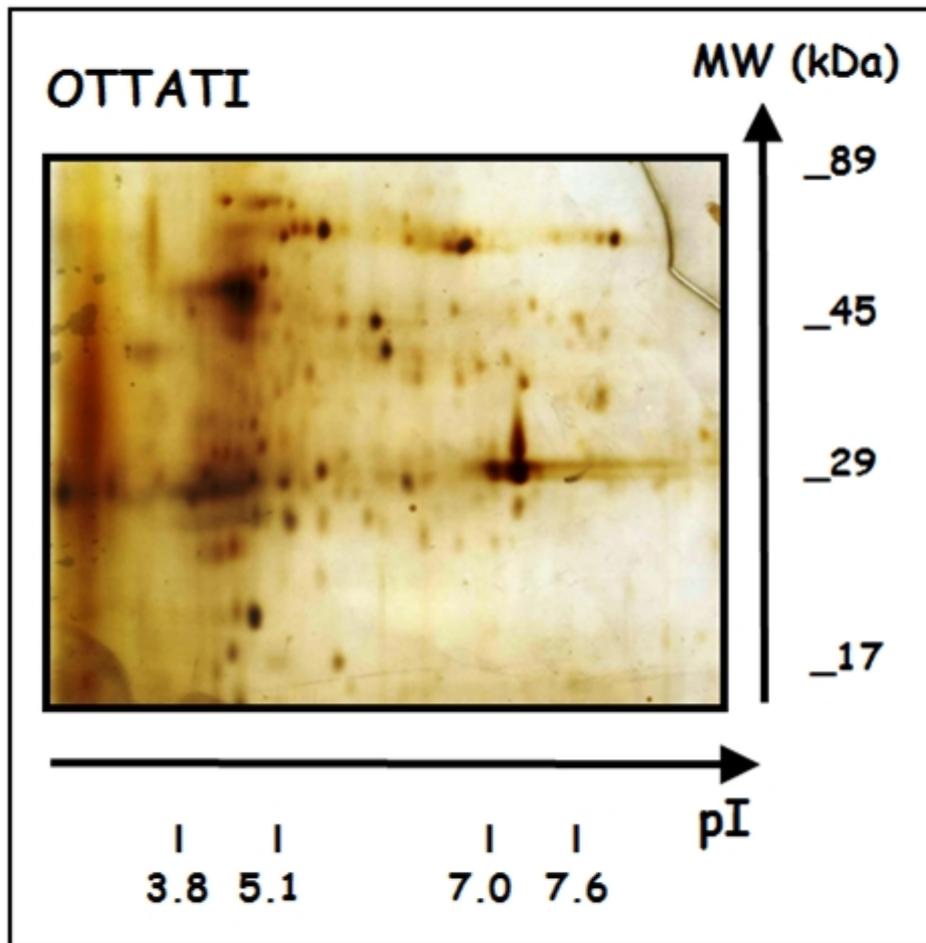
Da una prima comparazione dei pattern proteici dei campioni di leccio provenienti dai siti rurali di Ottati (Fig. 11) e dai siti urbani di Capodimonte (Fig. 12), sono state osservate delle differenze nella quantità di proteine anche se non è stato possibile tracciare delle nette distinzioni.

L'analisi dei campioni di leccio provenienti dal sito degli Astroni (Fig. 13), mostra invece un pattern proteico molto simile al pattern proteico riscontrato nei campioni provenienti dal sito di Capodimonte piuttosto che quello presente nei campioni provenienti dal sito di Ottati.

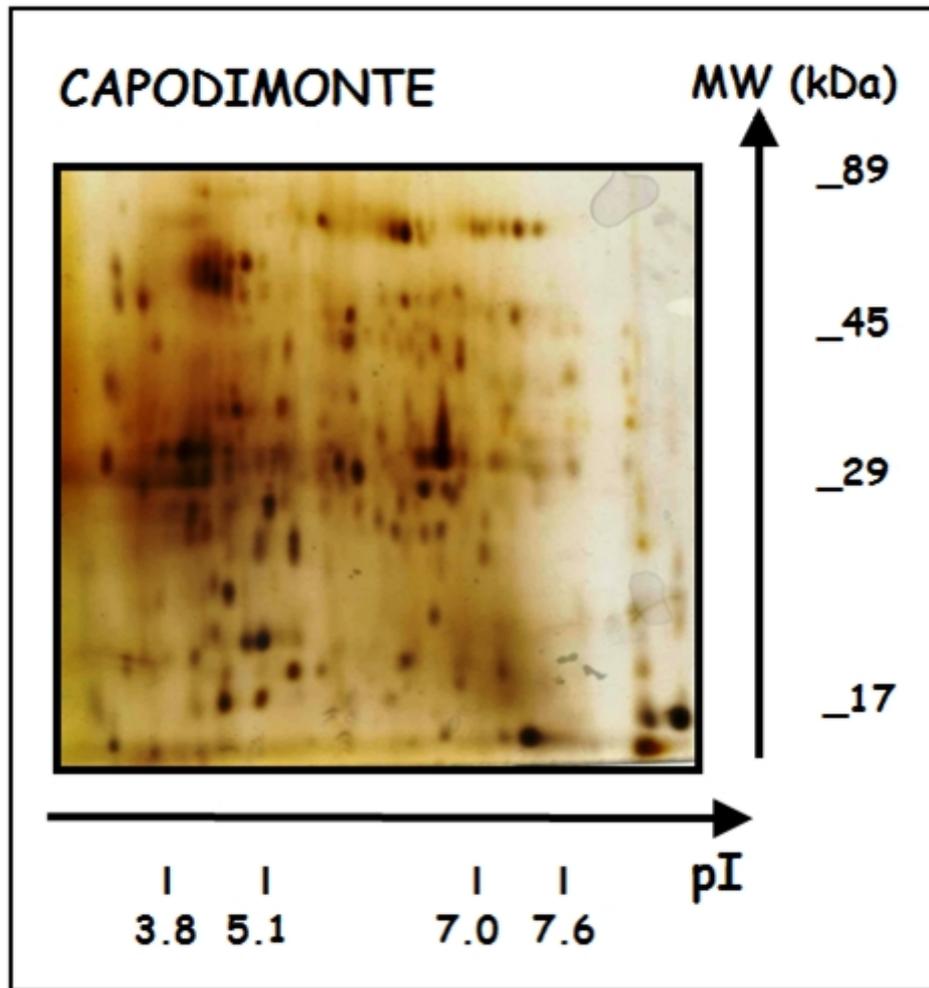
Un tale risultato può essere giustificato se si considera la tipologia del parco degli Astroni e quindi la provenienza dei differenti campioni. Il campionamento infatti, è stato effettuato in un'area protetta alla periferia occidentale di Napoli in prossimità di un centro urbano fortemente antropizzato come Pozzuoli, e quindi, costantemente sottoposto ad un elevato livello di inquinamento, così come Capodimonte. Quest'ultimo infatti, pur essendo un parco naturale, è immerso in una zona urbana con un elevato tasso di inquinamento.

Infine, un'analisi comparata dei gel bidimensionali di tutti i campioni, ha evidenziato un'elevata espressione di proteine basiche in condizioni di forte impatto antropico rispetto all'espressione delle stesse in campioni provenienti da zone rurali.

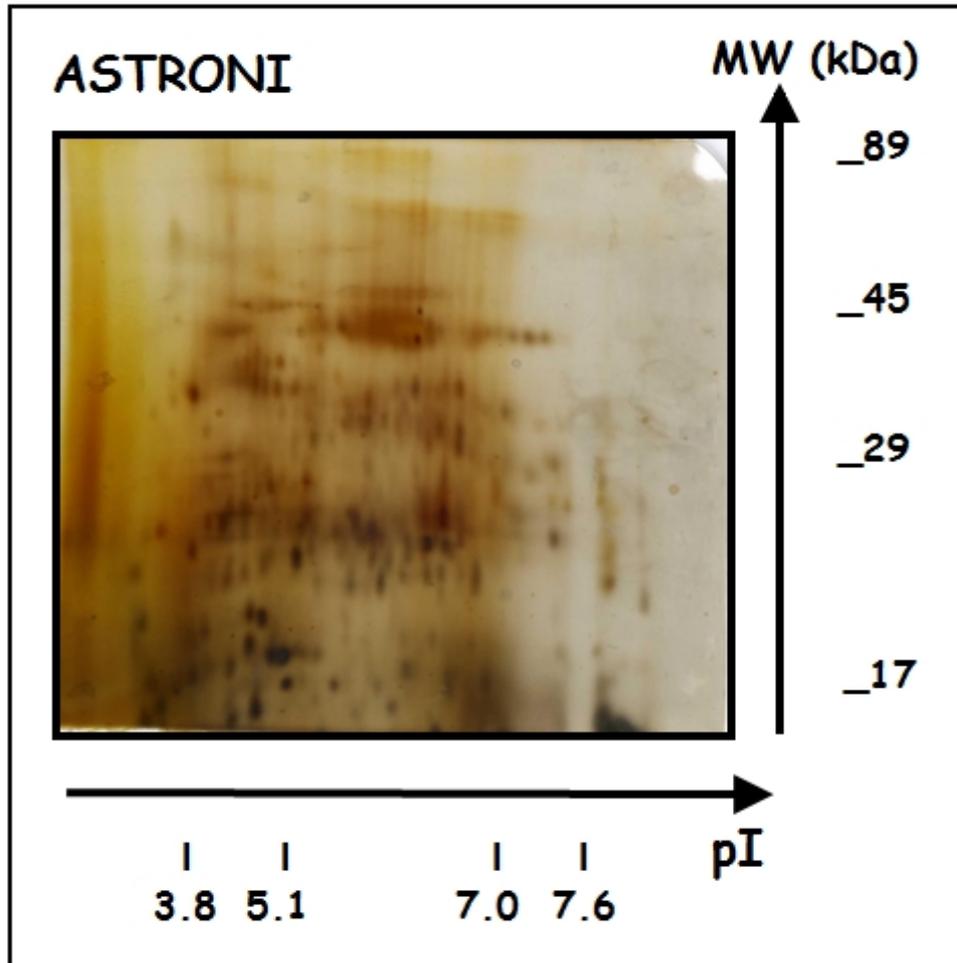
Per quanto riguarda i campioni di muschio provenienti dai diversi siti campani di Ottati (Fig. 14) e di Capodimonte (Fig. 15), sottoposti ad analisi elettroforetica mediante l'elettroforesi bidimensionale è stato possibile osservare un diverso livello d'espressione dovuto alla differente grado di inquinamento a cui i campioni sono stati sottoposti.



