

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
VITERBO
Dipartimento di Scienze Ambientali**



**DOTTORATO DI RICERCA IN “GENETICA E BIOLOGIA
CELLULARE” – XXI CICLO**

**Studio degli effetti dell'inquinamento da Cadmio
sulle piante di *Spinacia Oleracea* L. mediante analisi
proteomica**

Settore scientifico disciplinare: BIO11

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera
Tutor: Dr.ssa Anna Maria Timperio

Dottorando: Dr. Marco Fagioni

Febbraio 2009

INDICE

SCOPO DELLA TESI

1. Introduzione

1.1 Brevi cenni sull'organizzazione della foglia

1.1.1 Struttura

1.1.2 Anatomia

1.1.3 Morfologia

1.1.4 Evoluzione della foglia

1.2 Organizzazione della cellula vegetale

1.2.1 Cloroplasto

1.2.2 I Tilacoidi

1.2.3 Organizzazione di complessi proteici della membrana tilacoidale

1.3 I Pigmenti

1.4 Stress da metalli pesanti

1.4.1 Stress da Cadmio

1.4.2 Metabolismo del Cadmio nell'uomo

1.4.3 Effetti sull'uomo

1.4.4 Effetti sulle piante

1.4.5 Effetti sulle radici

1.4.6 Effetti sulle foglie

1.4.7 Effetti sull'apparato fotosintetico

1.4.8 Stress ossidativo

1.4.9 Meccanismi di risposta allo stress da Cd a livello cellulare

2. Risultati degli effetti del Cd sui tilacoidi

2.1 Accumulo di Cd e analisi dei pigmenti nei tilacoidi

2.2 Analisi proteomica e 1D BN-PAGE

2.2.1 2D SDS- PAGE

2.3 Separazione cromatografica delle membrane tilacoidali

2.4 Livelli di espressione dei geni *Lhcb1*

2.5 Spettroscopia ESR

2.6 Discussione

2.6.1 L'analisi proteomica rivela un'elevata sensibilità del PSI al Cd e solo effetti minori sul PSII

2.6.2 Patterns generali della tossicità del Cd nell'apparato fotosintetico e meccanismi di difesa

3. Risultati degli effetti del Cd sulla foglia

3.1 Analisi proteomica

3.2 Analisi proteomica delle foglie apicali

3.3 Analisi proteomica delle foglie basali

3.4 Proteine carbonilate come biomarker della generazione dei ROS

3.5 Determinazione delle fitochelatine

1	
3	46
3	47
3	48
4	49
5	
8	
10	53
11	
13	55
13	58
	58
14	65
15	75
15	
16	75
16	
17	
17	
18	
19	
20	3.6 Discussione
21	3.6.1 Il Cd
	raggiunge le foglie
	apicali dopo un
26	lungo periodo di
	esposizione
26	3.6.2 Le foglie
	basali sono
	maggiormente
31	affette dal Cd
38	
44	

3.6.3 Danni all'apparato fotosintetico delle foglie basali

3.6.4 "Down regolazione" delle proteine coinvolte nei pathway energetici e metabolici

3.6.5 Sovrapproduzione delle fitochelatine

3.6.6 Senescenza

4. Bibliografia

5. PUBBLICAZIONI	78
6. COMUNICAZIONI A CONGRESSI	79
RINGRAZIAMENTI	85
	80
	81
	82
	83
	86
	102
	102
	106

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo principale è stato quello di osservare gli effetti del Cd sul primo anello della catena alimentare, cioè la pianta, mediante un approccio proteomico e di cercare di fare chiarezza su fenomeno molto dibattuto in letteratura, ma con risultati a volte contraddittori.

È risaputo, comunque, che il Cd è facilmente assorbito dalle radici, tramite le quali raggiunge le parti aeree della pianta dove viene accumulato ad alte concentrazioni. Una volta assorbito, è stato osservato come il Cd possa interferire a livello fotosintetico sia con fotosistema I sia con il fotosistema II, evidenziando una marcata specie-specificità del fenomeno.

A livello macroscopico è stato possibile osservare, in accordo con la letteratura, come il Cd riduca enormemente la crescita dell'intera pianta e induca una marcata clorosi sulle foglie di *Spinacia Oleracea* L. facendo una differenziazione tra foglie apicali e basali, dove le prime rimangono verdi come le piante controllo, mentre le seconde mostrano clorosi. Con l'andare avanti del trattamento è stata notata anche la comparsa di necrosi, dapprima sulla punta della foglia basale per poi estendersi sull'intera superficie della pianta. Questo effetto macroscopico va in contrasto con alcuni studi fatti su altre piante (Kieffer *et al.*, 2008), ma è a conferma di come l'azione del Cd sia specie-specifica.

Quindi osservati tali effetti a livello macroscopico, abbiamo voluto indagare gli effetti del Cd dapprima a livello fotosintetico facendo sempre una distinzione tra foglie apicali e basali, in quanto hanno mostrato una diversa risposta al trattamento con il metallo pesante. Come tecniche di analisi e come parametri di riferimento sono stati usati un approccio proteomico tramite BN-PAGE e gradiente di saccarosio e l'analisi dei pigmenti fotosintetici. Il BN-PAGE in prima e seconda dimensione ci permette di avere una visione d'insieme di tutti i supercomplessi fotosintetici, le relative variazioni ed, inoltre, è una tecnica altamente riproducibile. Mentre il gradiente di saccarosio ci permette di separare i supercomplessi in varie bande che successivamente possono essere iniettate in HPLC on-line con uno spettrometro di massa per una successiva separazione e identificazione di ogni singola proteina di ogni supercomplesso. Tale tecnica, quindi, ci permette di analizzare ogni singola variazione di sintesi di ogni singola proteina di tutti i supercomplessi della membrana tilacoidale.

I pigmenti fotosintetici sono un altro parametro fondamentale per monitorare lo stato di salute di una pianta. L'analisi è stata effettuata mediante l'utilizzo della tecnica RP-HPLC con detector diode array UV-VIS. È stato possibile, quindi, non solo separare e analizzare semi-quantitativamente ogni singolo pigmento, ma è stato possibile osservarne anche il relativo spettro di assorbimento, per una identificazione inequivocabile.

Avendo notato tramite gradiente di saccarosio come le proteine antenna Lchb 1.1 fossero maggiormente inibite dal trattamento, abbiamo voluto controllare anche le variazioni di sintesi dei trascritti delle proteine suddette mediante RT-PCR. Inoltre sono state analizzate

anche le piante cresciute con ioni bivalenti in eccesso nelle soluzioni di crescita, per verificare se il Cd si sia sostituito ai cofattori bivalenti nella trascrizione.

Visti i notevoli effetti del Cd sulla pianta a livello macroscopico che sui tilacoidi, abbiamo voluto indagare se gli effetti del Cd siano reversibili. Infatti è stato allestito un esperimento di “recovery”, dove non solo è stato rimosso il Cd, ma sono stati aggiunti alle soluzioni di crescita ioni bivalenti come Zn, Mg etc., per vedere quale ione fosse stato sostituito nei fattori di trascrizione.

Una volta analizzati gli effetti a livello tilacoidale, il nostro scopo si è incentrato sulla determinazione delle proteine differenzialmente espresse in tutto l’estratto fogliare, mediante la tecnica 2D IEF-SDS-PAGE. Anche in questo caso sono state separate le foglie basali da quelle apicali, vista la marcata clorosi delle prime, ed inoltre è stata seguita una cinetica di trattamento, per osservare gli effetti del Cd sulla foglia spingendoci a lunghi tempi di esposizione come 42 giorni.

Una risposta immediata da parte delle piante allo stress da Cd è la produzione di fitochelatine. Questi composti sono dei piccoli peptidi, formati da glutammato, cisteina e glicina, anche se in natura si possono trovare altre forme isomeriche dove al posto della glicina si possono sostituire altri aminoacidi. La funzione di tali composti è di chelare il Cd, presente nel citosol, e renderlo innocuo, trasportandolo nei vacuoli. Un’analisi semi-quantitativa di tali composti è indice della presenza di Cd o meno all’interno della foglia. Quantificare la presenza delle varie forme di fitochelatine nelle foglie basali e apicali è stato un ulteriore “target” di questa tesi.

Per completare l’intera analisi sulla pianta, sono state analizzate anche le radici trattate con il Cd sia mediante un approccio proteomico, che mediante un approccio metabolomico, tramite spettroscopia NMR e RP-HPLC on line con lo spettrometro di massa. In questa tesi, comunque, non verrà presentato nessun dato a tal riguardo, in quanto la nostra ricerca è ancora ad una fase di indagine preliminare.

1. Introduzione

1.1 Brevi cenni sull’organizzazione della foglia

In botanica, la **foglia** è un organo delle piante specializzato per la fotosintesi. Per questo scopo, una foglia è normalmente piatta e sottile, per poter così esporre i cloroplasti, contenuti nelle cellule del *parenchima fotosintetico*, alla luce del Sole e far sì che la luce

penetri completamente nei tessuti. Le foglie sono inoltre gli organi in cui, nella maggior parte delle piante, hanno luogo la respirazione, la traspirazione e la guttazione (fuoriuscita d'acqua per permettere la traspirazione quando le condizioni atmosferiche sono sfavorevoli). Le foglie possono immagazzinare alimenti e acqua ed in alcune piante le loro forme sono modificate per altri scopi. Strutture simili a foglie - e denominate fronde - si trovano nelle felci.

1.1.1 Struttura

La struttura completa di una foglia di un'angiosperma consiste di quattro parti: la guaina (struttura avvolgente a livello dell'inserzione sul fusto); le stipole (due appendici presente alla base della foglia); il picciolo (il gambo della foglia); la lamina, detta anche lembo (la parte piatta della foglia). È raro che la foglia presenti tutte e quattro le sue parti. Il punto in cui il picciolo è attaccato al fusto è denominato ascella della foglia. Non tutte le specie di piante producono foglie la cui struttura comprende tutte le parti sopra citate; in alcune specie il picciolo è assente (foglie *sessili*, ad esempio nel mais), in altre piante la lamina può essere molto ridotta. Nella pianta dei piselli la lamina è trasformata in un cirro, mentre la funzione fotosintetica è assolta dalle stipole. Nel sedano, il cosiddetto gambo è in realtà una grossa guaina carnosa. Nelle piante attuali le foglie si formano in serie acropeta (accrescimento verso l'alto) dalle bozze fogliari presenti nell'apice caulinare e derivanti dalla tunica. Nelle prime fasi di sviluppo tutte le cellule della bozza si dividono intensamente. Successivamente si distinguono una porzione basale che rallenta la serie di divisioni e una porzione apicale ancora attiva.

- Dalla zona basale deriva la guaina fogliare (non sempre presente)
- Dalla zona di contatto fra parte basale ed apicale della bozza si originano le stipole (non sempre presenti)
- Dalla zona apicale si differenziano il picciolo e la lamina (la crescita della lamina in genere precede quella del picciolo).

1.1.2 Anatomia

In base all'anatomia della lamina fogliare si possono distinguere:

- **foglie bifacciali** (dorso-ventrali): a portamento plagiotropo es. nella maggior parte delle Dicotiledoni. In questo caso si distingue una pagina superiore (adassiale) ed una inferiore (abassiale) diverse fra loro;

- **foglie equifacciali** (isolaterali): a portamento ortotropo es. nella maggior parte delle Monocotiledoni. In questo caso non si distinguono le due pagine, che hanno uguale struttura, es. Aloe, Gramineae, Narciso:
- **foglia centrica** (foglia aghiforme delle Conifere) così definita per la posizione dei fasci cribrovascolari; è un caso del tipo precedente
- **foglie unifacciali**, che possiedono un'unica faccia visibile, questo perché la foglia piegandosi su se stessa lungo il suo asse maggiore permette l'unione delle due estremità della faccia abassiale e così facendo mette in mostra solo la parte superiore della lamina. Hanno un aspetto tubulare o assile, es. alcune Monocotiledoni, come cipolla, Iris.

Una foglia è considerata un organo della pianta, tipicamente è costituita dai seguenti tessuti:

Struttura anatomica di una foglia bifacciale

1. un'epidermide che copre la superficie superiore ed inferiore. La parte superiore è spesso ricoperta dalla cuticola, una sostanza cerosa (cutina) che rende la foglia impermeabile.
2. un mesofillo, costituito da 2 parenchimi. Un parenchima a **palizzata** superiormente e uno **lacunoso** inferiormente. Quello a palizzata è ricco di *cloroplasti* mentre quello lacunoso, oltre a contenere cloroplasti, è caratterizzato da **ampi** spazi intercellulari.
3. una caratteristica disposizione delle nervature (i fasci cribro-vascolari). Lo **xilema** si trova superiormente e comprende i vasi per il rifornimento di acqua e sali provenienti dalle radici. Il **floema** si trova inferiormente e comprende cellule allungate e modificate per formare dei tubi (detti cribrosi) che consentono il trasporto dei *prodotti* della fotosintesi fino ai siti di utilizzo o accumulo.
4. gli stomi che sono aperture microscopiche disposte su tutte le parti erbacee delle piante, in modo particolare sulle foglie; la loro funzione è di mantenere lo scambio gassoso con l'esterno, in particolare la fuoriuscita di vapore acqueo e l'entrata di ossigeno e di anidride carbonica.

Le foglie che presentano questa anatomia sono dette bifacciali o dorsoventrali (comuni tra le dicotiledoni). La faccia (o pagina) rivolta verso l'alto è detta superiore, o adassiale, o dorsale; quella rivolta verso il basso è detta inferiore, o abassiale, o ventrale. Se le due

facce della lamina si equivalgono, si parla di foglie equifacciali (es. graminacee). Nella cipolla (liliacee) la foglia assume un aspetto tubolare, quindi espone una sola faccia all'esterno, mentre l'altra resta interna e non esposta: foglia unifacciale. La foglia delle conifere ha la lamina molto sottile, benché consistente, e viene detta aghiforme.

Sulla base della disposizione degli stomi si avranno: 1. foglie ipostomatiche (se gli stomi sono nella faccia inferiore, nelle foglie bifacciali); 2. foglie epistomatiche (se gli stomi sono nella faccia superiore, nelle foglie bifacciali natanti delle piante acquatiche, come la ninfea); 3. foglie anfistomatiche (se gli stomi sono distribuiti su ogni faccia, nelle foglie equifacciali); 4. foglie astomatiche (se sono prive di stomi, ad esempio le foglie di piante sommerse).

1.1.3 Morfologia

Le foglie possono essere distinte e classificate in base alla conformazione e struttura delle loro parti costituenti:

Base

- *cordata*: rientra nel picciolo
- *ottusa*: base estesa per più di 90°
- *acuta*: base estesa per meno di 90°
- *cuneata*: base estesa per meno di 15°
- *reniforme*: il picciolo si attacca al centro della foglia
- *tronca*: base piatta a circa 180°
- *asimmetrica*: il punto di attacco sul picciolo è sfasato
- *irregolare*: base asimmetrica che si attacca nello stesso punto del picciolo

Nervature

- *penninervia*: nervatura centrale che si divide in secondarie, terziarie, etc.
- *palminervia*: ricorda il palmo della mano (3, 5, 7, 9 punte)
- *parallelinervia* le nervature sono tutte principali e parallele
- *peltinervia* il picciolo è inserito al centro della lamina, mentre non è presente la base

Le foglie a nervatura **pennata** possono essere:

- *foglia paripennata*, la foglia è composta di un numero pari di foglioline disposte in modo simile alla penna di un uccello
- *foglia imparipennata*, la foglia è composta di un numero dispari di foglioline disposte in modo simile alla penna di un uccello
- *foglia bipennata*, foglia in cui le singole foglioline sono a loro volta pennate

Le foglie a nervatura **palmata** possono essere:

- *foglia palmata*, le incisioni sono radiali cioè si dirigono verso un unico centro
- *foglia palmato-lobata*, le incisioni sono disposte in maniera palmata e con il margine lobato
- *foglia palmato-partita*, le incisioni sono disposte in maniera palmata e con il margine partito

Margine

Le foglie possono essere classificate per il tipo di margine che presentano. Si distinguono i seguenti tipi di margine:

- *margine liscio*, il margine non presenta incisioni
- *margine ondulato o sinuoso*, il margine presenta delle pronunciate ondulazioni
- *margine dentato*, il margine presenta sporgenze acute o seghettature dirette verso l'esterno della foglia
- *margine doppiamente dentato*, il margine presenta una dentatura principale sulla quale appare una dentatura più piccola
- *margine dentato-spinoso*, i denti si prolungano con lunghe punte
- *margine seghettato*, il margine presenta sporgenze acute rivolte verso l'apice della foglia
- *margine crenato*, le sporgenze sono simili a dentature ma con contorno arrotondato

Le foglie si distinguono inoltre per la profondità di incisione del margine:

- *margine lobato*, le incisioni sono poche e profonde, ma non raggiungono la metà della lamina
- *margine fesso*, le incisioni sono più profonde che in quello lobato e arrivano a metà tra la lamina e la nervatura mediana
- *margine settato*, le incisioni raggiungono la nervatura mediana

- *marginare rovinato*, i lobi sono ricurvi all'indietro verso la base della foglia

Lamina

- *ellittica*: apice e base tonda con larghezza massima al centro
- *ovata*: larghezza massima nella terza parte inferiore
- *obovata* larghezza massima nella terza parte superiore
- *lanceolata*: lamina molto lunga e stretta
- *romboidale*: a forma di rombo
- *cuoriforme*: lamina rotonda con apice cuspidata
- *pennato composta*: foglia composta
- *pennato lobata*: foglia con lobi penninervia
- *palmato lobata*: foglia palmata con lobi

Picciolo

- *pedunculata*: con picciolo
- *sessile*: non c'è picciolo
- *schacciato*: appiattito
- *con stipole*: con foglioline alla base
- *con guaina*: la guaina avvolge il ramo
- *amplessicaule*: la guaina ricopre interamente il ramo

Colore

- *concolore*: colore uguale sulle due pagine
- *dicolore*: diverso colore sulle due pagine

Peli

- *glabro*: senza peli
- *pubescente*: peli piccoli
- *tomentoso*: peli abbondanti

Superficie

- *coriacee*: dure e spesse
- *tomentose*: vellutate

- *scabre*: superficie ruvida

1.1.4 Evoluzione della foglia

Secondo Zimmermann (1956), le prime piante terrestri sarebbero state formate solo da un fusto poco ramificato e da una parte immersa nel suolo riconducibile ad una radice. Questa teoria parte dall'osservazione di un macrofossile del Devoniano (400 milioni di anni fa), appartenente al genere *Rhynia*. Il fusto inizialmente avrebbe dato origine a ramificazioni tutte eguali, di tipo dicotomico. La porzione di fusto al di sopra dell'ultima ramificazione si definisce **teloma**. Anche le foglie sarebbero derivate dalla modificazione delle ramificazioni dicotomiche. La formazione delle foglie sarebbe avvenuta per tappe secondo il seguente schema:

- 1) uno dei telomi si sviluppa più degli altri assumendo l'aspetto di un ramo mentre il secondo rimane ridotto,
- 2) i telomi piccoli, disposti su più piani, si appiattiscono disponendosi su un unico piano,
- 3) ciascun teloma si appiattisce e si fonde con gli altri disposti sullo stesso piano grazie alla neoformazione di porzioni laminari di tessuto.

Se un teloma rimane isolato si ha un **microfillo** (es. aghi di gimnosperme). Se più telomi si fondono si ha un **macrofillo** (es. foglie di poche gimnosperme e di tutte le angiosperme). Un'ulteriore evoluzione di questa struttura comporta l'anastomosi fra i [fasci cribro-vascolari](#) appartenenti ai diversi telomi.

Distribuzione sul fusto (Fillotassi)

Foglie a fillotassi verticillata

Le foglie possono essere classificate per come si posizionano lungo il [fusto](#) di un [pianta](#). La distribuzione è usualmente caratteristica di una specie. Le foglie possono essere:

- *opposte*, 2 foglie portate in un singolo nodo in posizione contrapposta.
- *opposte decussate*, foglie *opposte* dove ciascuna coppia è ruotata di 90 [gradi](#) rispetto alla precedente.

- *alternate o alterne*, foglie disposte una per nodo e orientate alternativamente da una parte e dall'altra.
- *verticillate*, tre o più foglie che si inseriscono sul fusto in corrispondenza di un singolo nodo.
- *a rosetta o radicali*, foglie che crescono alla base del fusto a formare la cosiddetta *rosetta*.

Organizzazione della cellula vegetale

La cellula vegetale è costituita da una parete più o meno rigida e da un protoplasto. La parete è composta di molecole di cellulosa, organizzate in microfibrille, che a loro volta si associano per dare origine a macrofibrille. Nella parete può essere presente anche la lignina, che conferisce rigidità alla struttura, la cutina, la suberina e le cere, sostanze grasse, aventi un ruolo protettivo per il tessuto vegetale.

Il protoplasto, termine che deriva dalla parola “protoplasma”, indicante la materia vivente delle cellule, comprende il citoplasma ed il nucleo. Nel citoplasma è presente la sostanza fondamentale o matrice, in cui sono sparsi gli organelli ed i sistemi di membrane. Gli organelli sono rappresentati da ribosomi, microtubuli, plastidi e mitocondri.

Una peculiarità delle cellule vegetali è la presenza di una o più cavità piene di liquido, i vacuoli, delimitate da una membrana singola, il tonoplasto. Il vacuolo è un organulo molto versatile che svolge importanti funzioni come quella di deposito per le sostanze nutritive e per i materiali di rifiuto. Inoltre esso costituisce un sistema per aumentare la dimensione della cellula e controllare la pressione di turgore (Mullet, 1988).

I plastidi sono un insieme di organelli presenti in tutte le cellule vegetali classificati in base a ciò che contengono in ezioplasti, amiloplasti, leucoplasti, cromoplasti e cloroplasti (Figura 1).

