

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA



Dipartimento di Ecologia



**Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale
XX Ciclo (2004-2007)**

**Individuazione di biomarker proteici
nell'adattamento di *Posidonia oceanica*
a un ridotto regime luminoso**

Coordinatore

Prof. Aldo Musacchio

Tutor

Prof.ssa Silvia Mazzuca

Candidato

Dr.ssa Dina Filadoro

Settore scientifico disciplinare: BIO/01

PhD thesis, Doctorate Research Program in Plant Biology Ecology
Department – University of Calabria XX Cycle (2004-2007)
Coordinator Prof. Aldo Musacchio

INDICE

INTRODUZIONE

La Proteomica come strumento di analisi per lo studio di popolazioni naturali: *Posidonia oceanica* 3

SCOPO DELLA TESI 10

CAPITOLO 1

Il sistema Biologico

1.1 Sistema vegetale oggetto dell'attività di ricerca: *P. oceanica* 14

1.2.1 Caratteristiche generali 16

1.2.2 Significato ecologico 20

1.2.3 Principali cause di regressione delle praterie 21

CAPITOLO 2

La tecnologia proteomica

2.1 Metodologie di indagine per lo studio del proteoma 22

2.2 Spettrometria di massa 27

CAPITOLO 3

Materiali e metodi

3.1 Modalità di campionamento 32

3.2 Preparazione del campione: estrazione della frazione proteica da foglie e rizomi di *P. oceanica* 33

3.2.1 Preparazione del tessuto e rimozione dei composti fenolici 33

3.2.2 Estrazione delle proteine 34

3.3 Determinazione della concentrazione proteica 35

3.4 Elettroforesi 37

3.4.1 Elettroforesi su gel di poliacrilamide con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) 42

3.4.2 Isoelettrofocalizzazione (IEF) 44

3.4.3 Elettroforesi bidimensionale 46

3.5 Western blot 49

3.6 Spettrometria di massa: Peptide Mass Fingerprinting (PMF) e De Novo Sequencing 51

3.7 Estrazione dei pigmenti clorofilliani da foglie adulte di *P. oceanica* e analisi spettrofotometriche 51

3.8 Analisi citologiche 53

3.9. Acquario: sistema sperimentale controllato per lo studio dell'adattamento di <i>P. oceanica</i> ad un ridotto regime luminoso	54
CAPITOLO 4	
Risultati	
4.1 Estrazione proteica e analisi elettroforetica monodimensionale	55
4.2 Analisi elettroforetica bidimensionale	57
4.3 Analisi elettroforetica monodimensionale di estratti di rizomi ortotropi	59
4.4. Analisi Western-blot mono-bidimensionale da estratti di foglia	60
4.5. Estrazione della clorofilla da foglie adulte di <i>P.oceanica</i> campionate rispettivamente nel sito A e nel sito B	61
4.6 Misure di fluorescenza e trasmittanza allo spettrofotometro a fibre ottiche	63
4.7. Analisi citologiche	64
4.8. Risultati ottenuti analizzando la risposta di <i>P. oceanica</i> a condizioni di luce limitanti	67
4.8.1. Risultati dell'analisi elettroforetica bidimensionale di campioni di foglia adulta di <i>P. oceanica</i> campionate nel sito A e nel sito B	68
4.8.2. Identificazione di alcuni degli spot differenzialmente espressi riscontarti nei due siti di campionamento (sito A e sito B)	71
4.8.3. Risultati dell'analisi elettroforetica bidimensionale di campioni di foglia adulta di <i>P. oceanica</i> campionate ad Ischia (sito C)	74
4.9 Risultati relativi all'allestimento in acquario di un sistema sperimentale controllato.	76
DISCUSSIONE	79
BIBLIOGRAFIA	87
Allegato 1	95
Allegato 2	111

INTRODUZIONE

La Proteomica come strumento di analisi per lo studio di popolazioni naturali: *Posidonia oceanica*

La Proteomica rappresenta lo studio sistematico delle molteplici e differenti proprietà delle proteine, è una scienza che mira ad indagare e stabilire l'identità, la quantità, la struttura e le funzioni biochimiche e cellulari di tutte le proteine in un organismo organo od organello, descrivendo come queste proprietà varino nello spazio, nel tempo o in un determinato stato fisiologico (figura 1).

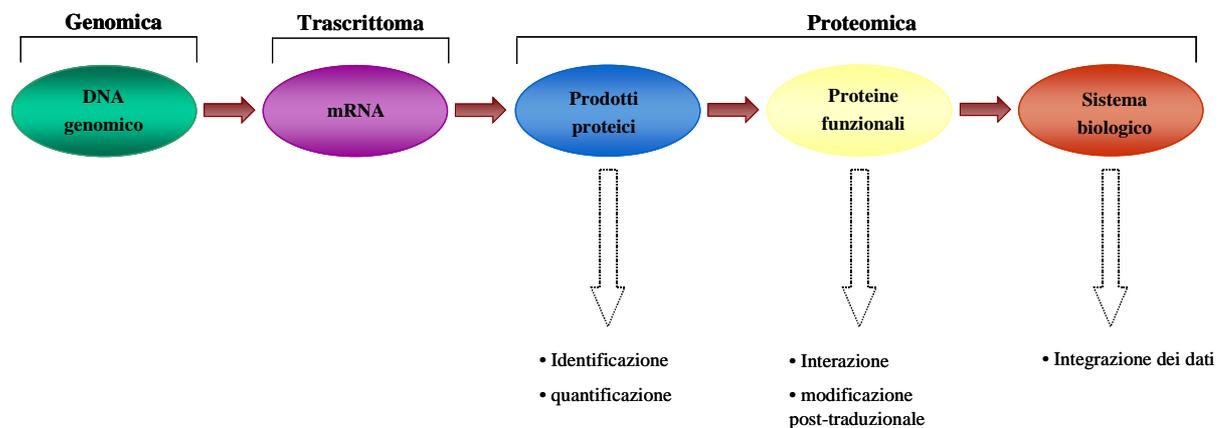


Figura 1. Dalla genomica alla proteomica. Integrazione delle informazioni dal genoma al proteoma per una migliore comprensione dei sistemi biologici.

Mentre il “genoma” è costante per una data cellula ed identico per tutte le cellule di un organismo, e non cambia molto all’interno della specie, il “proteoma” è molto dinamico nel tempo e in risposta a fattori esterni differisce in maniera sostanziale tra i diversi tipi cellulari.

Il termine “proteoma” è stato introdotto per la prima volta nel 1994 al “I 2DE meeting” a Siena e viene definito come il complemento proteico del genoma, e di conseguenza lo studio dello stesso viene indicato con il termine “proteomica”.

Nella sua espressione più classica, il termine proteomica indica lo studio condotto attraverso la separazione di un determinato campione proteico per mezzo di elettroforesi bidimensionale (2-DE), seguita dall’identificazione dei singoli spot mediante l’ausilio della spettrometria di massa (MS) (Wilkins *et al.*, 1996; Anderson & Anderson, 1996). Recentemente lo sviluppo di una proteomica di tipo funzionale e strutturale ha portato ad un ampliamento di intenti conducendo la ricerca un passo più vicino ad una migliore comprensione dei processi e delle funzioni cellulari (Pandey & Mann, 2000).

Ad’oggi, infatti, la proteomica è diventata uno dei maggiori campi nella genomica funzionale (Phizicky *et al.*, 2003). Lo studio dell’espressione funzionale delle proteine e dei meccanismi in cui sono coinvolte, aiuta a comprendere quali siano i meccanismi alla base dell’insorgenza di fattori che alterano il normale funzionamento del programma cellulare e quindi ad identificare le eventuali alterazioni proteiche che ne sono la causa; tutto ciò può portare all’individuazione di biomarker proteici che possono essere utilizzati, come nel caso oggetto dell’attività di ricerca, in popolazioni naturali sottoposte a fattori di stress ambientale biotici o abiotici.

Infatti, accanto alle tradizionali strategie di monitoraggio effettuate per la valutazione dello stato delle praterie di *Posidonia oceanica*, è stato possibile affiancare nuove metodologie atte ad identificare potenziali fattori di rischio e le loro dirette azioni sulle piante ad essi sottoposti, questo con il fine ultimo di consentire una migliore strategia di sorveglianza e conservazione delle stesse.

L’utilizzo di biomarker proteici comporta sicuramente dei vantaggi, uno dei quali è la possibilità di produrre anticorpi monoclonali specifici, una volta identificato e purificato il prodotto proteico.

L’ottenimento di estratti proteici puri e la conseguente analisi dei profili proteici sono dunque alla base di tale approccio metodologico, in quanto la disponibilità di *kit*

diagnostici contribuirebbe a garantire una maggiore affidabilità nella valutazione degli effetti di determinati disturbi ambientali sugli organismi.

La spendibilità di tali strumenti risulterebbe quindi di interesse da parte di enti di ricerca nei progetti di bio-monitoraggio ambientale. Gli svantaggi nell'uso dei biomarker proteici sono, purtroppo, molteplici e riguardano principalmente le modificazioni post-traduzionali (glicosilazione, metilazione, fosforilazione, glicazione, ecc.) a cui queste molecole sono soggette, i vari processi di turnover proteico, e infine la perdita della struttura quaternaria e terziaria (con conseguente perdita di funzione) a cui le proteine vanno incontro durante i processi di purificazione necessari ad ottenere estratti proteici altamente purificati da utilizzare poi nella caratterizzazione molecolare. In ultima analisi va detto che mentre la ricerca proteomica è applicata in modo estensivo in campo animale, in campo vegetale è ancora limitata a poche specie, mi riferisco in particolare ad *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* di cui è noto il proteoma (Jacobs *et al.*, 2000; Setsuko & Hiroyuki, 2006); questo perché i tessuti delle piante contengono contaminanti endogeni non proteici che inficiano l'analisi elettroforetica e che influiscono negativamente sulla qualità e sulla quantità delle entità proteiche estratte. In generale, infatti, l'analisi proteomica di tessuti vegetali è resa difficoltosa proprio dalla preparazione del campione proteico di partenza.

Le cellule vegetali, infatti, sono spesso ricche di proteasi e composti non proteici, principalmente fenoli, polisaccaridi, pigmenti e terpeni, che interferiscono severamente con la stabilità proteica (Gegenheimer *et al.*, 1990; Tsugita *et al.*, 1999). Questi contaminanti comigrano con le proteine durante l'elettroforesi bidimensionale, causando una scarsa risoluzione di separazione dei polipeptidi.

Nel tentativo di risolvere queste difficoltà sono state sperimentate e messe a punto diverse metodiche di estrazione e purificazione al fine di ottenere un'alta solubilizzazione delle proteine ed una riproducibilità del metodo indispensabili per un'analisi bidimensionale valida ed affidabile.

I primi approcci, per ottenere un pattern proteico altamente puro, sono stati sviluppati con protocolli alternativi nei quali le proteine vengono solubilizzate in fenolo (Phe) con o senza SDS e precipitate successivamente in metanolo e ammonio

acetato. Le proteine così purificate vengono risolubilizzate nel buffer desiderato (IEF o SDS-PAGE) (Hurkman & Tanaka, 1986; Mayer *et al.*, 1988).

Il metodo di estrazione fenolica porta ad avere un'efficace resa proteica anche da tessuti che fisiologicamente dovrebbero contenere bassissime concentrazioni proteiche, come quelli del legno (Mijnsbrugge *et al.*, 1988).

Lo stesso protocollo, applicato a piante fortemente recalcitranti, come *Olea europaea* L., ha portato risultati ottimali sia per la quantità di proteine ottenute, sia per il loro grado di purezza. Infatti, nei tessuti della foglia di *O. europaea* sono presenti alti livelli di composti endogeni non proteici, semplici e complessi che la annoverano tra le piante recalcitranti ai comuni metodi di estrazione proteica (Wang *et al.*, 2003).

Tra i metodi proteomici estrattivi che rispondano alle necessità primarie, di preparazione del campione per facilitare l'estrazione, se ne possono considerare quattro: la precipitazione in acido tricloroacetico (TCA)/acetone; la precipitazione ed il frazionamento in TCA/acetone; un'alternativa al secondo metodo, basata sul frazionamento e senza precipitazione; la precipitazione in metanolo/ammonio acetato ed estrazione con fenolo; ottimizzando il protocollo di estrazione col fenolo per piccole quantità di tessuto.

Questo tipo di protocollo è stato messo a punto su specie vegetali recalcitranti, come il banano (*Musa spp.*) e successivamente applicato a due altre specie: il melo (*Malus domestica* L.) e la patata (*Solanum tuberosum* L.). Il banano è una pianta molto rappresentativa tra le specie recalcitranti, poiché contiene molti metaboliti interferenti. Soltanto la classica precipitazione in TCA ed acetone si è rivelata utile come metodo standard, perchè associata ad una perdita minore di proteine.

Ogni metodo estrattivo e la seguente procedura analitica presentano i loro limiti fisico-chimici, dovrebbero essere perciò studiati prima di selezionare un protocollo appropriato, per guidare le impostazioni sperimentali su altre specie non rappresentative per questo aspetto, ma che presentano altri elementi interferenti (Saravanan & Rose, 2004).

Nella maggior parte dei protocolli per l'estrazione delle proteine, è stato introdotto un passaggio di precipitazione per concentrare le proteine e per separarle dai

composti interferenti. Le proteine vengono di solito precipitate dall'aggiunta di alte concentrazioni di sali, di anioni di massa, di acqua mista a solventi organici o di una combinazione di solventi organici e ioni (Carpentier, 2005).

Da quanto si evince dai dati riportati in letteratura dal 1999 ad oggi si è assistito ad uno sviluppo esponenziale delle tecnologie a servizio della proteomica nelle piante, tali nuove metodologie di indagine sono servite per la caratterizzazione del proteoma di 35 specie di piante diverse, anche se l'attenzione è stata principalmente rivolta come detto in precedenza, alla caratterizzazione del proteoma di *Arabidopsis th.* e *Oryza sativa* (Rossignol, 2006). La caratterizzazione del proteoma di tali piante risulta molto più facile rispetto ad altre perché oltre ad essere delle piante modello il loro genoma è stato completamente sequenziato, tutto ciò si traduce con una semplificazione del lavoro di identificazione proteica. Comunque nonostante il genoma di *Arabidopsis th.* sia stato completamente sequenziato ad oggi la funzione di circa 1/3 delle proteine identificate è ancora sconosciuta. Questo significa che individuare la loro localizzazione nella cellula ci potrebbe fornire informazioni utili circa la loro funzione.

Inoltre, la caratterizzazione dell'intero proteoma è possibile quando si ha a che fare con genomi relativamente piccoli come quello di *Arabidopsis th.* (120 Mb) o come quello di riso (480 Mb), o quando il proteoma cellulare totale viene frazionato nei suoi componenti subcellulari; pertanto per ridurre la complessità del campione, negli ultimi anni sta prendendo piede la caratterizzazione proteomica di organi ben distinti, nonché di compartimenti subcellulari come mitocondri, cloroplasti e nucleo.

Poiché, il frazionamento può causare inevitabilmente la presenza di contaminanti nell'estratto è sempre utile accertarsi della presenza dei contaminati prima di procedere con la successiva caratterizzazione molecolare.

Gli studi condotti su organelli come cloroplasti e mitocondri dal gruppo di ricerca di Norbert Roland del CNRS di Grenoble ha permesso di disporre di specifici protocolli di estrazione che prevedono, nel caso dei cloroplasti, una loro prima separazione utilizzando un gradiente di saccarosio e una successiva purificazione dell'estratto per rimuovere la clorofilla e i carotenoidi che in qualche modo inficiano l'analisi (Ferro *et al.*, 2000; Ferro *et al.*, 2003).

Da due anni a questa parte le conoscenze sul proteoma organellare hanno quindi subito un salto in avanti, sono stati, infatti, acquisiti una moltitudine di dati che hanno permesso la creazione di specifici DATABASE organellari; due plastidiali (PPDB, plprot- Friso *et al.*, 2004; Kleffmann *et al.*, 2006) uno mitocondriale (AMPDB-Heazlewood *et al.*, 2005) uno nucleare (AtNo PDB –Brown *et al.*, 2005).

Oltre a questi database sono presenti anche delle banche dati che danno informazioni sulle proteine totali questo è il caso per esempio di *Arabidopsis th.* e *Oryza sativa* (Komatsu, 2005). Infine va detto che molti studi sono stati volti alla caratterizzazione proteomica (identificazione della componente proteica) della membrana plasmatica, della parete cellulare nonché all'identificazione delle proteine extracellulari, anche se le informazioni circa l'identificazione proteica di questi componenti cellulari non sono stati assemblati in uno specifico database.

Sulla base delle conoscenze acquisite, abbiamo avviato uno studio su un sistema vegetale, particolarmente complesso, che presenta alti livelli di composti fenolici e basse concentrazioni di proteine, *Posidonia oceanica* (L.) Delile.

È stata scelta come sistema oggetto del nostro studio la *P. oceanica* perché tale pianta, oltre ad essere molto sensibile agli agenti inquinanti e quindi un buon indicatore biologico, racchiude in sé una serie di sfide: è una pianta che presenta un elevato grado di adattabilità ambientale, è in regressione perché minacciata da una serie di disturbi ambientali, ed è risultata recalcitrante ai comuni metodi di estrazione proteica (imponendo quindi la messa a punto di uno specifico protocollo di estrazione). Racchiude quindi tutte le problematiche scientifiche e tecniche tipiche dei sistemi vegetali non-modello. Il problema principale, che insorge quando si lavora con piante come *P. oceanica*, riguarda la difficile interpretazione dei dati e la difficoltà nel riconoscimento proteico.

Il riconoscimento proteico è reso difficile dal momento che poco si sa sul genoma di tale specie, difficoltà che invece viene superata quando si lavora con specie come *Arabidopsis th.* in ragione della sua versatilità e dell'ampia disponibilità di risorse molecolari e bioinformatiche ad essa relative, non ultimo il fatto che nel 2000 è stato completato il sequenziamento genico.

Di conseguenza se si hanno informazioni circa il genoma si hanno anche informazioni sul proteoma delle specie in esame.

Quando al contrario si studia il proteoma di piante geneticamente sconosciute o poco note come *P. oceanica* il riconoscimento delle proteine è molto più difficoltoso e nella maggior parte dei casi viene effettuato tramite il confronto di fingerprint teorici e/o sperimentali presenti in banca dati.

Inoltre lavorare con specie modello come *Arabidopsis th.* risulta molto più semplice per tutta un serie di motivi: si può disporre di una grande quantità di materiale, di piante di piccole dimensioni che possiedono un ciclo vitale breve e, che possono essere facilmente cresciute in laboratorio e sottoposte a tutta una serie di test per verificare le risposte della pianta stessa a modificazioni di parametri biotici e abiotici.

Nonostante le difficoltà riscontrate sia a livello tecnico che prettamente legate al sistema analizzato, per tutta una serie di motivi che ho elencato precedentemente, lo studio del genoma funzionale di *P. oceanica*, a livello di proteina, rappresenta uno degli aspetti più interessanti che possono contribuire all'identificazione delle strategie di adattamento e/o di difesa che la pianta adotta in condizioni di pressioni ambientali, e quindi risalire all'identificazione di eventuali biomarker proteici.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare l'adattamento di *P. oceanica* ad un ridotto regime luminoso, e individuare, sia tramite studi di proteomica funzionale che tramite analisi citofisiologiche, eventuali biomarker proteici da correlare a fenomeni di adattamento a basse intensità luminose. Gli studi sono stati eseguiti su piante provenienti da due praterie dislocate in due località dell'Alto Tirreno Cosentino e precisamente: prateria Isola di Dino (Praia a Mare - CS), sito fortemente antropizzato, considerato come sito di disturbo (sito A); prateria di controllo San Nicola Arcella -CS. (sito B) (figura 1).

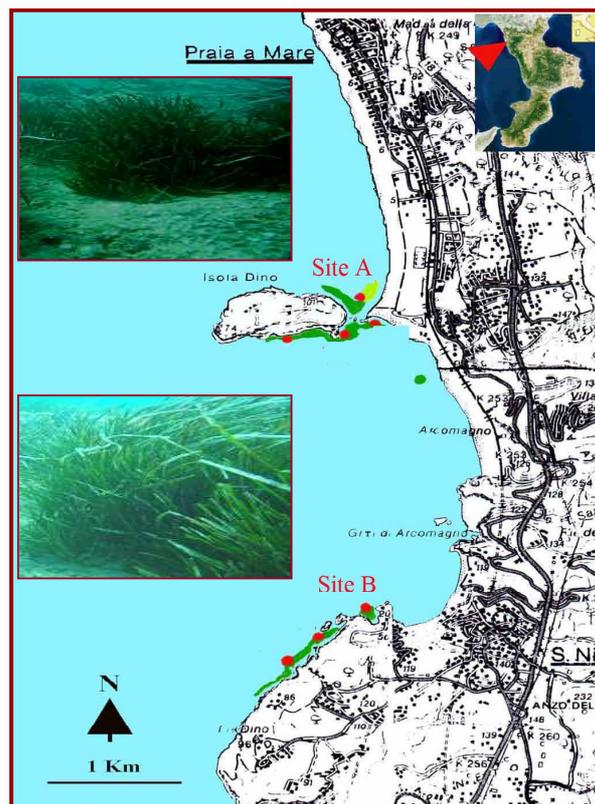


Figura 1. Aree di campionamento

Le praterie di San Nicola Arcella, sulla base di evidenze macrostrutturali e fenologiche (Acunto *et al.*, 2006) si presentano in ottimo stato di conservazione rispetto alle praterie insediate a nord dell'isola di Dino che appaiono invece soggette, ad una più elevata pressione antropica, e a fenomeni di intorbidamento delle acque per la presenza del fiume Noce. Le due praterie si trovano ad una distanza di 3.5 Km l'una dall'altra, i campionamenti sono stati eseguiti allo stesso orario ad una profondità di circa 10 m da piante sottoposte alle stesse condizioni macro-climatiche, fatta eccezione per quanto riguarda l'intensità di luce incidente; infatti, la misura per circa un anno consecutivo della radiazione luminosa incidente sulle due praterie ha rilevato valori medi doppi nel sito B rispetto a quelli registrati nel sito A (figura 2).

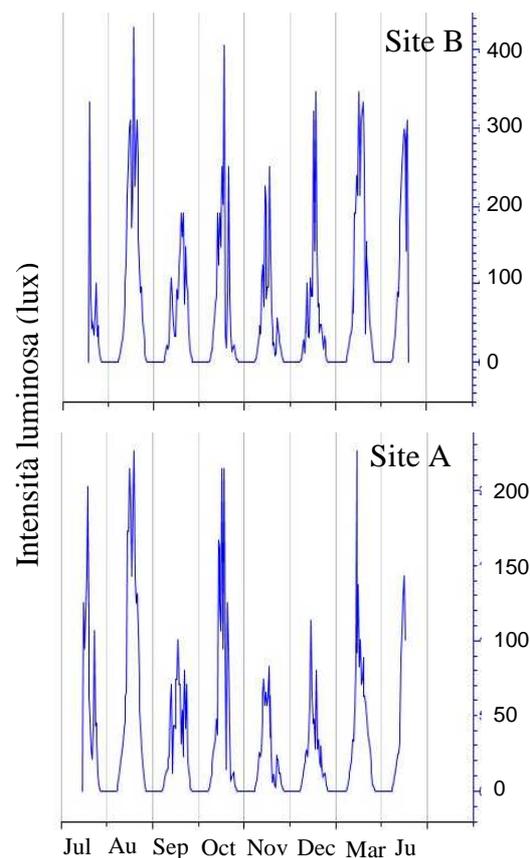


Figura 2. Intensità luminosa (lux) registrata per circa un anno (Luglio 2005 - Giugno 2006) nei siti di campionamento (sito A - sito B) utilizzando la sonda HOBO(R) Pendant IM temperature/light.

Inoltre, per verificare se le differenze in termini quantitativi dei livelli di espressione proteica riscontrate nelle due praterie (sito A, sito B), soggette a diverse condizioni quali-quantitative dello spettro luminoso, fossero da ascrivere a processi di acclimatazione a lungo termine alle condizioni di scarsa luminosità e non a tipiche caratteristiche della popolazione in esame, abbiamo esteso i nostri studi al proteoma foliare di campioni ottenuti da piante prelevate a batimetria diversa (-5m e -22m) da una prateria insediata lungo un gradiente di profondità (sito C - Lacco Ameno Ischia).

In ultima analisi, per validare i risultati ottenuti, abbiamo allestito in acquario un sistema sperimentale controllato per lo studio della risposta di *P. oceanica* allo “stress luminoso”. Le piantine sono state acclimatate in acquario a diversa intensità luminosa per circa un mese.

E' ovvio che disturbi dell'intensità e delle componenti spettrali della luce radiante possono assumere carattere di “stress” fino a causare alterazioni morfologiche e/o biochimiche dell'apparato e del processo fotosintetico. Gli effetti causati da una diminuzione dell'irraggiamento sulle piante terrestri sono da tempo studiati. Infatti, tale condizione provoca una serie di modificazioni e meccanismi di adattamento all'ombra come la formazione delle così dette “foglie d'ombra” che, rispetto alle foglie normo-esposte, si presentano generalmente con una superficie più ampia ed hanno cloroplasti più grandi, un più elevato contenuto in clorofilla, un più basso rapporto clorofilla *a*/clorofilla *b* oltre ad un più basso punto di saturazione luminosa e di fissazione della CO₂ (Chapelle *et al.*, 1992; Schiefthaler *et al.*, 1999).

Al contrario, le conoscenze sugli effetti fisiologici di tali modificazioni in fanerogame marine quali *P. oceanica* sono solo da poco tempo oggetto di approfondimento, e comunque non seguono un meccanismo univoco in tutte le specie.

Infatti, molte *seagrasses*, così come del resto avviene nelle foglie d'ombra delle piante terrestri (Schiefthaler *et al.*, 1999) a condizioni di stress luminoso negativo, aumentano il contenuto in clorofilla proprio per massimizzare l'assorbimento della luce disponibile (Major & Dunton, 2002).

Tuttavia alcune specie possono anche non variare, nelle citate condizioni, il contenuto in clorofilla (Neely, 2000), mentre altre, tra cui *Zostera capricorni* e

Cymodocea serrulata, ne riducono addirittura il contenuto, quando viene dimezzata loro la normale disponibilità luminosa ambientale (Dawson & Dennison; 1996).

Quindi, alla luce di quanto detto, al fine di valutare come *P. oceanica* risponde fisiologicamente a variazioni dell'intensità luminosa, contemporaneamente alle analisi proteomiche sono state condotte anche analisi citometriche e spettrofotometriche.

Dai risultati ottenuti e da quanto presente in letteratura, si evince una risposta molto articolata del riarrangiamento dell'apparato fotosintetico di fanerogame marine sottoposte a basse condizioni di luminosità. In più è da premettere che la capacità fotosintetica in *P. oceanica* è da ritenersi conseguenza di una risposta multifattoriale che vede nella radiazione luminosa la componente principale ma che può essere influenzata anche da altri fattori quali la temperatura, la presenza e la composizione dei nutrienti che possono agire sinergicamente con la luce (Pedersen, 1993) rendendo spesso il dato della risposta locale e non generalizzabile (Alcoverro *et al.*, 2001).

Tuttavia la scelta dei siti e le metodiche di campionamento effettuate hanno cercato di ridurre al minimo le variabili prevedibili.

CAPITOLO 1

Il sistema biologico

1.2. Sistema vegetale oggetto dell'attività di ricerca: *P. oceanica*

La *P. oceanica* è una fanerogama marina presente esclusivamente nel Mediterraneo bacino nel quale ha trovato le condizioni ambientali ottimali di temperatura, salinità e trasparenza delle acque. Essa appartiene a quel gruppo di piante che comunemente vengono chiamate *seagrasses* per via della loro morfologia e della loro capacità di formare letteralmente delle “praterie marine”(figura 1.1).



Figura 1.1. Prateria di *P. oceanica*

L'areale di *P. oceanica* si estende dalla superficie fino a circa 30-35 metri di profondità, spingendosi a volte fino a quaranta metri in acque particolarmente limpide (Duarte, 1991a).

Le fanerogame marine contano circa 50 specie e dal punto di vista tassonomico appartengono a cinque famiglie: *Posidonaceae*, *Zosteraceae*, *Cymodoceaceae*, *Hydrocaritaceae*, *Ruppiaceae*. Tuttavia su tassonomia e numero di specie non vi sono pareri unanimi a causa di diversi criteri sistematici adottati (Hemminga & Duarte, 2000). Esse mostrano una morfologia simile a quella delle piante terrestri presentando radici, rizoma (che funge da fusto modificato) e foglie. Studi filogenetici possono efficacemente spiegare le strettissime affinità fisiomorfologiche delle fanerogame marine con le piante terrestri. Infatti l'ordine *Helobiae*, di cui *P. oceanica* fa parte, è costituito da piante vascolari che, svincolatesi evolutivamente dal mare, sono in seguito ritornate a colonizzare le acque.

Molte teorie indicano che dalle Angiosperme terrestri si siano evolute specie capaci di sopravvivere ad immersioni episodiche e/o cicliche nelle acque salate come quelle causate da fenomeni di marea. In effetti, la ricolonizzazione marina sarebbe avvenuta durante il Cretaceo, circa 100 milioni di anni fa come molti ritrovamenti fossili lasciano ritenere, da parte di piante che svilupparono capacità osmoregatorie in grado di permettere la resistenza a periodi di immersione (Larkum & den Hartog, 1989).

Successivamente l'evolversi dell'impollinazione idrofila ha permesso che si sviluppassero piante capaci di compiere il loro intero ciclo biologico in *habitat* marino (Cox *et al.*, 1992). Secondo la teoria più accreditata, il genere *Posidonia* aveva in passato un areale molto più ampio, che comprendeva sia regioni tropicali sia temperate, la competizione con altre piante meglio adattatesi alla vita lungo la fascia tropicale ha relegato tali piante solo nelle regioni temperate. Attualmente, infatti, il genere *Posidonia* presenta una distribuzione bipolare: delle nove specie note la *P. oceanica*, come già detto precedentemente, è endemica del mar Mediterraneo, mentre le rimanenti otto specie sono diffuse nei mari dell'Australia (figura 1.2).



Figura 1.2. Areale del genere *Posidonia*

1.2.1. Caratteristiche generali

La morfologia di *P. oceanica* è del tutto tipica. Nella parte superiore del rizoma è situato l'apice vegetativo da cui si originano foglie nastriformi con apici arrotondati della larghezza media di circa un centimetro ed organizzate in tipici fasci, nell'ambito di ogni fascio, le foglie si dispongono a ventaglio le più vecchie, di maggiore lunghezza, sono esterne, mentre le più giovani, di taglia inferiore, si trovano all'interno del fascio stesso (figura 1.3).

Esse sono differenziate in un lembo fotosintetizzante ed in una base presente solo nelle foglie che hanno raggiunto un certo grado di sviluppo (foglie adulte) ed in una base che può mostrarsi più o meno lignificata in rapporto all'età. Il limite tra queste due zone (base e lembo) è rappresentato da una linea concava detta ligula, in corrispondenza della quale le foglie più vecchie tendono a staccarsi, lasciando sul rizoma le basi che con il tempo si riducono a sottili scaglie e persistendo, formano una sorta di manicotto avvolgente il rizoma.

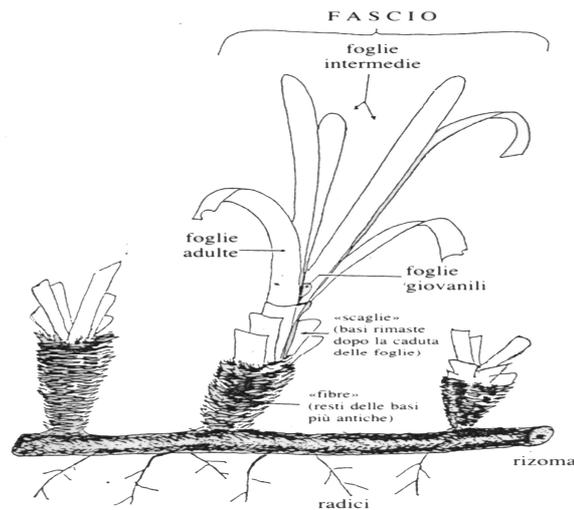


Figura 1.3. Fascio di foglie di *P. oceanica* in cui sono rappresentate le tre diverse tipologie di foglie (adulte, intermedie, giovanili)

Quindi, a seconda della presenza o meno della base e della lunghezza delle foglie, che può raggiungere anche il metro e mezzo, convenzionalmente si distinguono: foglie giovanili (< 5cm), intermedie ed adulte (Giraud, 1979). E' importante sottolineare l'accrescimento basale delle foglie che, in piante colonizzate da epifiti, contribuisce a ridurre l'ombreggiamento dei tessuti in accrescimento e differenziazione da parte di questi stessi organismi. L'attività fotosintetica sembra confinata quasi esclusivamente negli strati epidermici della foglia mentre, al contrario di quanto avviene nelle piante emerse, risulta scarsa nel mesofillo.

Le cellule epidermiche presentano, infatti, numerosi e ben sviluppati cloroplasti oltre a molti organelli, indice questo di un'intensa attività metabolica.