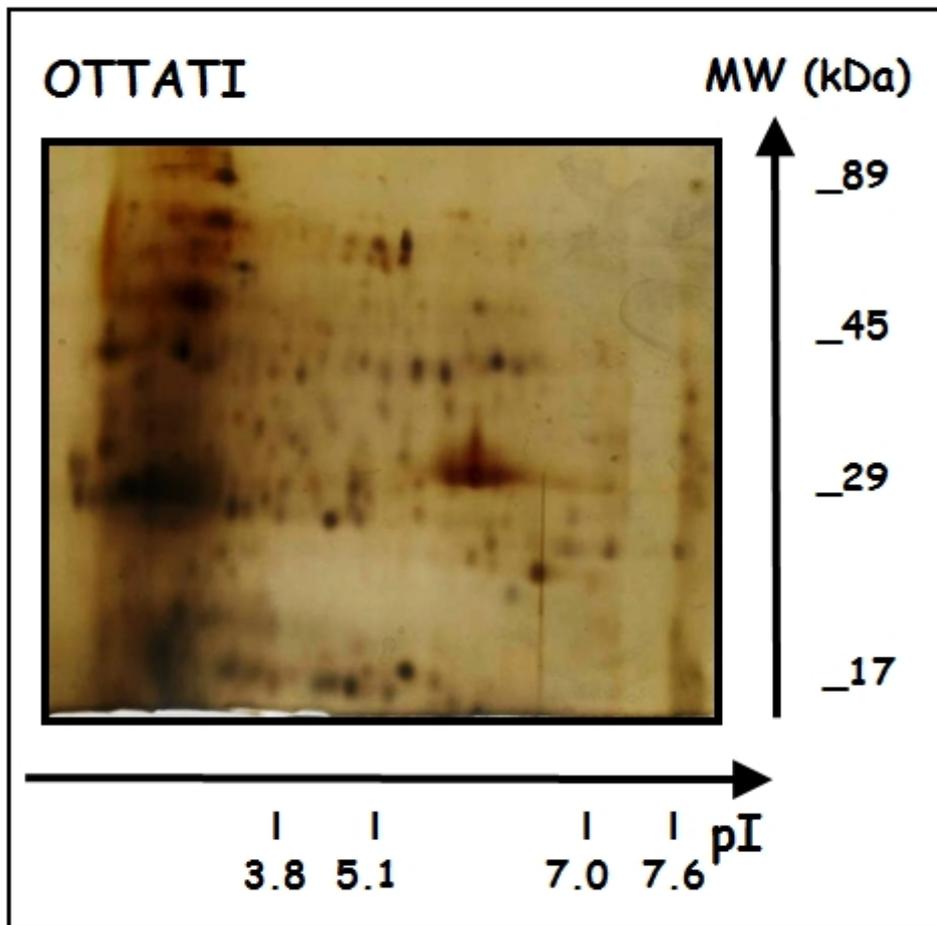
**Fig. 11:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di foglie di leccio (*Quercus ilex*) prelevati nel sito di Ottati. Il gel è stato colorato con nitrato d'argento.



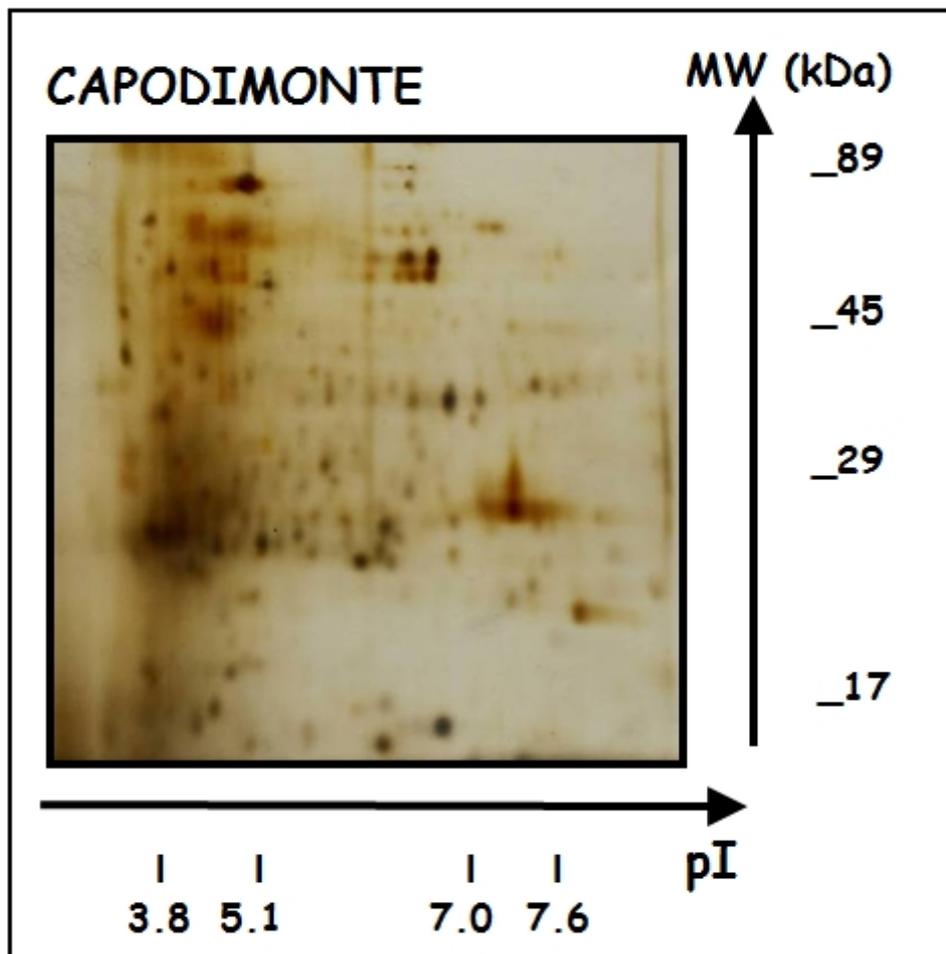
**Fig. 12:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di foglie di leccio (*Quercus ilex*) prelevati nel sito del Parco di Capodimonte. Il gel è stato colorato con nitrato d'argento.



**Fig. 13:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di foglie di leccio (*Quercus ilex*) prelevati nel sito del Parco degli Astroni (NA). Il gel è stato colorato con nitrato d'argento.



**Fig. 14:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di muschio (*Leptodon smithii*) prelevati nel sito del Parco di Ottati. Il gel è stato colorato con nitrato d'argento.

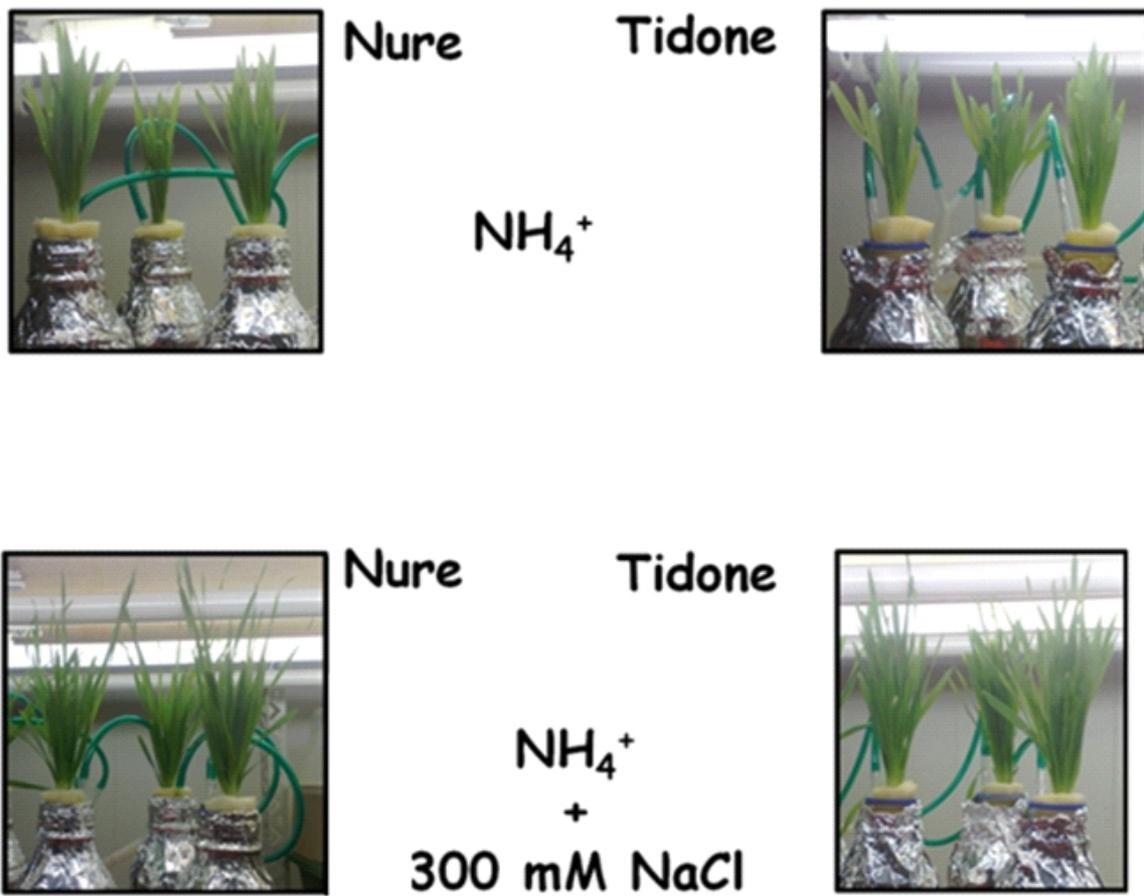


**Fig. 15:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di muschio (*Leptodon smithii*) prelevati nel sito del Parco di Capodimonte. Il gel è stato colorato con nitrato d'argento.