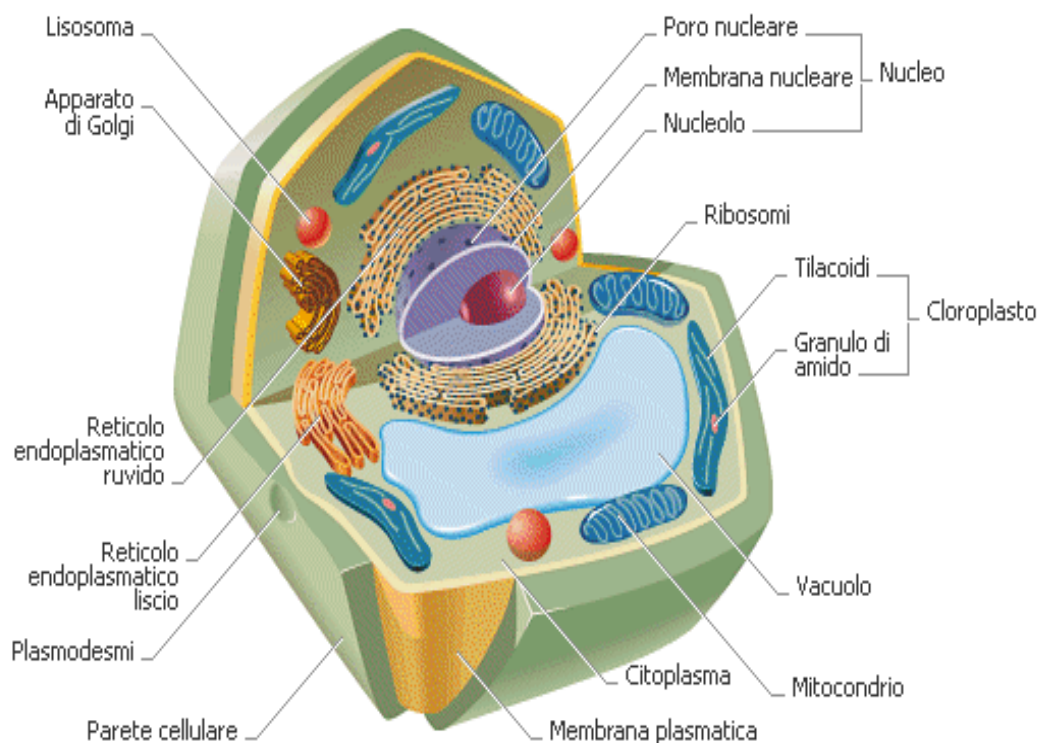


Figura 1. Organizzazione della cellula vegetale

1.2.1 Il Cloroplasto

I cloroplasti rappresentano un particolare tipo di plastidi, che si sviluppò dai protoplastidi per influenza delle radiazioni. Questi organelli sono localizzati nel citoplasma, e visti al microscopio elettronico è possibile evidenziarne le caratteristiche morfologiche. Hanno un diametro di 4-6 μm e sono la sede delle reazioni fotosintetiche. Il numero presente in ogni

cellula è variabile certe alghe ne possiedono solo uno mentre alcune angiosperme e gimnosperme ne contengono numerosi. Il numero e la dimensione dei cloroplasti aumentano durante l'accrescimento della cellula e varia in funzione all'esposizione di intensità luminosa (Whitfield e Bottomly, 1983). Nello spinacio è stata osservata una proporzionalità tra la quantità di luce disponibile e il volume dei cloroplasti, il quale diminuisce dopo che è stato colpito dalla luce.

Osservando la struttura al microscopio si può vedere che i cloroplasti hanno una forma ovoidale con un diametro di 4-6 μm e sono circondati da due membrane una esterna altamente permeabile una interna meno permeabile.

All'interno del cloroplasto è possibile riconoscere lo stroma o matrice (una sospensione acquosa di sali, piccole molecole organiche, proteine, acidi nucleici ed enzimi) attraversato da una fitta rete di membrane. Tali membrane sono organizzate in strutture discoidali appiattite, dette tilacoidi, intercomunicanti tra loro che si organizzano in una serie di dischi impilati (Figura 2).

I cloroplasti svolgono diverse funzioni, tra cui:

- a) sono sede della fotosintesi;
- b) in essi avviene la sintesi di amminoacidi ed acidi grassi;
- c) sono riserva di amido.

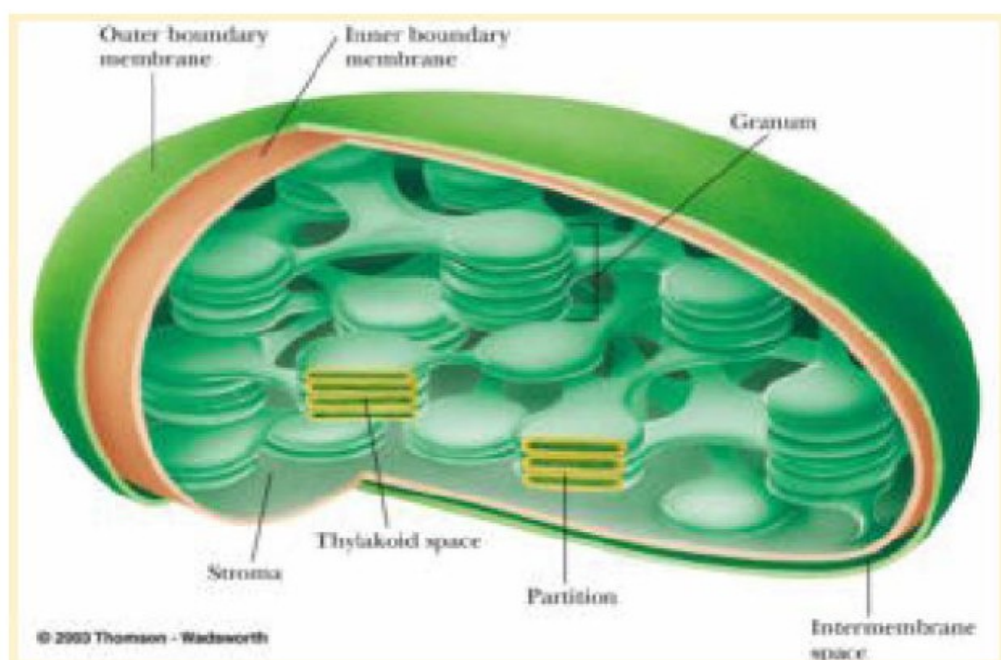


Figura 2: Il cloroplasto

1.2.2 I Tilacoidi

I tilacoidi rappresentano un sistema di membrane fotosintetiche singole che racchiudono un compartimento interno, il lume, separandolo dallo stroma, dove avviene la fissazione dell'anidride carbonica. Le membrane tilacoidali sono suddivise in due compartimenti, il grana e le lamelle stromali.

Il grana consiste di un core centrale, costituito da membrane impilate, un dominio periferico, i margini e le due membrane più esterne. I margini, le membrane esterne e le lamelle stromali, a differenza del core centrale del grana, sono esposti allo stroma. Tra grana e lamelle stromali vi è un dominio di connessione. I tilacoidi discoidali impilati nel grana hanno diametri di 0.4-0.5 μm e vi sono 5-20 strutture discoidali per ogni grana. Il compartimento luminale interno ha dimensioni molto ristrette per via di forze attrattive tra le due superfici interne ed in alcuni punti vi sono dei contatti tra porzioni dei complessi proteici transmembranali, protrudenti verso il lato luminale.

1.2.3 Organizzazione di complessi proteici della membrana tilacoidale

Nella membrana tilacoidale vi sono quattro tipi di complessi proteici transmembranali che sono coinvolti nel processo fotosintetico. Tra questi vi sono il fotosistema I (PSI), il fotosistema II (PSII), il citocromo b_6/f e l'ATP sintetasi (Figura 3). È stato ormai dimostrato che i due fotosistemi siano distribuiti in maniera differente nelle due componenti tilacoidali: stroma e grana (Yu *et al.*, 1994).

Ciascuno di questi complessi è costituito da numerose proteine ed alcune di queste contenute, in particolar modo nel PSI e nel PSII, sono legate a pigmenti, aventi la funzione di assorbire radiazioni elettromagnetiche di una certa energia con conseguente transizione degli elettroni di legame dallo stato fondamentale, a più bassa energia, ad uno stato eccitato, a più alta energia.

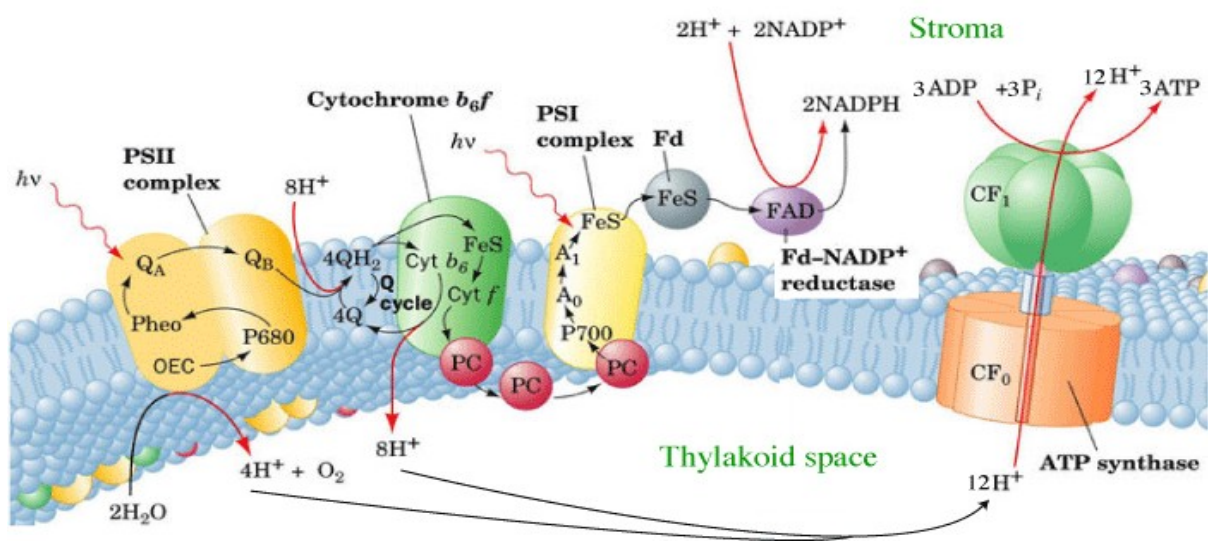


Figura 3. Organizzazione della membrana tilacoidale

1.3 I Pigmenti

Tra i pigmenti associati ad alcune di queste proteine vi sono le clorofille (Chl). Si tratta di pigmenti verdi a strutture policicliche planari che ricordano la protoporfirina dell'emoglobina.

In particolar modo, vi sono quattro anelli pirrolici (I, II, III, IV) ed un quinto non pirrolico. I quattro atomi di azoto dei quattro anelli pirrolici sono coordinati da uno ione Mg^{2+} .

Nelle piante è possibile trovare due tipi di clorofilla, α e β , che differiscono in struttura per un sostituito dell'anello pirrolico (nella clorofilla β vi è un gruppo aldeidico al posto di un metile, che invece è presente nella clorofilla α) (Figura 4) e in proprietà spettroscopiche per uno shift dello spettro di assorbimento verso lunghezze d'onda più basse per la clorofilla β rispetto alla clorofilla α .

Altri pigmenti che possono essere presenti e che assorbono in una regione del visibile diversa rispetto alle clorofille sono i carotenoidi, tra cui il β -carotene, un composto isoprenoide rosso-arancione, precursore della vitamina A degli animali, e la xantofilla.

Dal momento che i carotenoidi assorbono a diverse lunghezze d'onda rispetto alle clorofille, svolgono un'azione suppletiva nell'assorbimento della luce durante la fotosintesi.

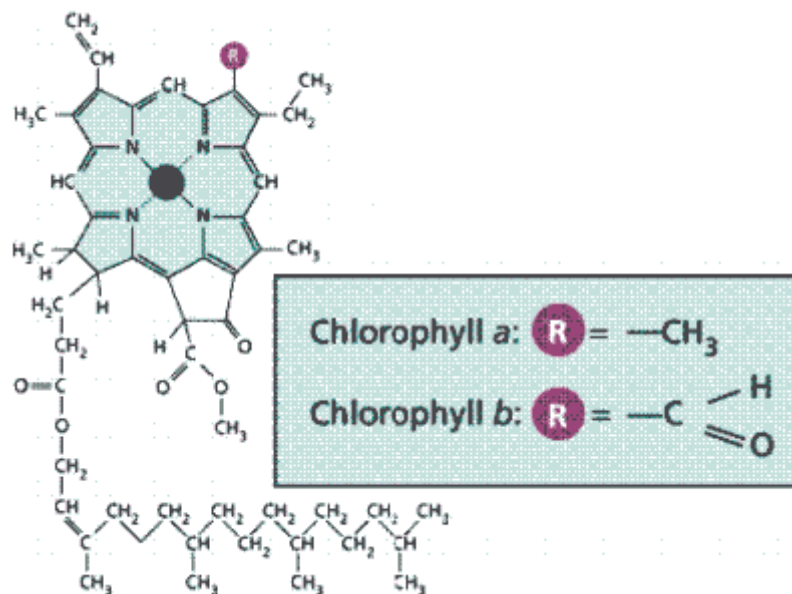


Figura 4. Struttura della clorofilla α e β

1.4 Stress da metalli pesanti

A concentrazioni fisiologiche, gli ioni metallici sono un importante fattore per la crescita delle piante e per la maturazione dei semi, ma oltre tale livello, le piante possono subire degli effetti tossici, mentre al di sotto delle concentrazioni fisiologiche, le piante possono

soffrire di mancanza di enzimi coinvolti in importanti cicli cellulari (Connolly e Guerinot, 2002).

1.4.1 Stress da Cadmio

Il Cadmio (Cd), uno ione bivalente con una densità pari a 8.6 gr cm^{-3} , è un metallo ampiamente diffuso in aree con alti livelli di inquinamento antropogenico. Il Cd, infatti, viene rilasciato nell'ambiente da centrali energetiche, impianti di riscaldamento, industrie siderurgiche, inceneritori, traffico urbano, cementifici e come sotto-prodotto dei concimi contenenti fosfati (Sanità di Toppi *et al.*, 1999). La presenza del Cd in atmosfera, nel suolo e nell'acqua, anche se in tracce, può causare seri problemi a tutti gli organismi e la sua bio-accumulazione nella catena alimentare può essere altamente dannosa (Mishra *et al.*, 2006).

1.4.2 Metabolismo del Cadmio nell'uomo

Il metabolismo del Cd possiede innumerevoli eccezionali sfaccettature, mentre l'assorbimento di tale ione mostra un preciso e ben delineato pathway. Soltanto circa il 5% di una dose ingerita viene assorbita dal tratto gastro-intestinale mentre l'assorbimento del Cd nei polmoni è molto alto, così tanto che il 90% della dose ingerita viene assorbita negli alveoli polmonari. Una volta assorbito, il Cd viene rapidamente passato nel sangue e concentrato nei vari tessuti (Goering *et al.*, 1994; Klaassen *et al.*, 1981).

Il Cd maggiormente si accumula nel fegato e nei reni rispetto alle altre parti del corpo; l'accumulazione epatica e renale potrebbe essere dovuta all'abilità di questi organi di produrre grandi quantità di metallotionine (MT), proteine in grado di legare i metalli con alta affinità per il Cd (Klaassen *et al.*, 1999). Le MT all'interno della cellula hanno la capacità di chelare il Cd, diminuendone notevolmente gli effetti negativi. Comunque proprio come conseguenza del legame del metallo con le MT, il Cd viene eliminato molto lentamente dal corpo. Questo lungo tempo di permanenza potrebbe aumentare la possibilità di formazioni di neoplasie, dovute al metallo pesante.

1.4.3 Effetti sull'uomo

L'inserimento del Cd all'interno della catena alimentare è oggetto di enorme preoccupazione a causa dei suoi noti effetti neurotossici, mutagenici e carcinogenici. Recentemente, Gulisano *et al.* (2008) hanno dimostrato che un'alta concentrazione di CdCl_2 inibisce la crescita e l'attività dei neuroblasti, inducendo alterazioni morfologiche e citoscheletiche così come la morte apoptotica della cellula. Il Cd può entrare all'interno

del parenchima e dei neuroni, causando alterazioni neurologiche per l'uomo e negli animali, conducendo poi all'abbassamento della concentrazione, dell'ipernocicezione (il controllo del dolore da eccesso di stimolo doloroso), disfunzioni dell'olfatto e perdite della memoria (Rigon *et al.*, 2008).

Slebos *et al.* (2006) hanno dimostrato che un'esposizione cronica di cellule umane a livelli ambientali di Cd aumenta la capacità mutazionale negli elementi tetranucleotidici ripetuti. Nella carcinogenesi dell'uomo, l'esposizione ad una combinazione di mutageni, incluso il Cd e fumo di sigaretta, potrebbe essere un passaggio per la fissazione di mutazioni nel genoma. Il livello di esposizione al Cd derivante da fumo di sigaretta e da assunzione di cibo sono sufficientemente alti da poter inibire DNA mismatch repair (MMR), nucleotide-excision repair NER and/or base-excision repair BER e possono portare ad un aumento delle mutazioni specialmente in presenza di mutageni addizionali come gli agenti alchilanti.

L'International Agency for Research on Cancer e l'US National Toxicology Programm hanno entrambe concluso che ci sono soddisfacenti evidenze che il Cd sia un carcinogeno per l'uomo (1993). Tale affermazione era stata comprovata principalmente dalle ripetute scoperte sull'associazione tra esposizione al Cd in ambienti lavorativi e cancro al polmone ed ulteriormente confermata da notevoli risultati sui topi i quali hanno dimostrato come il sistema respiratorio sia il sito target principale. In alcuni studi, l'esposizione al Cd sul lavoro e nell'ambiente è stata associata allo sviluppo del cancro alla prostata, ai reni, al fegato, al sistema ematopoietico e allo stomaco (Waalkes, 2000). A tutt'oggi, però, il legame fra l'esposizione al Cd con il sorgere di neoplasie in qualsiasi organo oltre che nei polmoni non è stato ancora del tutto stabilito. Chiaramente, ulteriori analisi sperimentali ed epidemiologici saranno necessarie per determinare i siti target e la natura del rischio di carcinogenesi per gli umani dovuta al Cd (Waalkes, 2000).

1.4.4 Effetti sulle piante

Il Cd esercita sulle piante notevoli effetti negativi. Sebbene non sia stato ancora stabilito chiaramente come le piante rispondono a questo tipo di stress abiotico, è ben risaputo che il Cd esercita la sua fitotossicità interferendo con molti eventi basilari della crescita, dello sviluppo e della fisiologia della pianta e tra i quali si possono ricordare l'assorbimento di nutrienti, il bilancio idrico, scambio dei gas, funzioni della membrana, metabolismo cellulare e difesa contro lo stress ossidativi (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). E' noto che i

maggiori effetti vengono esercitati sulle radici (già a basse concentrazioni e dopo i primi giorni di stress) per poi raggiungere le foglie e i germogli.

1.4.5 Effetti sulle radici

Nella maggior parte delle condizioni ambientali, il Cd viene assorbito dalle radici dove viene traslocato nelle parti aeree della pianta, dove viene accumulato ad alti livelli (Barylá *et al.*, 2001). In generale, sebbene il Cd non sia un elemento essenziale per la normale crescita delle piante, esso è facilmente assorbito dalla parete delle cellule corticali o convogliato nelle radici dove viene poi compartimentalizzato all'interno dei vacuoli o indirizzato nello xilema per il successivo trasporto nelle foglie e nelle parti aeree della pianta (Sandalio *et al.*, 2001; Sanità di topi e Gabrielli, 1999). Il Cd danneggia, inoltre, la parte apicale delle radici, nelle quali è possibile osservare un marcato cambiamento di colore tendente al marrone e riduce l'assorbimento di acqua e nutrienti (Das *et al.*, 1998). Alla luce di questi cambiamenti è possibile osservare delle variazioni irreversibili nell'espressione e nella conformazione delle proteine attraverso la formazione di legami del metallo con i tioli e la conseguente alterazione della permeabilità delle pareti cellulari. (Dafrè *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 2002). Infatti gli ioni del Cd possono interferire con i pathway omeostatici degli ioni dei metalli essenziali. Possono quindi entrare nelle cellule attraverso i canali di assorbimento per il Fe^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} (Connolly *et al.*, 2002).

L'assorbimento del Cd, comunque, è specie-specifico (Inoué *et al.*, 1994) così come la distribuzione negli altri organi della pianta. Nelle cellule apicali delle radici di *Allium cepa*, ad esempio, il Cd danneggia i nucleoli, mentre nel riso altera principalmente la sintesi dell'RNA e l'attività della ribonucleasi (Liu *et al.*, 1995; Shah e Dubey, 1995). Il Cd riduce anche l'assorbimento di nitrati e il relativo trasporto dalle radici ai germogli, inibendo l'attività della nitrato reductasi nei germogli (Hernandez *et al.*, 1996).

1.4.6 Effetti sulle foglie

Una volta assorbito dalle radici, il Cd viene trasferito nelle organi aerei della pianta e in special modo nelle foglie, dove viene accumulato ad alte concentrazioni. A parte un ritardo nella crescita della pianta, il sintomo più evidente della tossicità del Cd è la clorosi delle foglie. Il meccanismo con il quale il Cd porta ad un ingiallimento fogliare non è ancora chiaro. È stato suggerito che il Cd potrebbe interferire con gli enzimi coinvolti nella biosintesi della clorofilla (Stobart *et al.*, 1985; Padmaja *et al.*, 1990; Böddi *et al.*, 1995) o nel giusto assemblamento dei complessi pigmento-proteina dei fotosistemi (Krupa, 1987;

Horváth *et al.*, 1996). È stato proposto, inoltre, che alte concentrazioni di Cd nei tessuti fogliari potrebbero interferire indirettamente il livello di clorofilla attraverso perturbazioni metaboliche (come un'accelerata senescenza (Vassilev *et al.*, 1995), stress ossidativi (Somashekaraiah *et al.*, 1992), aumento dell'attività catabolica dell'enzima clorofillase (Abdel Basset *et al.*, 1995) o la deficienza in alcuni elementi essenziali come il Fe o il Mg (Greger e Lindberg, 1987; Siedlecka e Krupa, 1999). Il Cd, infatti, causa l'inibizione dell'attività della Fe(III) reductase, portando alla perdita di assunzione di Fe(II) assimilabile per le piante, con conseguente Fe deficienza (Alcántara *et al.*, 1994). La sostituzione dello ione centrale di Mg da parte del Cd nella molecola di clorofilla è stato ipotizzato come un altro possibile meccanismo che conduce alla distruzione della clorofilla, con la conseguente clorosi fogliare (Küpper *et al.*, 1998).