Le *seagrasses* sono considerate dal punto di vista fotosintetico come piante C3 ma spesso ritroviamo anatomie della foglia che sembrerebbero appartenere a specie intermedie tra C3 e C4 suggerendo anche la presenza di particolari meccanismi di

concentrazione del carbonio per favorire l'azione della Rubisco (Kuo, 1983; Touchette & Burkholder, 2000).

Infatti solo poche piante terrestri adattate all'ombra presentano una disposizione cloroplastica prevalentemente epidermica confrontabile con quanto riscontrato in *P. oceanica*.

Continuando a parlare delle caratteristiche generali della *P. oceanica* possiamo approfondire il discorso dei rizomi; i rizomi sono fusti modificati che presentano la caratteristica di accrescersi sia in senso orizzontale (rizoma plagiotropo o tracciante) che verticale (rizoma ortotropo). Quelli plagiotropi hanno la funzione di ancorare la pianta al substrato, quelli ortotropi invece, crescendo in altezza, contrastano il progressivo insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione e permettono in tal modo di sfruttare al massimo lo spazio e la luce disponibili, più strati di rizomi, assieme al sedimento in esso compattato, formano una particolare struttura detta *matte* che può raggiungere diversi metri di spessore (Green & Short, 2003).

I rizomi, dunque, intrappolano grandi quantità di sedimenti contribuendo così ad aumentare la qualità delle acque e nel contempo a limitarne la torbidità (Terrados & Duarte, 2000). Inoltre, le fronde formate da foglie lunghe anche un metro, agendo come massa frenante del moto ondoso, smorzano l'impatto idrodinamico sul litorale (figura 1.4).

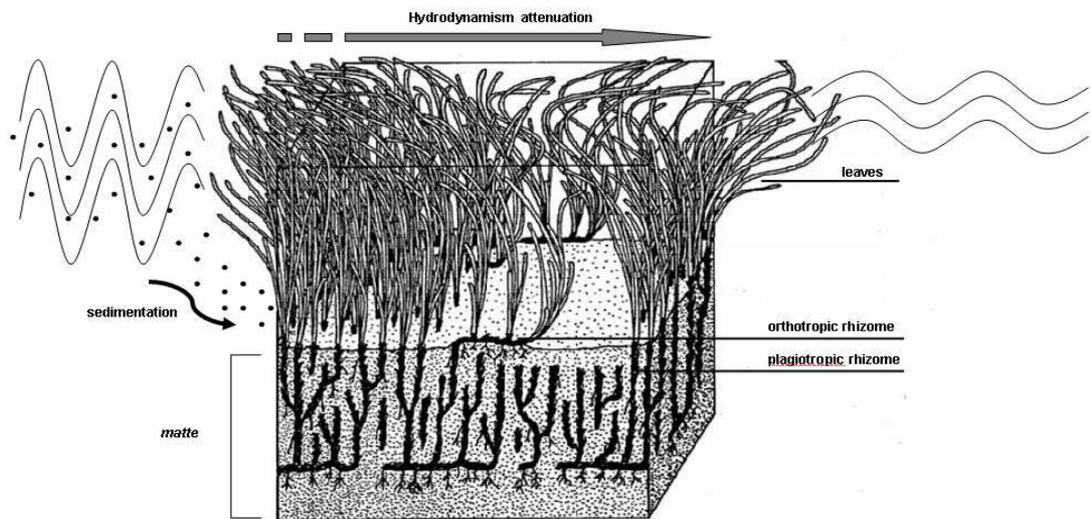


Figura 1.4. Rappresentazione schematica di una prateria di *P. oceanica*

Per quanto riguarda la biologia riproduttiva, *P. oceanica* presenta sia riproduzione sessuale, con formazione di fiori e frutti, che riproduzione asexuale, per stolonizzazione. In caso di riproduzione sessuale, la pianta produce infiorescenze recante tre sette fiori di cui alcuni ermafroditi ed altri maschili (figura 1.5).



Figura 1.5. Infiorescenza di *P. oceanica*

Dai fiori maturano frutti che si staccano dalla pianta madre e galleggiano fino alla rottura del pericarpo che libera il seme che darà origine ad una nuova pianta.

Nelle praterie superficiali a circa 15 m di profondità, i fiori compaiono nei mesi di Settembre-Ottobre, mentre alla fine della stagione autunnale si possono già osservare i primi fiori fecondati e l'inizio dello sviluppo dei frutti. Nelle praterie invece insediate a profondità superiore ai 15 m il ciclo è ritardato di circa due mesi. La fioritura è un fenomeno abbastanza raro ed è influenzato da una serie di fattori come la Temperatura la profondità ed il tipo di substrato in cui si trova la prateria. La stolonizzazione rimane comunque la principale modalità di riproduzione vegetativa di *P. oceanica* essa si verifica per moltiplicazione ed accrescimento dei rizomi plagiotropi ed ortotropi.

1.2.2. Significato ecologico

Le praterie a *P. oceanica* rivestono un ruolo di fondamentale importanza nell'economia generale delle aree costiere di fondo mobile per l'influenza che queste piante rivestono, dal punto di vista energetico, sulle comunità animali e vegetali che in essa trovano riparo. L'elevata produzione di ossigeno (20 l/m²/giorno) e l'ampia disponibilità di biomassa vegetale (30t/ha), infatti, fanno sì che la prateria costituisca un ambiente di grande interesse trofico e riproduttivo per molte specie (Della Croce *et al.*, 1997; Gambi, 2002). Nel suo complesso, quindi, le praterie a *P. oceanica* rappresentano l'ecosistema tra i più estesi e produttivi della regione mediterranea (Pergent *et al.*, 1994; Pergent Martini *et al.*, 1994). È facile capire, dunque, l'importanza che tale pianta riveste nell'ecosistema marino e di come questa abbia forti interazioni sia con le componenti biotiche che abiotiche.

1.2.3. Principali cause di regressione delle praterie

I vari studi scientifici che già a partire dagli anni cinquanta sono stati condotti sull'argomento, oltre ad evidenziare come descritto l'estrema importanza delle praterie a *P. oceanica* nella conservazione degli equilibri degli ecosistemi costieri, hanno messo in luce gravi fenomeni di regressione che interessano molti tratti costieri del Mediterraneo, soprattutto nelle fasce più superficiali (Duarte, 2000) dovute sia a causa di tecniche di pesche deleterie per i fondali (Pasqualini *et al.*, 1999), sia per lo sversamento nelle acque marine di sostanze tossiche e/o nocive e degli stessi scarichi civili. Anche la diffusione di specie vegetali alloctone, fortemente invasive e di grande capacità colonizzatrice, in particolare *Caulerpa taxifolia*, sembra poter causare danni alla prateria o quantomeno ostacolarne i processi di ricolonizzazione lì dove questa risulti diradata o danneggiata. Gli effetti di disturbo su questa fanerogama stanno ormai diventando causa di grave alterazione degli ecosistemi marini da essa caratterizzati (Whitfield *et al.*, 2004) con conseguente riduzione degli habitat, perdita di biodiversità, alterazione della rete trofica, riduzione della funzionalità ecologica, della capacità di controllo dei meccanismi di erosione costiera, della produttività, della qualità ambientale e così via. La nostra attività di ricerca ha, quindi, come finalità quello di indagare i meccanismi fisiologici di questa pianta in risposta alle interazioni con fattori naturali e/o antropici in modo da poter ottenere anche eventuali ricadute applicative di tutela e salvaguardia della stessa.

CAPITOLO 2

La tecnologia proteomica

2.1. Metodologie di indagine per lo studio del proteoma

L'analisi del proteoma è una disciplina scientifica emergente, che consente un approccio allo studio dell'espressione genica da un punto di vista globale, attraverso una combinazione di tecnologie che consentono di risolvere, identificare, quantificare e caratterizzare le proteine (Wilkins *et al.*,1997). In un progetto proteomico, il primo passo consiste nel comprendere il tipo di campione da analizzare, decidendo quali proteine si vogliono separare e caratterizzare. Una volta preparato correttamente il campione, i vari polipeptidi vengono separati tramite analisi bidimensionale e/o MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Tecnology*) e poi puntualmente identificati tramite spettrometria di massa e caratterizzati attraverso la ricerca di sequenze omologhe presenti in banche dati per (figura 2.1).

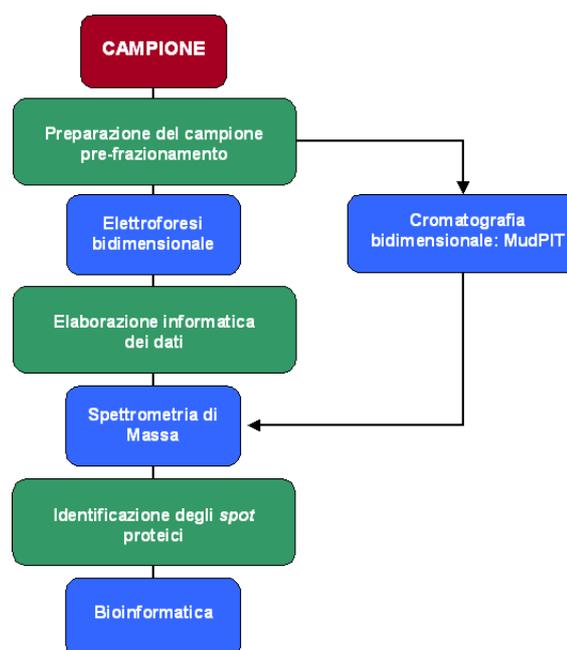


Figura 2.1. Schema di un progetto proteomico

La tecnologia MudPIT o *shotgun proteomics* è di recente introduzione. I primi risultati promettenti, circa l'utilizzo di questa metodica, si ebbero quando Hunt e collaboratori (Hunt, 1992) dimostrarono la capacità della cromatografia liquida combinata con la spettrometria di massa (LC-MS/MS) di poter analizzare complesse miscele peptidiche attraverso un approccio che non prevedeva l'utilizzo di gel.

Pochi anni più tardi Yates ed i suoi colleghi (Yates, 1997) svilupparono un sistema di separazione in fase liquida interfacciato con uno spettrometro di massa definendolo con il nome di *Multidimensional Protein Identification Technology*, tale metodica mostra la capacità di rendere possibile la catalogazione di centinaia di migliaia di componenti generate da un singolo esperimento. Il campione da analizzare viene sottoposto a digestione enzimatica al fine di frammentare le proteine in peptidi.

Il campione viene iniettato in HPLC e sottoposto a separazioni in una colonna a scambio ionico; ogni frazione ottenuta da questo passaggio è automaticamente caricata in una colonna a fase inversa e da questa passa direttamente in spettrometria di massa.

Nonostante tale metodica consenta di raggiungere lo scopo della ricerca, in un modo più diretto e veloce rispetto alla 2-DE, richiede un notevole investimento in strumentazione e soprattutto in *software* per l'analisi dei dati, e comunque non consente il più delle volte la rivelazione e l'analisi di tutti i peptidi presenti nel campione preso in esame.

Quindi, a dispetto di tutte le limitazioni che la 2-DE possiede, e che sono legate all'elevata diversità chimica delle proteine e al loro differente livello di espressione nella cellula (Corthals, 2000), essa possiede molteplici caratteristiche e proprietà che hanno reso difficile la ricerca di una valida alternativa che possa sostituirla *in toto* negli studi volti alla mappatura del proteoma. A tutt'oggi, infatti, non esiste un'altra tecnica che possa fornire informazioni ricche e dettagliate su una particolare proteina in esame in termini di quantità relativa, pI, peso molecolare e solubilità.

Inoltre, l'applicazione di questa metodologia, ha permesso a diversi gruppi di ricerca di poter iniziare un'analisi globale delle proteine così da permettere la costruzione sistematica di banche dati contenenti mappe bidimensionali facilmente consultabili in rete.

Un ulteriore approccio per lo studio del proteoma è stato sviluppato da Smith e collaboratori (Conrads, 2000; Smith, 2001; Smith, 2002) che hanno analizzato un digerito proteolitico *in toto*, utilizzando un sistema di cromatografia capillare ad altissima risoluzione, in combinazione con uno spettrometro di massa a risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR-MS).

In ogni modo, nonostante la *shotgun proteomics* determini una identificazione su larga scala delle proteine e quindi possieda notevoli vantaggi, presenta però ancora, come detto precedentemente, dei limiti.

In ultima analisi, va detto, che lo scopo principale perseguito dall'indagine proteomica è quello di risalire all'analisi quantitativa e al confronto dell'espressione proteica tra un sistema biologico in condizioni normali ed uno in condizioni alterate, o quantomeno al monitoraggio delle stesse caratteristiche durante le diverse fasi di sviluppo del sistema in esame.

La metodica corrente più usata ancora una volta è la 2-DE, attraverso la quale le catene polipeptidiche sono visualizzate e quantificate per mezzo delle procedure di colorazione. Il blu Coomassie è il colorante di gran lunga più utilizzato grazie alla sua semplicità d'uso e alla sua compatibilità con altre tecniche analitiche come la spettrometria di massa; la sua relativa sensibilità (circa 1µg) però limita la sua estensione allo studio di proteine debolmente espresse o poco rappresentate.

Dal momento che l'analisi delle mappe polipeptidiche su gel bidimensionali non può prescindere da una valutazione statistica di tipo morfometrico-densitometrico, la scelta dei metodi colorimetrici per la visualizzazione dei vari gruppi di polipeptidi rappresenta un importante elemento tecnico da cui è difficile e rischioso prescindere.

I coloranti con il più elevato grado di sensibilità sono quelli a base di sali di argento. Tali colorazioni si basano sull'affinità delle proteine per l'Argento.

In letteratura sono presenti diverse metodiche di colorazione basate su sali di argento che possono essere suddivise in due grandi famiglie: una utilizza AgNO_3 e come sviluppo una soluzione alcalina di carbonato e formaldeide; l'altra utilizza un complesso di Ag-NH_4 e come sviluppo una soluzione di acido citrico e formaldeide. Le colorazioni a base di Ag-NH_4 sono caratterizzate da un minore background e una

colorazione degli spots più intensa rispetto a quelle con AgNO₃ ma sono tutte incompatibili con la spettrometria di massa.

Con una sensibilità di poco inferiore a quelle a base di sali di Ag vi sono le colorazioni con coloranti fluorescenti, quali le colorazioni a base di RuBP come il Sypro Ruby (19 Genova) ed il Sypro Orange.

Un approccio, per una quantificazione differenziale delle proteine, è quello che prevede l'uso della "Difference Gel Electrophoresis" (DIGE) che utilizza la formazione di legami covalenti tra gli ε ammino-gruppi della lisina con differenti coloranti fluorescenti. Quando si esegue questa procedura, le proteine di due o tre popolazioni di campioni sono marcate differentemente con dei coloranti fluorescenti (succinimidil esteri o diversi coloranti derivati dalla cianina Cy2, Cy3, Cy5).

Questo, rende possibile utilizzare un solo gel per la separazione proteica e per la quantificazione delle differenze tra i campioni.

La tecnologia DIGE offre vantaggi eccezionali nel superare i vari problemi correlati con l'elettroforesi 2D tradizionale come la variazione sperimentale tra gel e gel (Tonge, 2001; Unlu, 1997), il limitato intervallo dinamico dei sistemi di post-colorazione (esp. nitrato di argento), consentendo in ultimo anche una evidente riduzione dei tempi di analisi. E' una tecnologia recente ed ancora poco applicata nel campo vegetale (Kubis *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2004) e comunque presenta delle limitazioni, infatti, dato che la quantificazione attraverso la 2-DE si basa sull'assunzione che in ciascun spot sia presente una proteina, i fenomeni di co-migrazione possono compromettere questa analisi. Inoltre, occorre ricordare che una rappresentazione completa del proteoma è comunque impossibile. Quindi, seppur considerando l'elevato grado di "maturità" della tecnica e seppure la 2-DE sia in continua evoluzione, la ricerca di metodiche alternative e sempre più aggiornate rappresenta la continua sfida dei ricercatori impegnati in questo settore. Un passo significativo nel campo della proteomica differenziale è stato fatto quando si è sviluppato il procedimento di marcatura isotopica seguito da analisi quantitativa attraverso spettrometria di massa. Questo approccio si basa sulla marcatura differenziale del campione controllo e di quello sperimentale, il loro mescolamento e

la misura delle differenze relative dell'espressione proteica tra i due MS-mediata. A tutt'oggi, esistono molteplici tecniche di marcatura, attraverso procedimenti biologici e chimici, e ciascuna può essere utilizzata in maniera peculiare per marcare le proteine durante un diverso step di preparazione del campione (figura 2.2). Queste metodologie di recente introduzione negli studi proteomici in pianta, presentano tutta una serie di limitazioni soprattutto se si pensa all'elevato costo del materiale utilizzato per la marcatura.

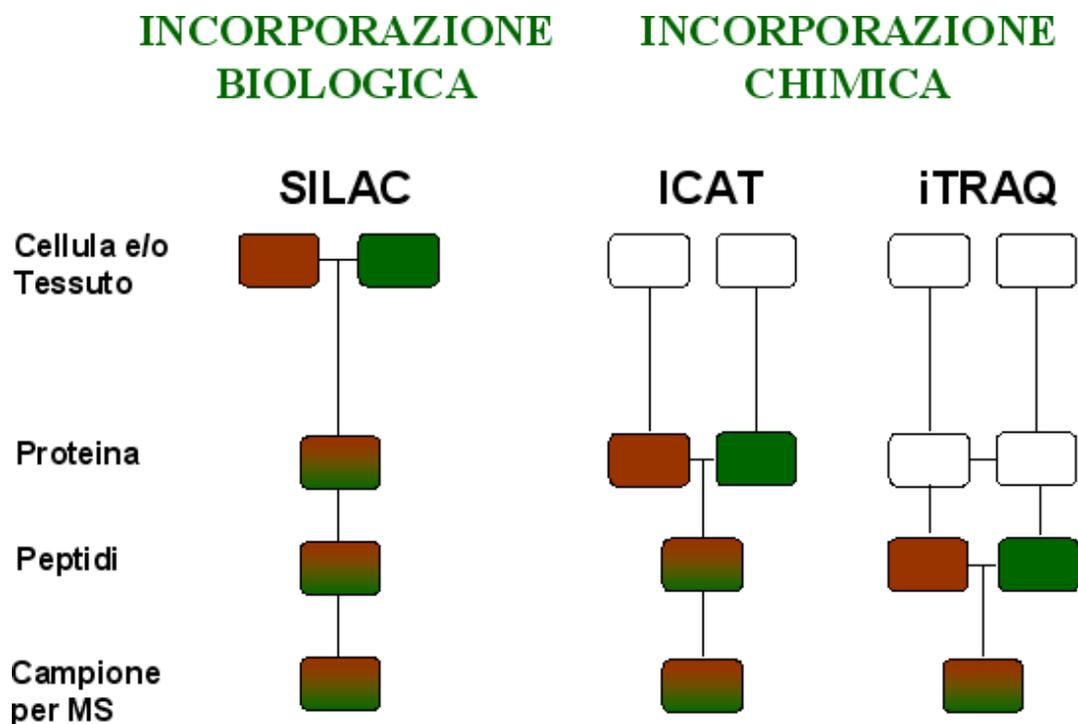


Figura 2.2. Illustrazione mostrante alcune delle molteplici tecniche di marcatura del campione per la quantificazione MS-mediata

2.2. Spettrometria di massa

Uno spettrometro di massa consiste di almeno tre principali componenti (figura 2.3):

- a) La sorgente ionica
- b) L'analizzatore di Massa
- c) Il Detector

È uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. Gli ioni sono prodotti nella sorgente ionica, separati nell'analizzatore in base al loro rapporto massa/carica (m/z) ed infine vengono rilevati dal detector che genera dei segnali proporzionali all'abbondanza ionica relativa. In generale, un grafico che rappresenta l'abbondanza ionica relativa verso il rapporto m/z è registrato ed analizzato tramite un computer fornendo uno spettro di massa.

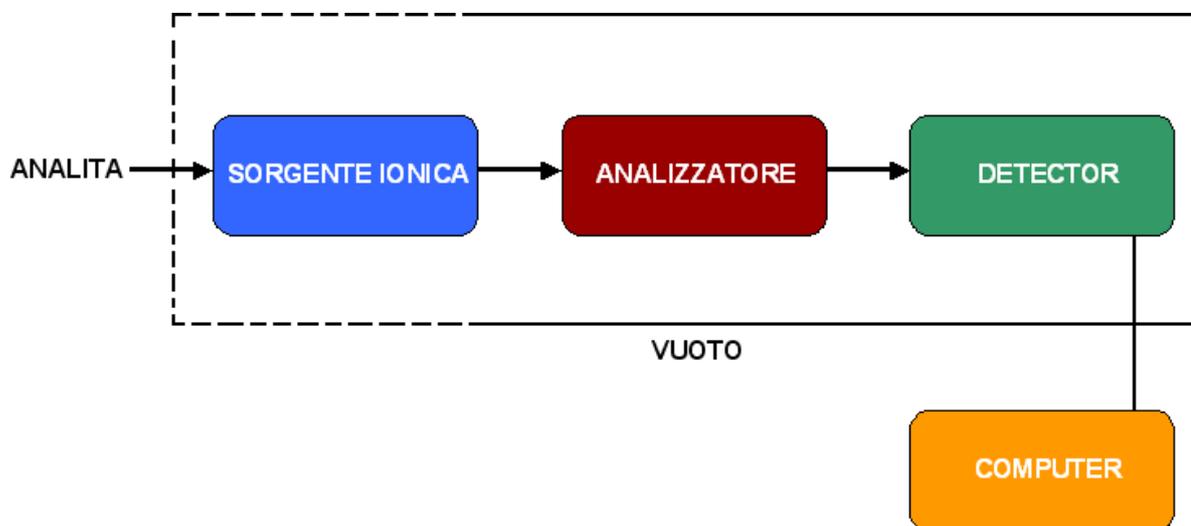


Figura 2.3. Diagramma rappresentante le principali componenti di uno spettrometro di massa. L'analizzatore ed il detector sono sempre sotto alto vuoto, mentre la sorgente ionica può anche operare a pressione atmosferica

La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (Godovac-Zimmermann, 2001; Aebersold, 2003). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente ESI (elettrospray ionization) (Fusaro, 2003).

La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare.

La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (figura 2.4).

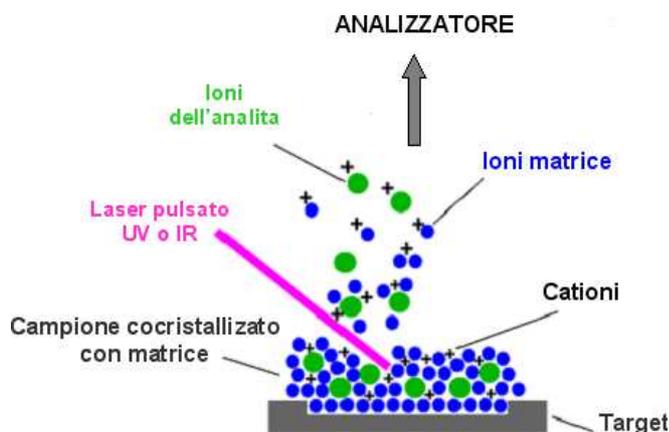


Figura 2.4. Rappresentazione schematica del processo di desorbimento /ionizzazione MALDI

La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico (figura 2.5). Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (Westermier, 2002).

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica.

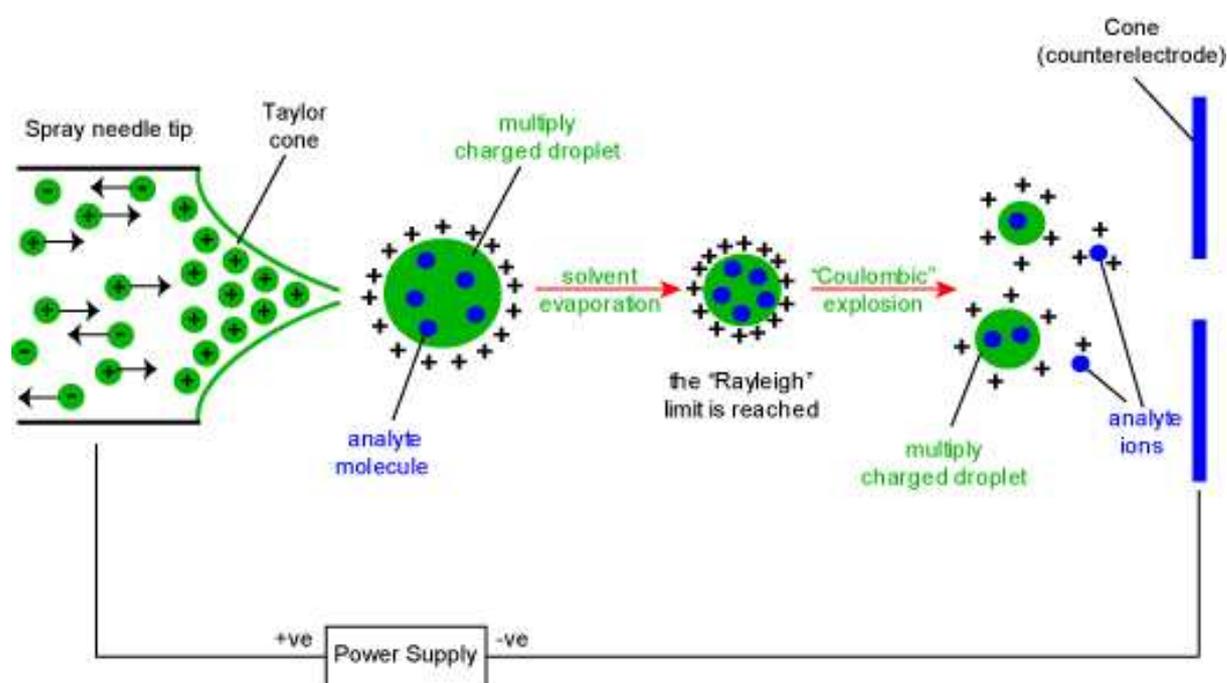


Figura 2.5. Rappresentazione schematica delle varie fasi del processo di ionizzazione elettrospray.

Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il TOF (time of flight) è uno strumento piuttosto semplice e generalmente è utilizzato in combinazione con sorgenti MALDI (figura 2.6). E' essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo

elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni.

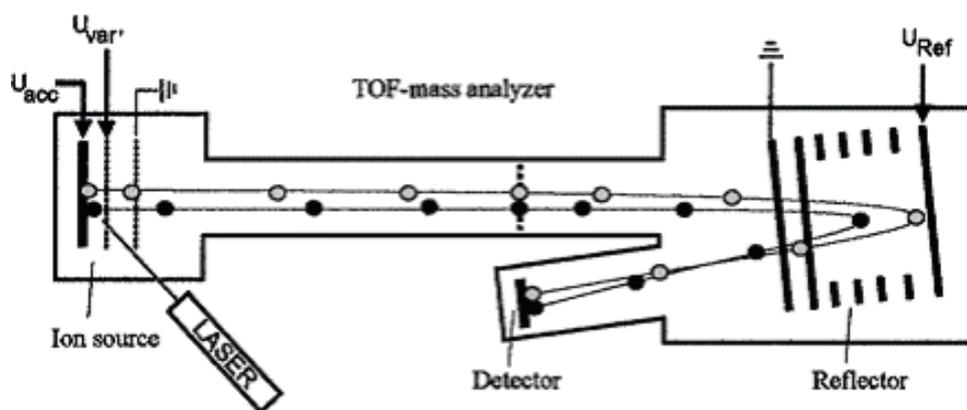


Figura 2.6. Rappresentazione schematica di massa equipaggiato con un analizzatore a tempo di volo (TOF) in modalità reflector.

Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri.

Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse. La MS crea una lista di massa

dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (Westermier, 2002).

La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli. Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (Bonk, 2001).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la peptide-mass fingerprinting (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la peptide sequencing. I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database. Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing).

CAPITOLO 3

Materiali e metodi

3.1. Modalità di campionamento

I ciuffi di *P. oceanica* sono stati campionati con *SCUBA diving* in tre differenti siti del Mar Tirreno e più precisamente due siti dislocati in due località dell'alto Tirreno cosentino: la prateria di Praia a Mare (Sito A = 39°48'45.71''N – 15°47'53.74''E) e la prateria di San Nicola Arcella (Sito B = 39°54'28.83''N - 15°46'50.38''E), e un sito di campionamento situato a Lacco Ameno (Sito C - Ischia). Nelle praterie di Praia a Mare e San Nicola Arcella i campionamenti sono stati effettuati ad una profondità di 10 m mentre i campionamenti eseguiti nella prateria di Lacco Ameno (Ischia-Na) sono stati effettuati a –5 m (40°45'41.6''N – 13°15'15.8''E) e –22 m (40°45'55.0''N – 13°53'29.4''E), poiché tale prateria è sviluppata lungo un gradiente di profondità. Il materiale biologico utilizzato per i nostri studi proviene da tessuti di foglia giovanile intermedia e adulta (figura 3.1) e da rizomi ortotropi, più precisamente il tessuto di rizoma che è stato poi successivamente processato corrisponde a quella porzione che si trova a circa un centimetro al di sotto dell'apice.



Figura 3.1. Rappresentazione delle tre tipologie di foglia di *P. oceanica*

3.2. Preparazione del campione: estrazione della frazione proteica da foglie e rizomi di *P. oceanica*

Al fine di ottenere un'alta solubilizzazione delle proteine ed una riproducibilità del metodo indispensabili per un'analisi elettroforetica valida ed affidabile sono state sperimentate e messe a punto diverse metodiche di estrazione e purificazione (Allegato 1). Qui di seguito verranno esposte le varie fasi sperimentali di messa a punto del protocollo di estrazione.

3.2.1. Preparazione del tessuto e rimozione dei composti fenolici

Le foglie di *P. oceanica* (1g per ciascun tipo) vengono frantumate con l'aiuto di pestello e mortaio, in presenza di azoto liquido e sabbia di quarzo, l'azoto liquido mantiene surgelati i tessuti e, allo stesso tempo, rendendoli anche più duri, ne facilita la frantumazione, mentre la sabbia di quarzo (silicon dioxide) contribuisce alla sua disgregazione fisica. Il tessuto così polverizzato viene posto in tubi da centrifuga da 2 ml e processato separatamente seguendo tre metodiche differenti di seguito riportate: a) secondo il protocollo descritto da Wang *et al.* (2003), il tessuto polverizzato viene sospeso in 2 ml di 100% acetone freddo (metodo AC) per rimuovere i contaminanti a basso peso molecolare e per precipitare le proteine; infatti, la maggior parte dei solventi organici miscibili in acqua (come acetone, metanolo ed etanolo) è in grado di precipitare le proteine dalle loro soluzioni acquose. L'azione precipitante dei solventi organici è attribuita al fatto che la loro presenza nelle soluzioni abbassa la costante dielettrica del solvente e sposta le molecole d'acqua legate alle proteine. Dato che le forze di attrazione elettrostatica sono inversamente proporzionali alla costante dielettrica del mezzo, in presenza di solventi organici, le proteine ed altri soluti formano degli aggregati che precipitano. Dopo il lavaggio in acetone 100% l'omogenato viene centrifugato a 13.000 rpm per tre minuti a 4°C; dopo la centrifugazione si elimina il sovrantante e il pellet viene lavato più volte in 10% TCA in acetone, finché il sovrantante non risulta decolorato, e una volta in 10% TCA

acquoso. Successivamente il pellet viene lavato due volte con 80% acetone, passando al vortex e centrifugando di volta in volta. I lavaggi in acetone vengono fatti oltre che per rimuovere le tracce di TCA perché essendo un solvente disidratante facilita la precipitazione delle proteine. Il pellet, ottenuto alla fine di questi passaggi, viene lasciato ad asciugare, a temperatura ambiente, in modo che l'acetone possa evaporare, ed usato per l'estrazione proteica oppure conservato a -80°C ed usato successivamente; b) il secondo metodo di estrazione prevede tre lavaggi in 10% TCA in acetone (metodo TCA-AC) e vari lavaggi invece in 10% TCA acquoso. Il TCA viene rimosso dai vari lavaggi in 100% acetone freddo fino a quando il sovrinatante non risulta decolorato, ancora una volta il pellet ottenuto viene lasciato asciugare a temperatura ambiente; c) il terzo ed ultimo metodo di estrazione prevede due lavaggi in 20% TCA acquoso freddo più 1% di PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), un inibitore delle proteasi, e successivi lavaggi in 80% acetone freddo fino a quando il sovrinatante non risulta decolorato. Il pellet così ottenuto viene lasciato asciugare a temperatura ambiente.

3.2.2 Estrazione delle proteine

Il protocollo scelto come definitivo per la preparazione del campione è l'estrazione con metodo fenolico descritto da Meyer *et al.* (1988) ed ottimizzato da Wang *et al.* (2003) per le piante recalcitranti. Il protocollo estrattivo per la separazione mono- e bidimensionale delle proteine totali si basa essenzialmente sulla precipitazione proteica in ambiente acido (20% TCA acquoso) e sulla successiva purificazione in fase fenolica. Circa 0,1g di tessuto, ottenuto seguendo le tre metodiche di estrazione precedentemente descritte (metodo AC, AC-TCA e TCA), vengono risospesi in 0.8 ml di fenolo e 0.8 ml di buffer SDS (30% saccarosio, 2% SDS, Tris HCl 0,1 M pH 8, 5% β -mercaptoetanololo), quindi si centrifuga a 13000 rpm per 5 min.