## **Elettroforesi bidimensionale dei campioni di *Hordeum vulgare***

I pattern proteici di due differenti varietà di orzo (Nure e Tidone), sottoposti a stress salino, sono stati analizzati mediante elettroforesi bidimensionale al fine di poter identificare le proteine coinvolte nella risposta allo stress. Inoltre, con tale comparazione, è stato anche dimostrato il differente grado di tolleranza allo stress delle due varietà.

Le differenze tra le due varietà sono state osservate già durante la crescita delle piante, infatti, la varietà Tidone ha mostrato, ancor prima di essere esposta allo stress salino, una velocità di crescita più lenta rispetto alla varietà Nure (Fig. 16).



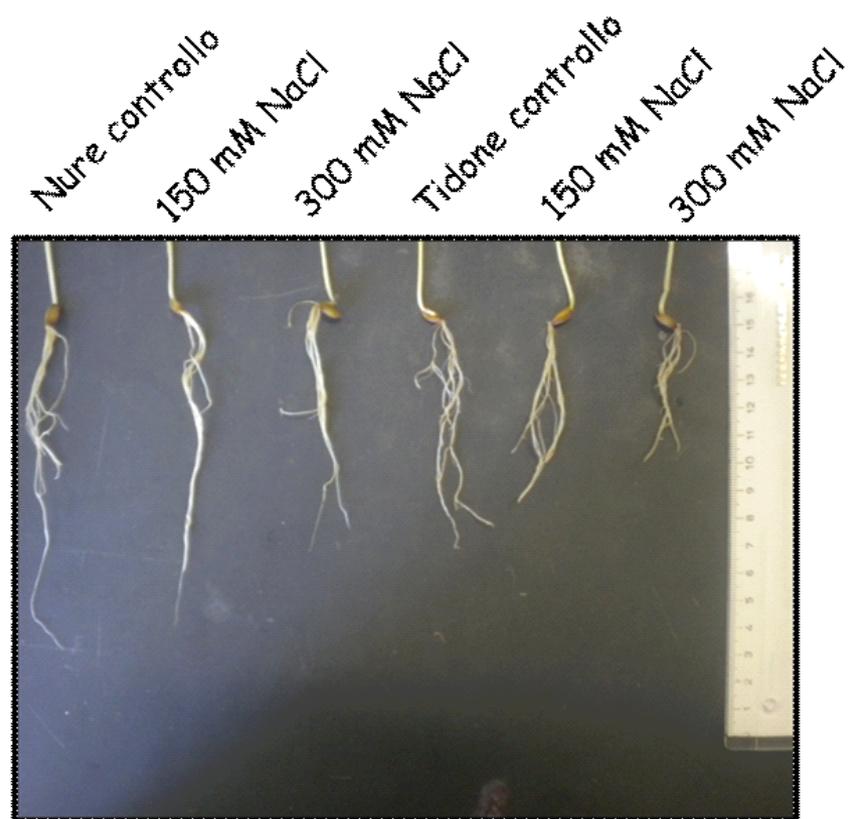
**Fig. 16:** Idrocoltura di piantine d'orzo della varietà Nure e Tidone, sottoposte a stress salino

Un'ulteriore differenza fra le due varietà è stata osservata anche per quanto riguarda il fenotipo dell'apparato radicale, infatti, Tidone in condizioni fisiologiche risulta avere radici meno sviluppate rispetto a Nure. È stato infatti osservato che le radici di Tidone, cresciute in presenza di ammonio fosfato 5 mM erano più corte del 31% rispetto alle radici di Nure cresciute nelle medesime condizioni.

In seguito all'esposizione delle varietà Nure e Tidone a differenti livelli di stress salino, è stato osservato, in entrambe le varietà, apparati radicali più corti se paragonati ai rispettivi apparati radicali di controllo (Fig. 17).

In particolare, è stato calcolato che le radici della varietà Nure, cresciute in presenza di NaCl 150 mM, erano più corte del 16% rispetto alle radici del controllo, mentre le radici cresciute in presenza di NaCl 300 mM erano del 31% più corte rispetto al controllo.

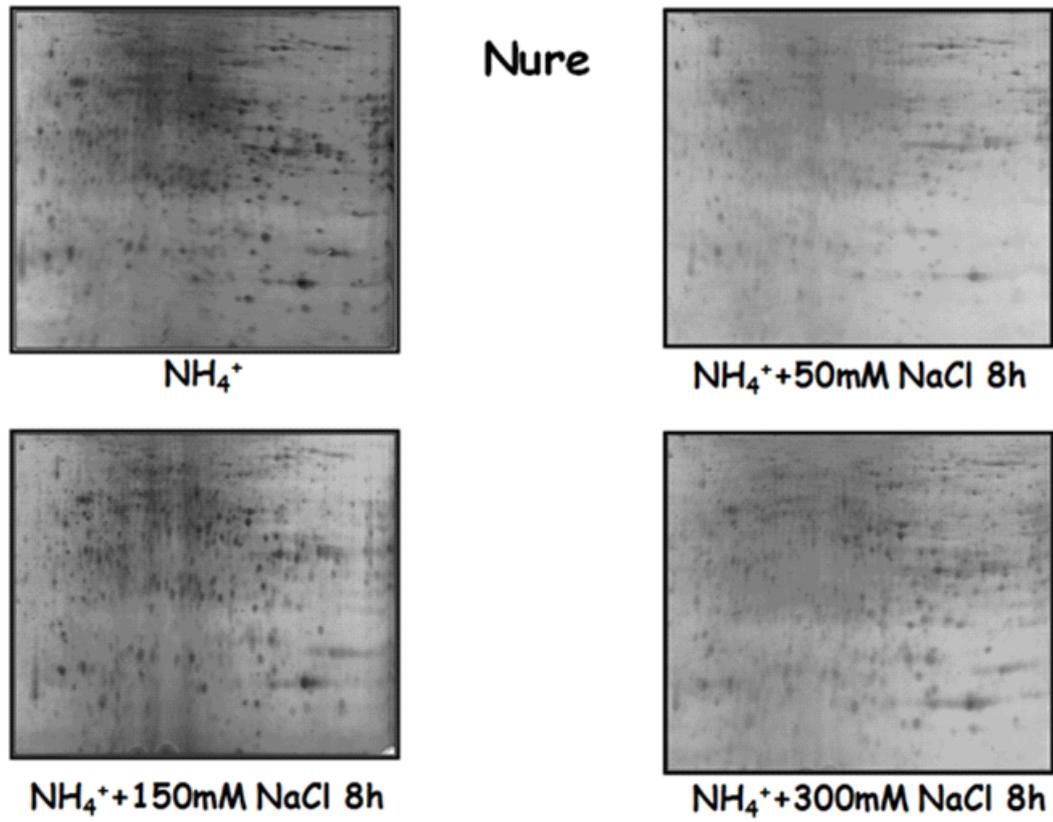
Per quanto riguarda la varietà Tidone invece, le radici di piante cresciute in presenza di NaCl 150 mM erano più corte del 12% rispetto al controllo, mentre le radici cresciute in presenza di NaCl 300 mM erano del 66% più corte rispetto al controllo.