Oltre alla clorosi, nelle foglie anche l'apertura stomatale viene influenzata dallo stress abiotico. L'apertura stomatale fornisce alla foglia l'opportunità di cambiare la pressione parziale della CO₂ e la velocità di traspirazione. L'inibizione dell'apertura stomatale nelle piante esposte al Cd potrebbe dipendere dalla concentrazione del metallo pesante e dal tempo di esposizione. Un effetto diretto del Cd sul movimento degli ioni e dell'acqua non è ancora stato stabilito, ma una relazione tra gli ioni K⁺ e Ca²⁺ è la risposta più plausibile.

Come conseguenza dell'inibizione dei movimenti stomatali, è stata osservata un aumento della concentrazione del saccarosio, abbassamento del potenziale osmotico e perdita di turgore con visibile senescenza (Prasad, 1995).

Kieffer *et al.* (2008) hanno mostrato, inoltre, necrosi a livello della lamina fogliare in *Populus tremula* L., sintomo di elevata tossicità da parte del Cd.

1.4.7 Effetti sull'apparato fotosintetico

Un effetto tipico del Cd negli studi fatti sino ad oggi è l'inibizione della fotosintesi. Tuttavia in letteratura si trovano risultati controversi a testimonianza della specie-specificità delle piante in risposta all'azione del Cd.

Per molte specie di piante, è stato dimostrato che la fase luminosa e la fase oscura della fotosintesi sono inibite dal metallo pesante. Secondo Krupa e Baszynski (1995), il fotosistema II (PSII) viene particolarmente influenzato dallo stress da Cd. Esso, infatti, è pensato interagire con il PSII sia a livello del sito riducente (accettore) che a livello del sito ossidante (donatore). Il centro di reazione e la catena di trasporto degli elettroni del PSII, inoltre, vengono affetti dall'azione del Cd, attraverso il danneggiamento della struttura degli enzimi, riducendone l'attività.

In altri lavori, comunque, è noto che il Cd riduce notevolmente la Ferrodossina NADP⁺ riduttasi, evidenziando che il Cd interferisce con la parte riducente della catena di trasporto degli elettroni del fotosistema I (PSI) (Siedlecka e Baszynki, 1993). A conferma di tale risultato, Sárvári *et al.* (1999) hanno osservato una riduzione dei complessi del PSI nella specie *Cucumis sativus*.

1.4.8 Stress ossidativo

Una tipica conseguenza della maggior parte degli stress biotici e abiotici, come il Cd, è un incremento di produzione dei ROS (reactive oxygen species). La successiva riduzione della molecola di ossigeno dell'H₂O porta alla formazione di radicali O₂⁻, HO[•] e H₂O₂, i quali sono potenzialmente tossici, essendo maggiormente reattivi rispetto all'O₂ stesso. I ROS possono portare ad un'ossidazione aspecifica delle proteine e delle membrane lipidiche o possono causare danneggiamenti del DNA. Come conseguenza, i tessuti danneggiati dagli stress ossidativi generalmente mostrano un'aumentata concentrazione di proteine carbonilate e malondialdeidi, indici di perossidazioni della membrana e un aumento di produzione di etilene (Schützendübel *et al.*, 2002).

Per molto tempo i ROS sono stati considerati principalmente come molecole dannose e i livelli dei quali dovrebbero essere mantenuti più bassi possibili. A tutt'oggi tale linea di pensiero sta cambiando completamente. Pian piano si sta realizzando il fatto che i ROS giochino un ruolo importante nel sistema di difesa della piante contro agenti patogeni (Bolwell *et al.*, 2002), intervenendo in alcuni step di sviluppo come la formazione degli elementi tracheali, lignificazione e altri processi cross-linking nella parete cellulare (PCA: programmed cell death, Fath, 2002). Possono agire, inoltre, come intermediari delle molecole segnali per la regolazione dell'espressione dei geni (Vranova *et al.*, 2002). A causa dei tali funzioni multiple di ossigeno radicalico, è necessario che la cellula mantenga i livelli dei ROS relativamente bassi, ma non deve eliminarli completamente.

I livelli dei ROS vengono controllati tramite il sistema degli antiossidanti. Questi meccanismi di difesa sono composti da metaboliti come l'ascorbato, il glutathione, fitochelatine, il tocoferolo etc e da "scavenger" dell'ossigeno radicalico come le superossidismutasi, le perossidasi e le catalasi (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999).

La presenza dell'ossigeno radicalico e i relativi effetti sono stati osservati in piante esposte a metalli pesanti, i quali non appartengono al gruppo dei metalli di transizione, come il Cd. L'esposizione al Cd provoca anche una marcata risposta del sistema antiossidante specie specifico e nella maggior parte dei casi il primo effetto dovuto ad uno stress da metalli pesanti si manifesta in una notevole diminuzione di produzione del GSH (Schützenbüdel *et al.*, 2002). L'esposizione al Cd mostra questo tipico effetto in quanto l'organismo richiede una notevole produzione di GSH per la sintesi di fitochelatine (Mehra e Triphati, 1999). La capacità di sintetizzare GSH, quindi, sembra essere cruciale per la protezione della pianta nei confronti del Cd (Zhu *et al.*, 1999) e in generale i livelli di GSH dopo prolungata esposizione ad uno stress da Cd risultano essere più bassi rispetto al controllo (Schützenbüdel e Polle, 2002).

1.4.9 Meccanismi di risposta allo stress da Cd a livello cellulare

In risposta allo stress da Cd, la cellula vegetale può ricorrere ad un gran numero di sistemi di difesa, come l'immobilizzazione, l'esclusione, la sintesi di fitochelatine, compartimentalizzazione, sintesi di proteine contro lo stress ossidativi e produzione di etilene.

Una prima barriera contro lo stress da Cd, operante principalmente a livello radicale, può essere l'immobilizzazione dello ione per mezzo della parete cellulare (Nishizono *et al.*, 1989) e di carboidrati extracellulari (mucillagine e altri tipi di zuccheri) (Wagner, 1993). Nelle radici e nelle foglie di *Phaseolus vulgaris* L., gli ioni del Cd sembrano legarsi maggiormente a dei siti pectici e ai gruppi istidinici della parete cellulare (Leita *et al.*, 1996). L'importanza di questi meccanismi, comunque, può variare in accordo con la concentrazione del Cd fornito, le specie coinvolte nello stress, etc. Per esempio, è stato riportato un trascurabile accumulo di Cd nelle pareti cellulari di pomodoro e nelle pareti cellulari di *S. cucubalus* e non è stata osservata nessuna differenza tra piante controllo e piante trattate (Verkleij e Schat, 1990).

Prevenire l'entrata degli ioni Cd all'interno del citosol attraverso l'azione della membrana plasmatica potrebbe rappresentare teoricamente il miglior meccanismo di difesa. Infatti, nelle prime fasi di germinazione del seme, il Cd sembra entrare nelle cellule attraverso il canale del Ca delle membrane plasmatiche (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999). Indubbiamente, la ricerca su queste eventi richiede una più approfondita analisi.

Il Cd possiede un'alta affinità verso i processi metabolici dello zolfo e i suoi primi effetti sono sull'ATP sulfurylase e adenosina 5'fosfosolfato sulfotransferasi (De Knecht *et al.*, 1995).

Una volta che il Cd è entrato nel citosol, un altro sistema strettamente associato al metabolismo dello zolfo è prontamente attivato; questo finisce con la produzione di importanti agenti complessati, chiamate fitochelatine (fig. 5), le quali possono contribuire in modo netto a detossificare il metallo pesante. Le fitochelatine sono state purificate per la prima volta da Grill (1985), sebbene già dal 1976 la loro presenza era stata presunta nelle foglie di tabacco trattate con mercurio (Anelli *et al.*, 1973). I metalli pesanti e in special modo il Cd possono attivare la sintesi di fitochelatine, le quali hanno la seguente struttura generale: γ (-Glu-Cys)_n-Gly, dove n è il numero di ripetizioni delle unità γ (-Glu-Cys), normalmente variabile da 2 a 11. Le fitochelatine formano vari complessi con il Cd, dovuti alla presenza di gruppi tiolici della Cys, la quale chela il Cd e, come risultato finale, previene la circolazione dello ione Cd²⁺ all'interno del citosol. Grazie all'utilizzo della spettroscopia EXAFS (extended X-ray absorption fine structure) (Strasdeit *et al.*, 1991) è stata riportata la lunghezza del legame Cd-S nel complesso Cd-fitochelatina pari a 2.52 ± 0.02 Å il quale mostra un'elevata stabilità e quindi un'elevata efficienza da parte delle fitochelatine nel chelare il Cd.

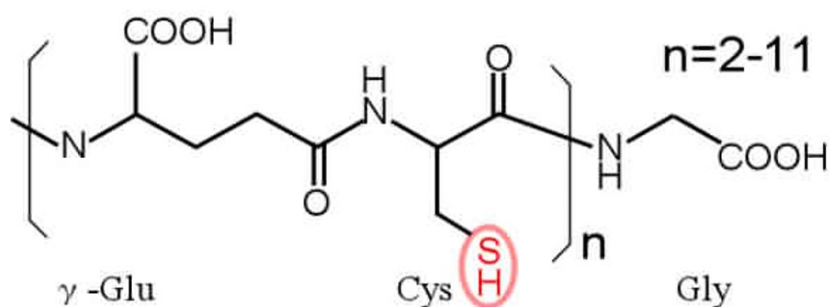


Figura 5 Struttura delle Fitochelatine

Le fitochelatine sono sintetizzate dal glutathione (GSH), attraverso l'azione dell'enzima fitochelatina sintetasi, una specifica γ -glutamylcisteina transpeptidasi. Tale enzima ha la capacità di autoregolarsi, infatti i suoi prodotti di reazione (le fitochelatine), le quali cominciano ad essere sintetizzate entro pochi minuti dopo aver fornito Cd, chelano il metallo pesante (il quale è necessario per attivare l'enzima), e la reazione finisce subito dopo che il Cd non è più fornito (Loeffler *et al.*, 1989). Ci sono, inoltre, alcuni composti simili ma non identici alle fitochelatine, comunemente chiamati iso-fitochelutine dove

Un ruolo veramente importante nella detossificazione del Cd viene giocato dalla compartimentalizzazione nei vacuoli, la quale previene la libera circolazione degli ioni Cd^{2+} nel citosol, confinandoli in un'area limitata. Il meccanismo è mostrato nella figura 6. L'esposizione al Cd stimola la sintesi di fitochelatine, le quali rapidamente formano un complesso a basso peso molecolare (LMW) con il Cd (principalmente con le PC_3) (Vögeli-Lange e Wagner 1996) e, nelle colture cellulari di *Rauvolfia serpentina*, un complesso con peso molecolare medio (MMW), caratterizzato prevalentemente da Cd legato a fitochelatine con alto grado di polimerizzazione (Kneer e Zenk, 1992). Questi composti acquistano acido solforico debole (S^{2-}), probabilmente a livello dei tonoplasti, e formano complessi ad alto peso molecolare (HMW) (Speiser *et al.*, 1992) con alta affinità verso gli ioni Cd^{2+} . È importante ricordare che la detossificazione del Cd sembra essere legata alla capacità delle fitochelatine di legarsi rapidamente ai gruppi S^{2-} e, conseguentemente, di bloccare ioni Cd liberi in modo molto efficace. Quindi, in particolar modo i complessi HMW, altamente stabilizzati dai gruppi S^{2-} , giocano un ruolo determinante nella detossificazione da stress da Cd.

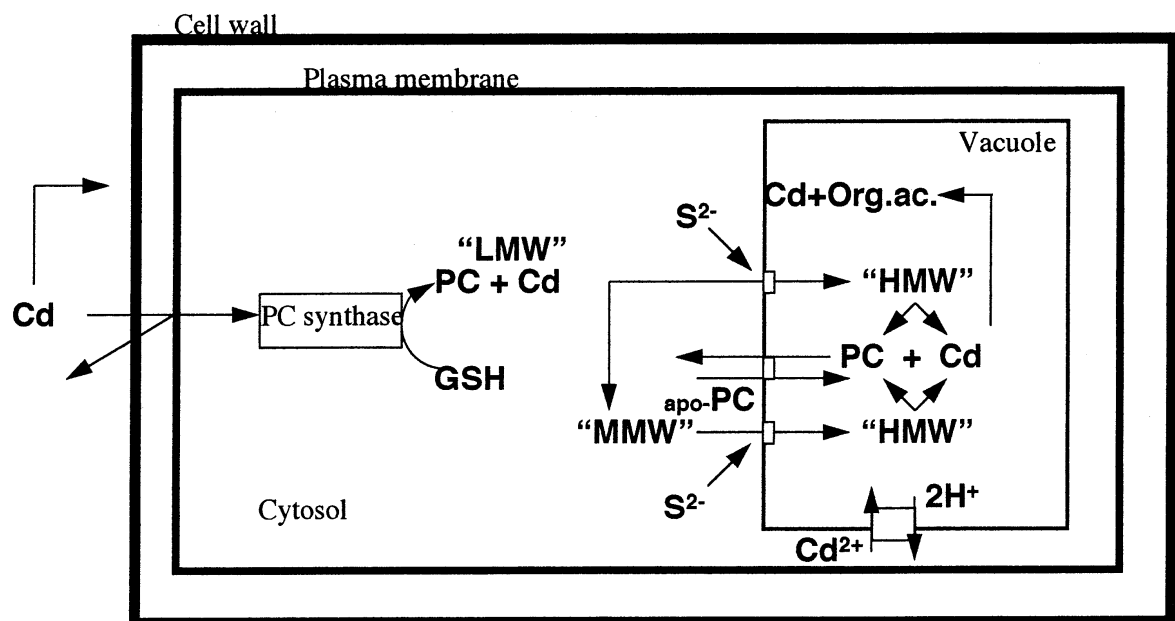


Figura 6. Meccanismo di detossificazione del Cd da parte delle fitochelatine

Gli ioni Cd^{2+} liberi entrano nei vacuoli per mezzo di un antiporto $\text{Cd}^{2+}/2\text{H}^{+}$ (Gries e Wagner, 1998). Nei vacuoli, a causa del pH acido, i complessi HMW vengono dissociati e il Cd può essere complessato dagli acidi organici vacuolari (citrato, ossalato e malato) (Krotz *et al.*, 1989) e, talvolta, anche dagli amminoacidi. Le apo-fitochelatine, complessi senza Cd, possono essere degradati da idrolisi vacuolari e/o ritornano nel citosol, dove possono continuare a svolgere il loro ruolo di detossificanti.

Negli animali, cianobatteri e funghi, il Cd e gli altri metalli pesanti possono essere complessati e detossificati dalle metallotionine, un gruppo di peptidi ricchi in cisterne, generalmente mancanti di amminoacidi aromatici. Non ci sono indicazioni in letteratura sull'esistenza nelle piante di metallotionine indotte da stress da Cd. Quindi, il loro ruolo nella detossificazione del metallo pesante sembra essere al momento di secondaria importanza se comparata con il potere di eliminare gli ioni bivalenti delle fitochelatine. Ad oggi, comunque, sono presenti in letteratura notevoli lavori che mostrano come l'associazione simbiotica tra radici (pianta) e micorrize (fungo) agisca in modo efficace come strumento per la "phytoremediation" da metalli pesanti. (Hildebrandt *et al.*, 2007).

Dopo essere soggette ad alta temperatura, metalli pesanti o altri trattamenti chimici, salinità o siccità, le cellule vegetali spesso cominciano la sintesi delle cosiddette "heat shock protein" (hsp) (Timperio *et al.*, 2008). Molte classi di hsp sono state trovate nelle piante tra le quali: a) hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, b) small hsp (con un peso molecolare compreso fra 17 e 30 kDa, c) ubiquitin, una hsp a basso peso molecolare con soltanto 76 amminoacidi (Hershko *et al.*, 1988). Nelle colture cellulari di *Lycopersicon peruvianum* esposte al Cd, notevoli quantità di hsp70 vengono a legarsi al plasmalemma, alle membrane mitocondriali e al reticolo endoplasmatico (Neumann *et al.*, 1994). Questo sembra essere correlato alla formazione di complessi tra il Cd e le proteine denaturate dal Cd stesso. La proteina Hsp70 ha una notevole affinità con le proteine ripiegate in maniera errata, e aiuta quest'ultime a trovare la loro conformazione nativa, reintegrandole all'interno del complesso della membrana. Questa caratteristica è in accordo con i dati di Jungmann *et al.* (1993), il quale ha trovato che l'esposizione al Cd causa una denaturazione delle proteine anche in *Saccharomyces cerevisiae*. Queste proteine denaturate, in presenza di ATP e di vari fattori ausiliari, fornisce un substrato per l'ubiquitina. Il substrato insieme all'ubiquitina viene poi degradato dal proteasoma, un complesso di multisubunità proteolitiche.

È noto che il Cd stimola la biosintesi di etilene attraverso il pathway MSAE (metionina, S-adenosil metionina, acido 1-aminociclopropano-1- carbossilico, etilene (Adams e Yang, 1979) – aumentando e poi inibendo l'attività in vivo dell'ACC sintasi (Fuher, 1982 a). La

produzione di etilene aumenta l'attività della guaiacolo perossidasi, e un accumulo di composti fenolici solubili e insolubili (tipo lignina) nelle colture di *Phaseolus vulgaris* esposte al Cd (Fuher, 1982 b). In alcune specie (Rodecap *et al.*, 1981), inoltre, il Cd induce una maggiore produzione di etilene nelle radici piuttosto che nei germogli. La stimolazione di produzione di etilene durante il trattamento da Cd raggiunge le massime concentrazioni entro 5-10 h dall'inizio dello stress e per poi tornare gradualmente ai valori normali entro 24 h dal trattamento. La diminuzione della produzione di etilene è dovuta molto probabilmente all'intrappolamento del Cd tramite fitochelatine.

A causa della scarsità di dati presenti in letteratura, è impossibile capire esattamente, a livello molecolare e cellulare, il rapporto tra biosintesi di etilene e Cd stress. Non è da escludere che nelle cellule vegetali uno stress dovuto al Cd potrebbe interagire a livello degli ioni Ca con conseguente stimolazione di produzione di etilene. Infatti è riportato che gli ioni Ca stimolano la produzione di etilene, come un effettore dell'enzima EFE (Pennazio e Roggero, 1992).

L'etilene indotto dal Cd potrebbe essere un segnale di:

- un accelerato processo di lignificazione (Ievinsh e Romanovskaya, 1991), attraverso l'incremento dell'attività degli enzimi fenilalanina liasi e per ossidasi.
- un'induzione dell'attività dell'ascorbato per ossidasi, necessaria per avviare il processo di detossificazione del perossido di idrogeno.
- una regolazione di espressione dei geni codificanti le metionine e/o proteine antistress (Whitelaw *et al.*, 1997)

Una proprietà importante dell'etilene è il legame π tra gli atomi di C. Potrebbe essere possibile, quindi, che l'etilene interagisca con il Cd e con gli altri metalli di transizione (Zn o Cu) (Scheller *et al.*, 1996) e/o con il metabolismo del glutatione con conseguente influenza sulla sintesi delle fitochelatine.

2. Risultati degli effetti del Cd sui tilacoidi

2.1 Accumulo di Cd e analisi dei pigmenti nei tilacoidi

Il trattamento con il Cd è iniziato quando le piante cresciute in cultura idroponica avevano 20 giorni di vita. A differenza con molte altre specie, lo spinacio non ha mostrato cambiamenti significativi a più basse concentrazioni (20, 50, 75 μM), quindi è stato deciso di effettuare le nostre analisi a 100 μM di CdCl_2 . Le prime quattro foglie basali sono state analizzate separatamente dalle due apicali per la loro struttura e composizione biochimica (Figura 7). Infatti, come previsto, dopo 10 giorni di trattamento, non sono stati trovati ioni Cd nelle foglie apicali, mentre in quelle basali la concentrazione di Cd era compresa tra 7.7 ± 0.1 (prime due foglie basali) e 3.9 ± 0.1 (le seconde foglie basali) nmol cm^{-2} . Poiché il Cd è stato localizzato nelle prime 4 foglie basali, la linea di ricerca è stata focalizzata proprio in queste foglie. Due nuove foglie sono comparse solo dopo 20 giorni di trattamento e quindi non sono state prese in considerazione per le analisi di ricerca.