Il fenolo scioglie le proteine (incluse quelle di membrana) e i lipidi lasciando le sostanze idrosolubili (carboidrati, acidi nucleici, ecc.) nella fase acquosa; le proteine

saranno purificate e concentrate nelle successive precipitazioni con ammonio acetato in metanolo. Il fenolo, inoltre, minimizza la degradazione delle proteine, dovuta all'attività proteolitica endogena, che spesso insorge durante la preparazione dei campioni. L'SDS è invece un eccellente agente solubilizzante, inoltre tale buffer contiene saccarosio che rende il buffer più pesante del fenolo. Perciò, dopo il passaggio in centrifuga, si ottengono tre fasi diverse; la fase superiore è la fase fenolo che sarà pipettata in nuovi tubi. Dopo l'estrazione con fenolo, si precipitano le proteine con ammonio acetato freddo a -20°C in metanolo per 30 min, quindi si centrifuga ancora a 13000 rpm per 5min. Infine, si effettuano due lavaggi in ammonio acetato 0.1 M in metanolo e altri due lavaggi con acetone centrifugando ogni volta. Una volta asciugato il pellet ottenuto dopo questi lavaggi, lo si discioglie in buffer opportuno *over night*.

3.3. Determinazione della concentrazione proteica

La determinazione della concentrazione delle proteine è effettuata ricorrendo al dosaggio colorimetrico con il reattivo di Bradford (Bradford, 1977), che coinvolge il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con le proteine.

Infatti, tale metodo si basa sul dato che, in determinate condizioni, i gruppi acidi e basici delle proteine interagiscono con gli ioni Cu^{2+} che sono stati dissociati dal colorante formando dei composti di colore blu.

L'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica. Il legame del colorante con le proteine causa uno shift del picco di assorbimento da 465 nm (forma rossa) a 595 nm (forma blu). Questo perchè il Coomassie Brilliant Blue G-250 esiste in due differenti forme: rossa e blu. La forma rossa è convertita in quella blu dal legame del colorante con le proteine. Questo legame è un processo molto rapido (circa 2 minuti) ed il complesso proteina-colorante resta stabile nella soluzione per un'ora.

Il reattivo di Bradford è costituito da: Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,01%), alcol etilico (4,7%), acido fosforico (8,5%). Il dosaggio è stato eseguito mettendo in una provetta 500 µl di H₂O distillata, e 500 µl di reattivo di Bradford e 1 µl dell'estratto proteico. Dopo 5' di reazione al buio ed a temperatura ambiente è stato misurato allo spettrofotometro (U-3410 Spectrophotometer, Hitachi) l'assorbimento di ogni campione alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il contenuto proteico di una determinata soluzione può essere valutato in diversi modi, alcuni dei quali necessitano di uno standard di riferimento. Lo standard di uso più comune è costituito dall'albumina di siero bovino (BSA).

Per individuare l'intervallo di linearità tra densità ottica e concentrazione, abbiamo riferito i valori di assorbimento di ogni campione incognito, ad una retta di taratura costruita, nelle medesime condizioni sperimentali, sulla base dei valori di assorbimento a 595 nm delle soluzioni di BSA a concentrazione nota (1, 2, 3, 4 mg/ml). L'analisi spettrofotometrica sfrutta la proporzionalità tra assorbanza e concentrazione secondo la legge di Lambert-Beer (Harris, 1991):

$$A = \epsilon lc$$

In questa equazione, l è la lunghezza del cammino ottico (in centimetri), c la concentrazione della specie che assorbe la luce (in mol per litro) ed ϵ è il coefficiente di estinzione molare (in unità di litro per moli-centimetro). Riportando in grafico l'assorbanza (A) in funzione della concentrazione mg/ml si ottiene la retta di calibrazione (figura 3.2). Dai valori di assorbanza degli standard si calcola il coefficiente di proporzionalità in modo da poter ricavare la concentrazione proteica presente negli estratti.

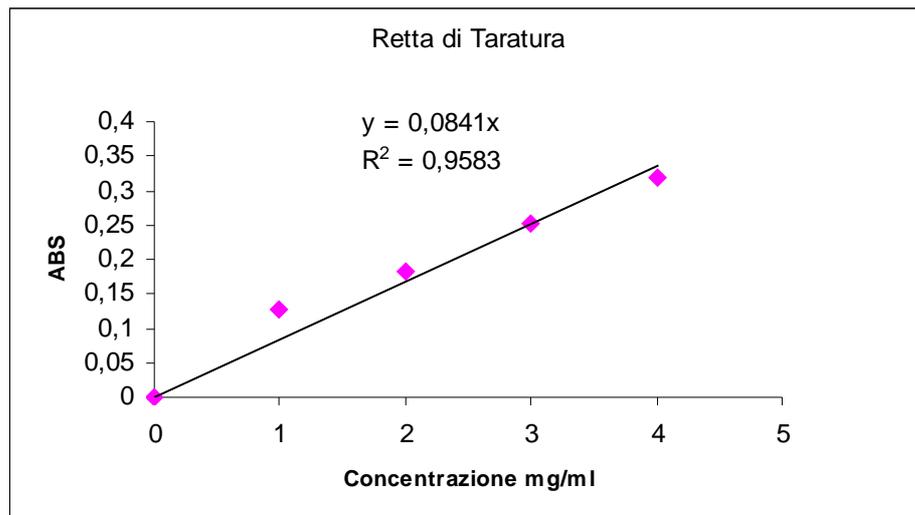


Figura 3.2. Retta di taratura

3.4. Elettroforesi

L'elettroforesi è un metodo di separazione basato sulla diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche attraverso una soluzione sotto l'influenza di un campo elettrico applicato.

Molte molecole di interesse biologico, come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e quindi ad ogni valore di pH sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche, sia come cationi (+) che come anioni (-). Sotto l'influenza di un campo elettrico, queste molecole cariche, migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che posseggano una carica negativa o positiva. Anche composti tipicamente non ionici, come i carboidrati, possono assumere una carica se trasformati chimicamente. Quindi, il fenomeno della migrazione è legato a numerosi fattori dipendenti oltre che dalla natura del mezzo e dal campo elettrico applicato, anche dalla massa, dimensione, carica e forma delle varie particelle, ossia dalla loro mobilità elettroforetica. Perciò, la mobilità elettroforetica di una particella, cioè la sua attitudine a muoversi in un determinato mezzo è semplicemente una funzione del rapporto fra carica e raggio della particella e, quindi,

varia da una particella ad un'altra. Su questa proprietà si basa essenzialmente il principio di separazione elettroforetica; infatti, applicando un campo elettrico ad una miscela ionica si avrà la migrazione delle varie specie, con velocità diversa a seconda delle rispettive mobilità, e, dopo un certo tempo, le varie particelle avranno percorso tratti diversi di soluzione risultando in questo modo separate.

Questa tecnica è difficilmente applicabile alla separazione di particelle di piccole dimensioni, in quanto queste giungerebbero agli elettrodi in un tempo estremamente breve; al contrario, risulta un mezzo di separazione eccellente per macromolecole ed in particolare per le proteine.

I fattori che influenzano una separazione elettroforetica sono di due tipi: quelli dovuti alla caratteristica degli ioni e quelli legati alle proprietà del sistema nel quale ha luogo la migrazione (tampone).

Il tampone ha la funzione di rendere possibile il passaggio della corrente e di mantenere il pH costante durante il processo elettroforetico; essendo la carica assunta da alcune specie ioniche, diversa a seconda del pH della soluzione, una variazione del pH produce una variazione nella carica dello ione e di conseguenza una variazione della sua mobilità.

La velocità di migrazione è direttamente proporzionale alla carica netta del campione e diminuisce all'aumentare del peso molecolare, questo perché aumentano le forze frizionali ed elettrostatiche. L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta fondamentalmente da due parti (figura 3.3): un alimentatore, che fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi, ed una cella elettroforetica, costituita dagli elettrodi (collegati ai rispettivi poli dell'alimentatore), dallo scomparto per il tampone, da un sostegno per il supporto elettroforetico e da un coperchio trasparente di materiale isolante.

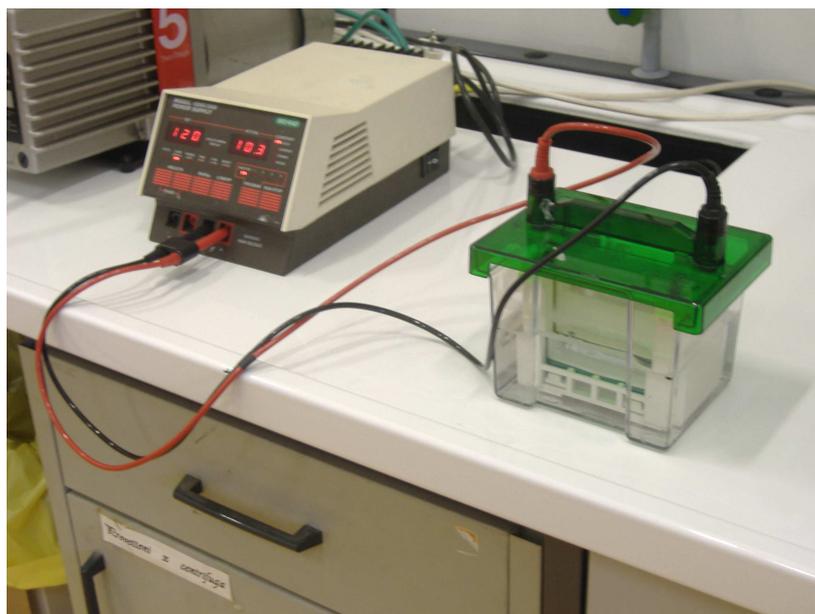


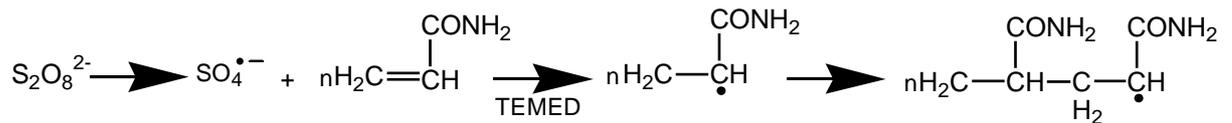
Figura 3.3. Power supply 1000/500 e Mini-Protean III (Biorad)

Per l'elettroforesi possono essere utilizzati supporti di varia natura, quali carta per piccole molecole (aminoacidi, nucleotidi), amido per la separazione di isoenzimi, poliacrilammide per proteine e oligonucleotidi (DNA fino a 500 bp) ed, infine, agarosio per proteine molto grandi ed acidi nucleici (DNA da 500 bp a 1 Mbp).

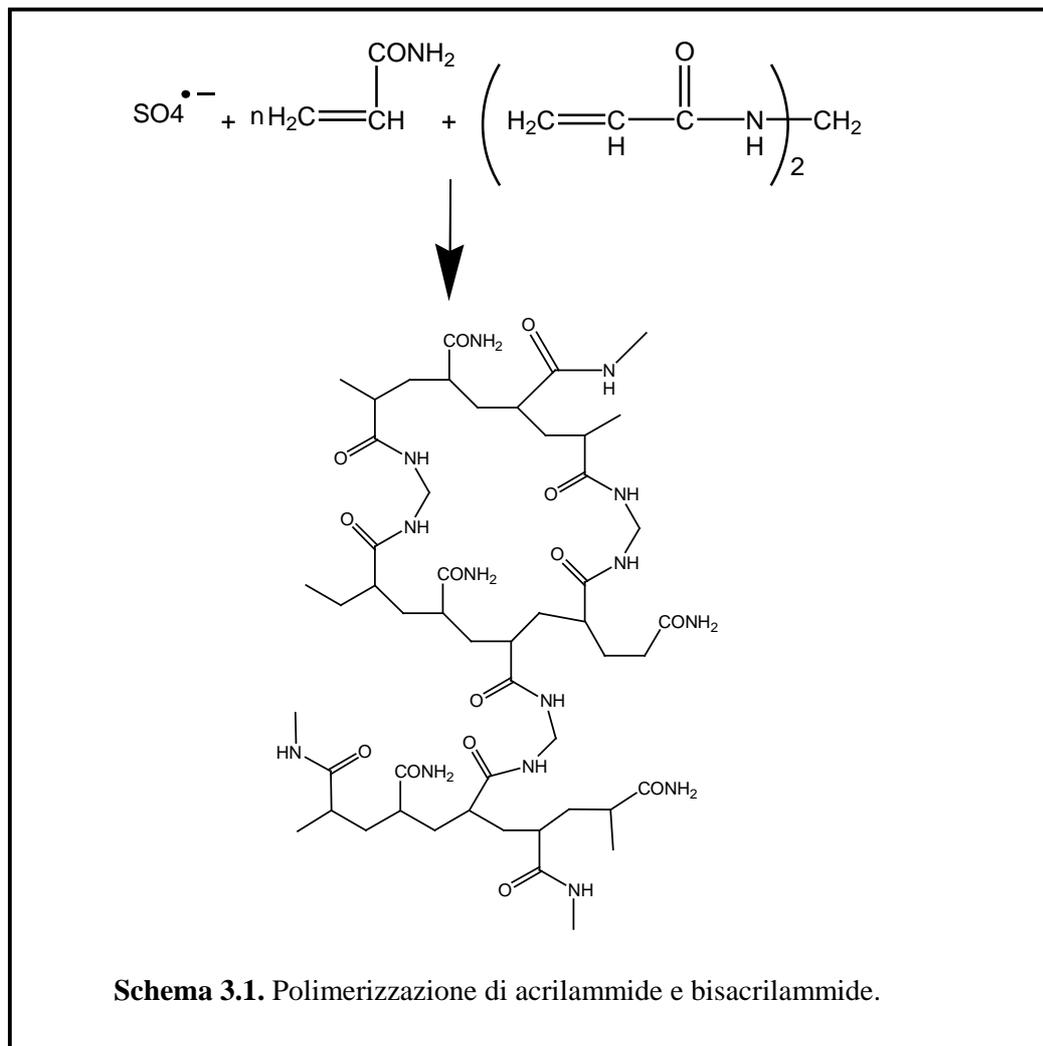
Sebbene come supporto vengano utilizzati materiali relativamente inerti, essi possono presentare effetti di adsorbimento, di elettro-osmosi e di filtrazione molecolare che modificano la velocità di migrazione dei componenti. Quindi, la scelta del supporto da usare dipende oltre che dal tipo di sostanza da separare anche e soprattutto dal grado di risoluzione che si vuole ottenere; nel nostro caso, visto che ci siamo occupati della separazione proteica, è stato scelto come supporto il gel di poliacrilammide. I gel di poliacrilammide vengono preparati facendo copolimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N, N'-metilenbisacrilammide.

La struttura della bis-acrilammide è costituita essenzialmente da due molecole di acrilammide legate da un gruppo metilene. La bis-acrilammide viene utilizzata come agente in grado di formare legami crociati (*cross-linking agent*). I monomeri di

acrilammide polimerizzano nel senso testa-coda e occasionalmente si legano ad una molecola di bis-acrilammide. Ciò fa sì che nella catena venga introdotto un secondo sito per l'estensione della catena. In questo modo si forma una matrice con dei legami crociati a struttura ben definita (schema 3.1).

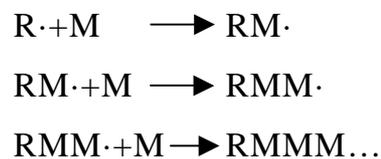


Polimerizzazione dell'acrilammide



Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide è un tipico esempio di *catalisi radicalica* e inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato e della base *N,N,N',N'*-tetrametilendiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero (cioè una molecola con un elettrone spaiato).

Se rappresentiamo il radicale libero con R (il punto rappresenta l'elettrone spaiato), e il monomero di acrilammide con M, possiamo schematizzare la polimerizzazione (schema 3.2).



Schema 3.2. Schematizzazione del processo di polimerizzazione

In questo modo si formano lunghe catene di acrilammide, tenute insieme da legami crociati derivanti dall'inserzione occasionale, all'interno della catena di molecole, di bis-acrilammide. Dal momento che l'ossigeno rimuove i radicali liberi dalla soluzione, tutte le soluzioni per la preparazione del gel vengono degassate prima dell'utilizzo.

I gel di acrilammide vengono definiti in base alla percentuale totale di acrilammide presente, e le dimensioni dei pori del gel sono in relazione alle concentrazioni di acrilammide e bis-acrilammide. Pertanto, gel a percentuale bassa (ad esempio 3%) possiedono pori di grosse dimensioni e sono utilizzati nell'elettroforesi di proteine dove la migrazione delle molecole deve avvenire senza l'effetto delle *forze frizionali*. Gel di acrilammide a bassa percentuale sono usati anche per i gel di impaccamento (*stacking gel*) nella SDS-PAGE e per separare DNA. Gel con una percentuale compresa tra il 10% e il 20% di acrilammide vengono utilizzati in tecniche quali la SDS-PAGE, dove le

dimensioni più piccole dei pori del gel introducono un effetto di filtrazione che contribuisce a separare le proteine in base alla loro dimensione.

3.4.1 Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE).

E' uno dei metodi di più largo impiego per l'analisi qualitativa di miscele di proteine, ed è particolarmente utile per valutare la purezza dei campioni durante purificazione. L'SDS-PAGE è basata sulla separazione delle proteine in funzione delle loro dimensioni, e si avvale dell'utilizzo di un detergente anionico, il sodio dodecilsolfato ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$).

I campioni da separare in SDS-PAGE vengono dapprima bolliti per tre minuti in un tampone (*sample buffer*) contenente SDS e β -mercaptoetanolo. Il mercaptoetanolo riduce i ponti disolfuro, eventualmente presenti nelle proteine, e destabilizza la struttura terziaria, mentre l'SDS legandosi fortemente alle proteine, ne provoca la denaturazione (figura 3.4).

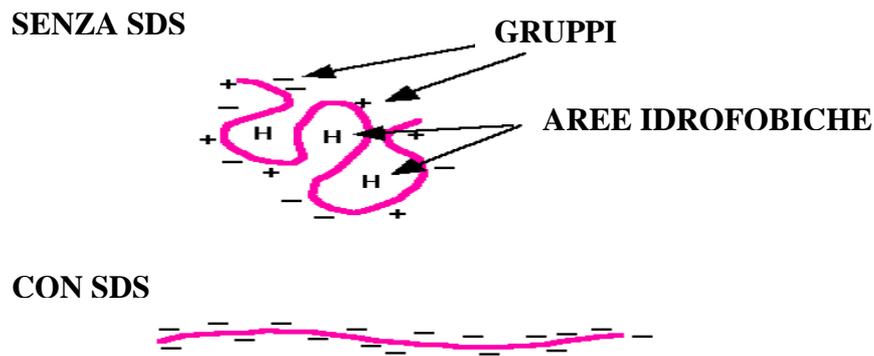


Figura 3.4. Effetti dell'aggiunta dell'SDS

L'SDS legato conferisce una carica netta negativa alla proteina, mascherando la carica intrinseca della proteina stessa. I complessi proteina-SDS sottoposti ad elettroforesi si muoveranno verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio del gel, la loro mobilità dipenderà di conseguenza esclusivamente dal peso molecolare. Il sample buffer contiene anche un *colorante tracciante ionizzabile* (blu di bromofenolo), che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Sono presenti inoltre del saccarosio o del glicerolo, che hanno la funzione di rendere più densa la soluzione del campione. Ciò permette di stratificare senza problemi il campione sul fondo del pozzetto.

Questo tipo di elettroforesi, messa a punto da Laemmli nel 1970 (Laemmli, 1970), permette di determinare il peso molecolare di proteine ignote confrontando la mobilità delle proteine dei campioni con quella di marker proteici a peso molecolare noto. Tale tecnica permette anche una stima approssimata della quantità di proteina caricata su gel attraverso l'intensità di colore delle singole bande.

Una versione dell'SDS-PAGE particolarmente utilizzata è rappresentata da un sistema di tipo discontinuo. Infatti, la risoluzione delle bande proteiche viene incrementata se si applicano i campioni su un breve tratto di gel a concentrazione più bassa di acrilammide (*stacking gel*), costituito da una matrice a pori larghi, posto sopra il gel principale a concentrazione più alta di acrilammide, detto gel di risoluzione (*resolving gel*), nel quale ha luogo la separazione delle singole proteine. Lo *stacking gel*, avendo pori molto larghi (6% acrilammide), rende possibile la libera migrazione delle proteine e le concentra in una sottile banda, prima che esse vengano risolte durante la migrazione nel gel di separazione, che ha una trama molecolare più fitta (12.5% acrilammide).

La corsa è eseguita sotto voltaggio costante (200 V) per circa tre ore e termina quando il blu di bromofenolo raggiunge il fondo del gel, perché come abbiamo detto precedentemente, essendo una molecola molto piccola, non subisce alcun effetto frizionale per cui rappresenta il fronte di migrazione. Terminata la corsa il gel viene rimosso dalle due lastre di vetro e messo a colorare sotto agitazione in una soluzione colorante (Coomassie Brilliant Blue), costituita da 0.25g di Coomassie,

90ml di metanolo/acqua distillata e 10ml di acido acetico per circa tre ore. I coloranti a base di Coomassie sono i più utilizzati a causa della semplicità d'uso, dell'elevata affinità per le proteine, dell'elevato coefficiente di estinzione e per la loro compatibilità con altre tecniche analitiche come il sequenziamento di Edman e la spettrometria di massa.

L'SDS-PAGE spesso viene utilizzata dopo ogni singolo passaggio di un protocollo di purificazione per verificare la purezza del campione. Infatti, in questo tipo di elettroforesi a una proteina pura corrisponde una singola banda. Proteine multimeriche, costituite quindi da diverse subunità produrranno invece più bande, ognuna corrispondente ad una singola subunità. Inoltre, dal momento che per questa tecnica sono necessarie quantità molto piccole di proteina (1-10 µg), solo una piccola frazione del materiale viene utilizzata per verificare la purezza e determinare la massa molecolare relativa della proteina purificata, utilizzando una singola separazione elettroforetica.

3.4.2. Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Questa tecnica permette di separare le molecole, in funzione del loro diverso *punto isoelettrico*, per cui risulta ideale per la separazione di molecole *anfotere*, come ad esempio le proteine. Il sistema per *IEF* più utilizzato è quello che utilizza *gel orizzontali* montati su piastre di vetro o foglietti di materiale plastico.

La separazione avviene applicando una differenza di potenziale alle estremità di un gel. Il gel, contiene un gradiente di pH, formato introducendo al suo interno delle molecole chiamate anfotiti, le quali sono costituite da miscele complesse di acidi poliammino-policarbossilici sintetici.

Vengono utilizzati abitualmente gel a bassa percentuale di poliacrilammide (4% circa) per evitare effetti di setaccio molecolare, ma si possono utilizzare anche gel di agarosio, soprattutto nei casi in cui si studiano proteine con massa molto alta, per le quali anche gel di poliacrilammide a bassa concentrazione

possono dare un effetto setaccio.

Per la preparazione di un gel per IEF gli anfolti, opportunamente scelti per coprire l'intervallo di pH desiderato, vengono miscelati insieme alla riboflavina nella soluzione di acrilammide. Successivamente la miscela viene versata su una lastra di vetro, sui bordi della quale sono presenti due sottili spaziatori, e su questa viene applicata la seconda lastra di vetro per formare il *gel cassette*. Il gel viene fatto polimerizzare con un processo chiamato fotopolimerizzazione, illuminando, cioè, la soluzione con una luce intensa. La fotodecomposizione della riboflavina genera un radicale libero, che è l'iniziatore della reazione di polimerizzazione. Una volta formato il gel, il vetro superiore viene rimosso lasciando il gel incollato alla prima lastra di vetro. Due elettrodi a stoppino, costituiti da sottili strisce di carta da filtro inumidita (l'anodo è imbevuto di una soluzione di acido fosforico, mentre il catodo di una soluzione di soda) sono poste lunghe i due lati maggiori del gel, quindi viene applicata una differenza di potenziale che determina, mediante la migrazione degli anfolti, la formazione di un gradiente di pH tra catodo e anodo. Dopo aver tolto la corrente, i campioni, vengono applicati, appoggiando sopra il gel, pezzetti di carta da filtro imbevuta della soluzione del campione. Viene quindi applicata una differenza di potenziale per circa trenta minuti, per permettere ai campioni di migrare all'interno del gel, ed infine, vengono rimossi. i pezzetti di carta da filtro.

A seconda della posizione del gradiente nel quale i campioni sono stati caricati, le proteine che si trovano ad un pH inferiore al loro punto isoelettrico saranno cariche positivamente e, quindi, inizieranno a migrare verso il catodo, mentre le proteine che vengono applicate sul gel a valori di pH superiori al loro punto isoelettrico, saranno cariche negativamente e, di conseguenza, migreranno verso l'anodo. Il pH del gel, tuttavia tende a salire man mano che le proteine si spostano all'interno del gradiente, e contemporaneamente, la carica positiva della proteina tende a diminuire, mentre la carica negativa tende a salire, fino a che queste raggiungeranno quella zona del gel dove il loro valore di pH è uguale al loro punto isoelettrico. A questo valore di pH, la proteina assume lo stato di

zwitterione (ione dipolare), cioè senza carica netta, e quindi si arresta. Dopo la focalizzazione dei campioni, il gel deve essere colorato per la rilevazione delle proteine. Tuttavia, questa operazione non può essere eseguita subito dopo la corsa, poiché verrebbero colorati anche gli anfoliti e, quindi, si otterrebbe un gel completamente blu, pertanto, il gel deve essere lavato con una soluzione di fissazione (ad esempio TCA al 10%), che fa precipitare le proteine nel gel, fissandole, e lava via gli anfoliti. Successivamente, il gel viene colorato con Coomassie Brilliant Blue e quindi decolorato.

Il pI, di una particolare proteina, viene solitamente determinato, facendo correre sul gel una miscela di proteine con pI noto. Dopo la colorazione, si misura la distanza di migrazione di ogni banda da un elettrodo e la si pone in grafico in corrispondenza del valore di pI (il valore del pH in quel punto del gel). Utilizzando questa retta di calibrazione è possibile determinare il pI di una proteina direttamente dalla sua distanza di migrazione.

L'isoelettrofocalizzazione, è dunque una tecnica analitica molto sensibile, ed è particolarmente utile per studiare le eventuali microeterogeneità di una proteina. Ad esempio, una proteina, può apparire come una singola banda in un gel contenente SDS, mentre può dare tre bande in IEF. Ciò può accadere, quando la proteina esiste in una forma mono-bi- e tri-fosforilata, in quanto la presenza di uno o due gruppi fosfato, non produce una differenza significativa nella massa molecolare relativa (determinata attraverso SDS-PAGE), mentre la differenza di carica può essere determinata in IEF.

3.4.3. Elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica basata sull'accoppiamento di due metodi elettroforetici monodimensionali che presentano di per sé un alto potere di risoluzione: a) l'isoelettrofocalizzazione (IEF) nella quale le proteine sono separate in base alla loro carica (pI), e b) l'elettroforesi in un gel di poliacrilamide in presenza di

sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) nella quale la separazione avviene in base alle dimensioni delle proteine. L'elettroforesi bidimensionale è la tecnica principe utilizzata nell'analisi del proteoma perché permette di separare in una sola operazione l'intero contenuto di estratti di cellule sulla base dei punti isoelettrici (pI) e del peso molecolare (PM) (figura 3.5).

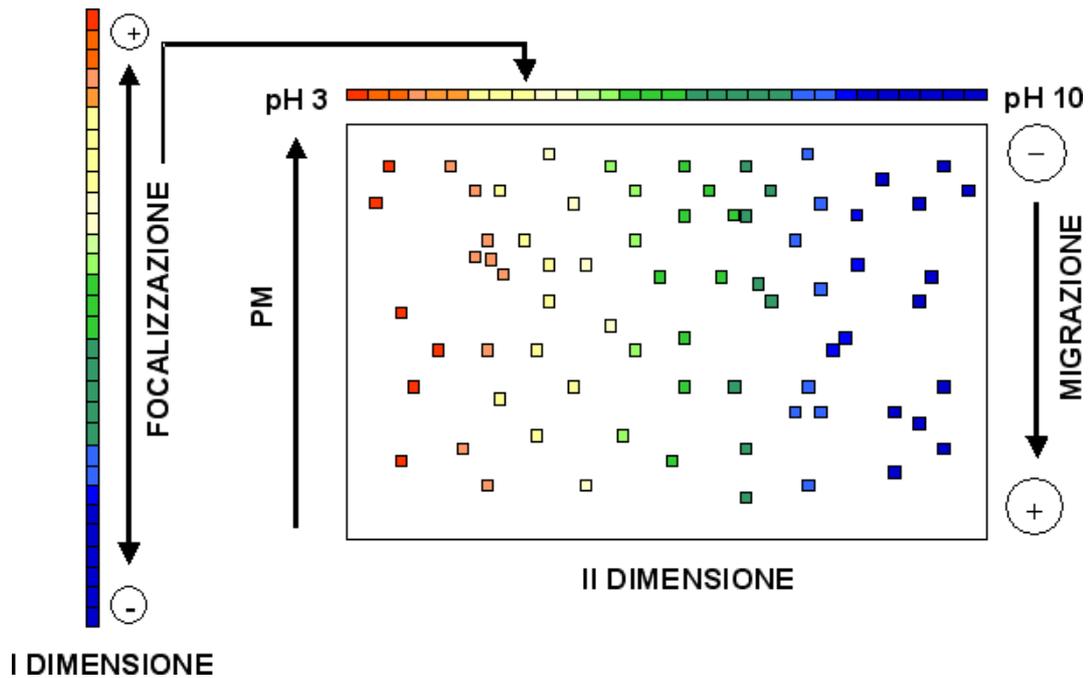


Figura 3.5. Schema della separazione delle proteine nel gel bidimensionale, in cui vengono separate prima in base al punto isoelettrico e poi in base al loro peso molecolare. Il risultato è una mappa di spot che possono essere ulteriormente separati, identificati e caratterizzati.

Per l'elettroforesi bidimensionale i campioni proteici vengono diluiti con 250 μ l di tampone di reidratazione, costituito da 7M urea (per solubilizzare e denaturare le proteine), 4% CHAPS (per solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica), 2M tiourea (in aggiunta all'urea migliora la solubilizzazione soprattutto delle proteine di membrana), 65mM DTT (per rompere i ponti disolfuro). Infine, si aggiungono 0.5% di IPG buffer di pH uguale a quello della strip (per

migliorare la solubilizzazione e separazione del campione) e 0.5% di soluzione di blu di bromofenolo (per visualizzare il fronte di migrazione).

Il campione così preparato viene distribuito nell'holder su cui successivamente viene posizionata la strip (13 cm NL pH 3-10 o 18 cm NL pH 3-11) facendo molta attenzione nel non formare bolle. Infine, prima di essere posizionata sull'IPG-phor (Bio-Rad) l'IPG va ricoperta con olio minerale, che isola dal contatto con l'aria limitando così il flusso elettroosmotico generato dall'anidride carbonica, l'evaporazione dei componenti volatili della soluzione di idratazione e la successiva cristallizzazione dell'urea. A questo punto l'unità di focalizzazione va programmata tenendo conto del tipo, del numero di IPG e quantità di campione caricato.

Finito il tempo di corsa (circa 26 ore), necessario affinché le proteine raggiungano il loro punto isoelettrico, le strips devono essere adeguatamente equilibrate prima di essere trasferite nel gel di poliacrilamide della seconda dimensione. Ogni strip va trasferita nella camera di riequilibrio contenente un volume, tale da coprire completamente le strips. Questa fase ha una durata massima di 30'. Infatti, una durata inferiore ai 20' non assicura un buon trasferimento delle proteine dalla prima alla seconda dimensione, mentre una durata superiore può determinare la perdita di materiale proteico per diffusione nella stessa. La soluzione utilizzata per l'equilibratura contiene urea, SDS, glicerolo e Tris-HCl pH 8.8. L'urea e il glicerolo riducono l'effetto elettroosmotico ed aumentano la solubilità delle proteine, il Tris mantiene il pH della strip ad un livello appropriato per la corsa della seconda dimensione e l' SDS complessa le molecole proteiche rendendone uniforme la carica consentendone la separazione in funzione della massa molecolare. Le strip vengono quindi sottoposte a riduzione e alchilazione utilizzando due soluzioni di equilibratura, contenenti la prima 2% DTT, che preserva lo stato ridotto di denaturazione delle proteine analchilate, e la seconda, 2.5% iodoacetamide, che alchila i gruppi tiolici delle proteine preservando la riossidazione durante l'elettroforesi.

Entrambi questi passaggi vengono effettuati a RT mantenendo le strips in continua e gentile agitazione. Dopo la fase di riequilibrio le strisce di IPG

vengono poste sulla sommità del gel di acrilammide e sigillate con una soluzione di agarosio allo 0.5% disciolto a caldo nel tampone di elettroforesi.