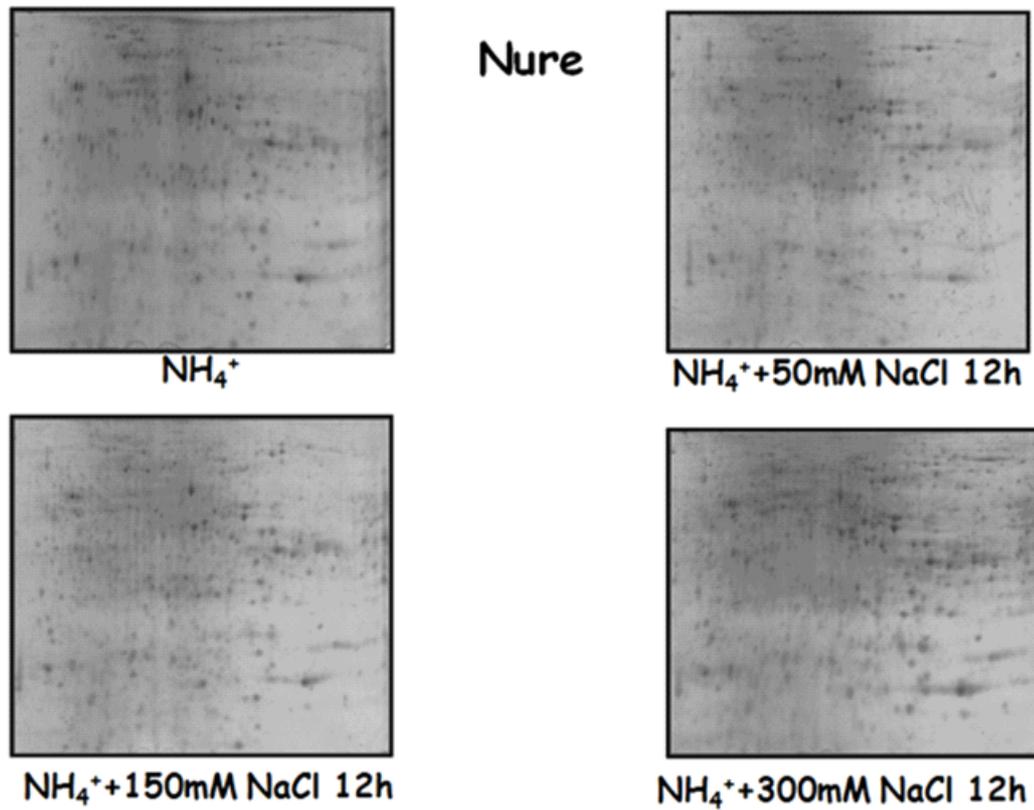
**Fig. 17:** Radici d'orzo, della varietà Nure e Tidone, sottoposte a stress salino

Dall'analisi comparativa dei gel, ottenuti mediante elettroforesi bidimensionale, è stata osservata una generale variazione dei pattern proteici dei campioni di orzo sottoposti a stress salino rispetto a quelli del controllo. Tale variazione può essere attribuita all'induzione e/o inibizione di specifiche proteine.

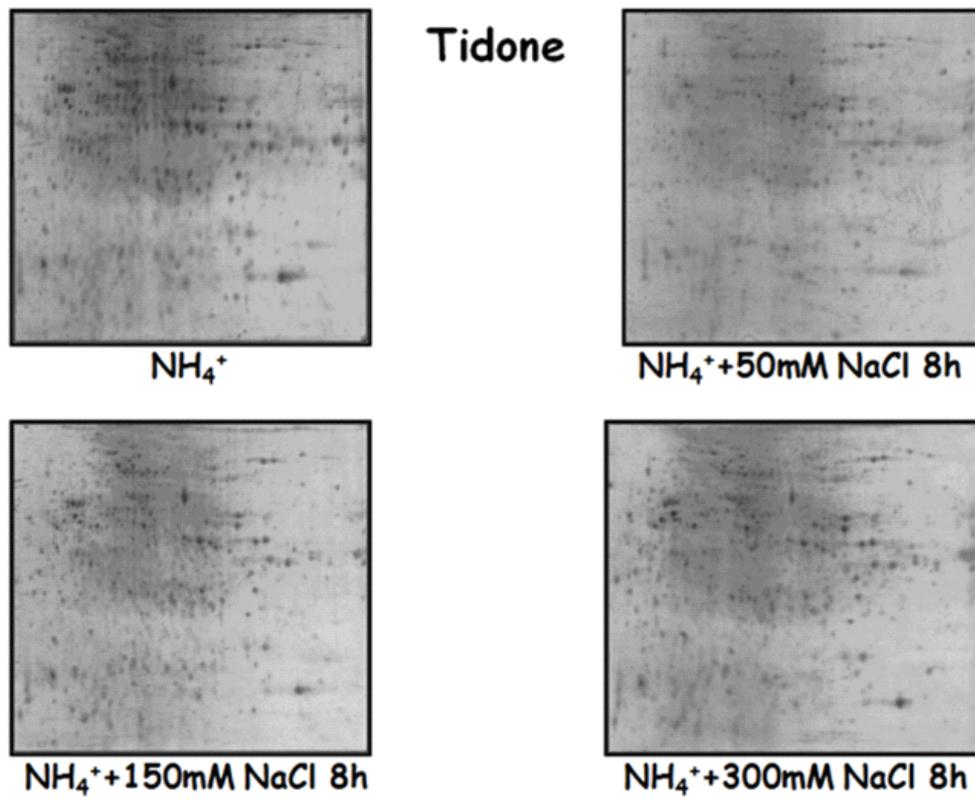
In generale la comparazione è stata fatta seguendo due diverse fasi: in una prima fase sono stati confrontati i pattern proteici dei campioni della varietà Nure (Fig. 18 e 19) sottoposti a differenti livelli di stress (50, 150, 300 mM) e per diversi tempi di esposizione (4, 8, 12, 24 ore). In maniera omologa è stata eseguita la comparazione per i campioni della varietà Tidone (Fig. 20).



**Fig. 18:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di orzo (Nure) dopo 8 ore di stress salino.



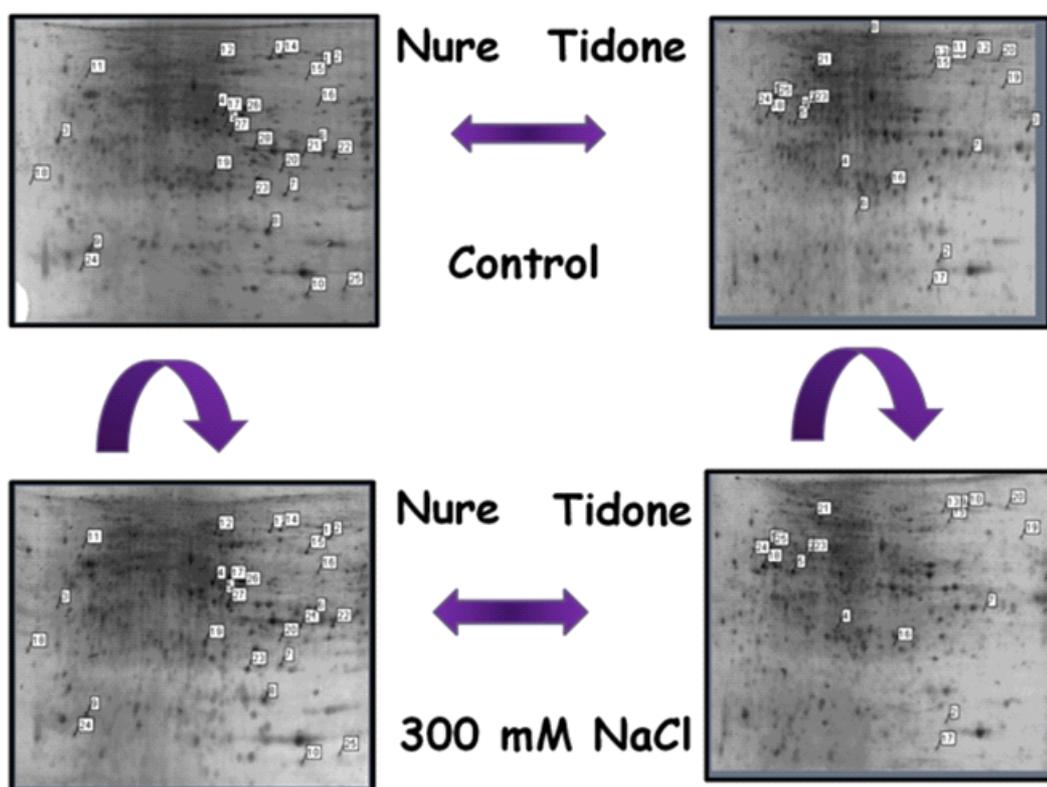
**Fig. 19:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di orzo (Nure) dopo 12 ore di stress salino.



**Fig. 20:** Analisi mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di orzo (Tidone) dopo 8 ore di stress salino.

La seconda fase prevedeva invece la comparazione dei gel appartenenti alle due diverse varietà di orzo per verificare la tolleranza allo stress (Fig. 20).

In tal caso la comparazione dei gel dei campioni della varietà Nure sottoposti a differenti livelli di stress salino e monitorati per differenti tempi d'esposizione hanno mostrato una quantità di proteine superiori ai gel dei campioni della varietà Tidone sottoposti alle medesime condizioni.



**Fig. 21:** Comparazione mediante elettroforesi bidimensionale del contenuto proteico di estratti di orzo di due differenti varietà (Nure e Tidone).

Dalla comparazione dei gel, mediante il software PDQuest (Sigma), è stato possibile individuare, per entrambe le varietà, le proteine che durante lo stress sono state up-regolate e down regolate (Tab. 3). L'individuazione di tali proteine è stata effettuata mediante il rapporto della densità di ogni singolo spot presente nei gel sottoposti a stress con la densità dei rispettivi spot presenti sui gel di controllo.

NURE TEMPO 8H	CONDIZIONI			
	SPOT	CONDIZIONI		
	N°	50 mM	150 mM	300 mM
	1	1.60	1.15	1.24
	2	1.26	0.49	1.47
	3	0.57	0.75	0.63
	6		0.75	
	7	0.55	0.57	0.82
	8	0.69	0.91	0.83
	10	0.36	0.67	0.71
	15	1.02	0.81	1.78
	18	3.05	2.96	4.06
	22	0.48	0.79	0.94
	23	0.37	1.00	1.02
	24	1.33	1.77	1.36
	25	0.21	0.62	0.35

TIDONE TEMPO 8H	CONDIZIONI			
	SPOT	CONDIZIONI		
	N°	50 mM	150 mM	300 mM
	1	1.27	1.29	0.83
	3	0.58	0.63	0.63
	10	0.79	0.77	0.75
	11	1.40	0.52	
	18	1.30	1.03	1.14
	19	0.80	0.44	0.52
	25	1.12	0.55	0.78

**Tab. 3:** Identificazione degli spot proteici della proteine up-regolate e down-regolate dei campioni di orzo (Nure e Tidone) in seguito a stress salino.