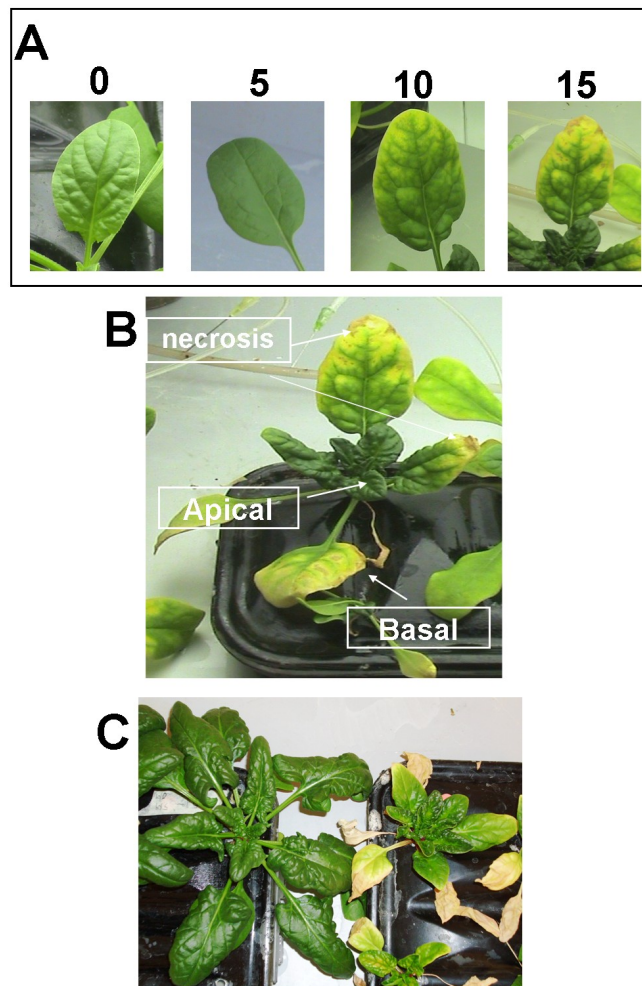


Figura 7. Effetti macroscopici del Cd sulla pianta di *Spinacia Oleracea*. A. Foglie con sintomi di clorosi indotta dal Cd dopo 0, 5, 10 e 15 giorni di trattamento. B. Pianta intera in coltura idroponica con evidenza delle foglie basali e apicali con presenza di necrosi dopo 15 giorni di trattamento. C. Figura comparativa con messa in risalto della differente velocità di crescita delle piante dopo 30 giorni di stress da Cd. A sinistra: pianta controllo. A destra: pianta trattata con Cd.

Le foglie basali trattate con il Cd hanno mostrato una riduzione nel numero di cloroplasti (da 1.42 ± 0.16 a 1.022 ± 0.21 numero di cloroplasti per $100 \mu\text{m}^2$ di cellula) rispetto alle piante controllo. Misure spettrofotometriche hanno messo in evidenza che la concentrazione di clorofilla totale ($[\text{Chl}]_{\text{tot}}$) delle foglie apicali si comporta similmente come le foglie controllo (figura 8A), indicando che l'apparato fotosintetico delle foglie apicali non è influenzato dallo stress da Cd. Al contrario, ($[\text{Chl}]_{\text{tot}}$) delle foglie basali diminuisce costantemente durante tutto il trattamento. In particolare, Chl *a* ($[\text{Chl}]_{\text{a}}$) diminuisce in modo più marcato rispetto alla Chl *b* ($[\text{Chl}]_{\text{b}}$), specialmente durante i primi giorni di trattamento (figura 8A). Per quanto riguarda i pigmenti inerenti al ciclo delle Xantofille, nelle foglie basali, alcune xantofille (luteina, neoxantina e violaxantina)

aumentano durante lo stress (figura 9). Tale incremento è stato particolarmente evidente per la luteina nelle foglie trattate con il Cd per 15 giorni. Al contrario di quanto osservato nelle piante cresciute in Fe deficienza a $300 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Timperio *et al.*, 2007), non sono state registrate formazioni di zeozantina e anteroxantina durante il trattamento con Cd, corroborando l'ipotesi che la clorosi osservata in presenza del Cd potrebbe essere attribuita non solo all'inibizione dell'accumulo del Fe, il quale porta ad una Fe(II) deficienza nelle foglie (Alcántara *et al.*, 1994), ma anche altri meccanismi sembrano essere coinvolti. Per effettuare l'analisi di "recovery", il trattamento con il Cd è stato stoppato in alcune piante dopo 30 giorni di stress, mentre in altre piante gli ioni Cd sono stati sostituiti con ioni Zn ad una concentrazione di $7.65 \mu\text{M}$ (10 volte maggiore rispetto alla quantità normalmente presente nella soluzione di Hoagland). È stata scelta questa condizione estrema in quanto si è voluto controllare se il "recovery" fosse possibile anche nelle piante che mostravano un danno visibile. Le varie analisi biochimiche sono state concentrate soltanto sulle seconde foglie basali, in quanto le prime due mostravano uno stato avanzato di essiccamento. È stato possibile osservare una re-sintesi di Chl totale già dopo tre giorni di "recovery", ma comunque la presenza degli ioni Zn non ha incrementato la formazione di Chl totale (figura 8A). In modo analogo, subito dopo la rimozione degli ioni Cd, il contenuto di luteina è stata osservata diminuire, sebbene il suo quantitativo totale rimaneva più alto rispetto al controllo (figura 9).

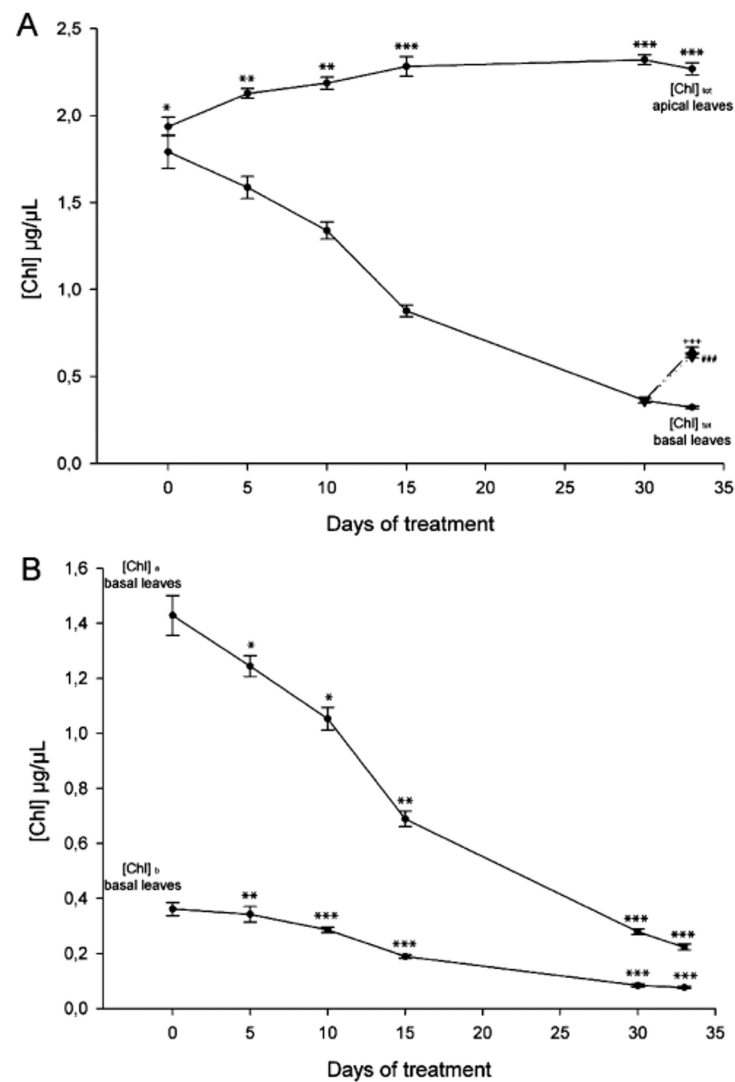


Figura 8 (A) Andamento delle concentrazioni delle clorofilla misurate nelle membrane tilacoidali delle foglie basali e apicali di piante di spinacio trattate con il Cd. La concentrazione totale di Chl è stata stimata tramite spettrofotometro a 652 nm utilizzando una soluzione con gli stessi numeri di cloroplasti. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) differenze statistiche fra i valori nelle foglie basali allo stesso giorno di trattamento. La linea tratteggiata mostra la concentrazione di Chl determinata dopo 3 giorni dalla rimozione del Cd dalle soluzioni di nutrienti Hoagland, mentre la linea punto e tratteggio rappresenta l'andamento delle clorofilla nelle piante dove è stato tolto il Cd dalla soluzione Hoagland e con aggiunta di Zn. +++ ($P < 0.001$, riferito alla soluzione Cd free) con differenza significativa dal valore a 33 giorni sulle foglie basali. ### ($P < 0.001$, riferito alle piante con Zn). Sono stati effettuati il test ANOVA ad una variabile seguito dal test di comparazione delle medie di Turkey e Scheffé. (B) Andamento della concentrazione della Chl *a* e Chl *b* misurata nelle membrane tilacoidali delle foglie basali di spinacio trattate con Cd. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) differenza significativa nei confronti dei valori della Chl *a* e Chl *b* a 0 giorni di trattamento. Test ANOVA ad una variabile seguito dai test Tukey e Scheffé.

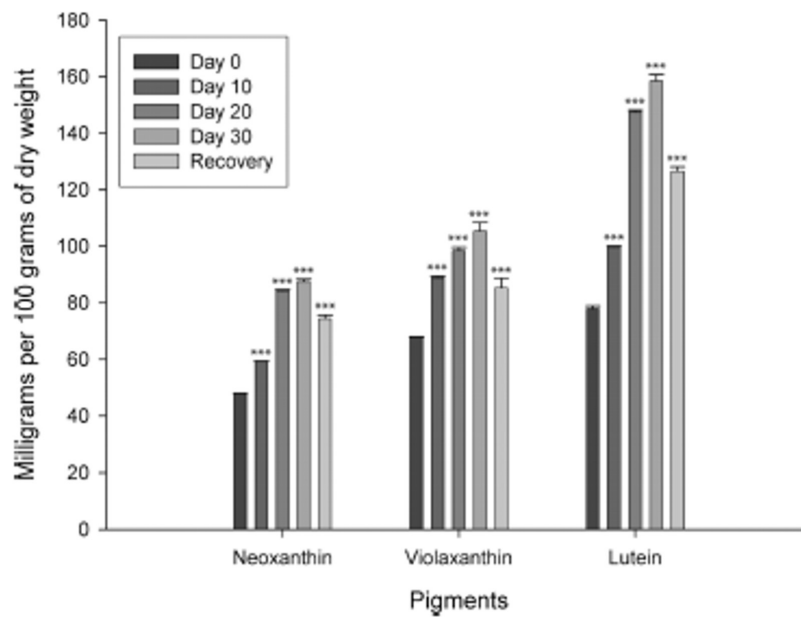


Figura 9. Andamento della concentrazione dei pigmenti fotosintetici nelle foglie determinate tramite analisi HPLC sulle piante di spinacio trattate con Cd: Violaxantina, Neoxantina e Luteina. I risultati sono espressi come milligrammi di pigmento per 100 gr di peso secco di foglia. *** ($P < 0.001$) differenze significative nei confronti del valore a 0 giorni. Test ANOVA ad una variabile.

2.2 Analisi proteomica e 1D BN-PAGE

BN-PAGE è il sistema elettroforetico preferito per l'analisi del proteoma delle membrane idrofobiche in quanto sembra meno problematico e più riproducibile rispetto alla elettroforesi 2D con l'IEF (Ciambella *et al.*, 2005; Aro *et al.*, 2005). Questo sistema di gel 2D ad alta risoluzione, permette di identificare i vari multicompleksi secondo la loro composizione nelle varie subunità. Nel caso delle proteine antenna, comunque, per le quali la tecnica 2D SDS-PAGE mostra dei limiti risolutivi, l'indagine proteomica è stata effettuata tramite gradiente di saccarosio seguito da RP-HPLC (vedi in seguito). Il BN-PAGE è stato effettuato su tilacoidi isolati sia da foglie basali non trattate (controllo) che in quelle stressate con il Cd dopo 0, 5, 10, 15 giorni di trattamento. Ogni stadio di sviluppo della foglia (sia nel controllo che nello stressato) è stato analizzato in 5 replicati. È importante evidenziare che il BN-PAGE effettuato nelle foglie apicali e basali delle piante controllo non ha mostrato nessuna differenza lungo tutto il periodo di 15 giorni (risultati non mostrati), indicando che i complessi fotosintetici non cambiavano durante il periodo di trattamento delle piante. La figura 10A mette a paragone il profilo del gel BN dei multicompleksi dei tilacoidi trattati con Cd, estratti dalle foglie basali dopo 0, 5, 10, 15 giorni di trattamento. I complessi fotosintetici presenti nelle bande dei gels sono stati identificati tramite digestione triptica e spettrometria di massa tandem. Come detto in precedenza, è stato ottenuto un numero limitato di peptidi dopo digestione triplica di queste proteine altamente idrofobiche, ma sicuramente sufficienti per identificare inequivocabilmente i vari multicompleksi (D'Amici *et al.*, 2008). Tutti le proteine dei vari complessi identificati sono elencati nella Tabella 1. La maggior parte dei complessi identificati tramite spettrometria di massa tandem hanno mostrato corrispondenza con quelli precedentemente identificati attraverso i pesi molecolari apparenti delle proteine dei complessi (Ciambella *et al.*, 2005; Aro *et al.*, 2005). Tutte queste identificazioni sono state, inoltre, confermate dall'analisi in seconda dimensione (vedi sotto).

Per comparare l'abbondanza relativa dei complessi multiproteici durante la cinetica di stress da Cd, un'analisi semi-quantitativa di ogni banda è stata effettuata tramite un software d'analisi d'immagine TotalLab vers. 2.01 (Nonlinear Dynamics) (Figura 10B). Per ogni campione, sono stati caricati lo stesso quantitativo di proteina (100 µg), la cui concentrazione è stata misurata dopo il passaggio di solubilizzazione. Per rendere minime le variazioni tecniche, le analisi semi-quantitative riportate in Figura 10B si riferiscono alla media di 5 replicati. La significatività statistica è stata valutata tramite l'analisi ad una variabile della varianza (ANOVA, $p < 0.05$).

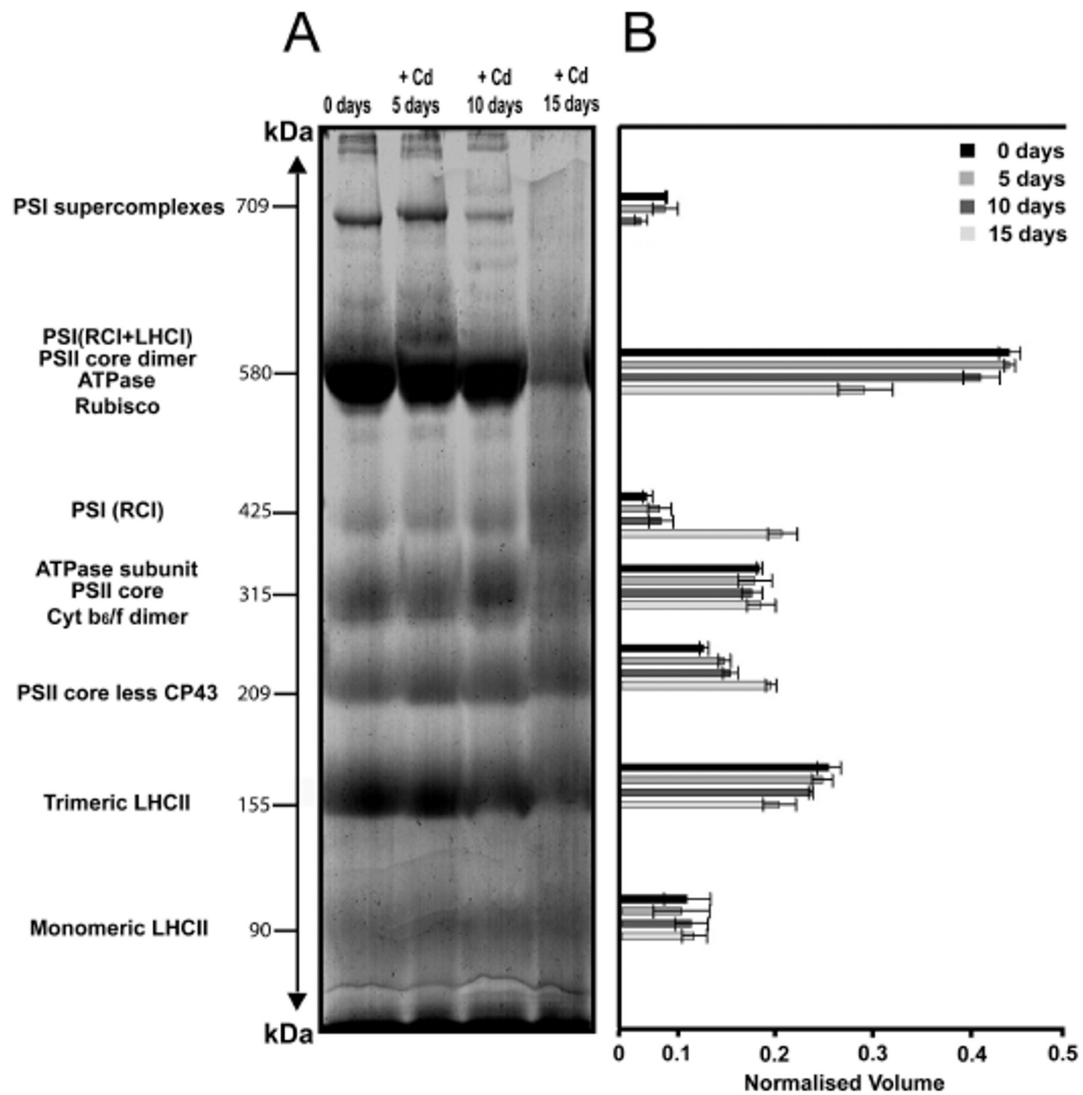


Figura 10 (A) Profilo del Blue Native PAGE dei complessi multi proteici della membrana tilacoidale (foglie basali dopo 0, 5, 10 e 15 giorni di trattamento con una soluzione 100 μ M di Cd). Ogni strip del riquadro A è stata caricata con lo stessa quantità di proteina (100 μ g), dopo aver misurato la concentrazione con il saggio DC della Biorad dopo solubilizzazione. Nel riquadro B, per paragonare l'abbondanza dei complessi durante il corso del trattamento, è stata effettuata un'analisi semi-quantitativa per misurare il volume di ogni banda con il software TotalLab vers. 2.01 (Nonlinear Dynamics). Per rendere minimo l'effetto dei replicati tecnici, il dato del volume normalizzato di ogni banda si riferisce alla media di 5 replicati. Test ANOVA ad una variabile. *($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) differenze significative dal valore a 0 giorni.

Il complesso del PSI con un peso molecolare apparente di 709 kDa, mostra una crescente riduzione del volume della banda durante il trattamento. Questi supercomplessi vengono completamente distrutti dopo 15 giorni di trattamento con il Cd, indicando che l'organizzazione delle membrane tilacoidali è stata fortemente compromessa e che il complesso del PSI è stato fortemente danneggiato. La grande banda verde a 580 kDa, dove PSI (RCI+LCHI), il dimero del core del PSII, ATPase (ATP-sintasi) e la Rubisco comigrano, ha mostrato essa stessa una riduzione nel tempo. Poiché sia la spettrometria di massa tandem che l'analisi elettroforetica in seconda dimensione hanno confermato che l'ATPase rimane costante, è stato possibile dedurre che il continuo decremento della banda a 580 kDa sia dovuto ad una riduzione del PSI (RCI+LHCI), della Rubisco e del dimero del core del PSII.

La banda a 425 kDa è divenuta più densa dopo 15 giorni di trattamento con il Cd. La digestione triptica di questo complesso multiproteico ha dato un numero ridotto di peptici (vedi la Tabella 1) rispetto al controllo, suggerendo che il polipeptidi delle foglie trattate con il Cd contengono aminoacidi non facilmente attaccabili dalla tripsina (Dalle Donne *et al.*, 2006). Sulla base dei polipeptidi identificati (vedi Tabella 1), è stato possibile rilevare che molti frammenti di proteine appartenenti al PSI sono venuti a mancare e quindi di conseguenza è stato possibile ipotizzare che la banda potrebbe corrispondere a un "incompleto" core del PSI (RCI) (vedi sotto), derivante dalla simultanea disaggregazione dei complessi del PSI e dei supercomplessi a 580 e 709 kDa.

Nessuna variazione significativa è stata osservata nella banda a 315 kDa, la quale contiene il complesso del dimero del core del PSII, una subunità dell'ATPase e il citocromo b_6f . Il volume della banda a 209 kDa, contenente la forma monomerica del core del PSII meno CP43, è aumentata dopo 15 di trattamento, in risposta probabilmente alla disaggregazione della forma dimerica del PSII a 580 kDa. Infine le due bande a circa 155 e 90 kDa, rappresentano la forme trimeriche e monomeriche delle LHCII, le quali non hanno mostrato cambiamenti significativi. Soltanto un modesto decremento dei trimeri è stato osservato dopo 15 giorni di trattamento. Tutte queste affermazioni, quindi, suggeriscono che il PSI è il complesso maggiormente influenzato già all'inizio del trattamento, mentre il PSII mostra alterazioni significative soltanto dopo 15 giorni di stress. L'ATP sintasi e il citocromo b_6f non vengono influenzati dal Cd. Sorprendentemente, l'analisi semi-quantitativa delle bande delle foglie apicali non mostra differenze significative (figura 10B), indicando che l'apparato foto sintetico di queste foglie non sembra essere

danneggiato. Questo risultato è in accordo con le analisi della [Chl]_{tot} effettuata sulle foglie apicali (Figura 12A).

Tabella 1. Proteine identificate nei tilacoidi di spinacio dopo separazione dei supercomplessi tramite 1D BN-PAGE. Ogni banda contiene uno o più multicompleksi riconosciuti sulla base delle proteine identificate.