La corsa è eseguita a corrente costante (45 mA/gel). Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state visualizzate con Coomassie Brilliant Blue. Con questo metodo è possibile normalmente risolvere da 1000 a 2000 proteine diverse presenti in un estratto cellulare.

3.5. Western blot

La tecnica western blot permette di identificare la presenza di una determinata proteina su un supporto, che di solito è una membrana di nitrocellulosa o di polivinilidenedifluoride (PVDF), sul quale sono state trasferite le proteine precedentemente separate tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide. Il trasferimento avviene grazie all'applicazione di un campo elettrico e le proteine sono poi visualizzate attraverso immunoblot.

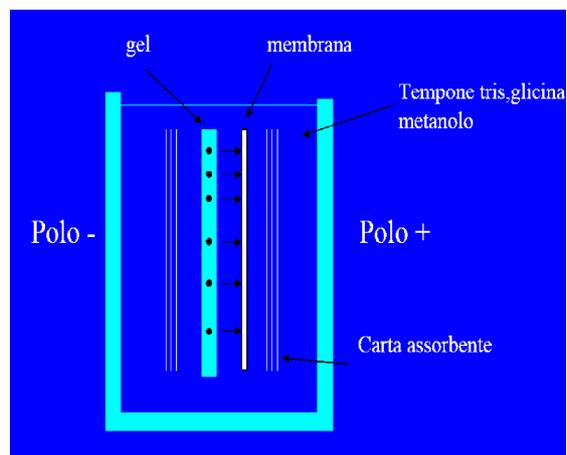


Figura 3.6. Trasferimento delle proteine dal gel alla membrana.

Questa tecnica è utilizzata in molte analisi proteiche in quanto le membrane risultano essere molto efficienti per l'immunodetection; infatti, gli anticorpi trovano facile accesso ai loro epitopi sulla proteina immobilizzata sulla superficie della membrana, mentre la penetrazione sarebbe limitata sul gel usato per l'elettroforesi.

Idealmente, il metodo blotting può trasferire tutte le proteine dal gel alla membrana, non rispettando le loro proprietà chimico-fisiche, in realtà durante il trasferimento sorgono delle incompatibilità tra le condizioni richieste per una efficiente migrazione delle proteine dal gel (alto pH, presenza di detergenti) e quelle richieste per una efficiente immobilizzazione delle proteine sulla membrana (basso pH, assenza di detergenti). Inoltre, le proteine di basso peso molecolare tendono a migrare facilmente dal gel, ma anche a passare attraverso la membrana senza essere trattenute, mentre le proteine ad alto peso molecolare migrano meno facilmente e sono immobilizzate sulla membrana. Di conseguenza, è molto difficoltoso ottenere un corretto e regolare trasferimento dal gel alla membrana di tutte le bande proteiche con diversi pesi molecolari. Noi siamo riusciti, con la messa a punto di uno specifico protocollo, a minimizzare la perdita di bande proteiche durante il processo e, quindi, ad ottenere il completo trasferimento sulla membrana dell'intero pattern proteico.

Le membrane di nitrocellulosa, sulle quali sono state trasferite le proteine tramite western blot, sono state dapprima incubate per una notte con una soluzione bloccante contenente 3% di BSA in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.8mM NaCl; 0.1% Tween 20). Incubare la membrana per una notte nella soluzione bloccante è indispensabile perché, durante il processo di trasferimento rimangono dei siti liberi sulla membrana, che vengono appunto bloccati con la soluzione di proteine non specifiche. In questo modo si evita il legame non specifico dell'anticorpo su tali siti. Il giorno successivo la membrana viene incubata con l'anticorpo primario (diluizione 1:2000) per due ore a RT, l'anticorpo secondario utilizzato è un anti-rabbit AP *conjugate* (diluizione 1:3000). La *detection* è stata eseguita utilizzando il sistema della fosfatasi alcalina con l'antibiotina NBT/BCIP (4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche), si tratta di un metodo non radioattivo, molto sensibile, rapido e quantificabile per visualizzare le proteine immobilizzate sulla membrana e coniugate,

direttamente o indirettamente, come nel nostro caso, con anticorpi legati alla fosfatasi alcalina.

3.6. Spettrometria di Massa: Peptide Mass Fingerprinting (PMF) e De Novo Sequencing.

I gel bidimensionali sono stati digitalizzati e analizzati mediante il software PD-Quest (Biorad). Ciò consente di ottenere una mappa degli spot proteici presenti e di definire la loro assenza/presenza o variazione di intensità in una sequenza di campioni, di cui uno ne costituisce il sistema di riferimento.

Sono definite così delle matrici a doppia entrata dove è indicata la percentuale di variazione (espressa come unità arbitraria) di ogni singolo spot. Gli spot che risultano significativamente variati sono stati mandati a Milano alla I.S.B.(Ion Source e Biotechnologies) e sottoposti a successiva analisi di spettrometria di massa (nano-electrospray Q-tof 2MS/MS).

Per l'identificazione delle proteine è stato utilizzato il software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) che ha permesso di eseguire le ricerche in un database non ridondante contenente sequenze proteiche (NCBI nr database), e il software MSBLAST (<http://dove.emblheidelberg.de/Blast2/msblast.html>)

3.7. Estrazione dei pigmenti clorofilliani da foglie adulte di *P. oceanica* e analisi spettrofotometriche.

I fotopigmenti di clorofilla (*cfl a* e *cfl b*) sono stati estratti da foglie adulte di *P. oceanica* rispettivamente campionate nel sito A e nel sito B. Prima dell'estrazione gli epifiti presenti sulla superficie delle foglie vengono delicatamente rimossi, a questo punto le foglie vengono frantumate con l'aiuto di mortaio e pestello, in presenza di

azoto liquido, che mantiene i tessuti a bassissima temperatura e ne facilita la frantumazione. Il tessuto così polverizzato viene pesato e posto in falcon da 15 ml a cui si aggiungono poi 5 ml di 80% acetone freddo.

Dopo 30 sec. di agitazione su vortex, si sistemano le falcon sull'agitatore in camera fredda a -4°C per circa tre ore. L'agitazione favorisce la solubilizzazione della polvere e quindi l'estrazione.

L'estratto è centrifugato per 15 minuti a 4°C a 1300 rpm, e il sovrantante viene prelevato per l'analisi spettrofotometrica. L'assorbanza è rilevata con spettrofotometro U-3410 (Hitachi), a 663 nm per la clorofilla *a* e a 645 nm per la clorofilla *b*.

La concentrazione di clorofilla *a* e clorofilla *b* sono state determinate dalla seguente equazione (Genot *et al.*, 1994):

$$\text{clorofilla } a \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 12,7 A_{663} - 2,69 A_{645},$$

$$\text{clorofilla } a \text{ } (\text{mg g}^{-1}) = (12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}) * 0,01/\text{wt};$$

$$\text{clorofilla } b \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 22,9 A_{663} - 4,68 A_{645},$$

$$\text{clorofilla } b \text{ } (\text{mg g}^{-1}) = (22,9 A_{663} - 4,68 A_{645}) * 0,01/\text{wt}$$

Inoltre è stata effettuata anche un'analisi spettrofotometrica, in fluorescenza e in trasmittanza, su campioni di foglia ottenuti da piante di *P. oceanica* campionate a diversa batimetria e precisamente ad una profondità di -5m e di -27m. Lo strumento utilizzato per questo tipo di analisi è uno spettrofotometro a fibre ottiche (AvaSpec-2048FT Fast Trigger Fiber Optic Spectrometer). Questo spettrofotometro è specifico per misure di fluorescenza, infatti si può impostare in maniera tale che cominci l'acquisizione con un ritardo dell'ordine dei nano secondi rispetto all'irraggiamento, ritardo caratteristico per questo tipo di misure.

3.8. Analisi citologiche

Per risalire al numero medio di cloroplasti per cellula e alla misura delle cellule del parenchima fogliare di *P. oceanica* sono state prelevate sei porzioni di foglie di sei ciuffi diversi del sito A e del sito B rispettivamente, come mostrato in figura 3.7.



Figura 3.7. Schema rappresentativo di una foglia di *Posidonia oceanica*

I campioni sono stati lasciati 24 ore in 4% formalina e successivamente è stato effettuato il prelievo paradermale di tessuto e sono stati allestiti i vetrini, da utilizzare per le relative misure citometriche al microscopio ottico(Leitz Dialux-EB). Le relative analisi d'immagine sono state eseguite tramite Qwin™ Image System Software della Leica. Per le analisi morfometriche sono stati considerati almeno sei diverse sezioni per ciascun individuo ($n = 36$). In aggiunta, è stato calcolato il rapporto tra la quantità di clorofilla totale e il numero di cloroplasti per cellula, in piante appartenenti alle due popolazioni.

3.9. Acquario: sistema sperimentale controllato per lo studio dell'adattamento di *P. oceanica* ad un ridotto regime luminoso

Per gli esperimenti in acquario è necessario che nel sistema artificiale vengano mantenute le caratteristiche chimico-fisiche presenti in natura.

Gli acquari sono stati pertanto dotati di un refrigeratore per mantenere la temperatura costante a 18 °C, e costantemente monitorati in modo tale che il pH si mantenesse invariato intorno a 8. Per quanto riguarda il fattore luce non è stata applicata alcuna fonte di luce artificiale, ma i due acquari utilizzati per l'esperimento sono stati posti al naturale ciclo giorno-notte e in uno dei due è stato simulato l'effetto turbidimetrico presente nel sito disturbato.

Le talee di *P. oceanica* utilizzate per l'esperimento sono state campionate con SCUBA diving e impiantate in acquario secondo un metodo brevettato nel nostro laboratorio dal gruppo della Prof.ssa Innocenti (CS 2007 A000018 del 19-04-07).

Le piantine sono state mantenute in acquario per circa un mese e continuamente monitorate sotto il profilo dell'intensità di luce incidente, tramite l'utilizzo delle sonde HOBO Pendant ONSCI.

CAPITOLO 4

Risultati

4.1. Estrazione proteica e analisi elettroforetica monodimensionale

La preparazione del campione rappresenta la fase più critica nello studio del proteoma. In questo lavoro di tesi sono state sperimentate differenti metodiche di estrazione, al fine di ottenere un'alta rappresentanza di classi proteiche, una buona risoluzione ed una riproducibilità nei campioni ottenuti.

P. oceanica si è rilevata recalcitrante ai comuni metodi di estrazione, imponendo quindi la messa a punto di uno specifico protocollo.

Inizialmente l'estrazione è stata eseguita omogenando direttamente le foglie in buffer acquosi e poi precipitando in solventi organici, ma i risultati ottenuti, in termini di resa proteica e di purezza, indicavano la presenza di composti interferenti negli estratti. Su tali basi si è deciso di rimuovere i composti interferenti prima dell'estrazione proteica seguendo tre metodiche differenti (metodo AC, TCA/AC e TCA). Le caratteristiche qualitative degli estratti proteici ottenuti, seguendo le tre procedure di estrazione, descritte in modo dettagliato nel capitolo dei materiali e metodi, sono state valutate osservando separazioni SDS-PAGE monodimensionali.

Le separazioni SDS-PAGE monodimensionali sono state eseguite su estratti proteici di foglie intermedie giovanili e adulte di *P. oceanica*.

La qualità e la risoluzione delle bande proteiche presumibilmente riflettono le abbondanze relative dei contaminanti.

È evidente come le contaminazioni, che appaiono come “strisciate”, elevato background di colorazione e distorsione delle bande, siano particolarmente marcate negli estratti proteici di foglie adulte e intermedie ottenuti con il metodo AC, dove sono anche meno presenti le proteine ad alto peso molecolare (figura 4.1a).

La precipitazione con acido tricloroacetico (TCA) 10% in acetone (TCA-AC), ha generato campioni con pattern di bande proteiche simili ma qualitativamente migliori

rispetto al metodo AC, anche se i contaminanti con questo metodo non sono stati ancora completamente rimossi (figura 4.1b).

Invece, l'analisi elettroforetica 1-D degli estratti derivati con il metodo TCA indica, un'efficiente rimozione dei composti interferenti e una elevata risoluzione delle bande polipeptidiche. I nostri dati, infatti, mostrano circa 80 bande polipeptidiche, con PM compreso tra 250-10 kDa, ben risolte e con un basso background (figura 4.1c).

La banda prominente di circa 55 kDa è visibile in tutti e tre i pattern (figura 4.1. vedi freccia) e tramite anticorpo specifico è stata identificata come subunità maggiore della Ribuloso-1,5-difosfato-carbossilasi/ossigenasi (RbcL).

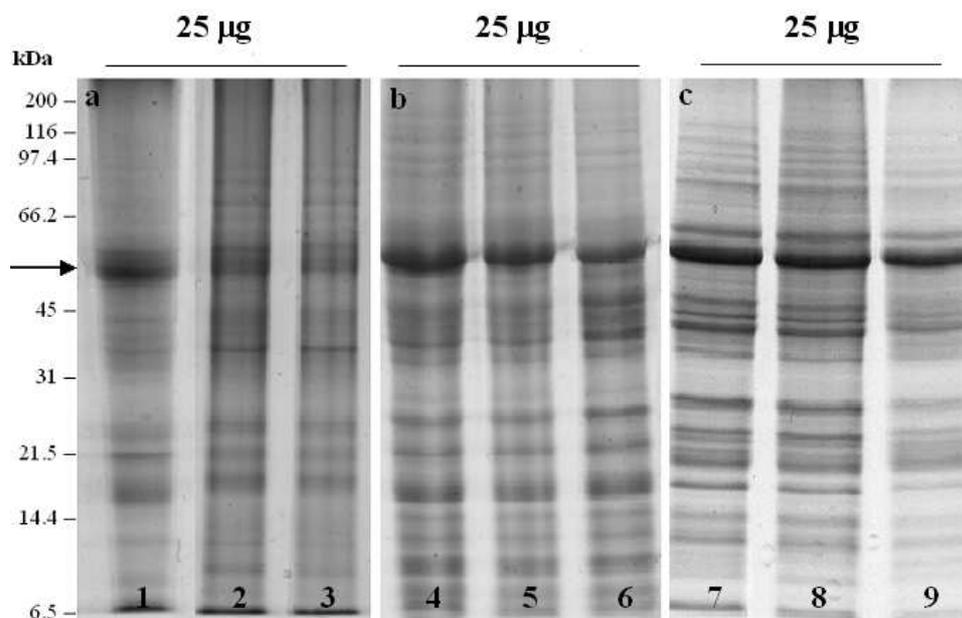


Figura 4.1. Analisi elettroforetica 1-D di estratti proteici di foglie di *P. oenaiica*. a) seguendo il metodo AC; linea 1: foglie giovanili, linea 2: foglie intermedie, linea 3: foglie adulte; b) seguendo il metodo TCA-AC; linea 4: foglie giovanili, linea 5: foglie intermedie, linea 6: foglie adulte; c) seguendo il metodo TCA; linea 7: foglie giovanili, linea 8: foglie intermedie, linea 9: foglie adulte. Marker Sigma 200-6.5 kDa.

Anche se la quantità di proteina caricata sul gel è la stessa (25 μ g) i pattern polipeptidici degli estratti proteici ottenuti da foglie giovanili e intermedie risultano differenti da quelli ottenuti da foglie adulte, probabilmente questo è dovuto alla

presenza di residui non-proteici che interferiscono nella risoluzione delle bande polipeptidiche negli estratti di foglia adulta.

In conclusione, tra le varie metodiche di estrazione sperimentate quella che ha previsto la precipitazione in ambiente acido 20% TCA acquoso e successiva purificazione in fase fenolica (metodo TCA) è risultato essere il metodo più efficace nella preparazione dei campioni di *P. oceanica*.

L'alta riproducibilità della metodica ha permesso di ottenere estratti proteici da foglie di *P. oceanica* ben risolti per ampi intervalli di pH e con alte concentrazioni proteiche rispetto alle altre metodiche sperimentate.

4.2. Analisi elettroforetica bidimensionale

Tale protocollo presenta anche un'alta risoluzione nella separazione elettroforetica bidimensionale nei gel bidimensionali, ottenuti utilizzando strip pH 3-10, riportati in figura 4.2 si contano più di 1000 spots a diversi pI e PM e anche in questo caso lo spot principale è quello della RbcL.

Comunque, nonostante la resa proteica sia più alta se si utilizzano foglie giovanili (meno ricche di composti interferenti), per la 2-DE abbiamo utilizzato esclusivamente campioni ottenuti dall'estrazione di foglie intermedie e adulte; questo perché per la 2-DE è necessaria una maggiore quantità di materiale di partenza per ottenere la quantità sufficiente di proteina da caricare su gel. Pertanto, per reperire il materiale sarebbe stato necessario aumentare il numero dei campionamenti e dei ciuffi campionati con conseguenti danni alla prateria in esame.

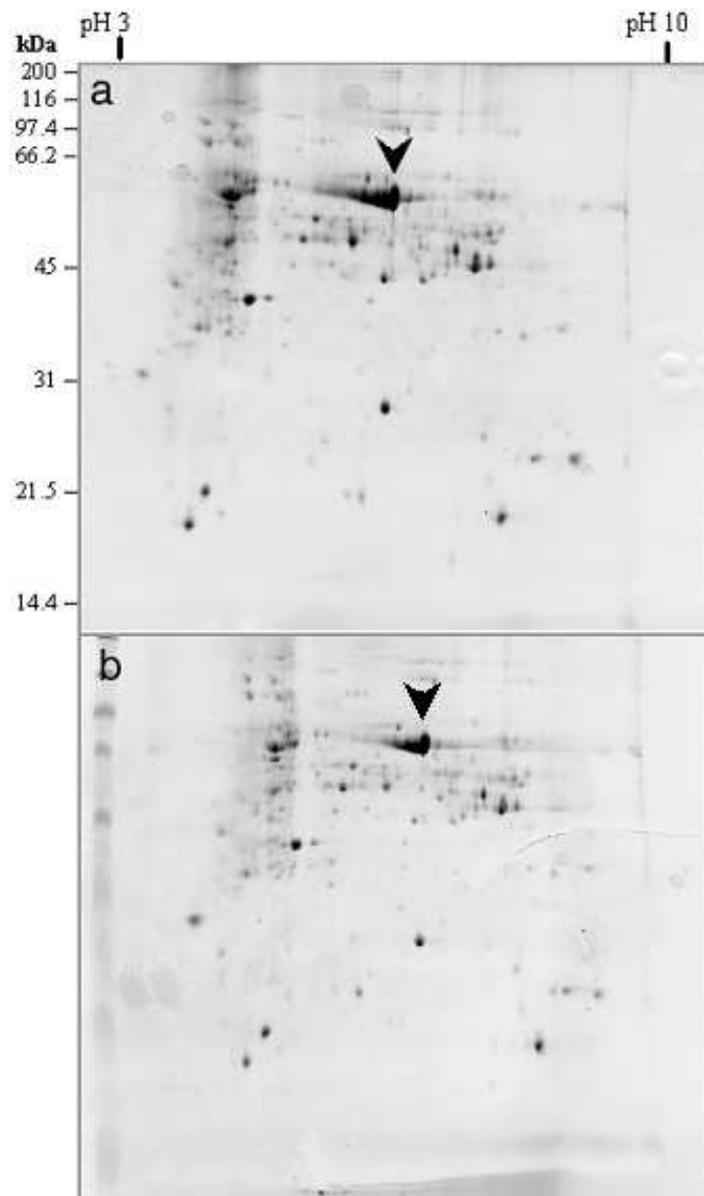


Figura 4.2. Analisi elettroforetica 2-D di estratti di foglie: a) intermedie, b) adulte seguendo il metodo TCA. La freccia indica la RbcL.

4.3. Analisi elettroforetica monodimensionale di estratti di rizomi ortotropi

Lo stesso protocollo ottimizzato per i tessuti fogliari è stato utilizzato per l'estrazione proteica e successiva analisi elettroforetica monodimensionale di rizomi ortotropi. L'analisi elettroforetica 1-D degli estratti proteici ottenuti da rizomi ortotropi mostra una efficiente rimozione dei composti interferenti e una buona risoluzione delle bande polipeptidiche. Per risalire ad eventuali differenze nel contenuto proteico abbiamo confrontato i pattern 1-DE degli estratti proteici di rizomi provenienti da due praterie sito A (disturbato) e sito B (controllo) in differenti periodi dell'anno (Marzo, Giugno e Ottobre). Come mostrato nel gel riportato in figura 4.3, vi sono bande polipeptidiche differenzialmente rappresentate nel sito B (controllo) rispetto al sito A (disturbato). Tali differenze potranno essere in futuro più adeguatamente evidenziate da un'analisi elettroforetica bidimensionale.

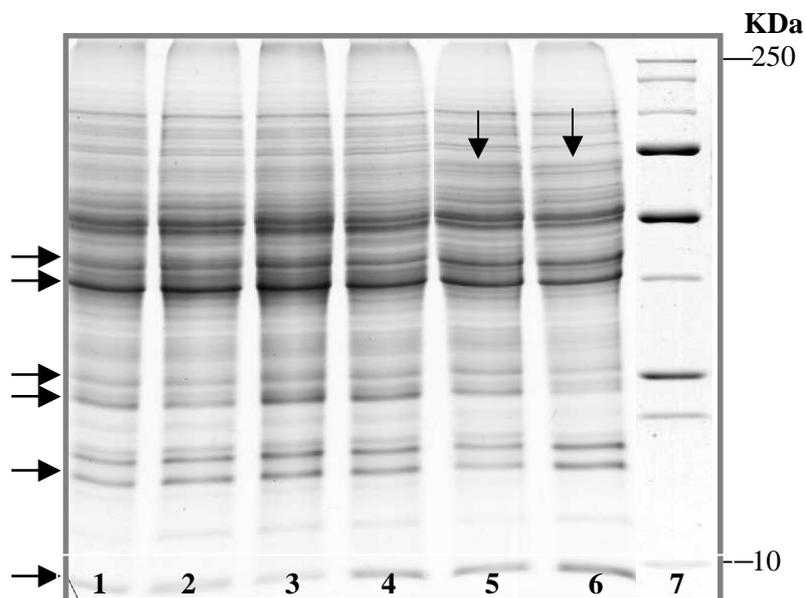


Figura 4.3. Analisi elettroforetica 1-DE in estratti proteici di rizomi ortotropi provenienti da due praterie sito B (controllo) sito A (disturbato) in diversi periodi dell'anno. Le frecce mostrano le proteine differenzialmente espresse nei vari periodi di campionamento considerati: Marzo (linee 1-2), Giugno (linee 3-4) e Ottobre (linee 5-6) rispettivamente nel sito B (linee 1-3-5) e nel sito A (linee 2-4-6). linea 7: marker Bio-Rad 250-10 kDa. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 µg di proteina.

4.4. Analisi Western-blot mono-bidimensionale da estratti di foglia

Rispettivamente in figura 4.4 e 4.5 sono riportati i risultati immunocitochimici mono e bidimensionali, utilizzando come anticorpo primario un anti-rabbit RbcL Type I + Type II Global (Agrisera). Dato di rilievo che emerge da tale analisi è che i livelli di espressione della RbcL sono significativamente minori nelle foglie del sito disturbato (sito A) rispetto al sito di controllo (sito B).

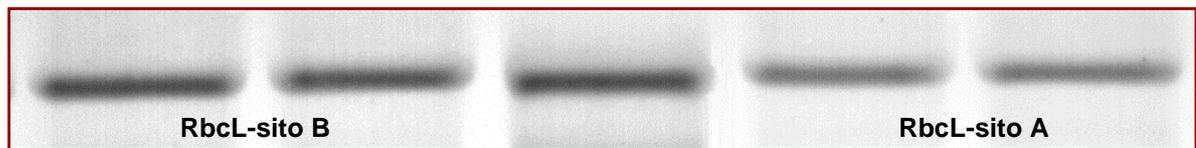


Figura 4.4. Analisi Western blot mono dimensionale. Linee 1, 2:livelli della RbcL rilevati nel sito B; linee 4, 6 livelli della RbcL rilevati nel sito A; linea 3 standard RbcL (Sigma 15 μ g).



Figura 4.5. Analisi Western blot bidimensionale. Sito A e sito B. Le frecce indicano i livelli della RbcL in foglie adulte di *P. oceanica* campionate rispettivamente nel sito A disturbato e nel sito B di controllo.

4.5. Estrazione della clorofilla da foglie adulte di *P.oceanica* campionate rispettivamente nel sito A nel sito B

I dati ottenuti dall'estrazione della clorofilla *a* e *b* da tessuti di foglia adulta in differenti periodi dell'anno, mostrano come vi sia una diminuzione nel contenuto totale di pigmenti clorofilliani nel sito disturbato rispetto al sito conservato. Nell'istogramma riportato in figura 4.6 sono riassunti i dati relativi all'estrazione della clorofilla *a* e *b* ottenuta da foglie adulte di *P. oceanica* nei due siti analizzati

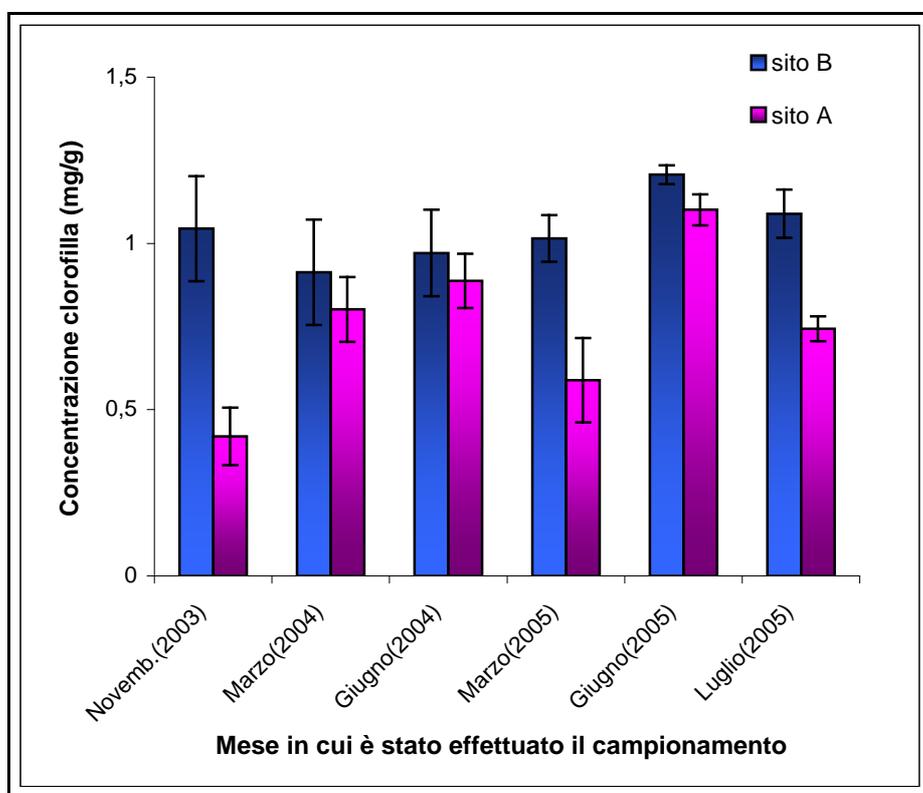


Figura 4.6. Risultati ottenuti dall'estrazione di clorofilla da foglie adulte di *P.oceanica*

In particolare, osservando il grafico, si nota come a Novembre (2003) e Marzo (2005) vi sia una notevole differenza in termini quantitativi di clorofilla totale tra i due siti, mentre a Giugno e a Marzo (2004) tale differenza sia molto più bassa. Comunque, qualsiasi periodo dell'anno venga preso in considerazione la quantità di clorofilla totale risulta essere sempre più bassa nel sito disturbato rispetto al sito conservato. Il

fatto che i cloroplasti delle piante di *P. oceanica* che si trovano nel sito disturbato, presentano un quantitativo minore di pigmenti fotosintetici, è in apparente contraddizione con i risultati attesi, in quanto, generalmente, i cloroplasti delle foglie sottoposte a ombreggiamento tendono ad aumentare al massimo la capacità di captazione della radiazione luminosa rispetto a quelli delle foglie in piena luce, stimolando la biosintesi di clorofilla, e determinando una alterazione dei rapporti, generalmente più bassi, fra clorofilla *a* e clorofilla *b*.

Analizzando il rapporto tra la clorofilla *a* e la clorofilla *b* nei due siti, appare evidente come questo rapporto sia maggiore nelle foglie del sito disturbato rispetto al sito conservato, come mostra l'istogramma in figura 4.7

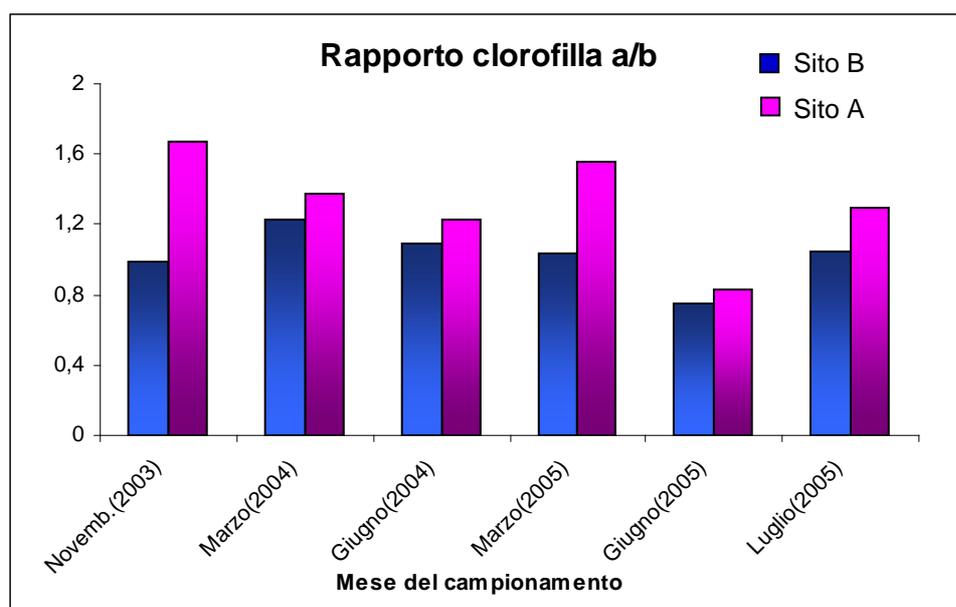


Figura 4.7. Diagramma del rapporto tra le clorofille *a/b* nei due siti.

Queste variazioni qualitative e quantitative dei contenuti in pigmenti fotosintetici sono essenzialmente correlate con un arricchimento in complessi del fotosistema II rispetto a quelli del fotosistema I e con una sintesi molto elevata dell'antenna esterna del fotosistema II, a differenza invece di quanto accade nei cloroplasti di sole (Alpi *et al.*, 1995); in *P. oceanica*, stando ai risultati ottenuti nelle nostre condizioni

sperimentali, si attuerebbe un diverso meccanismo di adattamento alle condizioni di scarsa luminosità, per quanto concerne la regolazione della quantità dei pigmenti fotosintetici, mentre, la risposta in aumento di concentrazione di clorofilla *a/b* delle piante del sito disturbato, rientra nei comuni canoni di comportamento di un sistema vegetale sottoposto a “stress” di luce.

4.6 Misure di fluorescenza e trasmittanza allo spettrofotometro a fibre ottiche

Misure di fluorescenza di estratti di pigmenti ottenuti da campioni di foglia di *P.oceanica* campionate rispettivamente a -5m e -27m mostrano un picco di fluorescenza circa 10 volte più intenso negli estratti a -5m rispetto a quelli a -27m, a dimostrazione del fatto che i campioni a -27m presentano una concentrazione di pigmenti fotosintetici più bassa. Questi dati sono confermati anche dai valori di trasmittanza riportati in figura 4.9.

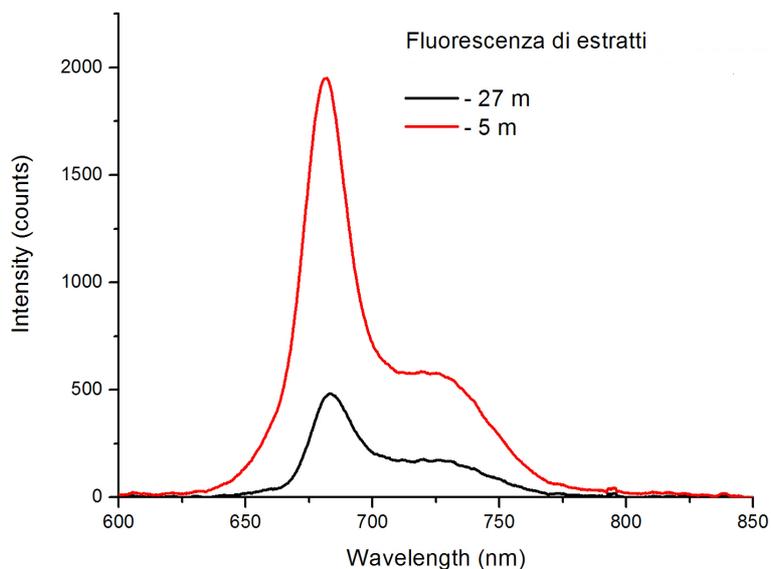


Figura 4.8. Spettro di fluorescenza di estratti ottenuti da campioni di *P. oceanica* prelevati a batimetria diversa.