Dopo aver individuato, sia in Nure e sia in Tidone, le proteine che durante lo stress hanno subito una variazione d'espressione, sono stati tagliati gli spot contenenti le proteine di interesse dai rispettivi gel, e identificati successivamente mediante spettrometria di massa (Tab. 4 e 5).

NURE TEMPO 8H			
SPOT N°	SEQUENCE	PROTEIN	FUNCTION
1	IGGIGTVPVGR QTVAVGVK	BLT63	Fattore di elongazione
2	IGGIGTVPVGR	BLT63	Fattore di elongazione
3	GFGVIDSIK QTVSCADILTVAAR	peroxidase	
6	GFGVIDSIK MGASLLR QTVSCADILTVAAR	peroxidase	
7	CSYTVWPGALPGGGVR ELQVPGGCASACGK FGGDTYCCR LDPGQSWALNMPAGTAGAR TGCTFDGSGR VSGQQPTTLAEYTLGQGANK	thaumatin-like protein TLP6	Proteine espresse in piante in seguito all'attacco da patogeni o in presenza di stress abiotici
8	AAASSATSVHDFTVK VDVNGNNVSPLYK YAPTTSPMSIEK	glutathione peroxidase-like protein GPX54Hv	
10	QTVSCADILTVAAR	peroxidase	
15	IGGIGTVPVGR	BLT63	Fattore di elongazione
22	MGASLLR	peroxidase	
23	CATDITKDCLK CITGDCNGVLACR CSYTVWPGALPGGGVR ELQVPGGCASACGK FGGDTYCCR LDPGQSWALNMPAGTAGAR TGCTFDGSGR VSGQQPTTLAEYTLGQGANK	thaumatin-like protein TLP6	Response to stress
24	LEAAGDGACVAK LRVEYER	pathogenesis-related protein 10 (PR-10)	Response to stress
25	SWTAADAVK	Bpr1-1 gene for type-1 pathogenesis-related protein	

**Tab. 4:** Identificazione, mediante spettrometria di massa, delle proteine coinvolte nella risposta allo stress salino in campioni di orzo (Nure).

TIDONE TEMPO 8H			
SPOT N°	SEQUENCE	PROTEIN	FUNCTION
1	ELISNASDALDK	GRP94	
3	IGGIGTVPVGR QTVAVGVK	BLT63	Fattore di elongazione
10	MGASLLR	peroxidase	
11	CYESYSEDPK INDAVYR NNIIPMSR TAGTTILSAIK IGEATALEVR IGQMTQIER SLVLLK	beta-D-glucan exohydrolase, isoenzyme ExoII	
18	MGASLLR	peroxidase	
19	IGGIGTVPVGR QTVAVGVK STTTGHLIYK	BLT63	Fattore di elongazione
25	VVAGNGLK	GA 2-oxidase 4 (GA2ox4)	

**Tab. 5:** Identificazione, mediante spettrometria di massa, delle proteine coinvolte nella risposta allo stress salino in campioni di orzo (Tidone)

## CAPITOLO 4:

### DISCUSSIONE

Gli organismi vegetali devono affrontare, nell'ambiente naturale, alti livelli di salinità, specialmente se crescono in prossimità di spiagge ed estuari dove l'acqua del mare si mescola con quella dolce o dove i due tipi si alternano a causa delle maree. Il dilavamento di sale naturale che si origina da depositi geologici marini può confluire in aree rese inutilizzabili per l'agricoltura.

La risposta delle piante allo stress salino riveste quindi notevole importanza per le implicazioni che può avere sulla produttività delle piante, comprese quelle di interesse agronomico.

La resistenza alla salinità delle specie vegetali è un carattere complesso con implicazioni a diversi livelli di organizzazione (organo, tessuto, cellula ed organello).

Gli effetti della salinità sugli aspetti qualitativi delle produzioni vegetali, risultano quasi sempre negativi ad elevati livelli di stress, ma in condizioni di stress moderato gli effetti positivi possono anche compensare ampiamente quelli negativi. Ad esempio, per il pomodoro si riscontra un miglioramento del colore ed un incremento dei solidi solubili totali, mentre

per il melone si osserva un miglioramento delle caratteristiche organolettiche.

Risulta importante notare che durante lo stress salino gli ioni sodio e cloro sono accumulati preferenzialmente nelle vecchie foglie d'orzo, invece alcuni osmoprotettori sono accumulati preferenzialmente nelle giovani foglie di piante d' orzo (Nakamura et al.,1996). Tali osservazioni suggeriscono che in condizioni di salinità, le piante d'orzo preferiscono far crescere i tessuti giovani che hanno sufficiente attività metabolica e fisiologica, e circoscrivere il danno da sale ai tessuti vecchi che non avranno ancora per molto ottime funzioni cellulari (Muramoto et al., 1999). La senescenza fogliare prematura indotta dallo stress salino ha un ovvio ruolo adattativo, consente infatti alla pianta di completare il proprio ciclo vitale, anche in condizioni avverse dovute a stress salino probabilmente conferendole tolleranza.

Durante lo stress salino si assiste dunque ad una mobilitazione di nutrienti smistati dalle foglie danneggiate a quelle giovani, per favorirne la sopravvivenza. Il sistema di riciclaggio dei nutrienti che avviene durante lo stress salino è simile a quello che avviene durante la naturale senescenza fogliare.

I risultati ottenuti riguardo ai livelli delle Hsp70 in orzo confermano il coinvolgimento di tali proteine nella risposta allo stress salino almeno nelle prime 24 ore dall'inizio dello stress, anche se un livello costitutivo di Hsp70 è sempre presente nelle radici di orzo per permettere un adeguato folding delle proteine sintetizzate. In seguito allo stress salino le Hsp70 aumentano considerevolmente di livello per evitare un ripiegamento errato sia delle proteine in sintesi che di quelle già funzionanti e funzionali (mis-folding). L'incremento è misurabile sia qualitativamente e sia quantitativamente (circa il 50% di aumento) mediante anticorpi specifici, ed ha un

comportamento simile a quello osservato in *Elodea canadensis* in seguito allo stress da metalli pesanti (Esposito et al., 2007), suggerendo che le risposte agli stress abiotici hanno almeno in parte percorsi comuni. Tale affermazione può essere confermata dai risultati ottenuti dai campioni di *Leptodictyum riparium* (muschio) e *Conocephalum conicum* (epatica) esposti a livelli crescenti di metalli pesanti quali cadmio, piombo e rame. In tutti i campioni considerati, infatti, in seguito a stress da metalli pesanti, è stato osservato un effetto dose dipendente dei livelli delle Hsp70. In particolare, il rame è risultato essere, rispetto al piombo e al cadmio, un forte induttore di tali proteine già a basse concentrazioni.

L'induzione delle Heat shock proteins negli organismi considerati è una conseguenza del meccanismo di metallo-tolleranza che si innesca come risposta allo stress da metalli pesanti. Infatti, come per lo stress da sale, anche per lo stress da metalli pesanti l'induzione e/o l'aumento delle Heat Shock Proteins (HSP) gioca un ruolo primario tra i molti e differenti meccanismi di adattamento e/o resistenza.

Le Hsp contrastano gli effetti tossici dei metalli su proteine ed enzimi, proteggendole dall'avvolgimento scorretto e dalle vie proteolitiche, mentre meccanismi più sofisticati tendono a recuperare le proteine che hanno perso la loro conformazione, e inducendo la tolleranza riducono gli effetti dello stress.

L'inquinamento da metalli pesanti, può infatti causare stress secondari nelle piante. Strategie biochimiche sono state sviluppate dagli organismi vegetali per controllare tali stress, così da produrre un netto incremento dei livelli di molecole in grado di sequestrare e/o contrastare gli effetti dei metalli. Non tutti gli organismi però, sono in grado di attuare meccanismi di resistenza allo stress da metalli (Rausser, 1999), che si esplicano nell'immobilizzazione, esclusione e/o compartimentazione dei

metalli. È possibile quindi ricercare, tra gli organismi che manifestano una spiccata tollerabilità allo stress indotto da sostanze inquinanti come i metalli pesanti, quello che viene definito un indicatore molecolare, capace di rivelare uno stato di stress indotto da suddette sostanze tossiche.

Anche i risultati delle quantità delle Hsp70, ottenuti dai campioni di muschio (*Leptodon smithii*) provenienti dai diversi siti campionati in Campania e in Toscana, hanno confermato il loro coinvolgimento nella risposta allo stress ed hanno sottolineato la validità delle briofite come ottimi bioindicatori molecolari. I livelli elevati di Hsp70 osservati nei campioni provenienti da Capodimonte, rispetto ai livelli delle stesse misurati nei campioni provenienti da Ottati, indicano un tasso di inquinamento superiore dovuto alla posizione del sito. Capodimonte infatti, pur essendo un parco naturale è situato in un centro urbano densamente popolato per cui è sottoposto costantemente ad elevato livello di inquinamento, a differenza di Ottati localizzato in una zona rurale lontana da rilevanti insediamenti antropici. Nei campioni provenienti dai siti toscani i livelli di Hsp70 osservati, indicano un tasso di inquinamento inferiore rispetto al tasso di inquinamento presente nei siti campani. Infine i livelli di Hsp70 relativamente elevati osservati nel sito toscano di Cala Violina sono riconducibili ad uno stress di tipo salino e non causati dall'inquinamento antropico, essendo tale sito in prossimità del mare e lontano da ogni centro urbano.