Band at 709 kDa: PSI supercomplex

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor (Photosystem I 20 kDa subunit) (PSI-D) [Spinacia oleracea]	847.60 652.14 913.51 826.02 385.87 588.47 750.99 437.89 534.96	3+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	70 - 94 95 - 110 96 - 110 111 - 125 126 - 132 136 - 145 159 - 171 184 - 191 204 - 212	GFTPELDPNTPSPIFAGSTGGLLR KAQVEEFYVITWESPK AQVEEFYVITWESPK EQIFEMPTGGAIMR EGPNLLK KEQCLALGTR VFPSGEVQYLHPK QGVGLNMR FTGKQPYDL	gi 19855891
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 [Spinacia oleracea]	660.45 493.09 425.79 838.97 693.97 716.54 737.93 449.54	2+ 3+ 2+ 2+ 3+ 3+ 2+ 2+	8 - 19 8 - 20 303 - 314 397 - 410 452 - 469 470 - 490 552 - 564 685 - 692	FSQGLAQDPTTR FSQGLAQDPTTRR DLLEAHIPPGR DYNPEQNEEDNVLR QILIEPIFAQWISAHGK TSYGFDVLLSSTSGPAFNAGR DFGYSFPCDGPGR TPLANLIR	gi 11497524
Chain F, The Structure Of A Plant Photosystem I Supercomplex At 3.4 Angstrom Resolution [Spinacia oleracea]	487.91 674.55 450.45 719.82 843.59 563.03 577.10	2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+	1 - 9 31 - 43 52 - 58 59 - 78 118 - 132 133 - 142 143 - 154	DIAGLTPCK LYADDSAPALAIK RFDNYGK YGLLCGSDGLPHLIVSGDQR EIHIDVPLASSLLFR GFSWPVAAYR ELLNGELVDNNF	gi 149242532
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	393.46 527.98 777.03 516.91 454.92 422.37	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	5 - 11 12 - 20 134 - 146 269 - 276 420 - 426 716 - 723	SPEPEVK ILVDRDPVK GIQITSGFFQIWR YADFLTFR YNDLLDR ALSI VQGR	gi 11497525
Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplast precursor (PSI-L) (PSI subunit V) [Spinacia oleracea]	613.85 756.55 567.45 722.47	3+ 2+ 3+ 2+	101 - 118 157 - 171 172 - 186 174 - 186	GVEVGLAHGFLLVGPFVK EGEPSIAPALTLTGR KKQPDQLQSADGWAK QPDQLQSADGWAK	gi 3914473
Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor (PSI-E)	603.84 524.09 635.47	3+ 2+ 2+	35 - 54 55 - 65 82 - 94	AAEEAAAAPAAASPEGEAPK AAAKPPPIGPK GVGSVVAVDQDPK	gi 131178

[Spinacia oleracea]					
Photosystem I subunit VII [Spinacia oleracea]	823.43 946.48	2+ 3+	7 - 19 20 - 35	IYDTCIGCTQCVR ACPTDVLMPWDGCK	gi 11497582
Chlorophyll a/b binding protein precursor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	659.95 687.17 694.97	2+ 3+ 2+	83 - 93 150 - 166 155 - 166	WFVQAELVNGR WQDIKNPGCVNQDPIFK NPGCVNQDPIFK	gi 72580631

Band at 580 kDa: PSI(RCI+LHCI), ATPase, PSII core dimer

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
Photosystem I reaction center subunit III, chloroplast precursor (Light-harvesting complex I 17 kDa protein) (PSI-F) [Spinacia oleracea]	674.56 843.63 688.58	2+ 2+ 2+	108 - 120 195 - 209 220 - 231	LYADDSAPALAIK EIHDVPLASSLLFR ELLNGELVDNNF	gi 131187
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	527.90 516.86 454.83 422.38	2+ 2+ 2+ 2+	12 - 20 269 - 276 420 - 426 716 - 723	ILVDRDPVK YADFLTR YNDLLDR ALSIVQGR	gi 11497525
Chlorophyll a/b binding protein precursor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	659.95 687.17 694.97	2+ 3+ 2+	83 - 93 150 - 166 155 - 166	WFVQAELVNGR WQDIKNPGCVNQDPIFK NPGCVNQDPIFK	gi 72580631
ATP synthase CF1 beta subunit [Spinacia oleracea]	868.08 597.05 978.07 491.39 736.53 975.57 980.57 717.55	3+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	23 - 39 76 - 87 110 - 127 179 - 191 218 - 231 249 - 261 262 - 277 278 - 291	IAQIIGPVLDVAFPPGK AVAMSATDGLTR IFNVLGEPVDNLGPVDTR TVLIMELINNIK Oxidation (M) ESGVINEQNIAESK VGLTALTMAEYFR DVNEQDVLFLFIDNIFR FVQAGSEVSALLGR	gi 11497535
ATP synthase CF1 alpha subunit [Spinacia oleracea]	800.03 709.07 1122.13 626.56	2+ 2+ 2+ 3+	26 - 41 95 - 107 142 - 162 481 - 491	VVNTGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR SVYEPLQTGLIADAMIPVGR TFEEAEALK	gi 126022791
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	403.03 663.90 656.71 905.95 743.34 352.62	2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+	8 - 18 58 - 68 287 - 304 288 - 304 309 - 321 379 - 384	VHTVVLNDPGR QGMFVIPFMT Oxidation (M) RVSAGLAENQSFSEAWSK VSAGLAENQSFSEAWSK LAFYDYIGNNPAK ADVPFR	gi 11497552

Band at 425 kDa: PSI(RCI)

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	527.90 516.86 454.83 422.38	2+ 2+ 2+ 2+	12 - 20 269 - 276 420 - 426 716 - 723	ILVDRDPVK YADFLTFR YNDLLDR ALSIVQGR	gi 11497525

Band at 315 kDa: ATPase subunit, PSII core, Cyt b₆/f dimer

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
ATP synthase CF1 alpha subunit [Spinacia oleracea]	800.03 709.07 748.53 626.55	2+ 2+ 2+ 3+	26 - 41 95 - 107 142 - 162 481 - 491	VVNTGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR SVYEPLQTGLIAIDAMIPVGR TFTEEAELK	gi 126022791
CP47 [Spinacia oleracea]	906.07 743.45 724.00 645.98	2+ 2+ 3+ 2+	291 - 307 312 - 324 330 - 350 427 - 437	VSAGLAENQSFSEAWSK LAFYDYIGNNPAK AGSMDNGDGIAGVWLGHPIFR AQLGEIFELDR	gi 1420852
photosystem II protein D2 [Spinacia oleracea]	614.39 774.58 521.53	2+ 2+ 2+	296 - 305 306 - 318 319 - 327	AYDFVSQEIR AAEDPEFETFYTK NILLNEGIR	gi 11497520
Apocytochrome f precursor	560.3600 617.9720 594.6660 477.3680 492.2710	3+ 2+ 3+ 2+ 2+	132 - 145 146 - 157 221 - 236 237 - 244 313 - 320	IGNLSFQNYRPNKK NILVIGPVPQGK EKGGYEITVDASNER QVIDIIPR VQLSEMNF. Oxidation (M)	gi 544122

Band at 209 kDa: PSII less CP43

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
Photosystem Q(B) protein (32 kDa thylakoid membrane protein) (Photosystem II protein D1)	714.35 730.06 730.18 657.87 429.19	2+ 3+ 2+ 2+ 3+	17 - 27 239 - 257 258 - 269 313 - 323 324 - 334	FCDWITSTENR FGQEEETYNIVAAHGYFGR LIFQYASFNNR VINTWADIINR ANLGMEVMHER.N Oxidation (M)	gi 1709829
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	403.03 671.89 656.71 905.95 743.34 352.62 723.91 645.43	3+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	8 - 18 58 - 68 287 - 304 288 - 304 309 - 321 379 - 384 423 - 434 424 - 434	VHTVVLNDPGR QGMFVIPFMTR.L. Oxidation (M) RVSAGLAENQSFSEAWSK VSAGLAENQSFSEAWSK LAFYDYIGNNPAK ADVPFR RAQLGEIFELDR AQLGEIFELDR	gi 11497552
Photosystem II protein D2	774.58 521.53	2+ 2+	306 - 318 319 - 327	AAEDPEFETFYTK NILLNEGIR	gi 11497520

Band at 155 kDa: Trimeric LHCII

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.44 663.51 492.37	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	TVQSSSPWYGPDR NRELEVIHCR FGEAVWFK	gi 115780
Lhcb2 protein [Arabidopsis thaliana]	711.17 711.52 442.69 953.04 960.52 492.43	3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	37 - 56 44 - 56 96 - 105 106 - 122 127 - 134 213 - 217	KTAGKPKNVSSGSPWYGPDR NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR WAMLGALGCVPELLAR Oxidation (M) FGEAVWFK VKEIK	gi 4741944

Band at 90 kDa: Monomeric LHCI

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.5140 663.5160 492.3710	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR FGEAVWFK	gi 133917261
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.1 [Spinacia oleracea]	711.51 663.51 492.37	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR FGEAVWFK	gi 133917263

2.2.1 2D SDS-PAGE

Le bande del 1D-BN gel delle foglie basali prese dal controllo e da quelle trattate (Fig. 10) a 0, 5, 10, 15 giorni con Cd sono state direttamente trasferite e analizzate in 2D gel denaturante con 6M Urea. Con tale procedimento i componenti proteici delle proteine della membrana tilacoidale sono separati secondo il loro peso molecolare. Nei gel dei campioni trattati dopo 15 giorni di trattamento, gli spot appartenenti al PSI (contenuti nella prima linea verticale) scompaiono completamente, mentre i pochi spot presenti nella seconda linea verticale corrispondono soltanto al complesso dell'ATP sintasi, corroborando la tesi che il PSI(RCI+LCHI) e il core del dimero del PSII vengono completamente distrutti (figura 11). Soltanto uno spot, identificato come PSAa/PSAb (vedi il cerchio nella figura 11A), è stato trovato appartenere alla banda a 425 kDa contenente il complesso PSI(RCI). Comunque con tale saggio, non è stato possibile analizzare variazioni delle antenne del PSI e nelle mappe del campione controllo non sono stati rilevate alcune variazioni significative (figura 11A).

Per confrontare i pattern proteici lungo tutto il trattamento, è stata effettuata un'analisi semi-quantitativa degli spot differenzialmente espressi nei gel 2D SDS-PAGE tramite il software Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics). L'originalità di questo approccio è stata l'uso del sistema 2D SDS-PAGE per un'analisi semi-quantitativa. L'analisi degli spot è stata effettuata su 5 gel in replicato per ogni campione. I 5 replicati sono stati eseguiti per ottenere una significatività statistica di 0.8 con un fold minimo di 2. La "master map" ottenuta dalla comparazione di tutti i trattamenti è rappresentata in figura 11B. E' stato deciso di analizzare le mappe a 10 giorni, in quanto sulla base dell'analisi in 1D, il campione a 15 giorni mostra un danneggiamento dell'apparato fotosintetico troppo marcato per essere paragonato. 18 proteine sono state trovate che mostrano una differente espressione in modo significativo ($p < 0.05$), tra le quali 7 proteine sono "up-regolate" (spot 1, 6, 7, 10, 11, 21, 23), mentre 11 proteine vengono "down-regolate" (spot 8, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 25, 26, 28). Il numero di spot totale ottenuti per ogni replicato ha mostrato un'elevata riproducibilità, avendo una deviazione standard della media di spot ottenuti compresa fra $\pm 1.3 - 1.7$ (vedi figura 11B). Inoltre, anche la riproducibilità del volume normalizzato degli spot tra i vari replicati è risultata alta. Entrambe queste osservazioni, indicano come il sistema 2D BN-SDS-PAGE sia un potente strumento per l'analisi semi-quantitativa per i proteomi idrofobici.

Gli spot differenzialmente espressi sono stati digeriti con tripsina e identificati tramite spettrometro di massa (tabella 2). Gli spot 1, 6, 11 e 23 appartenenti al dimero del core del

PSII sono stati identificati rispettivamente come CP43, CP47, D1 e D2. Lo spot “up-regolato” 21 è stato identificato come PsaA/PsaB dal complesso del PSI.

Presi insieme questi risultati indicano che le proteine del dimero del core del PSII aumentano durante i primi 10 giorni di trattamento, mentre il complesso e i supercomplessi del PSI diminuiscono. Altre proteine sovraespresse sono la Ferrodossina Riduttasi (una proteina libera attribuita allo spot 7) e l'Oxygen Evolving Enhancer 2 (OEE2) (spot 10).

Al contrario, La Rubisco (spot 22) diminuisce durante i primi giorni di trattamento. Le proteine LCHII dal complesso monometrico del PSII (spot 15 e 17), il core monometrico del PSII meno CP43 (spot 19) e i trimeri delle LHCII (spot 20), le LHCI e il PSI(RCI+LHCI) (spot 25 e 26) e il PsaA/PsaB (spot 8) dai supercomplessi del PSI diminuiscono durante i primi giorni di trattamento.

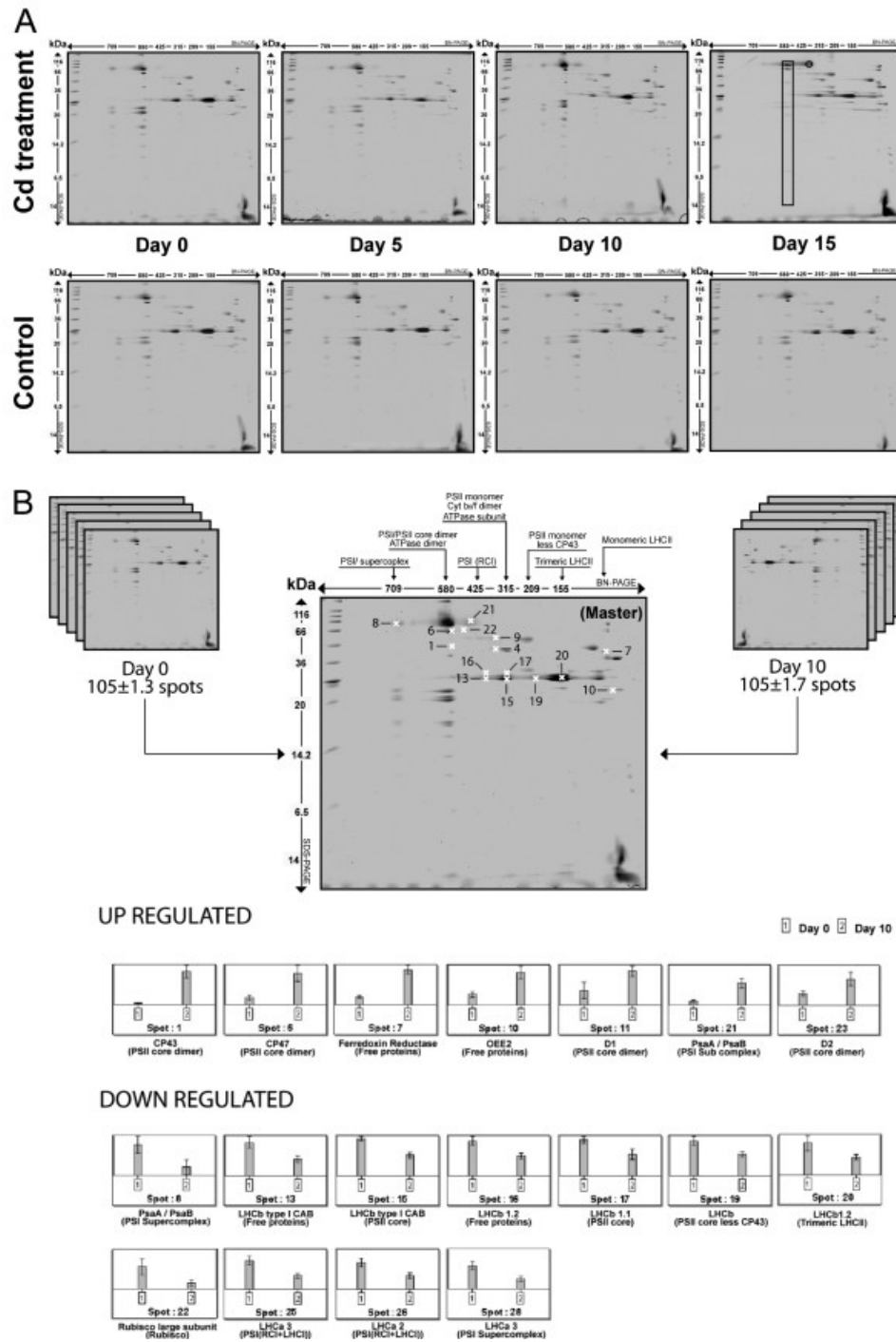


Figura 11. (A) Mappe 2D BN-SDS-PAGE delle proteine della membrana tilacoidale estratte sia da foglie controllo che da foglie basali trattate con Cd a 0, 5, 10 e 15 giorni. Il riquadro B mostra la “master map” creata dalla comparazione delle mappe a 0 e 10 giorni (5 replicati ogni campione). Questa analisi è stata effettuata con il software Progenesis SameSpot ver. 2.0 (Nonlinear Dynamics). I numeri mostrati si riferiscono alle proteine identificate tramite spettrometria di massa e riportate in tabella 2. Sono riportati anche la media del numero degli spot $\pm$ la deviazione standard. I gel sono stati colorati con il Coomassie blue colloidale. Proteine totali caricate: 100 μ g. La parte bassa del riquadro B mostra gli istogrammi riferiti ai 18 spot che sono stati trovati differenzialmente espressi.

Tabella 2. Proteine identificate nelle mappe in 2D BN-SDS-PAGE

Subunit name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
	m/z	charge state	start-end	sequence	
major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.30 663.39 528.35	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR ELEVIHCR	gi 133917261
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.36 492.3430	2+ 2+	44 - 56 125 - 132	TVQSSSPWYGPDR. FGEAVWFK	gi 115780
Lhcb2 protein [Arabidopsis thaliana]	544.74 418.31 491.82 492.24	3+ 3+ 2+ 2+	43 - 56 94 - 103 96 - 103 125 - 132	STPQSIWYGPDRPK NRELEVIHSR ELEVIHSR FGEAVWFK	gi 4741944
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.36 492.35	2+ 2+	44 - 56 127 - 134	TVQSSSPWYGPDR. FGEAVWFK	gi 115780
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.4790 824.9880 663.4110 960.6770 983.6650 492.3680	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	44 - 56 44 - 58 96 - 105 98 - 105 106 - 122 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NVSSGSPWYGPDRVK NRELEVIHCR ELEVIHCRGlu->pyro-Glu (N-term E) WAMLGALGCVFPELLARoxidation (M) FGEAVWFK	gi 133917261
major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.1 [Spinacia oleracea]	711.30 663.39 528.35 492.24	2+ 2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134 98 - 105	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR ELEVIHCR FGEAVWFK	gi 133917263
light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein [Prunus Persica]	711.49 825.00 627.06 492.37	2+ 2+ 2+ 2+	44 - 56 44 - 58 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NVSSGSPWYGPDRVK NRELEVIHSR FGEAVWFK	gi 556367
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.44 663.51 492.37	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	TVQSSSPWYGPDR NRELEVIHCR FGEAVWFK	gi 115780
photosystem II 44 kDa protein (CP43)	713.92 740.88 491.81 902.53	2+ 2+ 2+ 3+	324 - 339 344 - 357 363 - 370 458 - 473	LGANVGSAQGPTGLGK SPTGEVIFGGGETMR APWLEPLR GIDRDFEPVLSMTPLN	gi 7525029

CP47 [Spinacia oleracea]	656.34 723.95 729.36 751.80 352.69 724.45 645.93	3+ 3+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+	290 - 307 330 - 350 361 - 381 362 - 381 362 - 381 382 - 387 426 - 437	RVSAGLAENQSFSEAWSK AGSMDNGDGLAVGWLGHPIFR RMPTFFETFPVVVLIDGDGIVR MPTFFETFPVVVLIDGDGIVR ADVPFR RAQLGEIFELDR AQLGEIFELDR	gi 1420852
Chain A, Refined Crystal Structure Of Spinach Ferredoxin Reductase At 1.7 Angstroms Resolution: Oxidized, Reduced, And 2'-Phospho-5'-Amp Bound States	737.53 915.50 807.98 669.52 947.52 690.48	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	1 - 15 1 - 18 94 - 109 118 - 129 130 - 146 265 - 275	QIASDVEAPPAPAK QIASDVEAPPAPAKVEKGln->pyro-Glu (N-term Q) LYSIASSALGDFGDAK LIYTNDAGETIK GVCSNFLCDLKPGEVVK DNTYVVMCGLK	gi 157831108
Photosystem I P700 Apoprotein A1 [Nicotiana glauca]	393.46 528.00 493.52 517.01 455.15	2+ 2+ 3+ 2+ 2+	5 - 11 12 - 20 233 - 244 269 - 276 420 - 426	SPEPEVK ILVDRDPVK EIPLPHEFILNR YADFLTR YNDLLDR	gi 225198
Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2) (23 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 23 kDa subunit) (23 kDa thylakoid membrane protein) [Spinacia oleracea]	795.48 899.05 680.46	3+ 2+ 2+	130 - 150 216 - 233 255 - 267	YEDNFDATSNLSVLVQPTDKK TADGDEGGKHQVIAATVK KFVESATSSFSVA	gi 131392
major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.30 663.39 528.35	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR ELEVIHCR	gi 133917261
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.44 663.51 492.37	2+ 2+ 2+	44 - 56 96 - 105 127 - 134	TVQSSSPWYGPDR NRELEVIHCR FGEAVWFK	gi 115780
Photosystem Q(B) protein (32 kDa thylakoid membrane protein) (Photosystem II protein D1)	714.35 730.06 730.18 657.87 429.19	2+ 3+ 2+ 2+ 3+	17 - 27 239 - 257 258 - 269 313 - 323 324 - 334	FCDWITSTENR FGQEEETYNIVAAHGYFGR LIFQYASFNNR VINTWADIINR ANLGMEVMHER.N Oxidation (M)	gi 1709829

RCA (RUBISCO ACTIVASE) [Arabidopsis thaliana]	710.95 511.36 489.59 456.27 369.25 631.33 481.80 605.05 456.79 478.69 607.42 614.94 773.98 927.54	2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	22 - 32 33 - 41 147 - 159 188 - 194 195 - 201 218 - 227 228 - 236 237 - 252 296 - 303 320 - 334 335 - 350 436 - 446 451 - 463 464 - 479	LNYYTPPEYETK DTDILAAFR TFQGPPHGIQVER AVYECLR GGLDFTK FLFCAEAIYK SQAETGEIK GHYLNATAGTCEEMMK Oxidation (M) AMHAVIDR LSGGDHVHAGTVVGK LEGDRESTLGFDLLR DLAVEGNEIR WSPELAAACEVWK EITFNFTIDKLDGQD	gi 18405145
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 (Psa- B) (PSI-B)	660.45 493.09 425.79 838.97 693.97 716.54 737.93 449.54		8 - 19 8 - 20 303 - 314 397 - 410 452 - 469 470 - 490 552 - 564 685 - 692	FSQGLAQDPTRR FSQGLAQDPTRR DLLEAHIPPGR DYNPEQNEDNVLAR QILIEPIFAQWISAHGK TSYGFDVLLSSTSGPAFNAGR DFGYSFPCDGPGR	gi 131149
Photosystem I light- harvesting chlorophyll a/b binding protein	711.49 825.00 627.06 492.37	2+ 2+ 2+ 2+	44 - 56 44 - 58 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPD NVSSGSPWYGPDVK NRELEVIHSR FGEAVWFK	gi 483723
PSI type III chlorophyll a/b- binding protein [Arabidopsis thaliana]	646.41 815.62 823.55 490.39	2+ 2+ 2+ 2+	95 - 105 106 - 122 171 - 182 183 - 190	WLAYGEIINGR FAMLGAAGAIPEILGK LQDWYNPGSMGK Oxidation (M) QYFLGLEK Gln->pyro-Glu (N-term Q)	gi 430947
Photosystem II D2 protein (Photosystem Q(A) protein) (PSII D2 protein)	613.80 774.46	2+ 2+	296 - 305 306 - 318	AYDFVSQEIR AAEDPEFETFYTK	gi 131296

* Spot number represents the number on the master gel in figure 1.