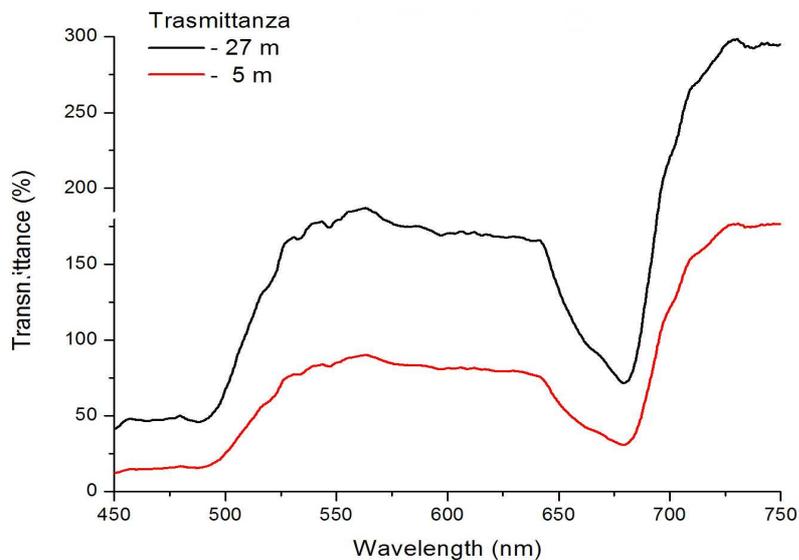


Figura 4.9. Spettro di trasmittanza di campioni prelevati a diversa batimetria -5 e -27m rispettivamente.

4.7. Analisi citologiche

I dati relativi alla quantità di clorofilla totale presente nei due siti sono avvalorati dalle analisi citologiche relative al conteggio del numero dei cloroplasti per cellula relativamente al tessuto epidermico e alla misura delle sue cellule, effettuate su foglie prelevate in giugno 2005. In particolare, tali risultati hanno evidenziato una riduzione nel numero di cloroplasti per cellula di circa il 10% nel sito disturbato (sito B) rispetto al sito di controllo (sito A) (figura 4.10).

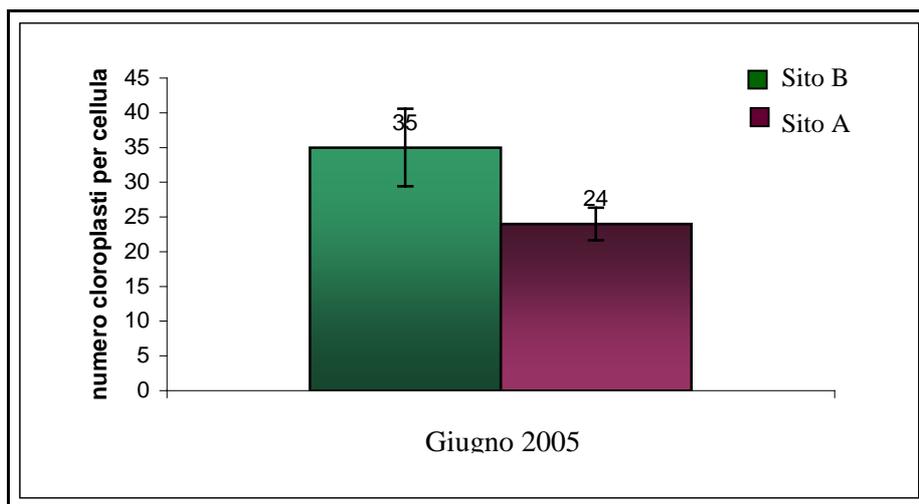


Figura 4.10. Numero di cloroplasti per cellula

In aggiunta, è stato calcolato il rapporto tra la quantità di clorofilla totale prodotta ed il numero dei cloroplasti per cellula, su foglie adulte di entrambe le praterie, prelevate nel mese di Giugno, ottenendo un vistoso divario tra il sito disturbato e il sito controllo, che mostra un rapporto maggiore nel primo e minore nel secondo come è evidenziato nei dati del diagramma in figura 4.11.

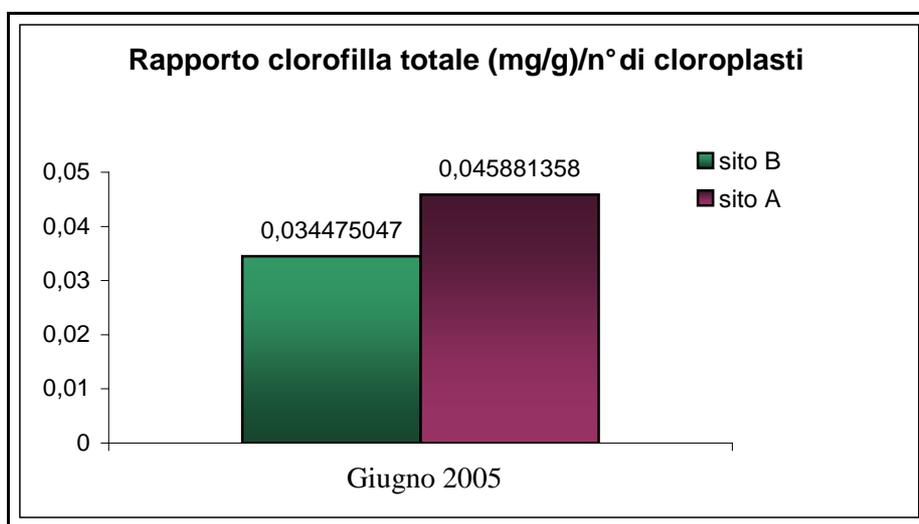


Figura 4.11. Diagramma del rapporto Clorofilla/Cloroplasti per cellula

Per quanto riguarda i dati relativi alla misura delle cellule, i risultati sono rappresentati graficamente nelle figure 4.11 e 4.12.

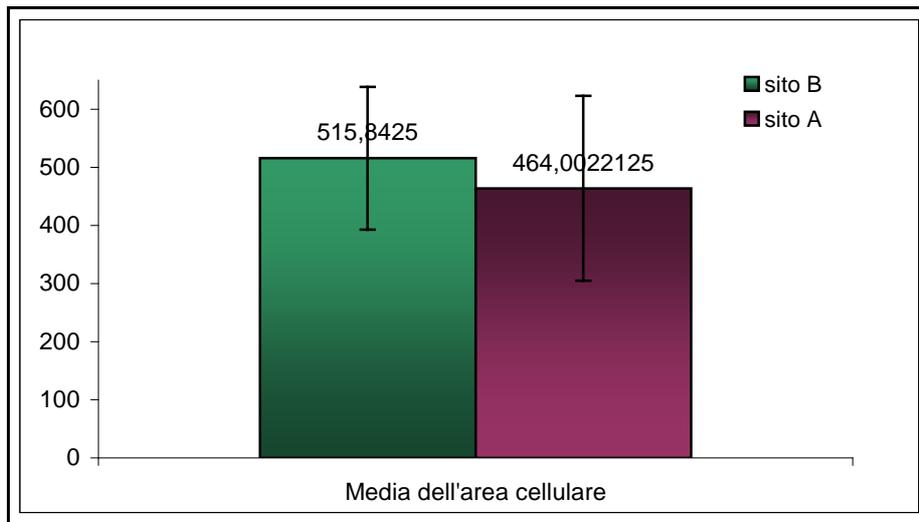


Figura 4.11. Misura dell'area cellulare

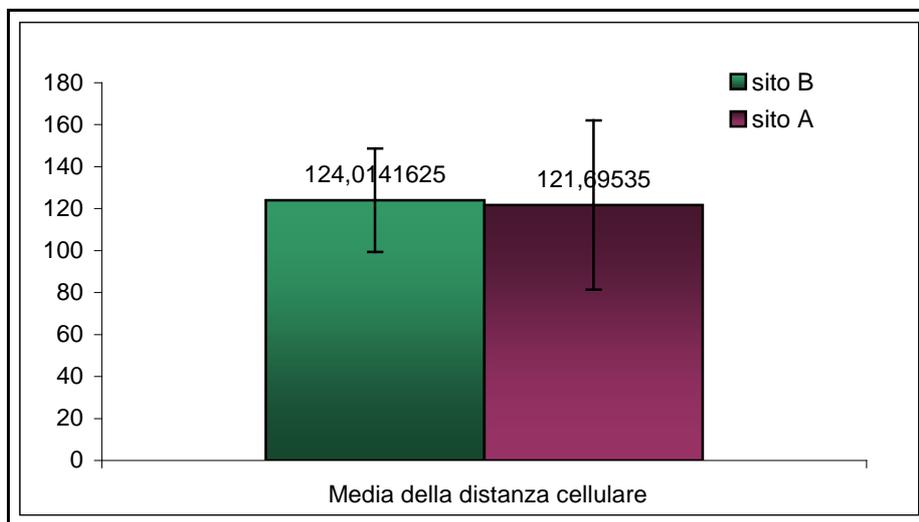


Figura 4.12. Misura della distanza cellulare

Dall'analisi dei dati si evince come non ci sia una significativa differenza in termini di media dell'area e di interdistanza tra le cellule dell'epidermide foliare del sito disturbato, rispetto al sito conservato. Una diversità visibile è data dall'eterogeneità nella forma delle cellule dell'epidermide foliare del sito disturbato, rispetto a quelle del sito conservato, come mostrato in figura 4.13. Sempre nel sito disturbato sono presenti all'interno delle cellule, inclusioni fenoliche (vedi frecce) non apprezzabili a questo ingrandimento (63x) nelle cellule del sito conservato.

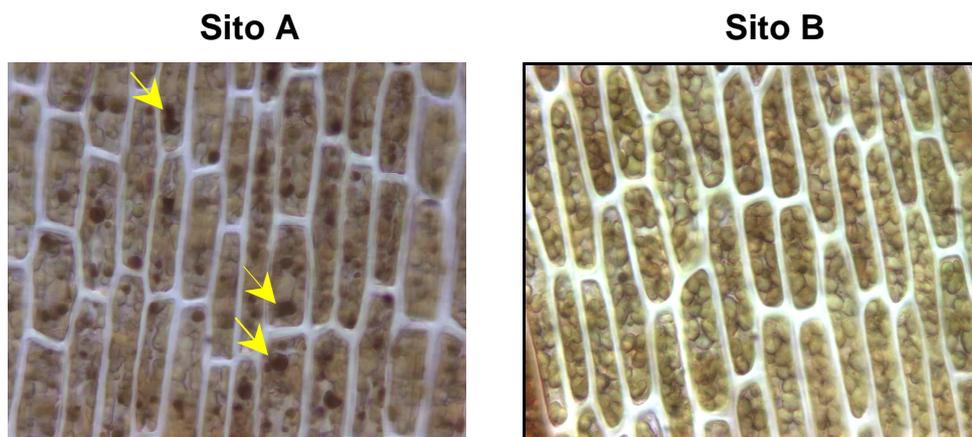


Figura 4.13 Sezioni di foglia ottenute tramite un prelievo paradermale di tessuto

4.8. Risultati ottenuti analizzando la risposta di *P. oceanica* a condizioni di luce limitanti

Usando l'approccio proteomico, abbiamo analizzato la risposta di *P. oceanica* a condizioni di luce limitanti, confrontando i pattern proteici di piante campionate in tre differenti siti del mar Tirreno e più precisamente una prateria disturbata (sito A) sottoposta mediamente ad una quantità di luce incidente pari a circa 150 lux, una prateria di controllo (sito B) sottoposta alle stesse condizioni macro-climatiche della prateria del sito A fatta eccezione per quanto riguarda l'intensità di luce incidente, che in questo caso è mediamente pari a circa 300 lux, e una prateria di Ischia (sito C) in cui le piante sono state campionate a diversa batimetria (-5m e -22m) e sottoposte a una diversa irradianza annuale pari a 480 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ per la prateria a -5m e 105 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ per la prateria a -22m. Il disegno di campionamento ha consentito l'individuazione di proteine la cui espressione differenziale fosse correlata a fenomeni di adattamento a bassa intensità luminosa, che caratterizzano sia il sito disturbato e sia le piante acclimatate a -22m.

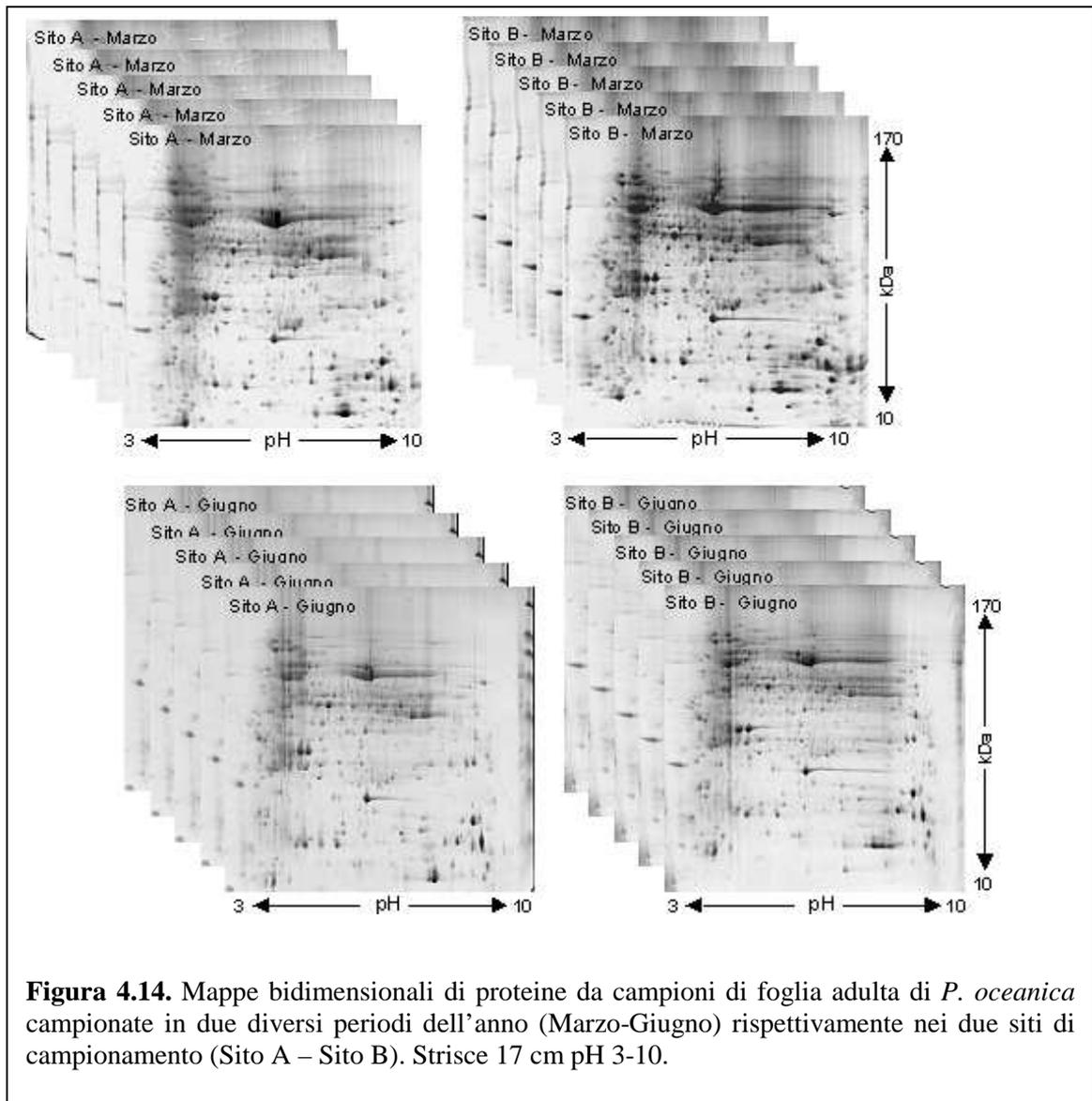
Le analisi comparative dei pattern proteici di piante sottoposte ad un ridotto regime luminoso mostrano, rispetto ai pattern proteici dei corrispettivi controlli, una drastica riduzione dei livelli di espressione della RbcL. e una espressione differenziale di una serie di proteine tra cui quelle appartenenti alla famiglia dei proteasomi.

4.8.1. Risultati dell'analisi elettroforetica bidimensionale di campioni di foglia adulta di *P. oceanica* campionate nel sito A e nel sito B.

In figura 4.14 sono riportati i gel bidimensionali, opportunamente colorati digitalizzati e sottoposti a scansione, ottenuti da foglie adulte di *P. oceanica* campionate in due diversi periodi dell'anno (Marzo e Giugno) nei due siti di campionamento (Sito A e sito B).

Per ogni sito di campionamento sono state prodotte cinque mappe bidimensionali, valore ritenuto sufficiente a garantire un'accettabile significatività statistica. La sovrapposizione degli elettroferogrammi dei cinque replicati ha consentito, mediante interpolazione computerizzata dei dati di immagine, di costruire i "master gel" relativi ai profili di espressione proteica dei vari campioni analizzati.

Quindi, si è proceduto con l'analisi quantitativa e statistica per individuare gli spot proteici diversamente espressi.



Comparando le mappe bidimensionali (figura 4.15) dei due siti campionati, nei due differenti periodi, sono emerse notevoli differenze tra sito A e sito B in termini di proteine differenzialmente espresse, mentre il confronto *spot to spot* tra figura 4.15a vs. figura 4.15b e tra figura 4.15a₁ vs. figura 4.15b₁, evidenzia una riproducibilità di circa l'80 % qualunque sia il periodo di campionamento e qualunque sia il luogo in cui è stato effettuato il campionamento. Il maggior numero di spots si conta nella regione del gel compresa tra *pI* 4 e *pI* 9 con PM compreso tra 120-6 kDa. In totale sono state isolate 26 proteine differenzialmente espresse; sedici di queste (contrassegnate in

verde in figura 4.15) presentano un'espressione differenziale diversa tra sito disturbato (sito A) e sito controllo (sito B), in genere opposta, e livelli di espressione dei controlli (sito B- Marzo, sito B- Giugno) molto diversi nei due periodi; questo denota una forte influenza della stagionalità sul comportamento della proteina. Le rimanenti dieci (contrassegnate in rosso in figura 4.15), invece, mostrano un'espressione differenziale che prescinde dal periodo di campionamento, in questo caso l'influenza stagionale risulta nulla, e la proteina può quindi essere indicata come biomarker proteico. Sulla base di queste considerazioni la nostra attenzione è stata focalizzata all'identificazione di solo alcune delle proteine differenzialmente espresse.

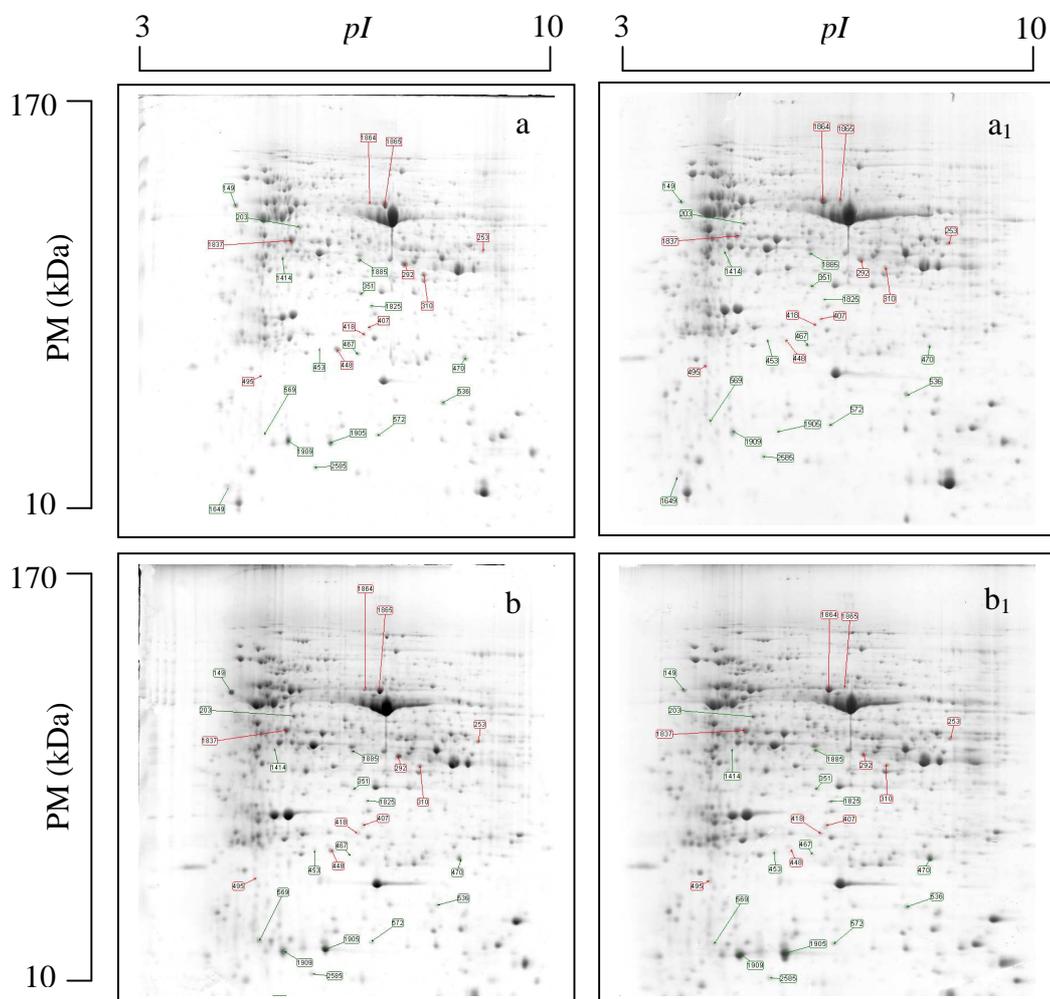


Figura 4.15. In a) e in a₁) sono riportati i pattern polipeptidici di foglie adulte campionate a Marzo rispettivamente nel sito A e nel sito B e in b) e b₁) rispettivamente i pattern polipeptidici di foglie adulte campionate negli stessi siti a Giugno. Gli spot differenzialmente espressi sono evidenziati automaticamente con un numero nella mappa proteica dal ImageMaster™ software. I risultati sono la media di cinque repliche. P < 0.01.

4.8.2. Identificazione di alcuni degli spot differenzialmente espressi riscontrati nei due siti di campionamento (sito A e sito B).

L'identificazione di 16 delle 26 proteine differenzialmente espresse è stata eseguita mediante una separazione elettroforetica bidimensionale di tipo preparativo che prevede una carica maggiore di estratto proteico e una colorazione massa compatibile (Coomassie). Le bande del gel preparativo corrispondenti agli "spot" identificati sui master gel e differenzialmente espressi, sono state riconosciute mediante analisi comparativa delle immagini e quindi ritagliate, recuperate e digerite con tripsina. Il digerito triptico è stato analizzato in spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). La tecnica MALDI-TOF prevede il desorbimento e la ionizzazione, mediante irraggiamento laser, dei peptidi inglobati in una matrice aromatica acida cristallina.

Quello che si ottiene è uno spettro di massa dei frammenti del digerito triptico, caratteristico di ogni singola proteina, una sorta di impronta digitale della proteina stessa (Peptide Mass Fingerprinting) (figura 4.16).

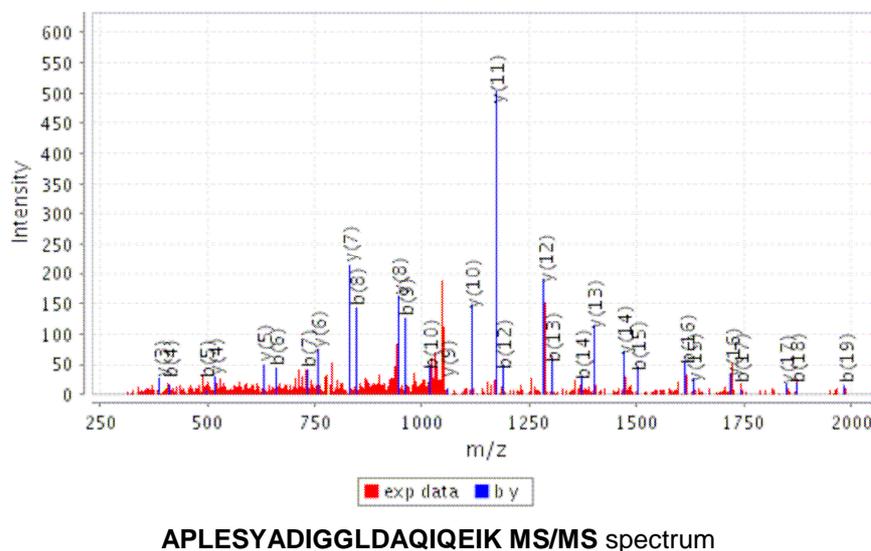


Figura 4.16. Spettro MALDI relativo allo spot 1865.

Il “fingerprinting” proteico viene confrontato con quanto contenuto nelle banche dati disponibili in rete, in cui sono raccolti tutti i fingerprinting delle proteine sequenziate dei vari organismi.

Una sovrapposizione statisticamente significativa tra il “fingerprinting” di una nostra proteina con quello di una proteina sequenziata già registrata in una banca dati, consente l’identificazione del fattore proteico.

Fra le proteine sequenziate 11 sono state identificate mediante data-base confrontando cioè fingerprint teorici e sperimentali mentre per le altre cinque non si è avuta alcuna assegnazione statisticamente significativa (tabella 4.1). Quindi, per questi spot proteici si è proceduto con il sequenziamento puntuale aminoacido per aminoacido dei diversi peptidi.

Per ogni spot proteico, gli spettri di massa acquisiti dopo digestione triptica, sono stati elaborati facendo un’analisi DE NOVO: metodo di sequenziamento che consente di identificare sequenze peptiche che non siano incluse in alcun database.

Per ogni singolo spot, tutti i peptidi trovati sono stati poi analizzati con il software *free* MSBLAST, Mass Spectrometry driven BLAST (<http://dove.emblheidelberg.de/Blast2/msblast.html>).

Ancora una volta nessun risultato significativo è stato ottenuto per i seguenti spot: 467, 1864, 1885, 1905.

Al contrario, i peptidi appartenenti allo spot 569 risultano avere una certa similarità con la proteina “Thylakoid lumen protein” sia di *Oryza sativa* (Q6Z8N7) che di *Arabidopsis thaliana* suggerendo l’ipotesi che lo spot 569 possa essere tale proteina.

Gli spot 149,203,253,292, 310,407,495, 536, 1414, 1649, 1837 non sono stati escissi perché debolmente espressi per essere sottoposti ad analisi MS/MS.

I dati relativi alle analisi MS/MS sono riportati nell’allegato 3.

Tabella 4.1. Spot proteici identificati tramite confronto di fingerprint teorici e sperimentali.

Spot number	Mw ^a (kDa)	pI ^a (pH un.)	March		June		Accession number	Cov. %	Protein	Mw (kDa)
			UR	DR	UR	DR				
149	64	3.7	1.7		2.8				Not excised ^b	
203	56	4.8	1.8		2.3				Not excised	
253*	46	8.0	1.1		1.2				Not excised	
292*	42	6.7	1.5		1.1				Not excised	
310*	39	7.0	1.9		2.0				Not excised	
351	37	5.9	2.1			1.3	gi/62733309	10	Pyridoxine	39
407*	32	6.1	2.0		1.5				Not excised	
418*	30	6.0	2.1		1.9		gi/34909168	17	Putative alpha 7 proteasome subunit	27
448*	27	5.5	5.5		2.8		gi/17380185	26	Proteasome subunit beta tipe	25
453	28	5.2		1.5	1.0		gi/66271071	17	Beta 1 proteasome-7D	26
467	27	5.9	3.0			5.8			Unidentified ^c	
470	26	7.7	3.6		3.3		gi/50938173	3	Beta-amylase	55
495*	23	4.2		1.9		1.4			Not excised	
536	16	7.3	1.6			2.1			Not excised	
569	12	4.2		1.2	2.6				Thylakoid lumen protein**	14
572	12	6.2	1.7		1.1		gi/538430	9	Superoxide dismutase	15
1414	44	4.6	3.0		1.3				Not excised	
1649	7	3.6	1.6		1.4				Not excised	
							gi/10800924	12	1-Fructose-bisphosphate aldolase	39
1825	35	6.1	8.1		2.3		gi/46093420	8	2-Caffeic acid o-methyl transferase	30
1837*	51	4.7	2.3		1.2				Not excised	
1864*	65	6.1		4.0		5.4			Unidentified	
1865*	63	6.3	4.3		3.8		gi/17297987	4	26S Proteasome	50
1885	43	5.9	1.8			1.1			Unidentified	
1905	11	5.4	10		14				Unidentified	
1909	12	4.5	2.4		1.7		gi/37991674	7	Perchloric acid soluble translation inhibitor protein homolog	20
2585	9	5.1	2.5		1.1		gi/7643788	14	Nucleoside diphosphate kinase	16

^aMW and pI correspond to experimental calculated values.

^bNot excised spots were not analysed by MS/MS.

^cUnidentified proteins were analysed by MS/MS but identification was not achieved.

* spots which expression behaviour was not affected by season (p<0.01).

**Identified by De Novo Sequencing

Tra le proteine identificate la nostra attenzione si è soffermata ad analizzare quelle appartenenti alla famiglia dei proteasomi, anche perché la loro espressione differenziale tra sito di controllo e sito disturbato non è influenzata dalla stagionalità, pertanto questa classe di proteine potrebbe essere candidata ad assumere il ruolo di biomarker proteico. Dai risultati ottenuti sembra infatti esserci una certa correlazione tra stress luminoso e aumento e/o diminuzione dei livelli di espressione di queste classi

proteiche, infatti, tre di queste risultano over espresse nei campioni sottoposti a condizioni di luce limitanti, e sono la subunità β del proteasoma (spot 448, PM 27, UR 5.5) la subunità α del proteasoma 7 (spot 418, PM 30 kDa, UR 2.1), e il proteasoma 26S, mentre una di queste risulta significativamente sotto espressa ed è la subunità β -1 del proteasoma 7D (spot 453, PM 26 kDa, DR 1.5; $p < 0.01$). In tabella sono riportate anche altre proteine differenzialmente espresse come la SOD e la piridoxina, tali proteine intervengono nella protezione delle cellule in risposta a stress ossidativi ma non state prese in considerazione perché la loro espressione differenziale è strettamente legata alla stagionalità e quindi difficilmente correlabile con le variazioni luminose a cui sono soggette le piante del sito disturbato.

4.8.3. Risultati dell'analisi elettroforetica bidimensionale di campioni di foglia adulta di *P. oceanica* campionate ad Ischia (sito C).

In figura 4.17 sono riportati i gel bidimensionali, opportunamente colorati digitalizzati e sottoposti a scansione, ottenuti da campioni di foglie adulte di *P. oceanica* campionate in una prateria di Ischia (sito C) insediata lungo un gradiente di profondità. Anche in questo caso, prima di effettuare le analisi d'immagine, sono stati eseguiti cinque replicati della separazione elettroforetica di ciascun campione, e sono stati costruiti i rispettivi master gel relativi ai profili di espressione proteica dei campioni prelevati a batimetria diversa (-5m, -22m). I due master gel prodotti sono stati analizzati per individuare le differenze di espressione proteica dei due campioni. Gli spot identificati complessivamente dal sistema di analisi d'immagine sono stati 2301 di questi spot 33 sono risultati differenzialmente espressi, di cui 19 sono stati individuati come sovra-espresi e 14 come sotto-espresi nei campioni di foglia campionati a -22m rispetto a quelli campionati a -5m usati come riferimento.

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel dei campioni in esame, ha evidenziato differenze statisticamente significative non solo nell'espressione quantitativa ma anche qualitativa di alcuni spot, cioè presenza e/o assenza dello spot

nella mappa proteica, in particolare gli spots 2320, 2321, 1580, 979, 100, 2248, sono presenti solo nella mappa bidimensionale dei campioni di foglia campionati a -22m.

Inoltre, Ancora una volta, in piante acclimatate a diversa intensità luminosa (-5m e -22m), si ha una espressione differenziale della famiglia dei proteasomi (tabella 4.2 e figura 4.17), e vengono riscontrati bassi livelli di espressione della subunità maggiore della Rubisco (figura 4.18), questi risultati sono ben correlabili con le variazioni dell'attività fotosintetica riscontrate nello stesso sito (sito C) e riportate in letterature.