In tutti i campioni di orzo e muschio esaminati, si ha un progressivo decremento della presenza delle Hsp70 fino a tornare a livelli comparabili a quelli iniziali, indicando l'instaurarsi di meccanismi più articolati di difesa della pianta dalla eccessiva salinità. In particolare è possibile che il perdurare dello stress salino comporti in piante d'orzo l'innescare dei processi di morte cellulare programmata (PCD).

L'aggiunta di NaCl nonché di mannitolo alle piante d'orzo provocava la comparsa, nel nucleo delle cellule della cuffia radicale, di frammenti mono-oligonucleosomali di circa 200 bp. Gli effetti osservati erano chiaramente dose e tempo dipendenti, indicando un effetto additivo dello stress salino nell'instaurarsi di meccanismi di PCD nelle radici di orzo.

Tra tali effetti osservati, il fenomeno del "DNA laddering" è riconducibile all'induzione di una specifica endonucleasi (Muramoto et al., 1999) che taglia il DNA nelle regioni linker tra i cores nucleosomali, maggiormente esposte a degradazione nucleolitica.

È noto che lo stress salino e l'applicazione di ABA esogeno in orzo inducono l'espressione del gene codificante per una nucleasi, che degrada sia l'RNA e sia il DNA a singolo filamento e che normalmente si ritrova nelle piante senescenti (Muramoto et al., 1999). Infatti è stato evidenziato che durante la senescenza l'espressione di alcuni enzimi degradativi come proteasi ed RNasi è accentuata.

Tra i geni indotti dallo stress salino, è stato identificato un gene che codifica per una nucleasi di tipo I che degrada sia l'RNA e sia i singoli filamenti di DNA, definita *Bnuc1*, inoltre il clone presenta una sequenza di 1283 bp e contiene una open reading frame che codifica per un polipeptide di 290 amminoacidi di massa molecolare 32.4 kDa. La proteina presenta un alto grado di similarità con *BEN1* (barley endonuclease I) e *ZEN1* (zinnia endonuclease I), geni che sono associati alla morte cellulare programmata (Aoyagi et al., 1998). In piante d'orzo sottoposte a stress salino i livelli di espressione e trascrizione di *Bnuc1* aumentano anche applicando ABA esogeno. Questo suggerisce che la proteina *Bnuc1* giochi un ruolo importante nella rimobilizzazione e nel riciclaggio di nutrienti come nucleotidi e fosfati dai vecchi ai nuovi e verdi organi della pianta.

Quindi con la degradazione del DNA si producono nucleotidi che possono essere riciclati per i meristemi (germogli) o per la formazione di nuove cellule radicali, e la degradazione delle proteine può rendere disponibile una parte degli amminoacidi, ad esempio, al termine di uno stress salino solo temporaneo (Katsura et al., 1997).

Nelle radici di piante di orzo cresciute in assenza di azoto è stata notata una consistente attività nucleasica, probabilmente dovuta sia all'attivo recycling dei frammenti nucleosomali verso i tessuti in attiva crescita (es. meristemi), e sia alla limitazione dell'azoto, che nelle piante rappresenta il maggiore e il principale elemento del terreno che regola la crescita. Quindi una condizione di stress nutrizionale tende a mantenere alti i livelli di attività della DNasi. L'aggiunta di azoto provoca sia nelle radici e sia nelle foglie una consistente diminuzione dell'attività misurabile di tale enzima, confermando che gran parte della sua attività è regolata da meccanismi di risposta allo stress abiotico. Nel momento in cui le piante venivano sottoposte a stress salino si evidenziava un rapido e immediato incremento dell'attività della DNasi, parallelamente all'apparizione dei frammenti nucleosomali (laddering). Tale comportamento conferma ulteriormente che lo stress salino in orzo induce meccanismi di risposta allo stress che coinvolgono l'instaurarsi della PCD.

Quindi la degradazione del DNA durante lo stress salino può essere spiegata attraverso una strategia secondo la quale le cellule vanno incontro alla cosiddetta morte cellulare programmata o PCD (Katsura et al., 1997).

Più complessa appare la definizione di un ruolo intrinseco della morte cellulare, ovvero se la PCD in sé abbia o meno un'implicazione fisiologica, infatti queste cellule morte potrebbero separare il disordine del sistema radicale dal resto dei tessuti della pianta, e inoltre potrebbero prevenire l'afflusso di un eccesso di ioni al meristema (Katsura et al., 1997).

Un comune meccanismo di morte cellulare nelle piante è presente come parte essenziale nel rimodellamento dei tessuti che avviene durante i processi di crescita e sviluppo, infatti la PCD in piante è coinvolta anche nella differenziazione dei tessuti conduttori quali gli elementi tracheali, nella formazione dello xilema, nello sviluppo di fiori unisessuali da fiori primordiali bisessuali e nella morfogenesi delle foglie (Gunawardena, 2008), oltre che come una componente delle risposte agli stress abiotici o biotici. La PCD dunque, è un processo essenziale nelle piante ed in quanto tale risulta evolutivamente conservato anche in lievito e metazoi.

Sebbene la PCD presenti significative differenze morfologiche e biochimiche con l'apoptosi in cellule animali, recenti studi su cellule vegetali sottoposte a PCD e cellule umane sottoposte invece ad apoptosi, mostrano l'esistenza di un meccanismo comune di destrutturazione del nucleo, suggerendo che questi due processi si siano originati e successivamente separati a partire da un antenato comune (Dominguez and Cejudo , 2006 ).

Nelle piante è possibile identificare delle caratteristiche comuni che identificano e definiscono la PCD.

Due tipologie, piuttosto differenti di PCD, peculiari delle piante, sono la senescenza e la formazione di una barriera istologica alla penetrazione dei patogeni, che si verifica nel caso della risposta di ipersensibilità (HR).

La senescenza è la morte lenta di cellule e tessuti al termine del loro periodo di vita che si realizza con il disassemblaggio di componenti cellulari e prevede il recupero della maggior parte dei nutrienti contenuti nel tessuto e la loro redistribuzione alle parti della pianta che sopravvivono.

Nella HR la morte cellulare interessa invece porzioni ristrette di tessuto intorno al punto in cui il patogeno entra in contatto con l'organismo ospite. In questo caso lo scopo della morte cellulare è di limitare la

propagazione dell'infezione, agendo direttamente sul patogeno, o limitandone fisicamente la penetrazione.

Molte delle evidenze del concetto di PCD nelle piante derivano dalle osservazioni in queste di frammenti oligonucleosomiali di DNA nucleare, che possono essere osservati mediante l'utilizzo di metodi citologici di colorazione in situ o con elettroforesi su gel d'agarosio. La rottura del DNA nei siti internucleosomiali rappresenta un chiaro marchio biochimico dell'PCD.

Il fenomeno del laddering del DNA è un evento tipico del processo di PCD, che investe la cellula in seguito all'esposizione ad una fonte di stress, si pensa che anche lo stress salino e quindi l'aggiunta di 150 mM di NaCl in su, induca una sorta di apoptosi (apoptosi-like). (Katsuura et al., 1997).

Se sottoposti ad elettroforesi, i filamenti di DNA frammentati dalle endonucleasi danno luogo ad una tipica immagine "a scaletta" (*ladder*), che è una delle caratteristiche distintive dell'apoptosi. In caso di necrosi, invece, le endonucleasi aspecifiche attivate daranno luogo a frammenti di tutte le lunghezze possibili e quindi non si avranno bande oligonucleosomiali nette, ma una miscela di frammenti di lunghezza variabile, che provocano uno "smear", ovvero una "strisciata" nei gel di agarosio.

Nel caso di cellule integre, infine, il DNA rimane ad alto peso molecolare e non migra, in quanto non riesce a penetrare nelle maglie del gel che costituisce il supporto dell'elettroforesi.

Studi effettuati su radici di *Arabidopsis* e mais hanno dimostrato che l'esposizione al D-mannosio è associata a una serie di fenomeni caratteristici dell'apoptosi come la formazione di frammenti oligonucleosomiali nel DNA nucleare. L'induzione del DNA laddering dovuta al mannosio coincide con l'attivazione di una DNasi negli estratti citosolici di

mais, ciò indica che il mannosio sia un potente regolatore della trascrizione genica.

Con il perdurare dello stress, la funzione delle Hsp 70 non è più sufficiente per proteggere le cellule, per cui, si innescano una serie di meccanismi che indirizzano le cellule verso la morte programmata cellulare (PCD).

Durante la PCD, si attivano infatti, specifiche DNasi, che frammentano il DNA in determinati siti. La presenza di tali DNasi è resa evidente da saggi di attività.

È stato infatti osservato, che nella pianta privata di fonte azotata l'attività della DNasi è molto elevata. L'aggiunta di azoto sottoforma di ammonio fa sì che tale attività diminuisca, mentre uno stress da sale fa sì che l'attività aumenti nuovamente.

Quindi appare consistente l'ipotesi che stress salini severi, o periodi prolungati di esposizione al sale provochino l'instaurarsi di fenomeni complessi, come quelli collegati alla degradazione del DNA e quindi riconducibili alla PCD.

Gli effetti degli stress abiotici sono stati analizzati a livello proteomico, mediante elettroforesi bidimensionale, sia su due differenti varietà di orzo (Nure e Tidone) e sia sui campioni di muschio (*Leptodon smithii*) e leccio (*Quercus ilex*) provenienti dai siti campani di Ottati, Capodimonte e Astroni.