** Score from search engine Mascot based on Ions score which is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 72 are significant ($p < 0.05$).

*** Accession number of the corresponding protein in the NCBI database.

**** Function/protein name of protein obtained via the Mascot software.

2.3 Separazione cromatografica delle membrane tilacoidali

Poiché le proteine antenna appaiono essere tra le più influenzate dal trattamento con il Cd, è stata utilizzata la tecnica di cromatografia liquida, la quale permette una migliore analisi qualitativa e quantitativa delle antenne rispetto alla 2D elettroforesi (Zolla *et al.*, 2002; Zolla *et al.*, 2003; Zolla *et al.*, 2004). Quindi le membrane tilacoidali estratte dalle foglie basali dopo 0, 5, 10 e 15 giorni di trattamento con il Cd sono state caricate su un gradiente di saccarosio e separate nei vari sub-complessi. Sono state ottenute 5 frazioni verdi dai campioni a 5 e a 10 giorni di trattamento, mentre solo 3 bande dal campione a 15 giorni (figura 12A). Dopo 5 giorni di trattamento la prima banda (B1), contenente i monomeri del PSII (Timperio *et al.*, 2007), ha mostrato una densità di colore simile al controllo. La seconda banda (B2), corrispondente ai trimeri delle LHCII, è più leggera nel campione trattato rispetto al controllo, confermando l'indicazione della 1D del BN gel che la trimerizzazione delle antenne veniva diminuita dal Cd. La terza banda (B3), contenente il core del PSII, sembra non essere apparentemente affetta dopo 5 giorni di trattamento, mentre le bande B4 e B5, entrambe contenenti PSI-Lcha sono fortemente ridotte nel campione trattato. Dopo 15 giorni di trattamento, queste due bande scompaiono completamente, unendosi in una nuova banda (indicata con l'asterisco nella Figura 12A), con un minor peso molecolare. Il colore più intenso di questa nuova banda suggerisce la formazione di un nuovo sub-complesso nelle foglie trattate con il Cd, in accordo con la 1D-BN PAGE che ha mostrato una crescente intensità di volume della banda a 425 kDa, la quale sembrerebbe corrispondere ad un "incompleto" core del PSI. Una volta digerita con tripsina, tale banda ha prodotto un così ridotto numero di peptidi, corroborando l'ipotesi che nella struttura della proteina soggetta a trattamento con Cd sono presenti aminoacidi modificati nella catena polipeptidica del PsaA/PsaB nelle foglie trattate.

Ogni banda presente nel gradiente di saccarosio è stata raccolta e analizzata tramite RP-HPLC. L'identificazione delle proteine è stata effettuata, comparando i pesi molecolari misurati con quelli dedotti dalle sequenze di DNA nei campioni controllo e trattato come fatto in precedenza (Zolla *et al.*, 2004; Whitelegge *et al.*, 2006).

B1 e B2 sono state unite insieme in quanto in questa maniera esse rappresentano il totale delle antenne del PSII. Dopo 5 giorni di trattamento, gli isomeri Lhcb1.1 vengono completamente distrutti mentre le altre forme isomeriche del Lhcb1, Lhcb2 e Lhcb3 vengono solo debolmente colpite (figura 12B).

Il cromatogramma delle bande B4 e B5 (unite insieme e rappresentanti il complesso totale del PSI) hanno mostrato che tutte le antenne del PSI vengono distrutte dopo 5 giorni di

trattamento, mentre i componenti PsaA e PsaB aumentano nel tempo (figura 12C). Questo risultato conferma i dati elettroforetici che mostravano un accumulo di un “incompleto” PSI nelle foglie con Cd, come conseguenza della distruzione dei supercomplessi.

La separazione cromatografica è stata anche effettuata nelle foglie del trattamento di “recovery”. Subito dopo la rimozione del Cd, è stata osservata un re-sintesi delle antenne Lhcb 1.1 già dopo tre giorni di “recovery”, ma il loro quantitativo aumenta significativamente dopo l’aggiunta di ioni Zn nella soluzione Hoagland (figura 12D). Questo dato suggerisce che, al contrario di quanto osservato nella sintesi della Chl, l’espressione del gene *Lhcb1.1* è fortemente influenzata dalla presenza degli ioni Zn.

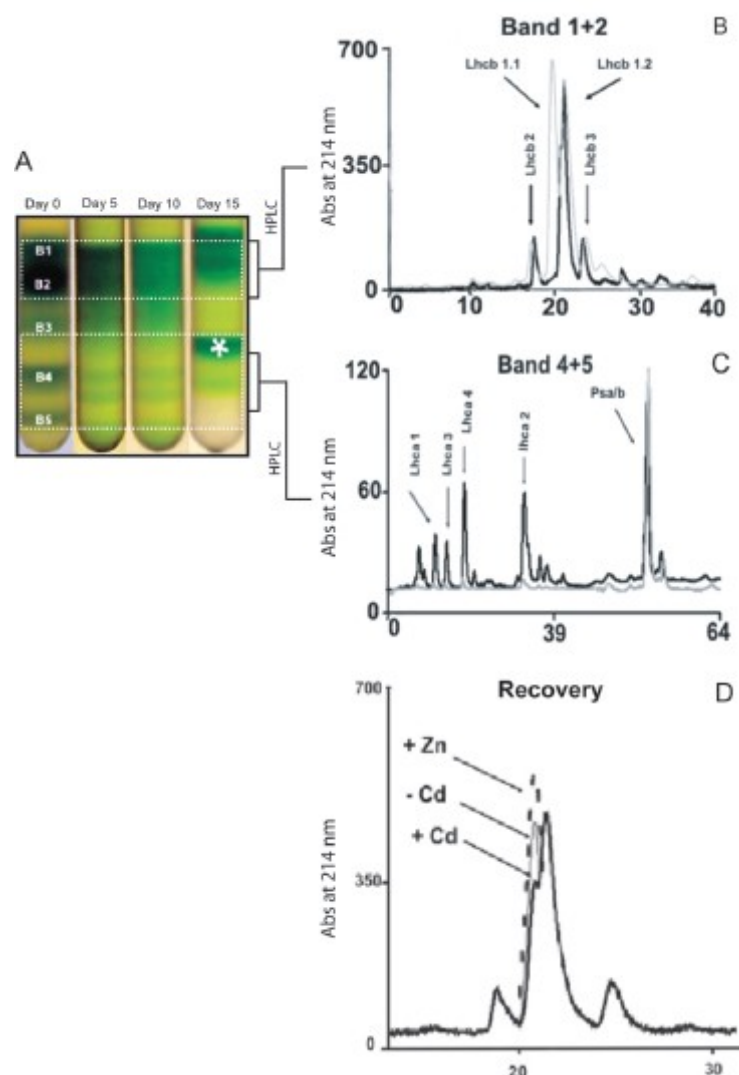


Figura 12. Separazione tramite gradiente di saccarosio dei multi complessi tilacoidali in 5 differenti frazioni (B1-B5) nel controllo (0 giorni) e nelle foglie basali trattate con il Cd (5, 10 e 15 giorni) (A). l’asterisco indica una nuova banda comparsa in 15^a giornata di stress. Nella figura B e C sono presenti le analisi HPLC di ogni sub-complesso dei tilacoidi nelle foglie dopo 0 giorni (linea nera) e dopo 5 giorni di trattamento (linea grigia). La figura D riporta la re-sintesi delle Lhcb 1.1 dopo rimozione del Cd²⁺ e dopo addizione di Zn²⁺.

2.4 Livelli di espressione dei geni *Lhcb1*

E' stato misurato l'accumulo di trascritti del gene *Lhcb 1.1* durante un prolungato e continuo trattamento con il Cd tramite Real Time PCR, usando RNA purificato dalle foglie basali esposte a differenti periodi di trattamento con il Cd. Per discriminare le isoforme *Lhcb1.1*, sono stati codificati specifici primers (Rea *et al.*, 2007) impiegando alcune differenze presenti nella sequenza codificata. La specificità di ogni primer è stata testata tramite amplificazione PCR sul corrispondente clone cDNA *Lhcb1*. I risultati dell'esperimento di RT PCR sono mostrati in figura 13. Il trattamento con il Cd ha causato un chiaro ed evidente decremento nel tempo nell'accumulo di trascritti del mRNA del *Lhcb1.1*. tale effetto è risultato particolarmente drammatico durante i primi 10 giorni di trattamento, come mostrato dall'inclinazione della curva di decadimento dell'accumulo dei trascritti mostrato in figura 13. L'effetto negativo del Cd è stato parzialmente e molto rapidamente recuperato già dopo 3 giorni dopo la rimozione del Cd dalle piante cresciute per 30 giorni in presenza del metallo pesante. Il "recovery" è risultato essere significativamente più veloce quando la concentrazione degli ioni Zn è stata aumentata nella soluzione Hoagland, indicando un ruolo determinante di tale metallo nell'espressione del gene *Lhcb1.1*.

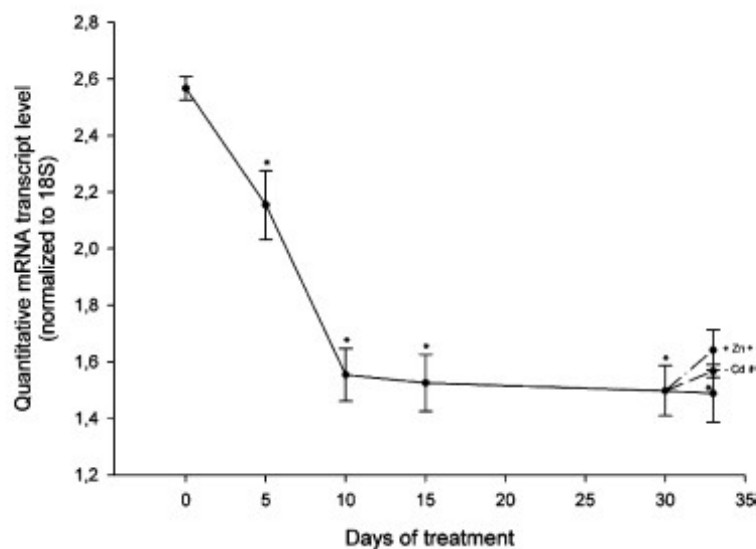


Figura 13. Analisi quantitativa dei livelli dei trascritti mRNA di una isoforma (*Lhcb 1.1*) del gene delle "light harvesting complex" delle piante di spinacio dopo trattamento con Cd per 5, 10, 15, 30 e 33 giorni. *($P < 0.01$) differenza significativa dal valore a 0 giorni. Sono mostrati i livelli dei trascritti dopo rimozione del Cd e dopo aggiunta dello Zn. # ($P < 0.05$, riferito a valore Cd free) differenza significativa dal valore a 33 giorni di trattamento, + ($P < 0.001$, riferito al valore ottenuto dalle piante con Zn) differenza significativa dal valore a 33 giorni di trattamento. Test ANOVA ad una variabile.

2.5 Spettroscopia ESR

Per studiare come il Cd influenzi la catena di trasporto degli elettroni, le membrane tilacoidali (prese da campione controllo e sia da foglie basali e apicali dopo 30 giorni di stress) sono state sottoposte a continua e intensa illuminazione a temperatura ambiente e successivamente sono stati registrati gli spettri ESR. Dapprima è stato monitorato il segnale della TyrD⁺, ma non è stata rilevata nessuna significativa differenza nella forma dello spettro tra i vari campioni. Al contrario, sono state ottenute delle informazioni interessanti seguendo la cinetica di formazione del TyrD⁺. In questo esperimento, l'intensità del picco del TyrD⁺ è stata monitorata continuamente permettendo una precisa determinazione della reazione cinetica di formazione (Figura 14). E' stato possibile osservare che il segnale TyrD⁺ raggiunge un culmine entro pochi secondi dall'inizio dell'illuminazione; questo tipo di cinetica è molto comune per i radicali liberi presenti in soluzione e normalmente coinvolgono due radicali. Sorprendentemente, una volta che il campione non veniva più illuminato, il segnale del radicale TyrD⁺ comincia a scomparire ma con una velocità differente a seconda del campione analizzato. In particolare, è stato osservato un veloce decadimento nelle foglie basali trattate con il Cd, mentre il controllo e le foglie apicali hanno mostrato un simile andamento. Quindi, il trattamento con il Cd sembra influenzare la velocità di riduzione del TyrD⁺ solo nelle foglie basali trattate.

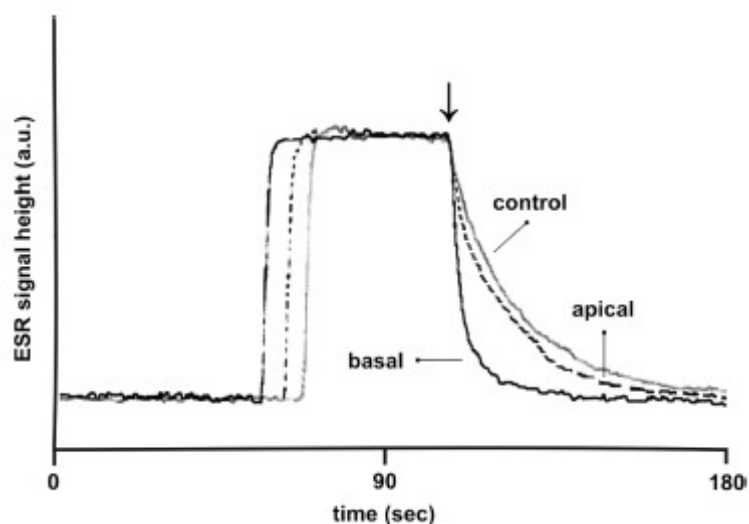


Figura 14. Cinetica della formazione del radicale TyrD⁺ dopo illuminazione dei tilacoidi estratti da foglie trattate a 30 giorni. La cinetica del radicale TyrD⁺ è stata misurata monitorando il segnale ESR a 3465 G e con un'intensità di luce pari a 3300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luce veniva spenta al punto indicato dalla freccia.

2.6 Discussione

L'analisi dei pigmenti rileva una marcata inibizione della sintesi della clorofilla soltanto nelle foglie basali. È stato suggerito che clorosi indotta dal Cd potrebbe indicare un impedimento dell'inserzione del Mg^{2+} nel protoporfirogeno (Gillet *et al.*, 2006), o la diretta distruzione della Chl come conseguenza della sostituzione dello ione Mg^{2+} in entrambe le clorofilla (Küpper *et al.*, 1998). Nelle varie analisi, le foglie basali delle piante trattate con Cd hanno mostrato una chiara e molto rapida inibizione della Chl *a*, seguita da una meno evidente inibizione della Chl *b*. Molto probabilmente la ridotta assunzione di Fe attraverso le radici dovuta al Cd potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella clorosi osservata. Comunque, una nostra precedente indagine sulle piante di spinacio Fe deficienti (Timperio *et al.*, 2007) ha mostrato che la Chl *b* diminuisce prevalentemente durante i primi 10 giorni di stress, contrariamente a quanto osservato nel trattamento con il Cd, suggerendo che l'inibizione dell'assunzione di Fe attraverso le radici gioca un ruolo minore e che un meccanismo diverso sia coinvolto nello stress. È stato anche proposto che la riduzione della Chl potrebbe essere causata da una diretta interferenza del Cd con gli enzimi coinvolti nella biosintesi della Chl o da un'interferenza del Cd con un corretto assemblamento dei complessi proteina-pigmento dei due fotosistemi (Szalontai *et al.*, 1999; Barylak *et al.*, 2001). Per questa ultima ipotesi l'effetto dovrebbe essere reversibile. Dopo la rimozione del Cd, infatti, è stata osservata una rapida re-sintesi di entrambe le clorofilla, indicando che l'inibizione della sintesi della clorofilla è un processo reversibile. Lo Zn potrebbe ulteriormente alleviare la tossicità indotta dal Cd (Aravind e Prasad, 2004), ma nel caso specifico del danneggiamento della Chl, è stato trovato che il "recovery" è indipendente dalla presenza dello Zn. Questo è in accordo con l'ipotesi che l'effetto del Cd sulla biosintesi della Chl potrebbe avvenire attraverso l'inibizione della fotoreduzione della quale contiene cluster Fe-S (Nomata *et al.*, 2008).

È ben noto che il Cd causa l'inibizione della Fe(III) reduttasi nelle radici, la quale porta a una diminuzione del contenuto di Fe nei germogli (Fodor *et al.*, 2005), quindi ci si potrebbe aspettare una produzione di zeozantina anche a $300 \mu E m^{-2}s^{-1}$, in modo simile a quanto osservato nelle piante di spinacio cresciute in Fe deficienza (Timperio *et al.*, 2007). Contrariamente alle attese, non è stato possibile osservare nessuna formazione di zeozantina né di anterozantina durante lo stress da Cd, in accordo a quanto osservato da altri autori (Grzyb *et al.*, 2004; Latoski *et al.*, 2005) che una ridotta attività della ferredossina dovuta al Cd causa l'inibizione della formazione della zeozantina. Il meccanismo molecolare è stato attribuito all'interazione del Cd con i residui della cisteina localizzati nel "motif I" della Ferredossina NADP reduttasi (FNR). La ferredossina trattata

con il Cd nello spinacio ha mostrato una sostituzione del Fe con il Cd nel cluster Fe-S (Iametti *et al.*, 1996).

La nostra indagine proteomica ha mostrato una sovra-espressione della Ferrodossina nelle foglie basali, come una possibile reazione della pianta ad una ridotta attività dell'enzima. È stato osservato, inoltre, un notevole aumento della luteina specialmente dopo 15 giorni di trattamento. La sovrapproduzione di luteina potrebbe indicare un tentativo della pianta di attivare un meccanismo di difesa contro i ROS che verosimilmente si accumulano per una ridotta attività foto sintetica nel tempo (Iannelli *et al.*, 2002; Pietrini *et al.*, 2003). Anche se non sono state effettuate misure dei ROS nelle foglie basali trattate con il Cd, ma è ben noto che i ROS sono notevolmente prodotti durante lo stress da Cd (Watanabe *et al.*, 2003; Smeets *et al.*, 2005). I ROS causano un'ossidazione degli aminoacidi. In particolare, è stata osservata un'ossidazione dell'arginina e della lisina nella semialdeide glutammica e nella 2-amino-adipic-semialdeide (Requena *et al.*, 2001), la quale potrebbe dare dei crosslink reagendo con gli altri residui della lisina, cisteina e istidina (Davies, 2003). Quindi non c'è stato da sorprendersi di una ridotta produzione di peptidi nella digestione triptica osservata durante i nostri esperimenti. A tal riguardo, si potrebbe ipotizzare che una sovrapproduzione della luteina nelle foglie trattate con il Cd potrebbe rappresentare un meccanismo di difesa delle piante contro una produzione dei ROS.

2.6.1 L'analisi proteomica rivela un'elevata sensibilità del PSI al Cd e solo effetti minori sul PSII

La figura 15 ottenuta dalla combinazione dei dati di prima e seconda dimensione del BN, mostra una rappresentazione schematica dei cambiamenti dei complessi fotosintetici osservati nelle foglie basali durante lo stress da Cd. La quantità di citocromo b_6f e di ATP sintasi non cambiano durante i 15 giorni di trattamento, suggerendo che solo i multi complessi contenenti Chl sono sensibili al Cd. È stato possibile osservare, inoltre, che il Cd riduce drasticamente la quantità di PSI già nei primi giorni di trattamento: entrambi i complessi monomerici e multimerici del PSI scompaiono dopo 15 giorni di esposizione al Cd. Un "incompleto" complesso multi proteico del PSI aumenta nel tempo, evidenziando un processo degenerativo del PSI. Contrariamente a quanto osservato in *Synechocystis* PCC 6803 (Tumová e Sofrová, 2002), dove il PSI non è influenzato dal Cd, indicando un differente meccanismo di risposta al Cd nelle piante e nelle alghe. Nei nostri esperimenti cromatografici e elettroforetici hanno rilevato che le Lhca diminuiscono significativamente già all'inizio del trattamento e scompaiono entro 10-15 giorni di stress al Cd, in

contemporanea ad un accumulo di un “incompleto” PSI contenente PsaA e PsaB con aminoacidi modificati, molto probabilmente dovuto alla produzione di ROS (Lemaire *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2003). Si potrebbe pensare che una prematura riduzione delle antenne del PSI riflette una riduzione della Chl *a* nelle foglie basali, poiché le antenne del PSI contengono principalmente questo tipo di Chl (Jansson *et al.*, 1996). Quindi la riduzione di Chl *a* e del PSI potrebbero ridurre la catena di trasporto di elettroni nel PSI. Di conseguenza, l’elevata produzione di ROS potrebbe essere prodotta da un flusso alternativo di elettroni, come una diretta foto riduzione dell’ossigeno, la quale distrugge le antenne Lhca e attacca il core del PSI.