Tabella 4.2. Spot proteici identificati tramite confronto di fingerprint teorici e sperimentali

Spot number	Mw ^a (kDa)	pI ^a (pH un.)	UR	DR	Accession number	Cov. %	Protein	Mw (kDa)
936	30	6.0		1.0	gi/34909168	17	Putative alpha 7 proteasome subunit	27
972	27	5.5	2.0		gi/17380185	26	Putative alpha 7 proteasome subunit	25
981	28	5.2	1.2		gi/66271071	17	Beta 1 proteasome-7D	26
1773	63	6.0	3.6		gi/17297987	4	26S Proteasome	50

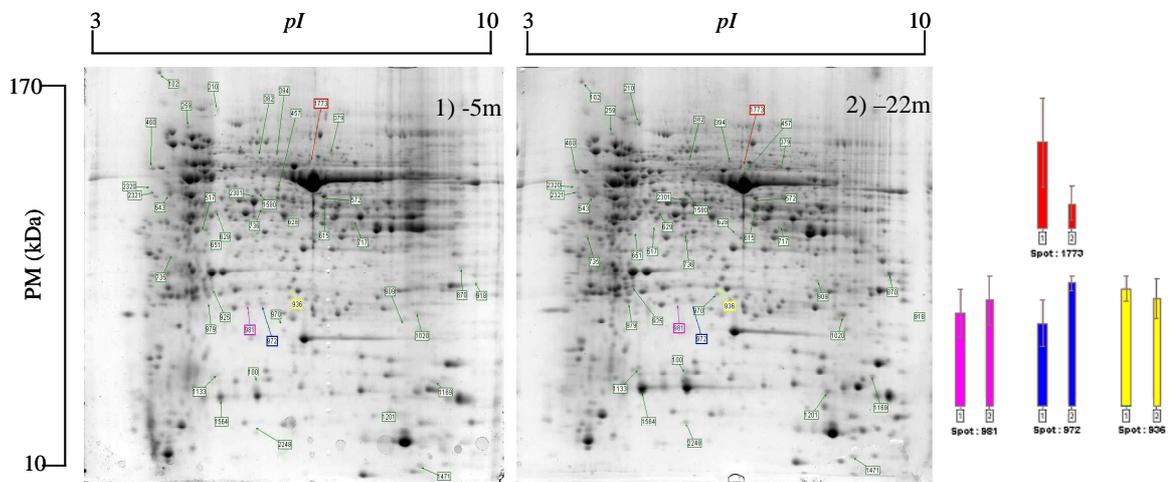


Figura 4.17. Spot variati in modo statisticamente significativo in piante campionate a due diverse profondità (-5 e -22m); gli istogrammi rappresentano la quantità media ed i rispettivi coefficienti di variazione di uno spot proteico nei due diversi gruppi di appartenenza: 1) -5m e 2) -22m, nello specifico si riferiscono alla famiglia dei proteasomi.

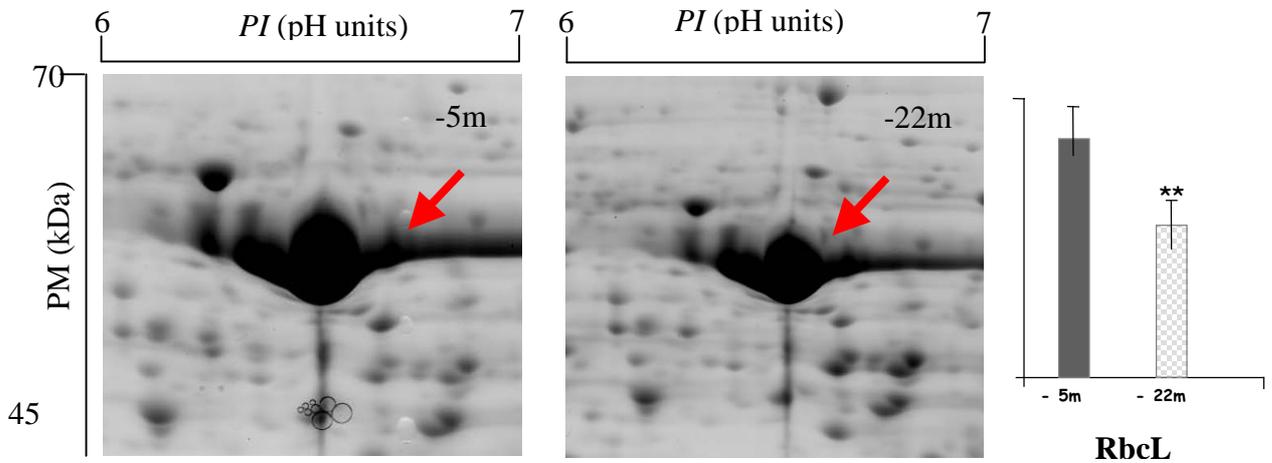


Figura 4.18. Ingrandimento della subunità maggiore della Rubisco, differenzialmente espressa in piante campionate nel sito C a due diverse profondità (-5m e -22m); la Rubisco, come risulta dall'istogramma riportato in figura, è sotto espressa nelle piante campionate a profondità maggiore rispetto a quelle campionate a profondità minore. $P < 0.01$.

4.9 Risultati relativi all'allestimento in acquario di un sistema sperimentale controllato.

In figura 4.19 è rappresentato il sistema sperimentale utilizzato per lo studio dell'adattamento di *P. oceanica* ad un ridotto regime luminoso.

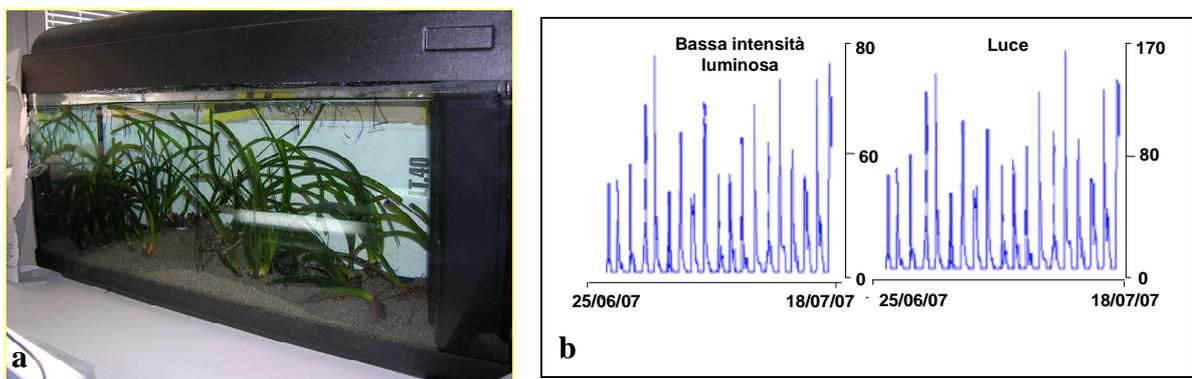


Figura 4.19. a) Allestimento in acquario di un sistema sperimentale controllato b) risultati delle sonde posizionate all'interno di due acquari la cui unica variabile è rappresentata dall'intensità di luce incidente (mediamente circa 80 e 160 lux rispettivamente)

Le piantine sono state acclimatate in acquario a diversa intensità luminosa per circa un mese, come risulta dai dati registrati dalle sonde e riportati in figura 4.19b.

Tramite analisi western-blot sono stati calcolati i livelli di espressione della subunità maggiore della Rubisco; tali livelli sono stati messi in relazione con quelli ottenuti da piante di *P. oceanica* provenienti da campioni prelevati a diversa batimetria (figura 4.20).

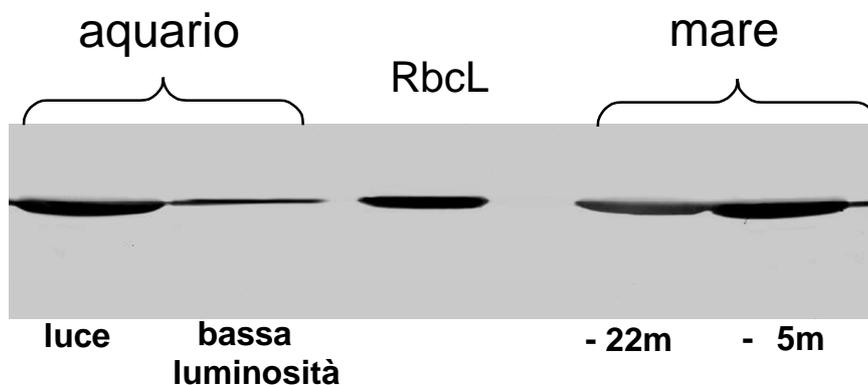


Figura 4.20. Analisi Western blot mono dimensionale. A partire da sinistra verso destra vengono mostrati dopo reazione con anticorpo diretto contro la subunità maggiore della Rubisco i livelli di espressione dei campioni acclimatati in acquario a diversa intensità luminosa rispetto ai campioni ottenuti a diversa batimetria. La linea centrale rappresenta lo standard della subunità maggiore della Rubisco (Sigma 15 μ g).

Mediante la tecnica del dot-blot invece sono stati calcolati i livelli di espressione del proteasoma 26S (figura 4.21) attraverso l'utilizzo di un anticorpo diretto contro la subunità DS5a.

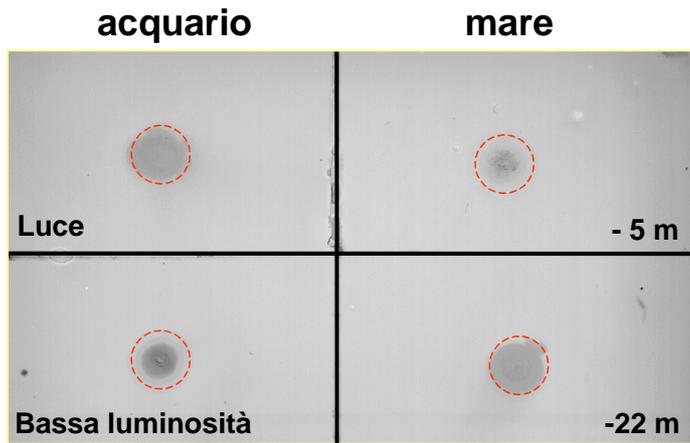


Figura 4.21. Dot blot con un anticorpo diretto contro la subunità DS5a del proteasoma 26S. Il cerchio rosso in figura serve ad evidenziare l'area di caricamento dell'estratto.

Dai dati risulta come le piante acclimatate a basse intensità presentano bassi livelli di espressione della subunità maggiore della Rubisco ed elevati livelli di espressione del proteasoma 26S.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che in *P. oceanica* una continua esposizione a bassa intensità luminosa influenza il profilo proteico nei tessuti foliari e si esplica con una espressione differenziale di una serie di proteine tra cui la Rubisco e quelle appartenenti alla famiglia dei proteasomi.

DISCUSSIONE

Posidonia oceanica risente in modo particolare delle variazioni della qualità dell'ambiente ed è sensibilmente danneggiata allorché l'inquinamento, inteso in senso lato, è troppo accentuato; per questo motivo *P. oceanica* è ritenuta un eccellente indicatore della qualità ambientale. All'inquinamento di origine antropica si associa un progressivo disadattamento di *P. oceanica* alle mutate condizioni climatiche in cui versa il Mar Mediterraneo, che ha come conseguenza una naturale rarefazione delle praterie. Si deve inoltre tenere presente che in questa specie la scarsa incidenza della riproduzione sessuata ha portato nel tempo a una diminuzione della variabilità genetica intrapopolazione che l'ha resa più vulnerabile rispetto ai cambiamenti delle condizioni ambientali (Procaccini & Mazzella, 1998; Procaccini *et al.*, 2002). In particolare la torbidità delle acque, l'eutrofizzazione e lo sviluppo di epifiti sulle foglie riducono l'intensità di luce che raggiunge la pianta mettendo in crisi la sua sopravvivenza.

Per il suo sviluppo *P. oceanica* necessita, infatti, di una adeguata illuminazione, e per questo motivo sono fattori determinanti sia la trasparenza dell'acqua che la profondità. Quando la pianta incontra queste condizioni ambientali favorevoli, colonizza vaste aree di fondo marino, formando praterie che si estendono dalla superficie fino a circa 30-35 metri di profondità, spingendosi a volte fino a 40 metri in acque particolarmente limpide. La luce, quindi, è spesso considerata il principale fattore che regola l'abbondanza delle *seagrass* e la produttività in termini di sviluppo di biomassa dipendente dalla stagionalità (Sand- Jensen, 1975; Marbà *et al.*, 1996) e alla distribuzione batimetrica (Dennison, 1987; Duarte, 1991b). Le *seagrass* ricevono approssimativamente l'11% della irradianza di superficie alla loro massima profondità di colonizzazione (Duarte, 1991b) e quindi sono in grado di vivere in ambienti con luce ridotta e variabile. A luce ridotta la performance di queste piante aumenta grazie a una serie di risposte di acclimatazione (Backman & Barilotti, 1976; Dennison & Alberte, 1986; West, 1990; Olesen & Sand-Jensen, 1993; Abal *et al.*, 1994; Philippart,

1995) che portano a modelli modificati di allocazione delle risorse energetiche; questi tendono a massimizzare l'efficienza di captazione della luce e della sua conversione in energia chimica, mentre riducono la quantità di energia dissipata nella respirazione (Björkman, 1981). Questo ha come conseguenza la richiesta di un minimo apporto di luce richiesto per la fotosintesi (Spence & Chrystal, 1970; Goldborough & Kemp, 1988; Maberly, 1993). Questo pattern di risposta è realizzato generalmente grazie ad un aumento del contenuto in pigmenti fotosintetici, una maggior superficie foliare per unità di biomassa foliare, che si traduce in un aumento della luce assorbita per unità di peso del tessuto fotosintetico (Enríquez *et al.*, 1994; Markager & Sand-Jensen, 1994).

Dati contrastanti però sull'attività fotosintetica stanno sempre più emergendo che testimoniano l'elevata plasticità delle *seagrass* nella risposta adattativa alla bassa luminosità (Figueroa *et al.*, 2002; Olesen *et al.*, 2002; Lorenti *et al.*, 2006) e che spesso invocano dei determinanti specie-specifici per spiegare la mancanza di significatività. In aggiunta a queste variazioni morfologiche e funzionali si ha anche una ridotta densità dei ciuffi nelle praterie (Chambers & Kalff, 1985; Duarte, 1991b; Krause-Jensen *et al.*, 2000). Quindi, l'acclimatazione a bassa irradianza nelle *seagrass* è un processo gerarchico, che coinvolge tutta una serie di arrangiamenti che avvengono a vari livelli (foglia, densità dei ciuffi e struttura della popolazione). Benché, l'acclimatazione delle *seagrass* sia stata stimata nel dettaglio, sono ancora disponibili poche informazioni sull'importanza relativa che l'acclimatazione possiede a ciascuno di questi livelli (viz. Dennison & Alberte, 1985; viz. Dennison & Alberte, 1986; Abal *et al.*, 1994; Lee & Dunton, 1997). Per esempio, in relazione alla profondità cambia la densità dei ciuffi, quindi per spiegare i processi che *P. oceanica* attua in risposta a cambiamenti dell'intensità luminosa e che portano alla conseguente acclimatazione della pianta si deve fare riferimento, alla ripartizione della biomassa e alla bassa risposta fotosintetica a cui le foglie vanno incontro (Olesen *et al.*, 2002). Inoltre, piante di *P. oceanica* acclimate a maggiore profondità mostrano una maggiore longevità dei ciuffi. Nell'insieme, queste tipiche differenze, legate al metabolismo fogliare e alla dinamica dei ciuffi, suggeriscono che *P. oceanica* sia capace di sopravvivere molto tempo a ridotta irradianza, perché essa mette in atto tutta

una serie di meccanismi per far fronte alle condizioni di scarsa luminosità cui è soggetta. Tali meccanismi riguardano principalmente, come riportato, una riduzione del tasso di respirazione delle foglie e una sostanziale riduzione della capacità fotosintetica delle foglie che si traduce con una ridotta capacità di crescita. Quindi, la progressiva riduzione della densità della prateria di *P. oceanica*, in relazione alla profondità, è uno degli effetti più evidenti del processo di acclimatazione a bassa irradianza. Una volta che vengono stabiliti alcuni parametri, la crescita e la sopravvivenza dei ciuffi dipende molto dalle variazioni ambientali a cui tali piante sono soggette e dall'intervallo di tempo che intercorre nell'istaurarsi della variazione.

Gli autori concludono sostenendo che *P. oceanica*, come atteso, nel caso in cui sia soggetta ad una repentina ed anormale riduzione dell'intensità luminosa, risponde in modo molto ridotto al disturbo e nella maggior parte dei casi si assiste ad una elevata mortalità dei ciuffi.

Sulla base di queste conoscenze, i siti selezionati per il presente lavoro di tesi, rappresentano due esempi di adattamento a basse luminosità derivanti, uno dalla torbidità persistente delle acque durante tutto l'anno che quindi si configura come cronicizzazione del disturbo; l'altro è caratterizzato da un gradiente di profondità che determina lo sviluppo della prateria in condizioni di progressiva riduzione di luce. Queste situazioni incidono entrambe sull'irradianza media annuale ricevuta dalle praterie, rispetto ai siti selezionati come controllo che, invece, ricevono entrambi una quantità di irradianza annuale che è doppia rispetto alle prime. Riscontri sulla densità delle praterie, la fenologia delle piante e i parametri citofisiologici (Acunto *et al.*, 2006, Cozza *et al.*, 2004), hanno evidenziato che la prateria del sito sottoposto a bassa luminosità in acque superficiali (sito A) presenta alcuni degli adattamenti gerarchici descritti per il processo di acclimatazione a ridotta irradianza, come la minore densità della prateria, il minor numero di foglie per ciuffo, ma a livello fenologico sono caratterizzate da una minore superficie foliare, hanno un minor contenuto di pigmenti fotosintetici, accompagnato da una significativa diminuzione del numero di cloroplasti per cellula nel mesofillo delle foglie adulte. Adattamenti gerarchici, in parte

concordanti con quelli riportati per l'acclimatazione, sono descritti anche per le praterie del Lacco Ameno (sito C) (Buia, 1992).

L'applicazione dell'analisi bidimensionale, la conseguente spettroscopia di massa e la identificazione delle proteine mediante analisi bioinformatica rappresenta il primo approccio proteomico completo in *P. oceanica*. Uno dei maggiori problemi che si riscontrano nello studio proteomico, ma anche genomico, di popolazioni naturali è l'estrema variabilità genetica degli individui che si traduce in una variabilità delle risposte fenotipiche agli stimoli ambientali. Inoltre, il genoma di *P. oceanica* è quasi del tutto sconosciuto e solo recentemente l'approccio genomico con EST (Expressed Sequence Tags) è stato avviato proprio sulla prateria del Lacco Ameno alle stesse profondità considerate per l'analisi proteomica (Migliaccio *et al.*, 2006). Nonostante queste difficoltà, *P. oceanica* rappresenta però un buon modello sperimentale in quanto essa preferisce propagarsi per via vegetativa piuttosto che riprodursi sessualmente (Meinesz *et al.*, 1991); ne consegue che un singolo individuo può ampliarsi aumentando il numero di ciuffi lungo il rizoma plagiotropo e conferendo alla prateria una struttura genetica a chiazze (*patches*) clonali. Questo abbatte fortemente il numero di genotipi presenti in una prateria anche molto estesa. Il disegno di campionamento rappresenta quindi uno degli elementi fondamentali della ricerca, perché determina la possibilità di applicare uno degli approcci possibili nella genomica funzionale, e cioè di comparare la variabilità intrinseca di un clone (analizzando più ciuffi foliari) e di confrontarla con la variabilità intrinseca di cloni diversi nelle stesse condizioni e nella stessa località. Analisi genetiche pregresse hanno evidenziato una variabilità genetica, anche se bassa, nelle due popolazioni superficiali da noi considerate (sito A e sito B) (Serra *et al.*, 2007) e hanno individuato una chiara disgiunzione tra piante che si sviluppano sopra e sotto la profondità di termoclino nel sito C (Migliaccio *et al.*, 2005). Come atteso, si è riscontrata una bassa variabilità del numero e del pattern di migrazione degli spot nei gel 2-DE all'interno della stessa popolazione e tra popolazioni appartenenti a siti di campionamento diversi; nel contempo si è avuta anche un'alta riproducibilità delle analisi 2-DE nei diversi periodi di campionamento.

In totale, confrontando le mappe 2-DE di campioni del sito A e del sito B, sono stati individuati 26 spot differenzialmente espressi, di questi solo 16 sono stati escissi digeriti proteoliticamente con tripsina ed analizzati con uno spettrometro di massa Maldi-TOF/TOF; gli altri dieci non sono stati escissi perchè poco rappresentati e quindi poco espressi nei campioni proteici, che non presentavano una quantità sufficiente di proteina per consentire l'analisi in spettroscopia di massa. Fra le proteine sequenziate 11 sono state identificate mediante *database*, confrontando cioè *fingerprint* teorici e sperimentali, mentre per le altre cinque non si è avuta alcuna assegnazione statisticamente significativa. Le proteine che sono state identificate sono: la β -amilasi la cui funzione è quella di degradare l'amido in zuccheri, la fruttosio-bisfosfato aldolasi che catalizza la reazione di degradazione del D-fruttosio 1,6-bisfosfato producendo i due triosi glicerolo fosfato+D-gliceraldeide 3-fosfato (quarto step della glicolisi), l'acido caffeico-O-metiltransferasi che interviene nella sintesi dei fenoli, la superossido dismutasi e la piridossina che intervengono nella protezione delle cellule in risposta a stress ossidativi, l'acido perclorico un potente inibitore della sintesi proteica, e la nucleoside di fosfato chinasi, un enzima che catalizza la sintesi di nucleosidi trifosfato a partire dai corrispondenti nucleosidi difosfato; in base a questa funzione quest'enzima può essere considerato un collegamento importante fra la fosforilazione ossidativa e funzioni come la biosintesi degli acidi nucleici, degli zuccheri e dei grassi, la sintesi proteica e la trasduzione del segnale. Se queste proteine siano coinvolte e quale ruolo abbiano nel processo di acclimatazione, non è al momento chiaro perchè mancano indagini al riguardo. Un'ipotesi, alla luce delle evidenze esistenti, potrebbe riguardare il ruolo del metabolismo ossidativo (attività della SOD e piridossina) e collegarlo alla biosintesi di fenoli (attività dell'acido caffeico-O-metiltransferasi) in risposta ad uno stato di stress imposto alle piante nel sito A. Infatti una maggiore concentrazione di fenoli è stata riscontrata proprio nelle cellule del mesofillo di queste piante (Cozza *et al.*, 2004); l'accumulo di fenoli in *P. oceanica* infatti è stato evidenziato anche in altri tipi di stress biotico e abiotico (Dumay *et al.*, 2004). La β -amilasi e la fruttosio-bisfosfato aldolasi hanno un ruolo nella dislocazione delle sostanze organiche, dallo stroma del cloroplasto ove è

accumulato l'amido primario, verso il citoplasma dove hanno sede le reazioni glicolitiche.

Tra le proteine identificate, quattro appartengono alla famiglia dei proteasomi, in particolare, tre di queste proteine risultano over espresse nei campioni sottoposti a condizioni di luce limitanti (sito A) e cioè la subunità β del proteasoma (spot 448, PM 27, UR 5.5) la subunità α del proteasoma 7 (spot 418, PM 30 kDa, UR 2.1), e il proteasoma 26S, mentre una di queste risulta significativamente sotto espressa ed è la subunità β -1 del proteasoma 7D (spot 453, PM 26 kDa, DR 1.5; $p < 0.01$).

Per verificare se le differenze quantitative in termini di livelli di espressione proteica riscontrate nelle due praterie (sito A, sito B), soggette a diverse condizioni quali-quantitative dello spettro luminoso, fossero da ascrivere a processi di acclimatazione a lungo termine alle condizioni di scarsa luminosità e non ad altri tipi di processi, sono stati valutati gli effetti di condizioni di luce limitanti sul proteoma di campioni ottenuti da un'unica prateria a 5 m e 22 m di profondità nei fondali del Lacco Ameno di Ischia. Dalle mappe bidimensionali, dei campioni prelevati alle due batimetrie, sono stati isolati 33 spot differenzialmente espressi. Di questi 19 sono stati individuati come sovra-espressi e 14 come sotto-espressi nei campioni di foglia campionati a -22m, rispetto a quelli campionati a -5m usati come riferimento. Il confronto della percentuale di volume degli spot, presenti nei gel dei campioni in esame, ha evidenziato differenze statisticamente significative non solo nell'espressione quantitativa ma anche qualitativa di alcuni spot e comunque ancora una volta, in piante acclimate a diversa intensità luminosa (-5m e -22m); come dato rilevante si ha una espressione differenziale della famiglia dei proteasomi, in particolare, si ha una sovra-espressione del proteasoma regolatorio 26S. La validazione di questi risultati è stata ottenuta dagli esperimenti condotti in acquario, mediante un sistema sperimentale controllato, in cui l'unica variabile era rappresentata dall'intensità luminosa; anche in questo caso, si è rilevato un aumento dei livelli di espressione del proteasoma regolatorio 26S in piante acclimate a bassa intensità luminosa.

L'espressione differenziale del proteasoma 26 S, complesso multiproteico che ha il compito di degradare polipeptidi all'interno della cellula, è quindi riconducibile

all'adattamento della pianta ad un ridotto regime luminoso. Questa ipotesi è supportata da evidenze che indicano come la proteolisi mediata dall'ubiquitina abbia un ruolo nel controllo dello sviluppo mediato dalla luce; studi recenti, infatti, hanno dimostrato che alcuni fotorecettori e in particolare alcuni fattori di trascrizione, che sono coinvolti nella traduzione del segnale luminoso, sono ubiquitina dipendenti e di conseguenza la loro degradazione avviene ad opera del proteasoma 26S (Hoecker, 2005).

Inoltre contemporanee analisi immunocitochimiche mono-e bidimensionali hanno rilevato più bassi livelli di espressione dell'enzima Rubisco nelle piante soggette ad un ridotto regime luminoso (sito A, sito C -22m, piante acclimatate in acquario a 80 lux).

La Ribuloso-1,5-difosfato-carbossilasi/ossigenasi (Rubisco) è l'enzima che catalizza la fissazione della CO₂ nel ciclo di Calvin e che costituisce la proteina più diffusa in natura. Da dati riportati in letteratura, si evince come in piante soggette a stress luminoso si assiste ad una progressiva riduzione dell'attività della Rubisco, tale riduzione contribuisce a una generale inibizione della capacità fotosintetica della pianta stessa influenzando negativamente sulla sua crescita (Gunasekera & Berkowitz, 1993). Questi dati, rafforzano l'idea circa la capacità che la *P. oceanica* ha nel adattarsi a bassi livelli di intensità luminosa, e sono ben correlabili con i dati citologici e spettrofotometrici rilevati nei medesimi siti di campionamento. Infatti, le piante, del sito sottoposto a minore intensità luminosa (sito A), presentano caratteri citofisiologici di acclimatazione e cioè un minor numero di cloroplasti per cellula e un minor contenuto di clorofilla *a* e *b*. In questo caso, come per altri già descritti, *P. oceanica* si adatta alle condizioni di scarsa luminosità con una riduzione della clorofilla e dei pigmenti accessori, invece di aumentare al massimo la capacità di raccolta della luce, aumentando la quantità di pigmenti fotosintetici. Tutto ciò si ripercuote sull'adattamento fenotipico della pianta stessa che si manifesta con un minor numero di cloroplasti per cellula, essendo i cloroplasti organuli che si dividono autonomamente dalla cellula proprio in risposta ad uno stimolo luminoso. Infatti, uno dei fattori fondamentali per la differenziazione dei cloroplasti nelle piante superiori è la luce; che attraverso i fotorecettori citocromo, criptocromo e protoclorofillide,

interagisce con i programmi endogeni di sviluppo e modula le risposte geniche regolando così la sintesi, l'assemblaggio e il funzionamento dei diversi componenti plastidiali. Dai risultati ottenuti e da quanto presente in letteratura, si evince, quindi, una risposta molto articolata del riarrangiamento dell'apparato fotosintetico della fanerogama marina *P. oceanica* sottoposta a basse condizioni di luminosità.

In conclusione possiamo affermare che le analisi proteomiche e immunocitochimiche hanno permesso di assumere che esiste una correlazione, tra la riduzione dei livelli di espressione della Rubisco e l'espressione differenziale delle classi polipeptidiche dei proteasomi, e l'acclimatazione (adattamento) di *P. oceanica* alle basse intensità luminose. Inoltre i risultati ottenuti suggeriscono che gli adattamenti gerarchici osservati nelle praterie in seguito ad acclimatazione alle basse luminosità siano originate da un primo adattamento biochimico (riduzione dei livelli di pigmenti e di Rubisco) seguito da un adattamento fenotipico e morfologico (riduzione del numero di cloroplasti) delle foglie. Tali drastici riarrangiamenti causerebbero la mortalità di molte foglie e ciò si rifletterebbe, a lungo termine, sulla densità dei ciuffi e sulla struttura della prateria.

BIBLIOGRAFIA

- Abal E.G., Loneragan N., Bowen P., Perry C.J., Udy J.W., Dennison W.C. 1994. Physiological and morphological responses of the seagrass *Zostera carpricorni* Aschers to light intensity. *J Exp Mar Biol Ecol* **178**: 113–119.
- Acunto S., Rende F., Cozza R., Innocenti A.M. 2006. State of health of *Posidonia oceanica* meadows along the northern tyrrhenian coast of Calabria, Italy. *Biol. Mar. Medit.* **13**: 8-13.
- Aebersold R. and Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**: 198-207.
- Alcoverro T., Cerbian E., Ballesteros E. 2001. The photosynthetic capacity of the seagrass *Posidonia oceanica*: influence of nitrogen and light. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **261**: 107-120.
- Alpi A., Bonfante P., Casadoro G., Coraggio I., Ligrone R., Mariani P., Rascio N., Sparvoli E., Vitale A. 1995. *Biologia della Cellula Vegetale*, UTET.
- Anderson N.G. and Anderson N.L. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* **17**: 443-453.
- Backman T.W. and Barilotti D.C. 1976. Irradiance reduction: effects on standing crops of the eelgrass *Zostera marina* in a coastal lagoon. *Mar Biol* **34**: 33–40.
- Berggren K. 2000. Background- free, high sensitivity staining of proteins in one and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* **21**: 2509-21.
- Björkman O. 1981. Responses to different quantum flux densities. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Encyclopaedia of plant physiology*, Vol 12A. Springer-Verlag, Berlin, p 57–107.
- Bonk T. and Humeny 2001. A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* **1**: 6-12.
- Bradford M.M. 1977. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**: 248-254.
- Brown J.W.S., Shaw P.J., Shaw P., Marshall D.F. 2005. *Arabidopsis* nucleolar protein database (AtNoPDB). *Nucleic Acids Research* **33**: 633–636.
- Buia M.C., Zupo V., Mazzella L. 1992 Primary production and growth dynamics in *Posidonia oceanica*. *PSZN I: Mar Ecol* **13(1)**: 2-16.

- Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **5** (10): 2497-2507.
- Chambers P.A. and Kalff J. 1985. Depth distribution and biomass of submersed aquatic macrophyte communities in relation to Secchi depth. *Can J Fish Aquat Sci* **42**: 701–709.
- Chapelle E.W., Kim M.S., McMurtrey J.E. III. 1992. Ratio analysis of reflectance spectra in (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sens. Environ.* **39**: 239-247.
- Conrads T.P., Anderson G.A., Veenstra T.D., Pasa-Tolic L., Smith R.D. 2000. Utility of accurate mass tags for proteoma-wide protein identification. *Anal. Chem.* **72**: 3349-3354.
- Corthals G.L., Wasinger V.C., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C. 2000. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**: 1104-1115.
- Cox P.A., Laushnan T., Ruckelshaus M.H. 1992. Surface and submarine pollination in the seagrass *Zostera marina*. *Bot. J. Linn. Soc.* **109**: 281- 291.
- Cozza R., Chiappetta A, Petrarulo M., Salimonti A., Rende F., Bitonti M.B., Innocenti A.M. 2004. Cytophysiological features of *Posidonia oceanica* as putative markers of environmental conditions. *Chemistry and Ecology* **20**: 215-223.
- Database. *Nucleic Acids Research* **33**: 605–610.
- Dawson S.P. and Dennison W.C., 1996. Effects ultraviolet and photosynthetically active radiation on five seagrasses species. *Mar. Biol.* **125**: 629-638.
- Della Croce N., Cattaneo Vietti R., Danovaro R. 1997. Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero. Utet, 1997.
- Dennison W.C. 1987. Effects of light on seagrass photosynthesis, growth and depth distribution. *Aquat Bot* **27**:15–26.
- Dennison W.C. and Alberte R.S. 1985. Role of daily light period in the depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). *Mar Ecol Prog Ser* **25**: 51–61.
- Dennison W.C. and Alberte R.S. 1986. Photoadaptation and growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) transplants along a depth gradient. *J Exp Mar Biol Ecol* **98**: 265–282.
- Duarte C.M., 1991a. Allometric scaling of seagrass form and productivity. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **77**: 289-300.
- Duarte C.M. 1991b. Seagrass depth limits. *Aquat Bot* **40**: 363–377.
- Duarte C.M., 2002. The future of seagrass meadows. *Environ. Conserv.* **29**: 192-206.