L'analisi proteomica comparativa dei gel ottenuti dai campioni di muschio e leccio provenienti dai siti campani, mostrano un'alterazione dei pattern proteici, suggerendo che, a differenza delle zone rurali come Ottati, anche all'interno di aree protette, come il Parco degli Astroni e il parco di Capodimonte, la vicinanza aree urbane fortemente antropizzate ha

esercitato degli effetti sugli organismi vegetali anche in assenza di sintomi macroscopici visibili.

In generale l'analisi proteomica comparativa consiste nella rivelazione delle diverse quantità di proteine in funzione dei differenti criteri fisiologici, di sviluppo e genetici, e i differenti pattern proteici sono la conseguenza delle strategie di adattamento e/o evitamento degli stress adottati dai singoli organismi.

Infatti, i pattern proteici dei campioni provenienti dal parco di Capodimonte situato all'interno di un quartiere densamente popolato di Napoli, e quelli dei campioni provenienti dal parco degli Astroni, anch'esso sito in una zona urbana, mostrano nette somiglianze fra loro, mentre risultano essere molto diversi dai pattern proteici dei campioni provenienti da Ottati localizzato in una zona con basso tasso di inquinamento.

Una differente strategia in seguito all'esposizione ad uno stress è adottata anche all'interno di una stessa specie. Questa ipotesi è stata dimostrata mediante la comparazione dei pattern proteici di due differenti varietà di orzo (Nure e Tidone) sottoposti a differenti livelli di stress salino, e monitorati a differenti tempi di esposizione.

I due cultivar hanno mostrato una diversa risposta allo stress già a livello fenotipico, infatti, dalla comparazione della lunghezza delle radici delle due varietà cresciute in presenza della sola fonte azotata, è stato osservato che, la varietà Tidone aveva un apparato radicale del 31% meno sviluppato rispetto alla varietà Nure.

In seguito all'esposizione a diverse concentrazioni di cloruro di sodio in entrambe le varietà è stato osservata una riduzione dell'apparato radicale, ma gli effetti dello stress erano più evidenti nella varietà Tidone, che, in presenza di 300 mM di NaCl, presentava una riduzione dell'apparato radicale del 66% rispetto al proprio controllo.

Gli effetti negativi dello stress nella varietà Nure erano meno evidenti infatti, le radici di piante cresciute in presenza di 300 mM di NaCl, erano più corte rispetto al controllo solo del 31%.

La differenza tra le due varietà è stata osservata anche dall'analisi dei rispettivi pattern proteici. In entrambe le varietà, in seguito all'esposizione a differenti concentrazioni di cloruro di sodio, è stata osservata una variazione dei livelli d'espressione delle proteine.

Il software PDQuest (Sigma) ha permesso di individuare in entrambe le varietà, alcune delle proteine che, in presenza dello stress salino, sono up-regolate e/o down-regolate, e in seguito, tali proteine, sono state identificate mediante la spettrometria di massa.

Nella varietà Nure, per esempio, è stato osservato che gli spot numero 3, 6 10, 22 durante lo stress salino sono down-regolati, tali proteine sono delle perossidasi che, in accordo con i dati presenti in letteratura, sono down-regolate durante condizioni di stress abiotici.

Tra le tante proteine, è stato identificato, in entrambe le varietà, il fattore di elongazione BLT63 che nella varietà Nure subisce, se paragonati ai rispettivi controlli, una up-regolazione mentre nelle varietà Tidone viene down-regolato.

Le diversa regolazione delle medesima proteina nelle due varietà potrebbe giustificare la differenza riscontrata riguardo lo sviluppo dell'apparato radicale.

Altre proteine identificate, presenti solo nella varietà Nure, sono le thaumatin-like TLP6, ossia proteine espresse in modo specifico in piante in seguito all'attacco di patogeni e in presenza di stress abiotici.

Le analisi indicano chiaramente che proteine coinvolte nella risposta agli stress, e in tal caso coinvolte nella risposta allo stress salino, vengono maggiormente espresse nella varietà Nure rispetto alla varietà Tidone.

In effetti, nelle varietà che risultano essere più resistenti agli stress (es. Nure) i meccanismi di risposta e di tolleranza allo stress hanno un'efficienza superiore rispetto alle varietà sensibili (es. Tidone).

Per un'analisi dettagliata di tutte le proteine coinvolte nella tolleranza e/o resistenza agli stress nelle piante, sono necessari ulteriori studi.

## CAPITOLO 5:

### BIBLIOGRAFIA

Agarwal, M. et al. (2001): *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones* 6, 219-224.

Agarwal, M. et al. (2003): Molecular characterization of rice HSP101: complementation of yeast hsp104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant Mol. Biol.* 51, 543-553

Ali A., Krone P. H., Pearson D. S. and Heikkila J. J. (1996): Evaluation of stress-inducible Hsp 90 gene expression as a potential molecular biomarker in *Xenopus laevis*. *Cell Stress & Chaperones*, 1 : 62-69.

Aoyagi, M. Sugiyama and H. Fukuda. (1998): BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett.* 429, pp. 134-138.

Apuya, N.R. et al. (2001): The *Arabidopsis* embryo mutant schlepperless has a defect in the chaperonin-60 gene. *Plant Physiol.* 126, 717-730.

Baker A. J. M. (1987): Metal tolerance. *New Phytologist*, 106: 93-111.

Banecki B., Zyllicz M. (1996): Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J Biol Chem* 271:6137-6143.

Bargagli R., (1998): Trace elements in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer, Berlin.

Basile A., Cogni A. E., Bassi P., Sorbo S., Giordano S. and Castaldo-Cobianchi R. (200): Accumulation of Pb and Zn in gametophytes and sporophytes of the moss *Funaria hygrometrica* (Hedw.). *Annals of Botany*, 87: 537-543.

Beers E.P., Woffenden B.J., Zhao C., (2000): Plant proteolytic enzymes: possible role during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.*, 44: 399-415.

Benaroudj N, Fouchaq B, Ladjimi MM (1997): The COOH-terminal peptide binding domain is essential for self-association of the molecular chaperone HSC70. *J Biol Chem* 272: 8744-8751.

Bertsch, U. et al. (1992): Identification, characterization, and DNA sequence of a functional 'double' GroES-like chaperonin from chloroplasts of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8696-8700.

Beuron, M.R. et al. (1998): At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J. Struct. Biol.* 123, 248-259

Bierkens J., Maes J., Plaetse F.V. (1998): Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environmental Pollution*, 101: 91-97(7).

Bimston D, Song J, Winchester D, Takayama S, Reed JC, Morimoto RI (1998): BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J* 17: 6871-6878.

Blank A., McKeon T:A., (1989): Single-strand-preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated. *PNAS*, 86: 3169-3173.

Boston, R.S. et al. (1996): Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32, 191-222

Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising principle of protein dye- banding. *Anal. Biochem.* 72, 248- 254 (1976).

Braune W., Header D. P., Hagen C. - 1994: Copper toxicity in the green alga *Hoematococcus lacustris*: Flagellates become blind by copper (II) ions. *Cytibios*, 77: 29-39.

Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W. (2000): Microbial resistance to metals in environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 198-207.

Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366

Chen S., Dickman B.M., (2004): Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J. Exp. Bot.*, 55 (408): 2617-2623.

Cobbet C. S. (2000): Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metals detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 211-216.

Cronje´ M, Bornman L (1999): Salicylic acid influences hsp70/hsc70 expression in *Lycopersicon esculentum*: Dose- and time-dependent induction or potentiation. *Biochem Biophys Comm* 265: 422-427

Crookes WJ, Olsen LJ (1998): The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *J Biol Chem* 273: 17236-17242.

Crosti P., Malerba M., Bianchetti R., (2001): Tunicamycin and Brefeldin A induce in plant cell a programmed cell death showing apoptotic features. *Protoplasma*, 216: 31-38.

De Jong A., Hoerberichts F.A., Yakimova E.T., Maximova E., Woltering E.J., (2000): Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells : involvement of caspase-like proteases. *Planta*, 211: 656-662.

del Pozo O., Lam E., (1998): Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plant to pathogens. *Curr. Biol.*, 8: 1129-1132.

Denecke J, Goldman MHS, Demolder J, Seurinck J, Botterman J (1991): The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. *Plant Cell* 3: 1025-1035.

Dominguez and Cejudo (2006): Identification of a nuclear-localized nuclease from wheat cells undergoing programmed cell death that is able to trigger DNA fragmentation and apoptotic morphology on nuclei from human cells. *Biochem.J.* 397, 529-536.

Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB (1990): Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heatshock cognate protein. *Nature* 346: 623-628.

Frydman, J. (2001): Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 603-647

Fukuda H., (1996): Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.*, 47: 299-325.

Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998): Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82

Goloubinoff, P. et al. (1999): Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13732-13737

Gottesman, S. et al. (1990): Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3513-3517

Greene MK, Maskos K, Landry SJ (1998): Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6108-6113.

Grill D., Winnacker E. L., Zenk M. H. -(1985): Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230: 674-676.

Gunawardena AH, Greenwood JS, Dengler NG. (2004): Programmed cell death remodels leaf plant leaf shape during development. *The Plant Cell* 16, 60-73.

Gunawardena, (2008): Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *Journal of experimental Botany*, Vol.59, No. 3, pp. 445-451.

Gutsche, I. et al. (1999): Group II chaperonins: new TriC(k)s and turns of a protein folding machine. *J. Mol. Biol.* 293, 295-312

Guy CL, Li QB (1998): The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell* 10: 539-556.