Apparentemente il PSII viene danneggiato in modo minore durante i primi 10 giorni. Infatti, come osservato in figura 14, la quantità di PSII cambia in risposta ad una riduzione del PSI. In particolare, la quantità del dimero del PSII aumenta nei primi 10 giorni, diminuendo poi durante i seguenti 5 giorni di stress. Anche il complesso del “PSII meno la proteina CP43” aumenta, probabilmente come conseguenza di una riduzione del core del dimero del PSII. Molto probabilmente le fluttuazioni del dimero del core del PSII sono una risposta fisiologica della pianta alla disattivazione del complesso del PSI. Comunque la forma monomerica del PSII rimane costante, contrariamente alle forme trimeriche delle LHCII le quali diminuiscono.

L’analisi cromatografica delle antenne del PSII ha mostrato una specifica riduzione delle Lhcb 1.1 già nei primi giorni di trattamento, mentre le altre componenti delle Lhcb rimangono costanti. La rapida “re-sintesi” dell’mRNA del *Lhcb1.1*, così come una rapida re-sintesi delle antenne Lhcb 1.1, subito dopo l’aggiunta di ioni Zn indicano che uno specifico fattore di trascrizione contenente Zn potrebbe essere coinvolto nell’espressione del gene *Lhcb 1.1*, e che il Cd, inseritosi al posto dello Zn, potrebbe influenzare tale proteina.

Comunque, durante lo stress da Cd, oltre ad un riarrangiamento dei complessi, è stato possibile osservare una sovra-espressione di singole proteine come la Ferrodossina (discussa in precedenza) e l’oxygen evolving complex (OEC) 23 kDa. Riguardo questa ultima proteina, è ben noto che il Cd potrebbe scambiarsi con un’alta affinità per il cofattore Ca^{2+} nel cluster Ca/Mn che costituisce l’oxygen evolving complex (Sigfridsson *et al.*, 2004). La subunità 23 kDa di tale proteina è nota permettere al PSII di produrre ossigeno durante carenza di Ca (Styring e Rutherford, 1987), suggerendo che questo polipeptide agisce come concentratore di tali ioni. La sostituzione dell’“essenziale” Ca con un “non funzionale” Cd potrebbe promuovere una sua sovra-espressione come qui

riportato. In linea con la perturbazione dell'attività del OEC, l'analisi ESR ha mostrato una maggiore velocità di decadimento del tempo di emivita del radicale TyrD⁺ nelle foglie basali trattate rispetto al controllo e alle foglie apicali. Infatti, il radicale TyrD⁺ è pensato ossidare il Mn attraverso un disturbo dell'equilibrio di trasferimento di elettroni tra i vari cofattori: per esempio TyrZ e ChlP. Di conseguenza una veloce perdita del segnale Y⁺D potrebbe influenzare il trasferimento di elettroni tra Y⁺D e il complesso del Mn (S⁰YD⁺ → S¹YD) (Styring e Rutherford, 1987).

Nel caso della Ferrodossina NADP reduttasi, la sua sovra-espressione potrebbe essere necessaria per sostenere la produzione di ATP, NADH e NADPH per essere usati nella sintesi di 2-oxoglutarato e fosfoglicerato, nella sintesi di aminoacidi coinvolti nella produzione di fitochelatine (Sarry *et al.*, 2006).

È stata osservata dall'analisi proteomica, inoltre, una forte influenza del Cd sui livelli della Rubisco. In *Clamydomonas*, l'effetto più marcato del Cd è la ridotta presenza sia della subunità piccola sia quella grande della Rubisco, in correlazione con altri enzimi coinvolti nella fotosintesi (Gillet *et al.*, 2006). Negli sferoplasti dei cianobatteri trattati con Cd, l'attività della Rubisco diminuisce fino al 40% del controllo (Sas *et al.*, 2006) e nei cloroplasti di Spinacio diminuisce fino al 2.5% del controllo, indicando che il Cd produce severi danneggiamenti alla Rubisco anche nelle piante. Infatti è stato suggerito che il Cd potrebbe legarsi irreversibilmente ai gruppi SH degli enzimi, abbassandone l'attività "in vivo" (Stiborova, 1998). Recentemente nei cianobatteri è stato riportato che il Cd potrebbe inattivare differenti enzimi contenenti metallo, compreso l'anidrasi carbonica, sostituendosi allo Zn, il quale potrebbe spiegare una rapida e quasi completa inibizione dell'attività fotosintetica di tali organismi (Dall'Osto *et al.*, 2006).

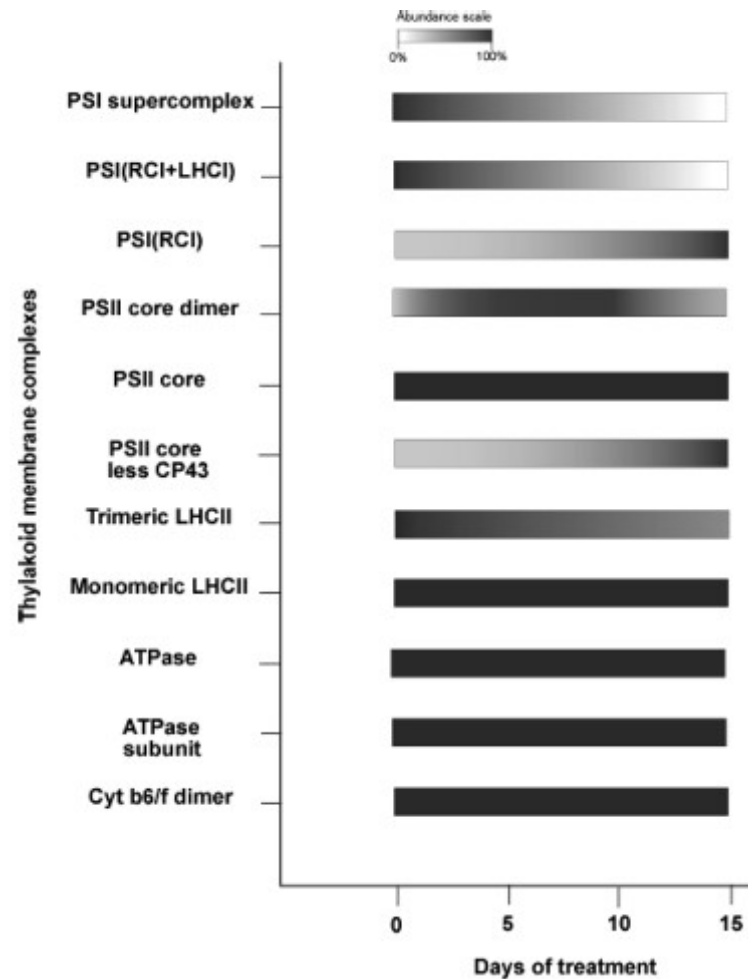


Figura 15. Rappresentazione semiquantitativa dei cambiamenti dei MPCs osservati nelle foglie basali di spinacio. Il diagramma è stato estrapolato dalla combinazione del 1D BN-PAGE e 2D BN-SDS-PAGE. La scala di grigi indica la variazione dei complessi relativamente allo stress da 0 % (bianco) a 100 % (nero).

2.6.2 Patterns generali della tossicità del Cd nell'apparato foto sintetico e meccanismi di difesa

Durante il trattamento con Cd, i complessi non contenenti Chl non sono influenzati, indicando che la riduzione di Chl è il maggiore effetto di tale stress. La riduzione specifica della Chl *a* induce una progressiva riduzione delle antenne del PSI, con conseguente scomparsa dei principali complessi multi proteici. Non è stata osservata nessuna inibizione di specifiche proteine del PSII, oltre ad un leggero aumento del dimero del core del PSII e un significativo accumulo della forma monomerica meno CP43 tra il nono e il quindicesimo giorno di stress (vedi figura 10B). Anche le antenne del PSII, le quali non sono state completamente inibite dal trattamento con il Cd, non sono state trovate riarrangiate, spostando l'equilibrio monomero-trimero, come precedentemente osservato nelle foglie Fe deficienti (Timperio *et al.*, 2007). Questo suggerisce che le piante non adottano con successo strategie alternative contro lo stress da Cd a livello proteico. Le foglie trattate inoltre sorprendentemente non sono in grado di produrre zeozantina, come rilevato nelle piante cresciute in Fe deficienza e come meccanismo di difesa migliore contro i ROS nelle foglie (Latoski *et al.*, 2005). La luteina è stata sovrapprodotta nelle foglie stressate, probabilmente a causa della sua specifica proprietà di catturare pericolosi radicali della Chl legandosi al sito L1 del complesso LHCII, prevenendo quindi la produzione dei ROS (Dall'Osto *et al.*, 2006). Comunque, la generale riduzione di proteine nelle foglie trattate sembra essere reversibile una volta che il trattamento con il Cd viene stoppato. Questa osservazione potrebbe supportare l'ipotesi che il Cd influenza l'apparato foto sintetico soltanto tramite la sostituzione a random di altri ioni come Zn, Fe o Ca all'interno dei vari gruppi prostetici di alcune proteine come visto in precedenza da altri lavori (Watanabe *et al.*, 2003; Grzyb *et al.*, 2004). Inoltre la chiara e veloce re-sintesi dell'mRNA del *Lhcb1.1* e conseguentemente dell'antenna Lhcb1.1 subito dopo la rimozione del Cd e l'aggiunta dello Zn, supporta ulteriormente l'ipotesi che lo Zn potrebbe essere sostituito dal Cd in alcuni fattori di trascrizione. A tal riguardo, è stato documentato che lo Zn può essere sostituito dal Cd nei complessi contenenti cisteine (Bandyopadhyay *et al.*, 1997; Paddock *et al.*, 1999) come osservato anche nei cianobatteri (Axerold *et al.*, 2000). Lo Zn, inoltre, sembra ridurre la tossicità del Cd sull'attività della Ferrodossina, suggerendo che lo Zn e il Cd si scambiano nei ligandi vicini al sito legante il chinone (Krupa, 1987).

In conclusione, si può riassumere che sulla base della nostra indagine l'azione tossica del Cd è principalmente aspecifica, probabilmente sostituendosi agli altri metalli presenti nelle

proteine (Watanabe *et al.*, 2003; Grzyb *et al.*, 2004; Küpper *et al.*, 1998) e nel tempo producendo ROS (Kieffer *et al.*, 2008).

Il Cd influenza significativamente ma reversibilmente l'apparato fotosintetico delle foglie basali, mentre nelle apicali, dove l'apparato foto sintetico non risulta essere danneggiato, provvede alla produzione dell'energia necessaria alla pianta per sopravvivere. Inoltre una sovrapproduzione di fitochelatine (PCs), la quale permette una chelazione intracellulare del Cd e la sua compartimentalizzazione nei vacuoli (Salt *et al.*, 2004), è stata registrata soltanto nelle foglie basali e non nelle foglie apicali. Questo limita la libera circolazione del Cd nelle foglie apicali e potrebbe rappresentare una strategia di detossificazione adottata dalle piante e un meccanismo generale di difesa che è anche impiegato per escludere altri anioni tossici come il Cl⁻ (Bongi e Loreto, 1989).

3. Risultati degli effetti del Cadmio sulla foglia

L'indagine è stata condotta utilizzando piante di spinacio ad un'età di venti giorni cresciute in coltura idroponica con una soluzione di nutrienti Hoagland. Queste piante sono state trattate con una soluzione 100 μM di CdCl_2 poiché quando le piante venivano esposte a concentrazioni di Cd più basse (20, 50, 75 μM), con le quali normalmente si hanno degli effetti in altre specie, in questo caso non mostravano effetti significativi. A questa età, le piante di spinacio hanno sei foglie più i due cotiledoni. Queste ultime mostrano clorosi già dopo i primi 4-5 giorni e muoiono dopo 9 giorni, mentre le prime foglie basali (foglie 1-2) mostrano una leggera clorosi dopo 6-7 giorni e muoiono dopo 25 giorni di trattamento. Le altre due foglie basali (foglie 3-4) dapprima mostrano clorosi dopo 10-12 giorni e sopravvivono oltre i 30 giorni di trattamento. Sorprendentemente, le due foglie apicali (foglie 5-6) non hanno mostrato alcuna clorosi per tutta la durata del trattamento, spinto fino a 40 giorni. Inoltre, nelle piante trattate la clorosi si manifesta partendo dalla punta della foglia e gradualmente si espande fino alla tutta la superficie (vedi Figura 7 A-B). Non ci sono sintomi visibili di necrosi a "pinpoint" vicino alla vena principale della foglia, come riportato per le foglie più giovani di pioppo (Kieffer *et al.*, 2008), ma ampie necrosi nella punta della foglia. La figura 7B mostra una pianta rappresentativa dopo 15 giorni di trattamento nella quale è possibile osservare che le foglie 1 e 2 sono secche, le foglie basali 3 e 4 sono visibilmente clorotiche, ma nessuna manifestazione di clorosi è stata osservata nelle foglie apicali, le quali appaiono più verdi di quelle del controllo anche dopo 30 giorni di trattamento (vedi Figura 7A). Inoltre un ulteriore effetto macroscopico osservato è stato che le piante che crescono in presenza di Cd hanno foglie più piccole rispetto al controllo (vedi Figura 7C), indicando che il Cd riduce significativamente la crescita della pianta e l'espansione della foglia.

I campioni sono stati presi da ogni coppia di foglie e sono le prime due paia di foglie basali (1-2 e 3-4) e le due apicali (5-6) che sono state analizzate separatamente dal punto di vista biochimico e dalla composizione proteica. Sono comparse due nuove piccole foglie (7-8) dopo 25 giorni di trattamento le quali non sono state utilizzate per l'analisi. In accordo con le osservazioni viste a livello macroscopico, il Cd non è stato rilevato nelle foglie apicali fino alla 42ª giornata di trattamento, dove è stato misurato ad una concentrazione di $0.21 \pm 0.01 \text{ nmol cm}^{-2}$. Al contrario, la concentrazione di Cd nelle foglie basali è compresa in un range tra 7.7 ± 0.1 (le prime due foglie basali) e 3.9 ± 0.1 (le seconde basali) nmol cm^{-2} dopo 10 giorni di trattamento, per poi aumentare nel tempo.

Le analisi HPLC sono state effettuate per determinare le concentrazioni di clorofilla e delle xantofille nelle foglie basali e apicali. La figura 16 mostra un cromatogramma comparativo dei pigmenti nelle foglie basali prima e dopo l'aggiunta di Cd (15 giorni di trattamento). L'inserto mostra le variazioni di Chl *a* e *b* in entrambi i tipi di foglia. In quelle apicali è stato osservato un leggero aumento rispetto al controllo (Figura 16A), mentre nelle foglie basali entrambe le clorofille diminuiscono già dopo i primi 5 giorni di stress e continuano a diminuire durante il corso dell'esperimento (Figura 16B). È evidente come la concentrazione totale della clorofilla *a* diminuisca significativamente e in modo più marcato rispetto alla clorofilla *b*, specialmente nei primi 10 giorni di stress. Per quanto riguarda le xantofille, invece, è stato osservato un differente andamento; nelle foglie basali alcuni pigmenti (luteina, neoxantina e violaxantina) aumentano nel corso del trattamento. L'effetto è particolarmente evidente per la luteina nelle foglie basali trattate con Cd per 15 giorni (vedi figura 16A), mentre nelle foglie apicali non ci sono cambiamenti significativi per quanto riguarda le xantofille (dati non presentati).

L'effetto del Cd sulla fotosintesi è stato confermato da analisi “*in vivo*” della fotosintesi tramite fluorescenza, ottenute saturando la concentrazione di CO₂ e in foglie adattate al buio (F_v/F_m). Le foglie basali hanno mostrato una significativa diminuzione dopo 10-15 giorni di trattamento (dati non presentati). Nelle foglie illuminate, il “quenching” fotochimico (qP), che indica la quantità di elettroni che effettivamente partecipano nel ciclo ossido riduttivo del carbonio della fotosintesi, raggiunge valori molto alti dopo 9 giorni di stress (dati non presentati). In accordo, le foglie apicali mostrano un leggero aumento nella fotosintesi per quanto riguarda il valore F_v/F_m così come è stata notata una leggera diminuzione nel “quenching” fotochimico (qP).

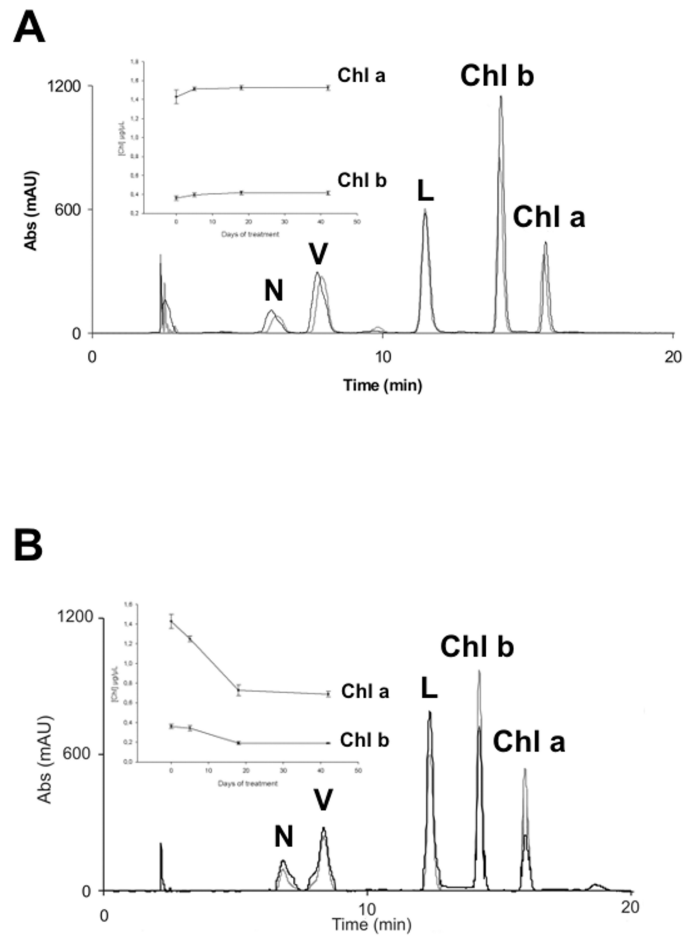


Figura 16. Cromatogrammi RP-HPLC dei pigmenti, dove vengono evidenziate la Luteina (L), Neoxantina (N), Violaxantina (V), Clorofilla b (Chl b) e Clorofilla a (Chl a). A. Cromatogrammi sovrapposti dei pigmenti estratti dalle foglie apicali dopo 0 giorni di trattamento (linea grigia) e dopo 18 giorni (linea nera) di trattamento con il Cd. B. Cromatogrammi sovrapposti dei pigmenti estratti dalle foglie basali dopo 0 giorni di trattamento (linea grigia) e dopo 18 giorni (linea nera) di trattamento con il Cd.

Gli inserti mostrano l'andamento della sintesi di clorofille presenti nelle foglie di Spinacio nel corso del trattamento con il Cd.

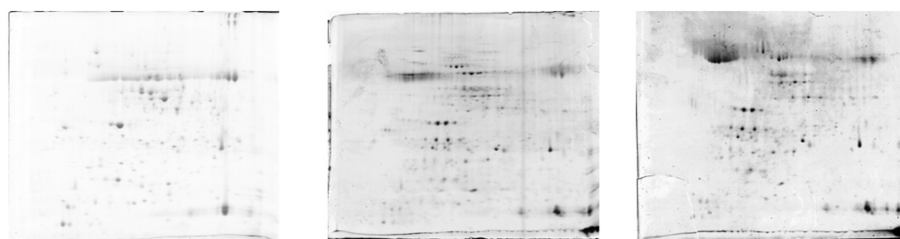
3.1 Analisi Proteomica

È stata utilizzata la tecnica elettroforetica 2D IEF-PAGE per paragonare il profilo proteico nelle foglie apicali e basali durante il corso del trattamento con il controllo. Le foglie apicali e basali sono state raccolte separatamente dalle piante a 0, 5 e 18 giorni di trattamento. Dieci foglie sono state selezionate da dieci differenti piante della stessa età, ma cresciute in periodi differenti in modo tale da considerare l'influenza di ogni qualsiasi variazione biologica. Alla stessa maniera, agli stessi giorni di crescita delle foglie apicali e basali sono state raccolte le foglie dalle piante controllo. Ogni stadio di sviluppo della foglia (sia in quelle trattate che in quelle controllo) è stato analizzato in 5 replicati.

3.2 Analisi proteomica delle foglie apicali

La figura 17A mostra i gel elettroforetici bidimensionali colorati con il Blue Silver delle proteine estratte dalle foglie apicali dopo 0, 5 e 18 giorni di trattamento con una soluzione 100 μM di CdCl_2 . La figura 17B mostra la “master map” ottenuta comparando le mappe a 0, 5 e 18 giorni di stress da Cd. È stato possibile osservare che sebbene il Cd non raggiunga le foglie apicali dopo 18 giorni, cambiamenti significativi sono stati osservati nel profilo proteomico. Non sono state osservate alcune proteine di nuova formazione, ma solo “up-regolate”. Le proteine contenute in ogni spot sono state identificate tramite digestione triptica e spettrometria di massa tandem. Tutte le proteine identificate con questa procedura sono elencate nella Tabella 3. La figura 18 mostra gli istogrammi degli spot modulati. I grafici sono stati ottenuti grazie all'utilizzo del software di analisi di immagine Progenesis SameSpot (Nonlinear Dynamics, New Castle, UK) e le relative identificazioni. È stato osservato come la maggior parte delle proteine differenzialmente espresse sono “up-regolate” e sono coinvolte nella fotosintesi, come le antenne del PSI e PSII, correlate con l'aumento della clorofilla osservato, ATP sintasi e NADH deidrogenasi. Anche le proteine coinvolte nel ciclo del carbonio e nella fissazione della CO_2 sono più abbondanti rispetto al controllo, come la Rubisco, l'anidrasi carbonica, la triosefosfato isomerasi e la fruttosio-bifosfato aldolasi. Infine anche le proteine coinvolte nella sintesi della Rubisco, come la caperonina cpn 21, e nella produzione di O_2 , come l'oxygen evolving complex 1 e 2, sono “up-regolate”.