- Dumay O., Costa J., Desjobert J.M., Pergent G. 2004. Variations in the concentration of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica* under conditions of competition. *Phytochemistry* **65(24)**: 3211-20.
- Enríquez S., Agustí S., Duarte C.M. 1994. Light absorption by marine macrophytes. *Oecologia* **98**: 121–129.
- Ferro M., Salvi D., Brugie S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin, Joyard J., Rolland N. 2003. Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* **2.5**.
- Ferro M., Seigneurin-Berny D., Rolland N., Chapel A., Salvi D., Garin J., et al., 2000. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* **21**: 3517–3526.
- Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.B., Rudella. A., Sun Q., van Wijk K.J. 2004. In-Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts: NewProteins, NewFunctions, and a Plastid Proteome Database. *The Plant Cell* **16**: 478–499.
- Fusaro V.A. and Stone J.H. 2003. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol.* **21(S32)**:S3-14.
- Gambi M.C. 2002. Spatio-temporal distribution and ecological role of polychaete borers of *Posidonia oceanica* (L.) Delile scales. *Bull. Mar. Sci.* **71**: 1323-1331.
- Gegenheimer P. 1990. Preparation of extracts from plants. *Meth. Enzimol.* **182**: 174-193.
- Genot C. and Castelain C. 1994. Conformational changes of bovine serum albumin upon its adsorption in dodecane-in-water emulsions as revealed by front-face steady-state fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1199**: 59-64.
- Giraud G. 1979. Sur un méthode de mesure et de comptage des structures foliaires de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile. *Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille* **39**: 33-39.
- Godovac-Zimmermann J., Brown L. 2001. Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry. *Mass. Spec.* **20**: 1-57.
- Goldsborough W.J., Kemp W.M. 1988. Light responses of a submersed macrophyte: implications for survival in turbid tidal waters. *Ecology* **69**: 1775–1786.
- Green E.P. and Short F.T. 2003. World Atlas of Seagrasses, University of California Press, Berkeley, USA.
- Gunasekera D. and Berkowitz G.A. 1993. Use of Transgenic Plants with Ribulose- 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Antisense DNA to Evaluate the Rate Limitation of Photosynthesis under Water Stress. *Plant Physiol.* **103**: 629-635.

- Harris D.C. 1991. *Chimica Analitica Quantitativa*, Zanichelli Luglio.
- Heazlewood J.L. and Millar A.H., 2005. AMPDB: the *Arabidopsis* Mitochondrial Protein. *Nucleic Acids Research* **33**: 605-610.
- Hemminga M.A., Duarte C.M. 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press.
- Hunt D.F., Henderson R.A., Shabanowitz J., Sakaguchi K., Michel H., Sevilir N., Cox A.L., Appella E., Engelhard V.H. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MCH molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255**: 1261-1263.
- Hurkman W.J. and Tanaka C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**: 802-806.
- Jacobs, D.I., van der Heijden R., Verpoorte R. 2000. Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research. *Phytochem. Anal.* **11**: 277-287.
- Kleffmann T., Hirsch-Hoffmann M., Gruissem W., Baginsky S. 2006. plprot: A Comprehensive Proteome Database for Different Plastid Types. *Plant and Cell Physiology* **47(3)**: 432-436.
- Komatsu S. 2005. Rice Proteome Database: A Step toward Functional Analysis of the Rice Genome. *Plant Molecular Biology* **59**: 179-190.
- Krause-Jensen D., Middelboe A.L., Sand-Jensen K., Christensen P.B. 2000. Eelgrass, *Zostera marina*, growth along depth gradients: upper boundaries of the variation as a powerful predictive tool. *Oikos* **91**: 233-244.
- Kubis S., Baldwin A., Patel R., Razzaq A., Dupree P., Lilley K., Kurth O., Leister D., Jarviset P. 2003. The *Arabidopsis ppil* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *Plant Cell* **15**: 1859-1871.
- Kuo J. 1983. The nacreous walls of sieve elements in seagrasses. *Am. J. Bot.* **70(2)**: 159-164.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larkum A.W.D. and den Hartog C. 1989. Evolution and biogeography of seagrasses. pp. 112-156. In *Biology of seagrasses: a treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Lee K.S., Dunton K.H. 1997. Effects of *in situ* light reduction on the maintenance, growth and partitioning of carbon resources in *Thalassia testudinum*. *J Exp Mar Biol Ecol* **210**: 53-73.
- Lorenti M., Gera A., Lassauque J., Mattera F., Buia M.C. 2006. Comparative *in situ* estimates of the photosynthetic activity of *Posidonia oceanica*: RLC and maximum quantum yield measurements. *Biol. Mar. Medit.* **13**: 56-59.

- Maberly S.C. 1993. Morphological and photosynthetic characteristics of *Potamogeton obtusifolius* from different depths. *J Aquat Plant Manag* **31**: 34–39.
- Major K.M. and Dunton K.H. 2002. Photosynthetic performance in *Syringodium filiforme*: seasonal variations in light-harvesting characteristics. *Aquat. Bot.* **68**: 249-264.
- Marbà N., Cebrián J., Enríquez S., Duarte C.M. 1996. Growth patterns of Western Mediterranean seagrasses: species-specific responses to seasonal forcing. *Mar Ecol Prog Ser* **133**: 203–215.
- Markager S., Sand-Jensen K. 1994. The physiology and ecology of light-growth relationship in macroalgae. *Prog Physiol Res* **10**: 209–211.
- Meinesz A., Molenaar H., Bellone E., Loques F. 1991. Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica* (L) Delile I. Effects of rhizome length and time of year on development orthotropic transplants. PSZNI: *Marine Ecology*. **13**: 136-174.
- Meyer Y., Grosser J., Chartier Y., Cleyet-Maurel J.C.C. 1988. Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* **9**: 704–712.
- Migliaccio M., De Martino F., Silvestre F., Photosynth G. 2005. Meadow-scale genetic structure in *Posidonia oceanica* L. (Delile). *Marine Ecology Progress Series* **304**: 55–65.
- Neely M.B. 2000. Somatic, respiratory and photosynthetic responses of the seagrass *Halodule wrightii* to light reduction in Tampa Bay. Pp. 33-48. In Bortone S.A. (ed). *Seagrasses: monitoring, ecology, physiology and management*. CRC Press, London.
- Olesen B., Sand-Jensen K. 1993. Seasonal acclimatization of eelgrass *Zostera marina* growth to light. *Mar Ecol Prog Ser* **94**: 91–99.
- Olesen B., Enríquez S., Duarte C.M., Sand-Jensen K. 2002. Depth-acclimation of photosynthesis, morphology and demography of *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* in the Spanish Mediterranean Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **236**: 89-97.
- Pandey A. and Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**: 837-846.
- Pasqualini V., Pergent-Martini C., Pergent G. 1999. Environmental impact identification along the Corsican coast (Mediterranean Sea) using image processing. *Aquat Bot* **65**: 311-320.
- Pedersen M. 1993. Growth and nutrient dynamics in marine plants. University of Copenhagen.
- Pergent G., Romero J., Pergent-Martini C., Mateo M.A., Boudouresque C.F. 1994. Primary production, stocks and fluxes in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **106**: 139-146.

- Pergent-Martini C., Rico-Raimondino V., Pergent G., 1994. Primary production of *Posidonia oceanica* in the Mediterranean basin. *Mar. Biol.* **120**: 9-15.
- Philippart C.J.M. 1995. Effects of shading on growth, biomass and population maintenance of the intertidal seagrass *Zostera noltii* Hornem. in the Dutch Wadden Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* **188**: 199–213.
- Phizicky E., Bastiaens P.I., Zhu H., Snyder M., Fields S. 2003. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* **422**: 208- 215.
- Procaccini G. and Mazzella L., 1998. Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis. *Marine Ecology Progress Series* **169**: 133-141.
- Procaccini G., Ruggiero M.V., Orsini L., 2002. Genetic structure and distribution of microsatellite population genetic diversity in *Posidonia oceanica* in the Mediterranean basin. *Bulletin of Marine Science* **71(3)**: 1291–1297.
- Rose J. K. C., Bashir S., Giovannoni J. J., Jahn, M. M., Saravanan R. S. 2004. TECHNIQUES FOR MOLECULAR ANALYSIS Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* **39**: 715-733.
- Rossignol M., Peltier J.B., Mock H. P., Matros A., Maldonado A. M., Jorrín J. 2006. Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. *Proteomics* **6**: 5529–5548.
- Sand-Jensen K. 1975. Biomass, net production and growth dynamics in an eelgrass (*Zostera marina* L.) population in Vellerup Vig, Denmark. *Ophelia* **14**: 185–201.
- Saravanan R.S. and Rose J.K.C. 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**: 2522–2532.
- Schiefthaler U., Russel A.W., Bolhà-Nordenkamp H.R., Critchley C. 1999. Photoregulation and photodamage in *Schefflera arboricola* leaves adapted to different light environments. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**: 485-494.
- Serra I., Procaccini G., Intrieri M.C., Migliaccio M., Mazzuca S., Innocenti A.M. 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in *Posidonia oceanica* (L) Delile. *Marine Ecology Progress Series* **338**: 71-79.
- Setsuko K. and Hiroyuki Y. 2006. Update and challenges on proteomics in rice *Proteomics* **6**: 4057–4068.
- Smith R.D, Anderson G.A., Lipton M.S., Pasa-Tolic L., Shen Y., Conrads T.P., Veenstra T.D., Udseth H.R. 2002. An accurate mass tag strategy for quantitative and high throughput proteome measurements. *Proteomics* **2**: 513-523.

- Smith R.D., Pasa-Tolic L., Lipton M.S., Jensen P.K., Anderson G.A., Shen Y., Conrads T.P., Udseth H.R., Harkewicz R., Belov M.E., Masselon C., Veenstra T.D. 2001. Rapid quantitative measurements of proteomes by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 1652-1668.
- Spence D.H.N. and Chrystal J. 1970. Photosynthesis and zonation of freshwater macrophytes. II. Adaptability of species of deep and shallow water. *New Phytol* **69**: 217–227.
- Terrados J. and Duarte C.M. 2000. Experimental evidence of resuspension within a seagrass (*Posidonia oceanica* L.) meadow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **243**: 45-63.
- Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I., Davison M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**: 377-396.
- Touchette B.W. and Burkholder J.M. 2000. Overview of the physiological ecology of carbon metabolism in seagrasses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **250**:169-205.
- Tsugita A. and Kamo M., 1999. 2-D electrophoresis of plant proteins. *Methods Mol. Biol.* **112**: 95-97.
- Unlu M., Morgan M. E., Minden J. S. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**: 2071-2077.
- Ute Hoecker 2005. Regulated proteolysis in light signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **8(5)**: 469-476.
- Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M. 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**: 2369–2375.
- West R.J. 1990. Depth-related structural and morphological variations in an Australian *Posidonia* seagrass bed. *Aquat Bot* **36**: 153–166.
- Westermier R., Loland S., Asbury R. 2002. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*.**25**: 250-260.
- Whitfield P.E., Kenworthy W.J., Durako M.J., Hammerstrom K.K., Merello M.F. 2004. Recruitment of *Thalassia testudinum* seedlings into physically disturbed seagrass beds. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **267**: 121-131.
- Wilkins M.R., Sanchez J.C., Williams K.L., Hochstrasser D.F. 1996 Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* **17(5)**:830-8.

Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.C., Jan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Umphery-Smith L., Williams K.L., Hochstrasser D.F. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* **14**: 61-65.

Yates III J.R., McCormack A.L., Schieltz D., Carmack E., Link A. 1997. Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry. *J. Prot. Chem.* **16**: 495-497

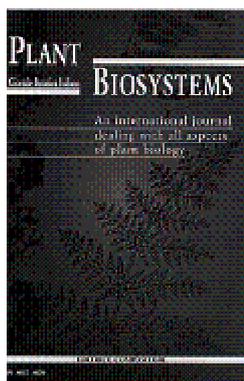
ALLEGATO 1

From: [Plantbio](#)

To: [Silvia Mazzuca](#)

Sent: Tuesday, October 16, 2007 1:32 PM

Subject: Manuscript accepted - Plant Biosystems



P L A N T

Giornale Botanico Italiano

B I O S Y S T E M S

Editorial office:

Dipartimento di Biologia Vegetale

Piazzale Aldo Moro, 5

I-00185 Roma, Italy

Tel. +39 06 49912420; Fax +39 06 49912420

E-mail: plantbio@uniroma1.it

Dear Prof. Mazzuca,

I am pleased to inform you that your manuscript

2-DE polypeptide mapping of *Posidonia oceanica* Leaf, a molecular tool for marine environment analyses

Antonia Spadafora, Dina Filadoro, Silvia Mazzuca, Marcella Bracale, Milena Marsoni, Monica Cardilio, Anna Maria Innocenti

has been accepted for publication on *Plant Biosystems*.

It will be published in vol. 142

Kind regards

Carlo Blasi
Editor-in-Chief



Abstract

The aim of this research is to provide a molecular tool based on polypeptide mapping to investigate the flowering marine plant *Posidonia oceanica*. This plant is very vulnerable to the contaminants, thus it is considered a valuable bio-indicator of water quality in bio-monitoring programs of coastal environment. *P. oceanica* was found recalcitrant to the common protein extraction methods, thus three different extraction procedures were compared to obtain high yield and quality protein extracts suitable for the mono-dimensional and bi-dimensional electrophoresis (1-DE and 2-DE). Proteins were extracted from juvenile, intermediate and adult leaves in order to assess the influence of tissues differentiation on the protein yield. The highest protein yield was obtained with 20 % trichloroacetic acid (TCA) precipitation of proteins. The best extraction efficiency was found in juvenile leaf with respect to intermediate and adult ones. However, as a large amount of juvenile leaves is required for the 1-DE and 2-DE protein samples, these were considered not suitable for the analysis, because extensive sampling could introduce further damages in the meadows under study. High quality 2-DE polypeptide mappings were obtained only from intermediate and adult leaves; the good reproducibility of protein patterns indicates that this approach could be used to explore changes in protein expression of *P. oceanica* in response to altered environment conditions.

Keywords: *Posidonia oceanica*, protein extraction, electrophoresis, 2-DE analysis.

Introduction

Posidonia oceanica meadows are widely recognized as key ecosystems in coastal habitats of Mediterranean sea (Hemminga & Duarte, 2000). Many authors have reported a regression of *P. oceanica* meadows with a resultant loss of biodiversity in the associated species, according to the ecotoxicological impact (Pergent-Martini & Pergent, 1995; Guidetti & Fabiano, 2000; Ruiz et al., 2003). As a consequence, changes in distribution patterns, density, biomass, growth dynamics have been widely used to obtain an integrated response to disturbances in the coastal ecosystems. Thus *P. oceanica* is considered a potentially valuable bio-indicator of water quality (Pergent, 1991) and has been used in bio-monitoring programs for the marine environment (Boudouresque et al., 2000). More recently, many efforts have been focussed on gene expression analyses of aquatic organisms under environmental stress, by the application of proteomics molecular tools, with the aim to extend these methodologies to the aquatic ecotoxicology (Morris et al, 2007; Andacht and Winn, 2006; Kim et al., 2005). In fact, proteomics explore the protein expression and provide results about the changes of cellular pathways in response to the environment contaminants. The proteomics approach has been utilized in of numerous aquatic animal species, whereas in plant this method is still at a starting phase, because plant tissues involve a number of practical challenges that are more problematic than in other organisms (Park, 2004). In addition plant tissues show a relatively low protein concentrations (Tsugita, 1999). Thus many authors proposed alternative extraction procedures, with respect to those developed in the animal tissues, in order to obtained more purified proteins from different tissues and organs in plants (Park, 2004; Saravan & Rose, 2004).

Plant tissues, in fact, are often rich in compounds that strictly interfere with protein separation and analysis, including polysaccharides, lipids, polyphenols as well as a big number of secondary metabolites. Such compounds strongly affect protein electrophoresis, resulting in vertical and horizontal streaking, high background and a reduction in the number of resolved protein bands and protein spots. Namely polyphenols, which are stably kept in the vacuole of differentiated cells (Harborne, 1980), when the tissues are broken in extraction buffer, undergo polymerization and form cross-linkages with the proteins. The consequent insoluble precipitate compromises the subsequent protein purification irreversibly. Since *P. oceanica* leaves contain high levels of simple and complex polyphenols compounds (Agostini et al., 1998; Ferrat et al., 2003; Dumay et al. 2004, Cozza et al, 2004) and low levels of

proteins the main aim of this study is the removal of non-protein compounds before protein precipitation and purification.

The leaf tissues are the eligible materials to start proteomics of *P. oceanica* due to their abundance in meadows and because many leaf proteins in several plant species have been identified (Saravanan & Rose, 2004; Schiltz et al., 2004; Wang et al, 2003), overcoming the lack of completeness of the gene databases for this species. In order to optimize a procedure for proteome extraction of *P. oceanica* leaves, three different methods have been tried, carrying out substantial modifications to the extraction protocols proposed for terrestrial recalcitrant plants (Saravan & Rose, 2004; Wang et al, 2003). For seagrass protein analysis we selected the 2-DE protein separation method, widely used in the proteomics laboratory teams (Park, 2004) for its sensitive and reproducible responses. Our aim was to evaluate the extraction efficiency of this procedure in juvenile, intermediate and adult leaves to assess the influence of tissues differentiation on the protein yield. In fact, high yield and quality of protein fractions are necessary for a 2-DE samples suitable for the proteomics approach of the functional genomics of this plant.

Materials and Methods

Plant sampling

P. oceanica shoots were collected by scuba in the Tyrrhenian Sea in a well preserved meadow along the coast near Praia (39°54'28.83''N - 15°46'.38''E), at the depth of 8 m and at the distance of 2-5 m each other, to avoid the sampling from the same plant clone. From each shoot, juvenile, intermediate and adult leaves were sampled separately. In the shoot a gradient of differentiation is recognized from the apex to the external adult leaf. The juvenile leaves grow proximally to the shoot apex, they are small, pale and few per shoot, while many intermediate green leaves, variable in length are present. Distal to the shoot numerous adult leaves are present; these leaves differ from the intermediate leaves only for the occurrence of a sheath at the base (Giraud, 1977)

Dried tissue powder preparation and removing of phenol compounds

leaves (1 g of each type) were ground in liquid N₂ to obtain a powder that was further ground to a fine powder by the aid of quartz sand (silicon dioxide) and then transferred in 2 ml micro tubes. Tissue powder was processed separately with three different procedures as follow: *a*) according to Wang et al. (2003), tissue powder was dissolved in 2 ml 100% cold acetone (AC procedure) in order to remove low molecular weight contaminants and to concentrate the protein; sample was vortexed for 30 s and centrifuged at 13 000 rpm for 3 min (4°C). The pellet was extensively washed with cold 10% TCA in acetone until the supernatant became colourless and once with cold aqueous 10% TCA. Then the pellet was rinsed twice with cold 80% acetone, using both vortex and centrifugation in every step. The final tissue powder was dried at room temperature and used for protein extraction or stored at -80 °C for further use; *b*) in the second procedure tissue powder was re-suspended in 2 ml of cold aqueous 10% TCA in acetone (TCA-AC procedure) and washed three times; after, pellet was extensively washed in 10% TCA. The TCA was removed by washes with cold acetone until the supernatant was colourless and pellet was dried at room temperature; *c*) in the last procedure, 2 ml of 20% aqueous TCA (TCA procedure) with 1% PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), as a proteases inhibitor, was added to the tissue powder. After vortexing, the resultant pellet was washed once more with 20% TCA + 1% PMSF. The pellet was rinsed with cold 80% acetone, vortexed and centrifuged until the supernatant was colourless. The final pellet was dried at room temperature.

Protein extraction, electrophoresis and western blot

Proteins were extracted from AC, TCA-AC and TCA tissues powders, using the phenol extraction methods described by Meyer et al. (1988) and optimized for recalcitrant plant tissue by Wang et al. (2003). About 0.1 g of the dry powder of leaf tissue was resuspended in 0.8 ml phenol (Tris-buffered, pH 8.0; Sigma St Louis , MO, USA) and 0.8 ml dense SDS buffer (30% sucrose, 2% SDS, 0.1 M Tris-HCl buffer , pH 8.0, 5% 2-mercaptoethanol) in a 2 ml microtube. Samples were vortexed for 30 s and centrifugated at 13.000 rpm for 5 min. The upper phenol phase was removed and pipetted to fresh microtubes (0.3 ml for 2 ml tube), 5 volume of cold methanol plus 0.1 M ammonium acetate was added and the mixture was stored at -20 °C for 30 min. The precipitated proteins were recovered by centrifugation at 13.000 rpm for 5 min, and then washed with cold methanolic ammonium acetate twice and

cold 80% acetone twice. The final pellet was dried and dissolved in Laemmli (1970) sample buffer for 1-DE separation or in 2-DE rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 100 mM DTT). Proteins were quantified spectrophotometrically by the Bradford assay. For 1-D separation the Laemmli buffer system was used to cast 4.75 stacking and 12.5 resolving gel. The pellet was incubated from 2 h to overnight in the electrophoresis loading buffer. After denaturation at 95 °C for 3 min, proteins were resolved under constant 120 V in a Bio-Rad mini-Protean III apparatus until bromophenol blue reached the bottom of the gel. Gels were processed using software (Bio-Rad). Western blot was performed using a monoclonal antibody (Agriser) against the Rubisco large subunit and the secondary antibody anti rabbit alkaline phosphatase, AP conjugated (Agriser). The detection was performed using the detection system with the NBT/BCIP (4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) reagent kit (Roche). For 2-DE, protein sample were applied in 250 µl of 2-DE rehydration solution by reswelling 13 cm or 18 cm Immobiline DryStrip (strip 13 cm NL pH 3-10; strip 18cm NL pH 3-11 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) overnight. IEF was performed in IPGphor system (Amersham) applying 0 V for 1 h at 20°C, 30 V for 10 h at 16°C, 200 V for 4 h at 16°C, 3500 V for 30 min by gradient, 3500 V for 3 h at 16°C, 8000 V for 30 min by gradient until reaching 70000 Vh. Focused strips were equilibrated using 2% DTT and 2.5% iodoacetamide solutions and then positioned on a 12.5% gel. Secondary SDS-PAGE was carried out under constant current 45 mA/gel. After electrophoresis proteins were visualized with colloidal CBB. The 2-DE gels were processed using the ImageMaster 2D (Amersham).

Results

Removal of polyphenol compounds from leaf tissues and purity of protein extracts

As expected, *P. oceanica* was a plant recalcitrant to the common protein extraction methods. In fact, when we tried to extract proteins by direct homogenizing of *P. oceanica* leaves in aqueous phosphate buffers protein pellets appeared brown and sticky, due to the occurrence of polyphenols and other contaminants that co-purify with the proteins. These protein pellets were hard to dissolve in electrophoresis buffers, and cause vertical and horizontal streaking, high background even in the first electrophoresis dimension gels (data not shown). Thus the removal of polyphenols and other compounds, prior of the proteins purification was necessary. The efficiency of polyphenol removal of the three different procedures was evaluated by the quality of protein extracts obtained from juvenile, intermediate and adult leaves and analysed by 1-DE patterns. As shown in Fig 1 a the electrophoresis patterns, obtained with the AC procedure, resulted in very few protein bands and high background, particularly for the intermediate and adult leaf proteins, indicating that this procedure did not remove polyphenols and other non-protein compounds from the tissues. Fig. 1 b shows the electrophoresis pattern of proteins obtained with the TCA-AC procedure; the quality of separation of single protein bands was improved with respect to AC procedure, but a low resolution of the polypeptides and a high background were still present. In Fig 1 c the 1-DE gel of proteins extracted with the TCA procedure is shown: about 80 sharp bands of polypeptides ranging from 250-10 kDa, were excellently resolved without background. The prominent band of approximately 55 kDa was visible in all three patterns (Fig 1, see arrow) and identified as Rubisco large subunit by the specific antibody (Fig 1 d)

Fig 1

Although the amount of loaded proteins was equivalent (25 µg), the protein bands of adult leaf appeared less intense than those of juvenile and intermediated ones, probably due to the residual non-protein compounds that interfered with the polypeptides bands resolution. Further washings of tissues powder, at the first step of extraction, with 20% TCA did not improve the quality of the protein extract from adult leaf. Altogether these results clearly indicated that the TCA procedure gave the best purified protein extract, in comparison to that from the other procedures, indicating the suitability of this procedure for further 2-DE protein separations and analyses.

Protein yields in the juvenile, intermediate and adult leaves

The AC and TCA-AC, as expected, gave a substandard yield of proteins (approx 1.0 mg/g fresh tissues) for juvenile leaves and 0.5 mg/g for intermediate and adult leaves. Following the TCA procedure from 1 g of fresh leaf (juvenile, intermediate and adult) typically yields of 0.25 - 0.29 g of tissue powder were obtained. The TCA procedures showed a variable extraction efficiency in the different differentiation stages of *P. oceanica* leaves. In fact, in the juvenile leaves, the mean protein yield from fresh tissues was 50% more respect to those from intermediate and adult leaves; this result did not change, substantially, whether the protein yield was referred to the dry weight of the leaf tissues (Fig 2).

Fig 2

2-DE polypeptides separation

The TCA procedure also gave a high resolution of *P. oceanica* leaf protein separation in 2-DE gel. In spite of high protein yield from juvenile leaf, a large amount of shoot tissue is required for the 2-DE protein samples; as a consequence we considered that juvenile leaves were not suitable for the routinely use, as extensive sampling could cause further damages in the meadows analyzed. Thus high quality 2-DE polypeptide mappings were obtained only from intermediate and adult leaves (Fig 3). The pH 3-10 Immobiline Dry Strip patterns of *P. oceanica* leaf extracts revealed well-resolved polypeptide spots throughout the gels. Approximately 2000-2800 spots in diversity of pIs and molecular mass were visualized by colloidal CBB G staining, and the prominent spot, Rubisco is a good land marker on 2-DE gels (Fig. 3 a, see arrow). The spot-to-spot comparison between Fig 3a vs. Fig 3b revealed a reproducibility of about 80 % (matched spots/total spot ratio). The majority of the spots were in the region of the gel from pI 6.0 to pI 10.

Fig 3

Discussion

Posidonia oceanica meadows, which rank amongst the most productive coastal ecosystems, were threatened by a wide scale decline. To revert this situation there was the need to identify the changes at level of plant metabolism in response to the environment pollution. In fact there was a lack of information on plant tissues reaction, which also could unable new methodology for bio-monitoring programs. Particularly interesting the results obtained in this work by the proteomics approach based on protein two-dimensional electrophoresis analyses. This procedure, undertaken in *P. oceanica* leaf tissues using phosphate extraction buffer, followed by organic solvent precipitation, resulted in a substandard protein yield and in a brown pellet, not useful for the following processing for the presence of polyphenols and other contaminants together with the proteins. Thus, in *P. oceanica* leaf tissue it was necessary to remove thoroughly all contaminants before protein extraction. We followed the AC procedure performed for olive leaf (Wang *et al.*, 2003) on *P. oceanica* leaf tissues. We found that acetone precipitation of proteins did not remove the polyphenols compounds in leaves tissues because, very probably, acetone did not inhibit the cross-linking between polyphenols and amino acid residues. The high background and the few protein bands resolved in the 1-DE confirmed this hypothesis. The results obtained with the TCA-AC procedure demonstrated that the acid improved the protein precipitation and removed the water-soluble contaminants more efficiently than acetone. It is known that strong acid solutions inhibit the polymerization of phenols and their subsequent cross-linking with proteins (Harborne, 1980) and allow diffusion of soluble contaminants in the aqueous phase. In fact, increasing TCA concentration and avoiding the use of acetone, we obtained the best results. Furthermore, at 20% TCA concentration many proteins precipitated, avoiding the protein loss in aqueous phase. Extensive acetone washes removed the TCA residuals in tissue powder. After tissue powder drying, the proteins can be partitioned in the phenol phase to further minimize the presence of their contamination in the extracts. As the protein yields were concerned, the AC and TCA-AC procedures gave substandard concentrations, thus suggesting that the cross-linked proteins were not able to migrate in the phenol phase and remain trapped in the tissues powder pellets. Using the TCA procedure, the *P. oceanica* adult leaf protein yield was comparable with those obtained from adult olive leaf (Wang *et al.*, 2003), but less concentrated respect to those obtained by analogous procedure from tissues of

other recalcitrant plant species (Saravanan & Rose, 2004). A noticeable result was that protein yield decreased as the leaf differentiation increased; it might be that in adult leaf, protein amount really decreased with age, since water content in tissue did not affect the relative yield of proteins between the leaf types. 2-DE analyses was carried out on TCA extracts from intermediate and adult leaves mainly for two reasons. First, the small number of juvenile leaves per shoot required more extensive sampling which could cause a higher stress in the meadow. Second, proteins from intermediate and adult leaves gave both 1-DE and 2-DE high resolved patterns of bands and spots respectively. The major polypeptide band and spot concerned the large subunit of Rubisco, that typically characterize the leaf extracts (Wang et al 2003; Saravan & Rose 2004). The most relevant conclusion of the present work was that the TCA procedure generated samples, from which complex and resolvable protein populations could be isolated and gave the greatest protein yield, which was particularly effective with recalcitrant tissues such as *P. oceanica* leaf tissues. These results could have interesting implications for proteomic analyses of sea grasses tissues based on 2-DE. However, the procedure generated similar patterns of protein spots following 2-DE in two different stage of leaf development, highlights the major problem intrinsic to the analysis of the total tissue proteome, in which mainly abundant proteins are detectable, while proteins differentially expressed are hard to identify. To resolve this challenge, protein fractionation procedures should be necessary, to simplify the patterns and to emphasize the detection of weakly expressed proteins. This would be our next effort in applying the 2-DE in the future coastal bio-monitoring programs.

Acknowledgements

This study has been funded by the 2005-2006 research grants of Università della Calabria, of Università dell'Insubria and of the Assessorato dell'Ambiente della Provincia di Cosenza

References

- Agostini S, Desjobert JM, Pergent G. 1998. Distribution of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry* 48: 611-617.
- Andacht T.M. and Winn R.N. 2006. Incorporating proteomics into aquatic toxicology. In: Abstract from Thirteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms. *Marine Env. Res.*, 62:156-157
- Boudouresque, C.F., Charbonel, E., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Cadiou, G., Bertrand, M.C., Foret, P., Ragazzi, P., Rico-Raimondino, V. 2000. A monitoring network based on the seagrass *Posidonia oceanica* in the northwestern Mediterranean sea. *Biol. Mar. Medit.* 7: 328-331.
- Cozza, R., Chiappetta, A., Petrarulo, M., Salimonti, A., Rende, F., Bitonti M.B. and Innocenti A.M. 2004. Cytophysiological features of *Posidonia oceanica* as putative markers of environmental conditions. *Chemistry and Ecology* 20: 215-223
- Dumay O, Costa J, Desjobert JM, Pergent G. 2004. Variations in the concentration of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica* under conditions of competition. *Phytochemistry* 65(24):3211-20.
- Ferrat L, Pergent-Martini C. and Romero M. 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 65: 187–204.
- Giraud, G. 1977. Essai de classement des herbiers de *Posidonia oceanica* (Linne`) Delile. *Botanica Marina* 20: 487–491.
- Guidetti, P. and Fabiano, M. 2000. The use of lepidochronology to assess the impact of terrigenous discharges on the primary leaf production of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Pollution Bulletin* 40: 449–453.
- Harborne JB. 1980. Plant phenolics, in *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 8, Secondary Plant Products, Bell EA and Charlwood BV. Eds, Springer, Berlin, 329-402.
- Hemminga, M.A., Duarte, C.M. 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press.
- Herzca, S.Z., Dunton, K.H., (1997). Seasonal photosynthetic patterns of the seagrass *Thalassia testudinum* in the western Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series* 152, 103–117.
- Kim YK, Yoo WI, Lee SH, Lee MY. 2005. Proteomic analysis of cadmium-induced protein profile alterations from marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Ecotoxicology*. 14(6):589-596.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Meyer Y, Grosser J, Chartier Y, Cleyet-Maurel, JCC. 1988. Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* 9: 704–712.

Morris RM, Fung JM, Rahm BG, Zhang S, Freedman DL, Zinder SH, Richardson RE. 2007 Comparative proteomics of *Dehalococcoides* spp. reveals strain-specific peptides associated with activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (1): 320-326.

Park, O.K. 2004. Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Ecology* 37: 133-138

Pergent-Martini, C., Pergent, G. 1995. Impact of a sewage treatment plant on the *Posidonia oceanica* meadow: assessment criteria. In: Proceedings of the second International conference on the Mediterranean coastal environment. MEDCOAST'95, pp. 1389– 1399.

Pergent, G. 1991. Les indicateurs ecologiques de la qualité du milieu marin en Méditerranée. *Oceanis* 17: 341-350.

Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M. and Fields, S. 2003. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422: 208- 215.

Ruitz, J.M. and Romero, J. 2003. Effects of disturbances caused by coastal constructions on spatial structure growth dynamics and photosynthesis of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 1523-1533

Saravanan R.S. and Rose J.K.C. 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4: 2522–2532.

Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer N, Burstin J. 2004. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiol.*, 135: 2241-2260.

Tsugita, A., Kamo, M. 1999. 2-D electrophoresis of plant proteins. *Methods Mol. Biol.* 112: 95–97.

Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M. 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24: 2369–2375.

Figure captions

Figure 1. Polypeptide patterns after mono-dimensional electrophoresis (1-DE) of *P. oceanica* leaf protein extracted a) following the AC procedure; lane 1: juvenile leaf; lane 2: intermediate leaf; lane 3: adult leaf; b) following the TCA-AC; lane 4: juvenile leaf; lane 5: intermediate leaf; lane 6: adult leaf; c) following TCA procedure: about 80 sharp bands of polypeptides ranging from 200-10 kDa were resolved in a 12.5% resolving gel without background; lane 7: juvenile leaves; lane 8: intermediate leaves; lane 9: adult leaves. d) Rubisco large subunit (55 kDa) identified in adult leaf extract by the specific monoclonal antibody (Agrisera). Markers ranging from 200 to 6.5 kDa.