Hare PD, du Plessis S, Cress WA, van Staden J (1996): Stress induced changes in plant gene expression. *S Afr J Sci* 92: 431-439.

Hartl, F.U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580

Hemmingsen, S.M. et al. (1988): Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 26, 330-334

Hightower L.E. (1993): A brief prospective on the heat-shock response and stress proteins. *Marine Environmental Research*, 35: 79-83.

Hightower L.E. (1985): Stress response in avian and mammalian cells. In B.D. Atkinson and D.B. Waldens (eds) *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress*, pp.197-210. New York: Academic Press.

Hill, J.E. and Hemmingsen, S.M. (2001): *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress Chaperones* 6, 190-200

Hiramoto K., Ojima N., Sako K., Kikugava K. (1996): Effect of plant phenol is on formation of the spin-adduct of hydroxyl radical. *Biol Pharm Bull.*, 19: 558-563.

Höhfeld J, Jentsch S (1997): GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* 16: 6209-6216.

- Höhfeld J, Minami Y, Hartl FU (1995): Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83: 589-598.
- Imai, J. et al. (2003): The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J.* 22, 3557-3567
- Irmer H, Höhfeld J (1997): Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone hip. *J Biol Chem* 272: 2230-2235.
- Ishikawa, A. et al. (2003): Deletion of a chaperonin 60 b gene leads to cell death in the Arabidopsis lesion initiation 1 mutant. *Plant Cell Physiol.* 44, 255-261
- Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO (1998): Hop modulates hsp70/hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* 273: 3679-3686.
- Kasparzak K. S. (1995): Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investigation*, 13: 411-430.
- Katsuhara M. (1997): Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant and Cell Physiology* 38(9):1091-1093.
- Kourtz, L., and Ko, K. (1997): The early stage of chloroplast protein import involves Com70. *J. Biol. Chem.* 272, 2808-2813.
- Krishna, P. and Gloor, G. (2001): The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell Stress Chaperones* 6, 238-246
- Lam E, Kato N, Lawton M. (2001): Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Lam E., (2004): Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 305-315.
- Leborgne-Castel N, Jelitto-van Dooren EPWM, Crofts AJ, Denecke J (1999): Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 11: 459-469.

Leita L., Contin M., Maggioni A. (1991): Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in root, stem, leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*, 77: 139-147.

Levy-Rimler, G. et al. (2002): Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett.* 529, 1-5

Lewis S., Handy R.D., Cordi B., Billingham Z., and Depledge M.H. (1999): Stress proteins (HSP's): Methods of Detection and Their Use as an Environmental Biomarker. *Ecotoxicology*, 8: 361-368.

Li QB, Haskell DW, Guy CL (1999): Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol Biol* 39: 21-34.

Liu F-H, Wu S-J, Hu SM, Hsiao C-D, Wang C (1999): Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 274: 34425-34432.

Luders J, Demand J, Schonfelder S, Frien M, Zimmermann R, Höhfeld J (1998): Cofactor-induced modulation of the functional specificity of the molecular chaperone Hsc70. *Biol Chem* 379: 1217-1226.

Marchionni M. (1999): Inquinamento del suolo da metalli pesanti: effetti sulle piante. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 maggio 1999.

Mars K. A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferase in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 127-158.

Miernyk JA (1997): The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends Plant Sci* 2: 180-187.

Miernyk JA, Duck NB, Shatters Jr RG, Folk WR (1992): The 70-kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. *Plant Cell* 4: 821-829.

Milioni, D. and Hatzopoulos, P. (1997): Genomic organization of Hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 35, 955-961

Mittler R., Lam E., (1997): Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol. Biol.*, 34: 209-221.

Morelli E., Pratesi E. (1997): Production of phytochelatins in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in response to copper and cadmium exposure. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology*, 59: 657-664.

Muramoto Y., Watanabe A., Nacamura T., Takabe (1999): Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene* 234: 315-321.

Nakamura T et al (1996): Fusion of the nucleoporin gene NUP 98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet* 12: 154-158.

O'Brien EM, Whittaker RJ, Field R. (1998): Climate and woody plant diversity in southern Africa: relationships at species, genus and family levels. *Ecography* 21: 495-509.

O'Brien EM. (1998): Water-energy dynamics, climate, and prediction of woody plant species richness: an interim general model. *Journal of Biogeography* 25: 379-398.

Ouzounidou G. - 1994. Copper induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 34: 165-172.

Pan W. L., Hopkins A. G., Jackson W. A. (1989): Aluminum inhibition of shoot lateral branches of *Glycine max* and reversal by exogenous cytokinin. *Plant and Soil*, 120: 1-9.

Prasad M.N.V. (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*, 35 : 525-545.

- Pratt, W.B. et al. (2001): Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci.* 6, 54-58
- Queitsch, C. et al. (2002): Hsp90 as a capacitor for phenotypic variation. *Nature* 417, 618-624
- Queitsch, C. et al. (2002): Hsp90 as a capacitor for phenotypic variation. *Nature* 417, 618-624.
- Ranson, N.A. et al. (1998): Chaperonins. *Biochem. J.* 333, 233-242
- Rausser W. E. (1999): Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 61-63.
- Reape TJ, McCabe PF. (2008): Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist* 180, 13-26.
- Reape TJ, Molony EM, McCabe PF. (2008): Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* 59, 435-444.
- Ritossa F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophyla*. *Experientia*, 18. 571-573.
- Rout G. R., Samantary S., Das P. (2000): Effect of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non tolerant population of *Echinochloa colona* (L.) Linck. *Chemosphere*, 40: 855-859.
- Rutherford, S.L. and Lindquist, S. (1998): Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336-342
- Rutherford, S.L. and Lindquist, S. (1998): Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336-342.
- Sanders B. M.: Stress protein (1990): potential as multitiered biomarkers. In : L. Shugart and J.McCarthy (eds) *Environmental Biomarkers*, pp. 165-191. Boca Ration, Florida : Lewis Publishers.
- Schirmer, E.C. et al. (1994): An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* 6, 1899-1909

Schirmer, E.C. et al. (1996): Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 289-296

Shetty P., Moktar T., Atallah, Kalidas S. (2002): Effects of UV treatment on the proline-linked pentose phosphate pathways for phenolics and L-DOPA synthesis in dark germinated (*Vicia faba*). *Process Biochemistry* 37,1285-1295.

Shinichi T, Xie Z, Reed JC (1999): An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 274: 781-788.

Siedlecka A. (1995) Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64: 265-272.

Siegel N., Haug A. (1983): Calmodulin-dependent formation of membrane potential in hairy root plasma membrane vesicles: a biochemical model of aluminium toxicity in plants. *Physiologia Plantarum*, 59: 285-391.

Stegeman J. J., Brouwer M., Di Giulio R. T., Forlin L., Fowler B.A., Sanders B. M., Van Veld P. A. (1992): Molecular responses to environmental contamination: enzyme and the protein systems as indicator of chemical exposure and effect. In: Huggett R. J., Kimerle R. A., Mehrle Jr. P. M., Bergman H. L., (eds) *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Hystological Markers of Antropogenic Stress*. Lewis Publishers.

Stein J. C., Hansen G. (1999): Mannose Induces an Endonuclease Responsible for DNA Laddering in Plant Cells. *Plant Phisiology* 121: 71-79.

Sugiyama M., Ito J., Aoyagi S., Fukuda H., (2000): Endonucleases. *Plant Mol. Biol.*, 4: 387-397.

Suh W-C, Lu CZ, Gross CA (1999): Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J Biol Chem* 274: 30534-30539.

Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. (2002): Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577 : 1-9.

Sung D, Vierling E, Guy C (2001): Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis hsp70 gene family. *Plant Physiol* 126: 789-800.

Swidzinski JA, Leaver CJ, Sweetlove LJ. (2004): A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* 65, 1829-1838.

Taiz L., Zeiger E. (2002): *Fisiologia Vegetale*. Piccin Padova: 869-911.

Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. (2002): Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiology* 128, 1271-1280.

Upadhyay R. K., Panda S. K. (2009): Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alteration in freshly grown water lettuce. *Pistia stratiotes* (L). *Science Direct. C. R. Biologies*, 332: 623-632.

Weber-Ban, E.U. et al. (1999): Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401, 90-93

Weber-Ban, E.U. et al. (1999): Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401, 90-93.

Wimmer B, Lottspeich F, Van der Kle I, Veenhuts M, Gietl C (1997): The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70-kDa heat shock protein) of watermelon cotyledons are encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13624-13629.

Wood M., Power J.B., Davey M.R., Lowe K.C., Mulligan B.J., (1998): Factor affecting single-strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.*, 131: 149-159.

Xiong L., Jian-Kang Zhu (2002): Salt tolerance. *The Arabidopsis book*: 1-24.

Xiong, S., Nilsson, C., Johansson, M. E. et al. (2001): Responses of riparian plants to accumulation of silt and plant litter: the importance of plant traits. / *J. Veg. Sci.* 12: 481/490.

Yao N., Greenberg J.T., (2006): Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH 2 modulates programmed cell death. *Plant Cell*, 18: 397-411.

Young, J.C. et al. (2001): Hsp90: a specialized but essential protein folding tool. *J. Cell Biol.* 154, 267-273

Zabaleta, E. et al. (1994): Antisense expression of chaperonin 60b in transgenic tobacco plants leads to abnormal phenotypes and altered distribution of photoassimilates. *Plant J.* 6, 425-432.

Zapata J.M, Guerra A., Esteban-Carrasco A., Martin M., Sabater B., (2005): Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Diff.*, 12: 1277-1284.

Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996): Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272:1606-1614.