Figure 2. Protein yields of *P. oceanica* from juvenile, intermediate and adult leaves referred to the tissue fresh weight (black bars) and to tissue dry weight (grey bars). Proteins were quantified by the Bradford assay. Results are the mean values from five independent replicates (\pm S.E.)

Figure 3. 2-DE patterns of proteins extracted using the TCA procedure. The polypeptide mappings were obtained with a 3-10 linear pH gradient in the first dimension and visualized using colloidal Coomassie staining. a) polypeptide pattern from the intermediate leaves and b) from the adult leaves. The arrow indicate the migration position of the Rubisco large subunit. The boxes indicate the range of *pI* from 4.0 to 5.5

Figure 1

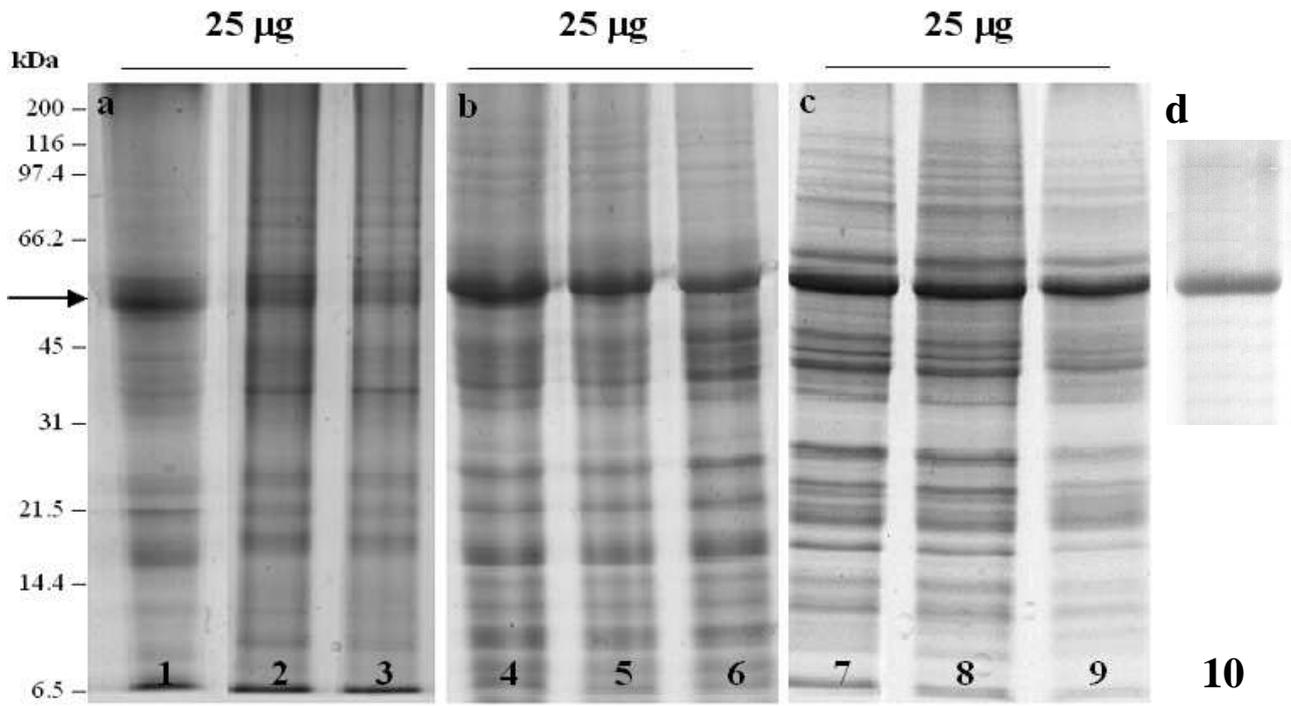


Figure 2

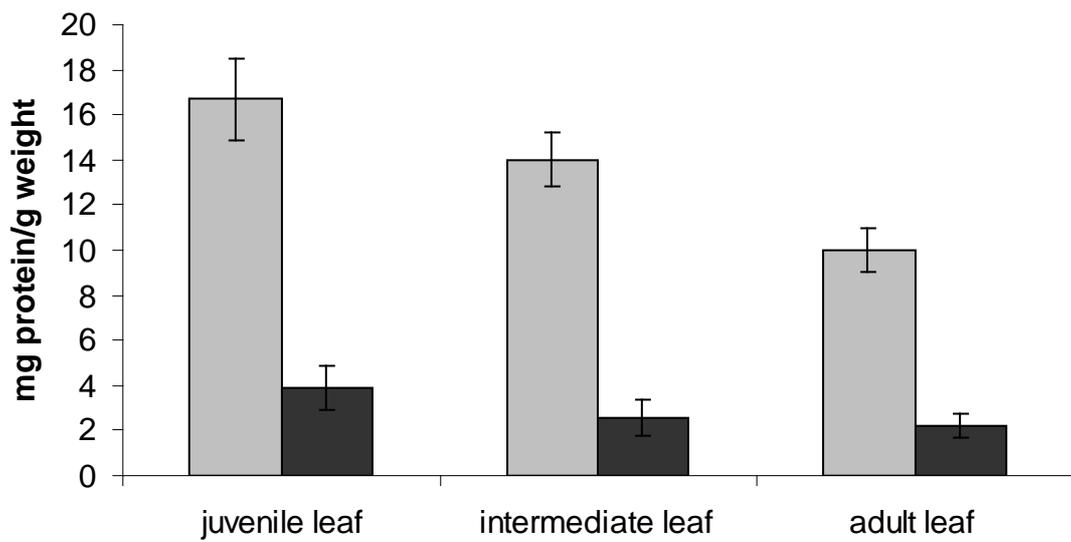
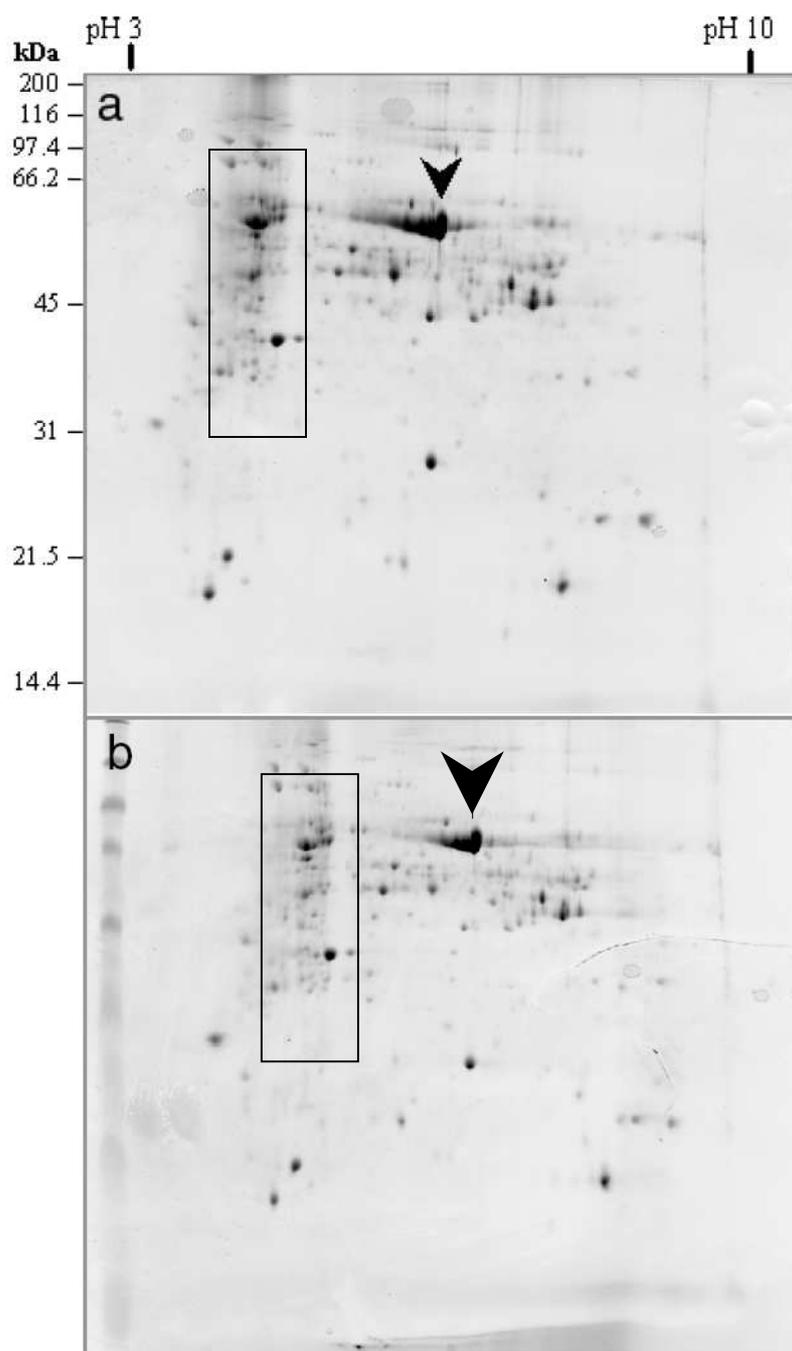


Figure 3



ALLEGATO 2

ALTRA PUBBLICAZIONE

S. Mazzuca, A. Spadafora, **D. Filadoro**, M. Marsoni, C. Vannoni, M. Bracale, A.M Innocenti (2007). Differential protein expression in *Posidonia oceanica* leaves acclimated to low light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Resubmitted after revision.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

S. Mazzuca, A. Spadafora, **D. Filadoro**, M. Bracale, M. Marsoni, A.M Innocenti. Proteasome as biomarker for acclimation to light stress in *Posidonia oceanica*. 102° Congresso Società Botanica Italiana, 26-29 settembre 2007, Palermo (coauthor in oral communication).

S. Mazzuca, A. Spadafora, **D. Filadoro**, M. Bracale, M. Marsoni, A.M Innocenti. The Proteomic approach in *Posidonia oceanica* population: which protein biomarkers for light stress acclimation? 3RD Mediterranean symposium on marine vegetation. 27-29 March 2007, Marseilles (coauthor in oral communication).

A. Spadafora, **D. Filadoro**, A. M. Innocenti, E. Perri, S. Mazzuca. Caratterizzazione della β -glucosidasi, un enzima chiave nei meccanismi di difesa contro agenti patogeni ed erbivori in *Olea europaea*. Convegno nazionale “Ricerca ed innovazione per l’olivocoltura meridionale (RIOM)”, 30 novembre-1 dicembre 2006, CRA - Istituto Sperimentale per l’Olivicoltura - Rende (CS).

S. Mazzuca, A. Spadafora, **D. Filadoro**, A. Parise, E. Perri, A. M. Innocenti. Localizzazione cellulare e tissutale della β -glucosidasi nella maturazione delle drupe e nel danno meccanico. Convegno nazionale “Ricerca ed innovazione per l’olivocoltura meridionale (RIOM)”, 30 novembre-1 dicembre 2006, CRA - Istituto Sperimentale per l’Olivicoltura - Rende (CS).

S. Mazzuca, A. Spadafora, **D. Filadoro**, M. Bracale, M. Marsoni, A.M Innocenti. Protein pattern and 2-DE polypeptides mapping in *Posidonia oceanica* subjected to different environment condition. Marine Genomics an international conference, 28 ottobre-1 novembre 2006, Sorrento.

S. Mazzuca, A. Spadafora, **D. Filadoro**, M. Bracale, M. Marsoni, F. Rende, A.M. Innocenti (2005). Proteins extraction from different tissues and organs of *Posidonia oceanica* and polypeptide mapping by two-dimensional electrophoresis. Mediterranean Seagrass Workshop, 29th May to 3th June 2006, Malta.

S. Mazzuca, R. Cozza, **D. Filadoro**, T. Pangaro, A.M. Innocenti 2005. Leaf protein analysis and ultrastructural features in *Posidonia oceanica*. Mediterranean Seagrass Workshop, 29th May to 3th June 2006, Malta.

Allegato 3



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1865

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
26S proteasome regulatory gi 17297987	50	5.91	4	6E-13	APLESYADIGGLDAQIQEIK	gi 1172635 in NCBI (Protein Details) gi 77745479 in NCBI (Protein Details) gi 34898202 in NCBI (Protein Details)



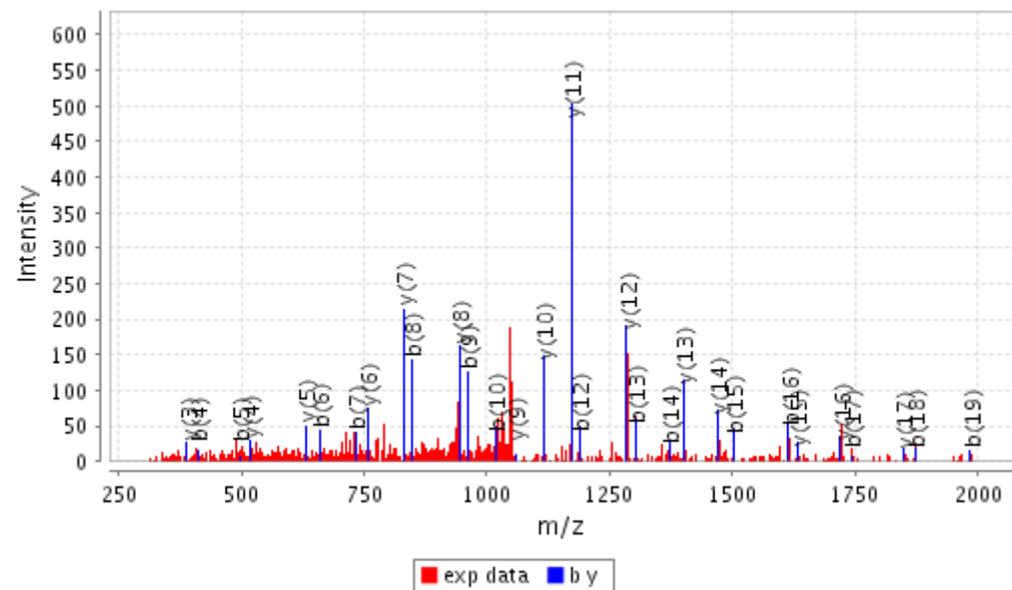
I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252



APLESYADIGGLDAQIQEIK MS/MS spectrum



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 351

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
pyridoxine biosynthesis protein gi 62733309	39	6.08	10	2E-18	VGLAQMLR TKGEAGTGNVVEAVR GEAGTGNVVEAVR IAAPYDLVMQTK	gi 50933621 in NCBIInr (Protein Details) gi 37530308 in NCBIInr (Protein Details) gi 15224470 in NCBIInr (Protein Details) gi 72256517 in NCBIInr (Protein Details) gi 2501578 in NCBIInr (Protein Details) gi 74026503 in



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						NCBIInr (Protein Details) gi 37531502 in NCBIInr (Protein Details) gi 78707909 in NCBIInr (Protein Details) gi 37531958 in NCBIInr (Protein Details) gi 34914302 in NCBIInr (Protein Details) gi 7488891 in NCBIInr (Protein Details) gi 10719739 in NCBIInr (Protein Details) gi 46399271 in



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						NCBIInr (Protein Details) gi 72256515 in NCBIInr (Protein Details) gi 72256519 in NCBIInr (Protein Details) gi 15224466 in NCBIInr (Protein Details) gi 13310484 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 470

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
Beta-amylase	55	5.29	3	5E-20	SAPEELVQQVLSAGWR	gi 50938173 in NCBIInr (Protein Details) gi 169779 in NCBIInr (Protein Details)



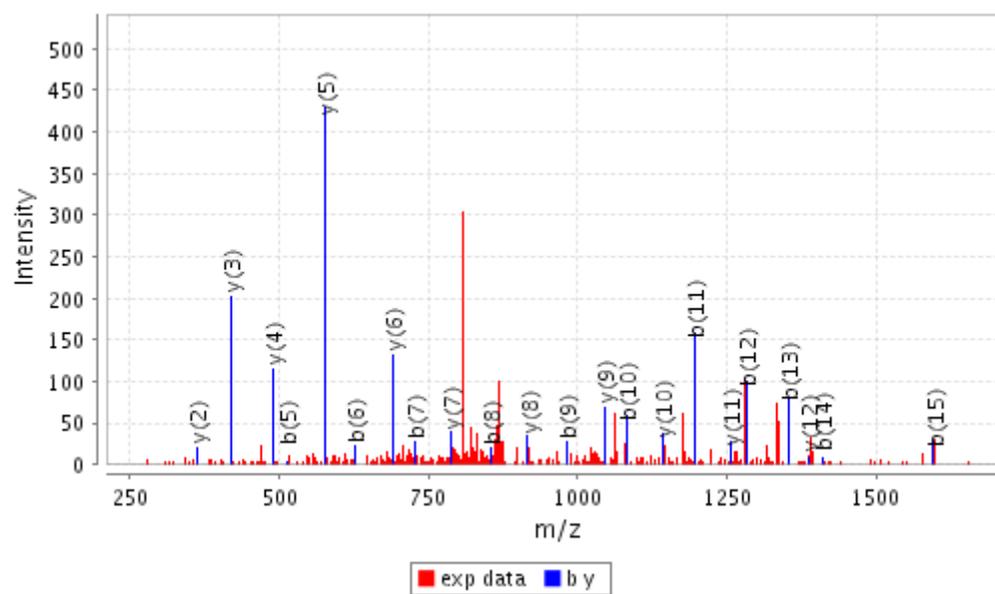
I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252



SAPEELVQQVLSAGWR MS/MS spectrum



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1905

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Omologous proteins codes</i>
Nessuna assegnazione statisticamente significativa						



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 467

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Omologous proteins codes</i>
Nessuna assegnazione statisticamente significativa						



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 569

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
Nessuna assegnazione statisticamente significativa						



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1825 prima proteina identificata

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
fructose-bisphosphate aldolase gi 10800924	39	6.48	12	2E-18	GILAADESTGTIGKR LASINVENVESNR ANSEATLGTYKGDAAK	gi 40362980 in NCBIInr (Protein Details) gi 15227981 in NCBIInr (Protein Details) gi 21913296 in NCBIInr (Protein Details) gi 83283995 in NCBIInr (Protein Details) gi 77999255 in NCBIInr (Protein Details) gi 50878379 in



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						NCBIInr (Protein Details) gi 30680156 in NCBIInr (Protein Details) gi 218157 in NCBIInr (Protein Details) gi 78191410 in NCBIInr (Protein Details) gi 82941449 in NCBIInr (Protein Details) gi 18414312 in NCBIInr (Protein Details) gi 3021338 in NCBIInr (Protein Details) gi 15231715 in NCBIInr (Protein



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						Details) gi 56785093 in NCBIInr (Protein Details) gi 40457267 in NCBIInr (Protein Details) gi 20260022 in NCBIInr (Protein Details) gi 15236768 in NCBIInr (Protein Details) gi 927505 in NCBIInr (Protein Details) gi 20204 in NCBIInr (Protein Details) gi 21553388 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						gi 10645188 in NCBIInr (Protein Details) gi 77745438 in NCBIInr (Protein Details) gi 2213867 in NCBIInr (Protein Details) gi 295850 in NCBIInr (Protein Details) gi 56785092 in NCBIInr (Protein Details) gi 4586596 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1825 seconda proteina identificata

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
OSJNBb0004G 23.10 gi 50921241	37	5.90	16	1E-6	VLTDVGDVPIQEIR FGVEQYEMR GVYISVDVDCLDPAFAPGVSHIEPGGLSFR	gi 54648780 in NCBIInr (Protein Details) gi 13182957 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1825 terza proteina identificata

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
caffeic acid o-methyl transferase gi 46093420	30	6.00	8	1E-9	VLMESWYYLK DAVLDGGIPFNK	gi 50941315 in NCBIInr (Protein Details) gi 2388664 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641708 in NCBIInr (Protein Details) gi 30385246 in NCBIInr (Protein Details) gi 14578615 in



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						NCBIInr (Protein Details) gi 14578613 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641754 in NCBIInr (Protein Details) gi 14578617 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641714 in NCBIInr (Protein Details) gi 77818928 in NCBIInr (Protein Details) gi 37805463 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						gi 33641712 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641740 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641770 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641768 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641750 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641724 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641738 in NCBIInr (Protein



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						Details) gi 3341509 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641748 in NCBIInr (Protein Details) gi 28569609 in NCBIInr (Protein Details) gi 14578611 in NCBIInr (Protein Details) gi 4104220 in NCBIInr (Protein Details) gi 34398680 in NCBIInr (Protein Details) gi 33323468 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						gi 37805461 in NCBIInr (Protein Details) gi 18033964 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641758 in NCBIInr (Protein Details) gi 33641752 in NCBIInr (Protein Details) gi 4104224 in NCBIInr (Protein Details) gi 4808524 in NCBIInr (Protein Details) gi 396591 in NCBIInr (Protein Details) gi 4808528 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						gi 7271883 in NCBIInr (Protein Details) gi 4808522 in NCBIInr (Protein Details) gi 38565551 in NCBIInr (Protein Details) gi 5031494 in NCBIInr (Protein Details) gi 22652502 in NCBIInr (Protein Details) gi 82581138 in NCBIInr (Protein Details) gi 4808530 in NCBIInr (Protein Details) gi 4808526 in NCBIInr (Protein Details) gi 6760443 in NCBIInr



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						(Protein Details) gi 22652500 in NCBIInr (Protein Details) gi 7528266 in NCBIInr (Protein Details) gi 29839288 in NCBIInr (Protein Details) gi 20951 in NCBIInr (Protein Details) gi 3913289 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1909

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
perchloric acid soluble translation inhibitor protein homolog gi 37991674	20	7.63	7	1.8E-18	APAALGPYSQAIK	gi 50937773 in NCBIInr (Protein Details) gi 9294558 in NCBIInr (Protein Details)



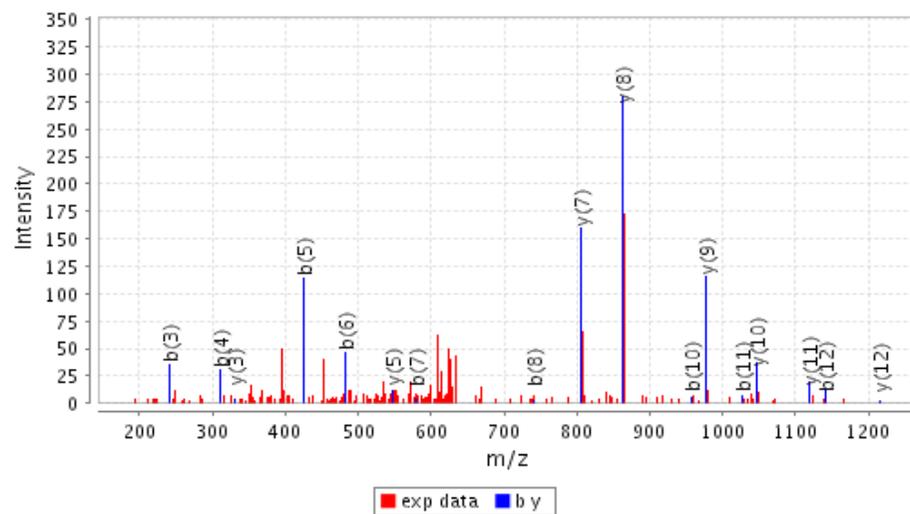
I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252



APAALGPYSQAIK MS/MS spectrum



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 418

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
putative alpha7 proteasome subunit gi 34909168	27	6.11	17	1.2E-18	AVDNSGTVVGIK HSGMAVAGLAADGR DGPQLYMVEPSGVSYSR	gi 34909168 in NCBI nr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 572

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
superoxide dismutase gi 538430	15	5.71	9	2.27E-14	AVVVHADPDDLK	gi 68342450 in NCBIInr (Protein Details) gi 77819931 in NCBIInr (Protein Details) gi 9802567 in NCBIInr (Protein Details) gi 12230561 in NCBIInr (Protein Details) gi 71040665 in NCBIInr (Protein Details) gi 51594295 in



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						NCBIInr (Protein Details) gi 13274154 in NCBIInr (Protein Details) gi 2305111 in NCBIInr (Protein Details) gi 33340236 in NCBIInr (Protein Details) gi 20695 in NCBIInr (Protein Details) gi 15131679 in NCBIInr (Protein Details) gi 34899232 in NCBIInr (Protein Details) gi 6018682 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						gi 13445918 in NCBIInr (Protein Details) gi 15223944 in NCBIInr (Protein Details) gi 58616003 in NCBIInr (Protein Details) gi 58616005 in NCBIInr (Protein Details) gi 134598 in NCBIInr (Protein Details) gi 12744890 in NCBIInr (Protein Details) gi 6273423 in NCBIInr (Protein Details) gi 58615999 in



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						NCBIInr (Protein Details) gi 50978416 in NCBIInr (Protein Details) gi 12230565 in NCBIInr (Protein Details) gi 6018746 in NCBIInr (Protein Details) gi 19197 in NCBIInr (Protein Details) gi 46093528 in NCBIInr (Protein Details) gi 17385628 in NCBIInr (Protein Details) gi 32441511 in NCBIInr (Protein



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						Details) gi 74229677 in NCBIInr (Protein Details) gi 3892130 in NCBIInr (Protein Details) gi 3914998 in NCBIInr (Protein Details) gi 56549631 in NCBIInr (Protein Details) gi 3273755 in NCBIInr (Protein Details) gi 854248 in NCBIInr (Protein Details) gi 15238738 in NCBIInr (Protein Details) gi 13274150 in NCBIInr (Protein



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						Details) gi 13751866 in NCBIInr (Protein Details) gi 19172405 in NCBIInr (Protein Details) gi 134613 in NCBIInr (Protein Details) gi 19713 in NCBIInr (Protein Details) gi 37727999 in NCBIInr (Protein Details) gi 134596 in NCBIInr (Protein Details) gi 3201501 in NCBIInr (Protein Details) gi 49615353 in NCBIInr (Protein



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
						Details) gi 60360880 in NCBIInr (Protein Details) gi 66775540 in NCBIInr (Protein Details) gi 50540929 in NCBIInr (Protein Details)



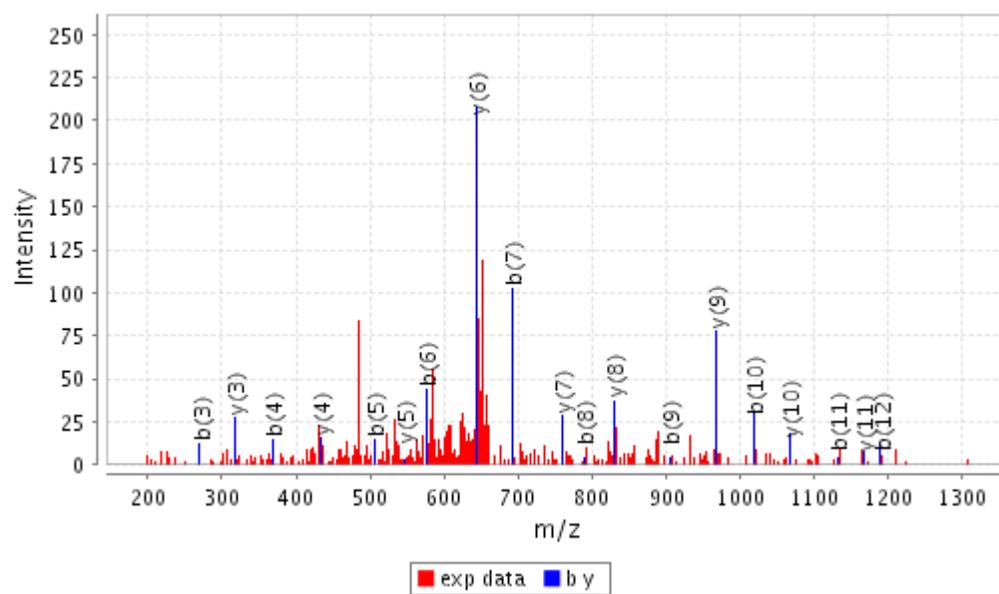
I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252



AVVVHADPDDL GK MS/MS spectrum



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 2585

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
nucleoside diphosphate kinase gi 7643788	16	6.31	14	1.4E-15	GLVGEIIGR GLVGEIIGRFEK GDY AIDIGR	gi 62114996 in NCBIInr (Protein Details) gi 1346675 in NCBIInr (Protein Details) gi 73808794 in NCBIInr (Protein Details) gi 2498076 in NCBIInr (Protein Details) gi 19570344 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 448

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
Proteasome subunit beta type 1 gi 17380185	25	6.30	26	1.5E-20	QMSCPAMGQLLSNTLYYK QMSCPAMGQLLSNTLYYKR GCVFTYDAVGSYER SPSPLLLPAQDAVTPLSEAEAIDLVK	-



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 453

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologous proteins codes</i>
beta1 proteasome-7D	26	5.33	17	2.5E-15	TSTGMYVANR SMLQAGMIVGGWDK YEGGQIYSVPLGGTILR	gi 66271071 in NCBIInr (Protein Details) gi 51979378 in NCBIInr (Protein Details)



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 - 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1885

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Omologous proteins codes</i>
Nessuna assegnazione statisticamente significativa						



I.S.B. S.R.L.

Ion Source & Biotechnologies S.r.l.

P. Iva 05231220962

Via Fantoli, 15-16 – 200100 Milano

Fax 02/700410252

Sample: 1864

<i>Protein Code</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Statistical Score (pValue)</i>	<i>Peptide Sequence</i>	<i>Homologue proteins codes</i>
Nessuna assegnazione statisticamente significativa						

[^](#) = [sptrembl|Q6Z8N7|Q6Z8N7](#) Thylakoid lumen protein,
 chloroplast-like.//:sptrembl|Q6Z8N7|Q6Z8N7_ORYSA Thylakoid lumen
 protein, chloroplast-like.//:trembl|AP004765|AP004765_11 gene:
 "P0711H09.12"; product: "thylakoid lumen protein, chloroplast
 precursor-like"; Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic
 DNA, chromosome 8, PAC clone:P0711H09.
 Length = 242

Total Score: 370

	0	50	100	150	200	
						242
sptrembl Q6Z8N7 Q6Z8N7	-----					
Local hits (HSPs)		-	-	-	-	-

Score = 69 (36.7 bits)
 Identities = 8/9 (88%), Positives = 9/9 (100%)

Query: 2870 YLEYTLQNP 2878
 Y+EYTLQNP
 Sbjct: 181 YIEYTLQNP 189

Score = 62 (33.1 bits)
 Identities = 10/14 (71%), Positives = 11/14 (78%)

Query: 3804 DSLVSLANTGLGPD 3817
 DS VS A TG+GPD
 Sbjct: 122 DSNVSVAITGIGPD 135

Score = 49 (26.6 bits)
 Identities = 7/8 (87%), Positives = 7/8 (87%)

Query: 2366 TVVNGLDR 2373
 T VNGLDR
 Sbjct: 151 TLVNGLDR 158

Score = 47 (25.5 bits)
 Identities = 7/10 (70%), Positives = 8/10 (80%)

Query: 4943 VDNYAESLVN 4952
 VD +AE LVN
 Sbjct: 145 VDFAETLVN 154

Score = 43 (23.5 bits)
 Identities = 7/11 (63%), Positives = 8/11 (72%)

Query: 2223 DWLAGVGDASG 2233
 DWL G G+ SG
 Sbjct: 98 DWLIGAGEVSG 108

Score = 34 (19.0 bits)
 Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%)

Query: 1130 LSRGMSSS 1137
 L RG SSS
 Sbjct: 16 LCRGLSSS 23

Score = 33 (18.5 bits)
 Identities = 5/6 (83%), Positives = 5/6 (83%)

Query: 4905 RNYTIVT 4910
 R YTVT

Sbjct: 210 RLYTVT 215

Score = 33 (18.5 bits)
Identities = 4/7 (57%), Positives = 5/7 (71%)

Query: 3387 YSLTGQF 3393
Y TGQ+
Sbjct: 212 YTVTGY 218

[^ = swiss|Q9S720|THL1_ARATH](#) Unknown thylakoid lumen protein, chloroplast precursor.//:sptremblnew|AAP88357|AAP88357
Atlg76450.//:treml|BT009723|BT009723_1 product: "Atlg76450";
Arabidopsis thaliana Atlg76450 gene, complete cds.
//:gp|BT009723|32815945 Atlg76450 [Arabidopsis thaliana]
Length = 247

Total Score: 162



Score = 69 (36.7 bits)
Identities = 8/9 (88%), Positives = 9/9 (100%)

Query: 2870 YLEYTLQNP 2878
Y+EYTLQNP
Sbjct: 188 YIEYTLQNP 196

Score = 52 (28.1 bits)
Identities = 7/13 (53%), Positives = 8/13 (61%)

Query: 3387 YSLTGQFNQDEAA 3399
Y TGQF +E A
Sbjct: 219 YTVTGYFTDEESA 231

Score = 41 (22.5 bits)
Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%)

Query: 2366 TVVNGGLDR 2373
T V GLDR
Sbjct: 158 TLVSGGLDR 165