A

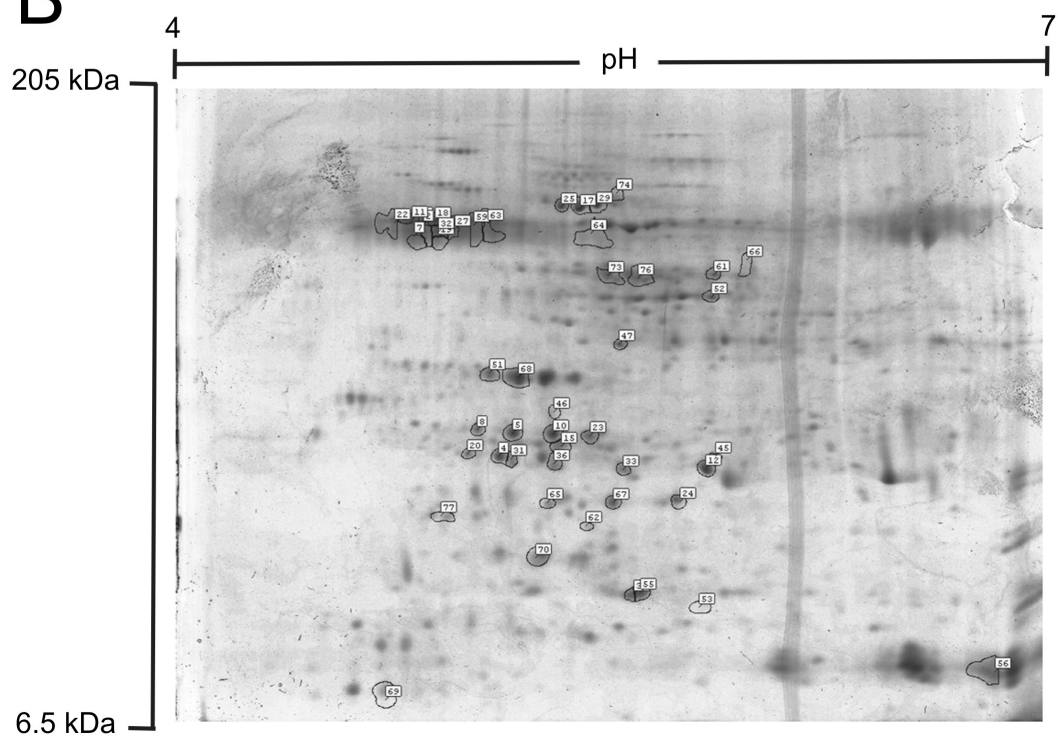


0 gg

5gg

18gg

B



Master map

Figura 17. Immagini dei gel 2D IEF SDS PAGE colorati con il colorante “Blue Silver”. A. Gel 2D IEF SDS PAGE delle foglie apicali dopo 0, 5 e 18 giorni di trattamento e relativa cinetica del trattamento. B. Immagine della “master map” che rappresenta il gel riassuntivo dopo l’analisi di immagine. Ogni spot differenzialmente espresso è indicato con il suo numero relativo.

Up Regulated

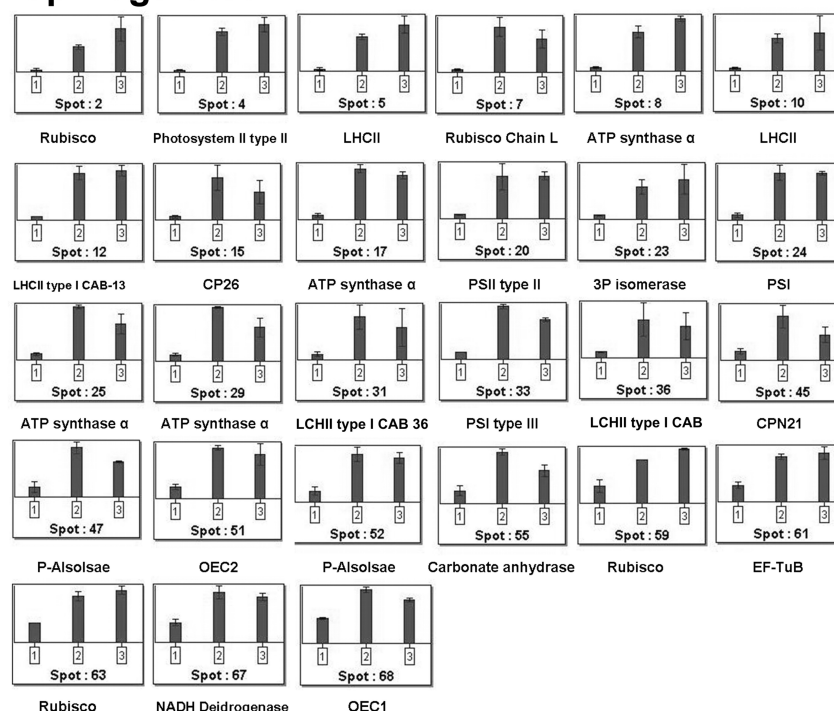


Figura 18. Istogrammi degli spot modulati dopo analisi di immagine dei gel 2D IEF SDS PAGE dell'estratto proteico totale delle foglie apicali. Ogni spot viene mostrato relativamente alla sua espressione durante il trattamento con il Cd. La casella 1 rappresenta lo spot presente nella mappa delle foglie apicale dopo 0 giorni di trattamento, la casella 2 e 3 sono inerenti agli spot presenti nelle varie mappe dopo 5 e 18 giorni di trattamento, rispettivamente.

Tabella 3 Lista delle proteine identificate tramite MS nelle foglie apicali trattate con il Cd

Carbohydrate metabolism

N° Spot*	Protein name**	Peptides identified by MS/MS				NCBI*** Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
2	ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Spinacia oleracea]	708.37 395.21 733.30 854.79 501.67 455.71 729.56 726.25 909.29 605.55 464.78 488.51 732.56 683.45 631.66 762.09 616.25 988.26 773.98 714.13 528.78	2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 3+ 3+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	135-146 140-146 147-159 147-161 165-177 188-194 195-213 202-213 228-252 237-252 296-303 320-334 320-334 320-339 340-350 340-358 440-450 447-463 451-463 464-475 467-475	LEDLRIPVAYVK IPVAYVK TFQGPPHGIQVER TFQGPPHGIQVERDK YGRPLLGCITKPK AVYECLR GGLDFTKDDENVNSQPFMR + Oxid.M DDENVNSQPFMR AQAEETGEIKGHYLNATAGTCEDMMK GHYLNATAGTCEDMMK AMHAVIDR Oxid.M LSGGDHIHSGTVVVGK LSGGDHIHSGTVVVGK LSGGDHIHSGTVVVGKLEGER DITLGFVDLLR DITLGFVDLLRDDYTEKDR DITLGFVDLLRDDYTEKDR EATKWSPELAAACEVWK WSPELAAACEV EIKFEFPAMDTV FEFPAMDTV	gi 11497536

7	Chain L, Activated Spinach Rubisco In Complex With The Product 3-Phosphoglycerate	726.33 473.89 605.68 652.36 456.82 732.47 762.13 659.43 773.93 722.16 536.74	2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 3+ 3+ 2+ 2+ 2+	202-213 228-236 237-252 237-253 296-303 320-334 340-358 447-463 451-463 464-475 467-475	DDENVNSQPFMR AQAETGEIK GHYLNATAGTCEDMMK + Oxid.M GHYLNATAGTCEDMMKR AMHAVIDR LSGGDHIHSGTVVGK DITLGFVDLLRDDYTEKDR EATKWSPELAAACEVWK WSPELAAACEVWK EIKFEFPAMDTV FEFPAMDTV	gi 2392029
23	Triosephosphate isomerase, chloroplast precursor (TIM) (Triose-phosphate isomerase)]	718.43 500.23 651.38 536.03	2+ 3+ 2+ 3+	138-151 167-179 206-215 242-256	GGAFTGEISVEQLK HVIGEQNEFIGKK TFDVCYQLK VASPDQAQEVHVAVR	gi 1351271
47	fructose-bisphosphate aldolase [Spinacia oleracea]	733.87 811.92 694.948 814.00 656.86 557.90 727.08 437.33 459.40	2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+	66-79 66-80 81-93 130-144 130-147 171-180 186-200 201-208 363-371	GILAMDESATCGK GILAMDESATCGKR LASIGLENTEANR MVDVLIEQGIVPGIK + Oxid.M MVDVLIEQGIVPGIKVDK + Oxid.M SAAYYQQGAR TVVSIPNGPSALAVK EAAWGLAR SNSLAQLGK	gi 22633
52	fructose-bisphosphate aldolase [Spinacia oleracea]	547.08 694.47 651.52 557.90 727.07 437.41 459.40	3+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+	66-80 81-93 130-147 171-180 186-200 201-208 363-371	GILAMDESATCGKR LASIGLENTEA MVDVLIEQGIVPGIKVDK SAAYYQQGAR TVVSIPNGPSALAVK EAAWGLAR SNSLAQLGK	gi 22633
55	unknown protein [Arabidopsis thaliana] Carbonate anhydrase	876.82	2+	240-256	VTVLGTSGLSGSYVEQR	gi 18401719
59	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Spinacia oleracea]	395.45 726.39 474.00 605.20 652.42 464.96 732.49 521.26 659.46 773.98 721.97 536.27	2+ 2+ 2+ 3+ 3+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+	140-146 202-213 228-236 237-252 237-253 296-303 320-334 351-358 447-463 451-463 464-475 467-475	IPVAYVK DDENVNSQPFMR AQAETGEIK GHYLNATAGTCEDMMK + Oxid.M GHYLNATAGTCEDMMKR AMHAVIDR Oxid.M LSGGDHIHSGTVVGK DDYTEKDR EATKWSPELAAACEVWK WSPELAAACEVWK EIKFEFPAMDTV + Oxid.M FEFPAMDTV	gi 1497536
63	Chain A, Activated Spinach Rubisco Complexed With 2-Carboxyarabinitol Bisphosphate	724.42 732.60 774.02 722.00	3+ 2+ 2+ 2+	195-213 320-334 451-463 464-475	GGLDFTEDDENVNSQPFMR LSGGDHIHSGTVV WSPELAAACEVWK EIKFEFPAMD	gi 1827835

Photosynthesis

N° Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
4	Os03g0592500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	534.78 626.73 491.65 954.37 461.08 492.13 549.89 803.68	2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 3+	41-54 92-101 94-101 102-118 119-130 123-130 174-185 186-208	SAPQSIWYGPDPRK NRELEVIHSR ELEVIHSR WAMLGALGCVFPEILSK + Oxid.M NGVKFGEAVW FGEAVWFK VGGGPLGEGLDK VYPGGAFDPLGLADDPDTFAE	gi 115453971
5	major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.55 663.44 519.34 492.46	2+ 2+ 2+ 2+	44-56 96-105 98-105 127-134	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR ELEVIHCR + Glu->pyro-Glu (N-term E) FGEAVWFK	gi 133917261
8	ATP synthase CF1 alpha subunit [Spinacia oleracea]	799.95 708.94 768.33 659.46 541.47 626.34	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	26-41 95-107 203-216 256-266 467-480 481-491	VVNTGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR ASSVAQVVTNFQER HTLIYDDLK TNKPEFQEISSTK TFTEAEALLK	gi 126022791
10	major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.31 663.31 519.20 960.81 492.13 1176.11 1036.67	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 3+	44-56 96-105 98-105 106-122 127-134 178-212 239-267	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR ELEVIHCR + Glu->pyro-Glu (N-term E) WAMLGALGCVFPELLAR + Oxid.M FGEAVWFK IAGGPLGEVVDPLYPGGSFDPLGLADD PEAFELK GPLENLADHLADPVNNNAWSFATNFV PGK	gi 133917261
12	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-13) (LHCP)	528.34 492.47	2+ 2+	97-104 126-133	KLEVIHCR FGEAVWFK	gi 115774
15	chloroplast pigment-binding protein CP26 [Nicotiana tabacum]	741.93 849.03 485.91	2+ 2+ 2+	142-154 155-170 219-227	FGADCGPEAVW TGALLLDGNTLNYFGK DPDQAAILK	gi 110377793
17	ATP synthase CF1 alpha subunit [Spinacia oleracea]	662.48 800.33 709.45 634.25 475.32 768.74 659.69 768.45 451.42 460.44 811.49 626.67 567.45	1+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	6-11 26-41 95-107 108-119 120-128 203-216 256-266 285-297 406-413 456-462 467-480 481-491 492-500	ADEISK VVNTGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR VINALAKPIDGR GEITASESR ASSVAQVVTNFQER HTLIYDDLK EAYPGDVVFLHSR ATQNQLAR KYLVELR TNKPEFQEISSTK TFTEAEALLK EAIQEQMER	gi 126022791
20	Os03g0592500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	534.72 626.87 491.85 691.80 492.26	2+ 2+ 2+ 2+ 2+	41-54 92-101 94-101 119-130 123-130	SAPQSIWYGPDPRK NRELEVIHSR ELEVIHSR NGVKFGEAVWFK FGEAVWFK	gi 115453971

24	photosystem I light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein [Nicotiana tabacum]	522.72 814.31 750.56 686.47 856.24	2+ 2+ 2+ 2+ 2+	86-93 166-180 167-180 168-180 168-183	ESELIHCR KKYPGGAFDPLGYSK KYPGGAFDPLGYSK YPGGAFDPLGYSK YPGGAFDPLGYSKDPK	gi 493723
25	ATP synthase CF1 alpha subunit [Spinacia oleracea]	518.92 376.22 800.16 709.16 634.06 733.21 475.37 805.72 753.81 768.37 439.91 768.30 396.68 811.65 626.28 567.31 424.68	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 3+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	15-22 17-22 26-41 95-107 108-119 108-128 120-128 141-162 142-162 203-216 256-266 285-297 457-462 467-480 481-491 492-500 501-507	ERIEGYNR IEGYNR VVNTGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR VINALAKPIDGR VINALAKPIDGRGEITASER GEITASER RSVYEPLQTGLIAIDAMIPVGR + Oxid.M SVYEPLQTGLIAIDAMIPVGR + Oxid.M ASSVAQVVTNFQER HTLIYDDLK EAYPGDVFYLHSR + Glu->pyro-Glu (N-term E) YLVELR TNKPEFQEISSTK TFTEAEALLK EAIQEQMER FLLQEQA	gi 126022791
29	ATP synthase CF1 alpha subunit [Spinacia oleracea]	662.44 376.38 800.32 709.10 633.99 475.38 768.52 659.57 768.47 387.40 451.54 811.51 626.40 575.40	1+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	6-11 17-22 26-41 95-107 108-119 120-128 203-216 256-266 285-297 367-374 406-413 467-480 481-491 492-500	ADEISK IEGYNR VVNTGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR VINALAKPIDGR GEITASER ASSVAQVVTNFQER HTLIYDDLK EAYPGDVFYLHSR + Glu->pyro-Glu (N-term E) VGSAAQIK ATQNQLAR TNKPEFQEISSTK TFTEAEALLK EAIQEQMER	gi 126022791
31	Chlorophyll a-b binding protein 36, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-36) (LHCP)	663.38 492.43 549.87	2+ 2+ 2+	94-103 125-132 176-187	NRELEVIHCR FGEAVWFK VGGGPLGEGLDK	gi 115802
33	PSI type III chlorophyll a/b-binding protein	646.76 776.41 706.43 499.38	2+ 2+ 2+ 2+	95-105 170-182 171-182 183-190	WLAYGEIINGR RLQDWYNPGSMGK LQDWYNPGSMGK + Oxid.M QYFLGLEK	gi 430947
36	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP)	740.43 492.48	2+ 2+	44-56 127-134	TVQSSSPWYGPDR FGEAVWFK	gi 115780
67	NADH deidrogenase	531.53	2+	1-9	FPTATKNQR	gi 3764067

Oxygen production

N° Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS	NCBI
---------	--------------	------------------------------	------

		m/z	charge state	start-end	sequence	Accession Number
51	33kDa precursor protein associated with the photosynthetic oxygen-evolving complex from spinach	809.43 881.01 782.12	3+ 2+ 2+	107-130 192-130 248-264	GTGTANQCPTIDGGVDSFAFKPGK DGIDYAAVTVQLPGER GGSTGYDNAVALPAG	gi 131385
68	photosystem II oxygen-evolving complex protein 1 precursor - spinach	549.18 809.09 447.95 554.66 765.48 881.12 756.36 592.74 781.95 831.13 992.77 474.51 478.33 668.38	2+ 3+ 2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 3+ 2+ 3+ 3+ 2+ 3+ 2+	90-98 105-128 134-140 151-160 186-206 190-206 215-235 244-262 246-262 246-270 246-274 263-270 263-274 321-331	LTYDEIQSK GTGTANQCPTVEGGVDSFAFKPGK FCLEPTK NSGPDFQNTK FEEKDGIDYAAVTVQLPGER DGIDYAAVTVQLPGER QLVASGKPEFSGDFLVPSYR + Glu->pyro-Glu (N-term Q) GRGGSTGYDNAVALPAGGR GGSTGYDNAVALPAGGR GGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQK GGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQKENNK GDEEELQK GDEEELQKENNK IEGVWYAQLEQ	gi 21283

Protein Folding

N° Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
45	chloroplast chaperonin 21 [Vitis vinifera]	639.65 580.84	3+ 2+	43-61 50-61	VAEAEKTAGGLLLEASK TAGGLLLEASK	gi 50660329
61	chloroplast elongation factor TuB (EF-TuB) [Nicotiana sylvestris]	661.56 718.41 906.02 590.51 723.04 677.95	3+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+	42-61 62-73 76-91 92-106 141-153 279-290	TTLTAALMALASMGNSAPK + 2 Oxid.M KYDEIDAAPEER GITINTATVEYETENR HYAHVDCPGHADVVK QVGVPNMVVFLNK NTTGTGVEMFQK	gi 218312

* Il numero degli spot rappresenta lo spot presente sulla mappa.

** La funzione o il nome della protein sono ottenuti tramite il software Mascot.

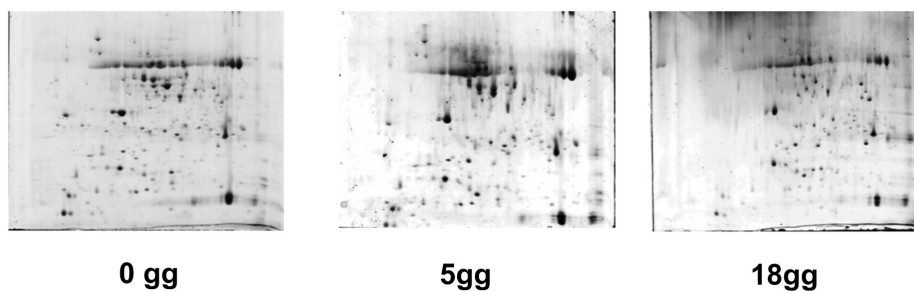
*** il numero di accesso è il numero corrispondente nel database NCBI.

3.3 Analisi proteomica delle foglie basali

La figura 19A mostra i gel elettroforetici bidimensionali colorati con il Blue Silver delle proteine estratte dalle foglie basali dopo 0, 5 e 18 giorni di trattamento con una soluzione 100 μM di CdCl_2 . La figura 19B mostra la “master map” ottenuta comparando le mappe a 0, 5 e 18 giorni di stress da Cd. Tutte le proteine identificate con questa procedura sono elencate nella tabella 4. La figura 20 mostra gli istogrammi degli spot modulati. I grafici sono stati ottenuti grazie all'utilizzo del software di analisi di immagine Progenesis SameSpot (Nonlinear Dynamics, New Castle, UK) e le relative identificazioni. È stato possibile osservare come la maggior parte delle proteine che hanno mostrato una significativa “up-regolazione” sono coinvolte nella risposta allo stress ossidativo, al metabolismo del carbonio, alle proteine relative a stress patogeni e a enzimi coinvolti nella sintesi della cisteina, mentre le proteine “down-regolate” sono coinvolte nella fotosintesi, nel metabolismo dei carboidrati, nella produzione di O_2 e nel “folding” delle proteine. Un'altra cosa da rimarcare è che la maggior parte delle proteine che sono “up-regolate” nelle foglie basali sono “down-regolate” in quelle apicali. Questo mette in evidenza come le foglie apicali e basali reagiscono diversamente al trattamento con il Cd probabilmente perché esse svolgono ruoli differenti nella pianta in risposta e per la sopravvivenza alla tossicità del metallo pesante.

Un'altra osservazione degna di nota è stata che nell'elettroforesi 2D IEF-SDS-PAGE delle foglie basali dopo 42 giorni di stress (dati non presentati) è stato possibile osservare dei leggeri spot nella parte centrale del gel i quali non sono presenti nel controllo, e un notevole numero di nuovi spot sono emersi nella regione a bassi pesi molecolari. In concomitanza, aggregati ad alti pesi molecolari, visibile come una striscia nella parte più alta del gel, sono apparsi nella regione attorno a 300 kDa. Una diminuzione di intensità di colorazione tramite Coomassie blue e un aumento in numero degli spot a bassi pesi molecolari nel gel SDS-PAGE sono fenomeni che di solito vengono osservati quando le proteine sono esposte a specie attive dell'ossigeno, suggerendo che la maggior parte dei danneggiamenti sono dovuti al processo ossidativo. In fatti, la presenza di “smearing”, spostamenti delle bande proteiche, formazione di aggregati e anche frammentazione delle proteine potrebbero essere causate dalle specie attive dell'ossigeno, generate durante la senescenza, la quale attacca a “random” le proteine (Rinalducci *et al.*, 2008).

A



B

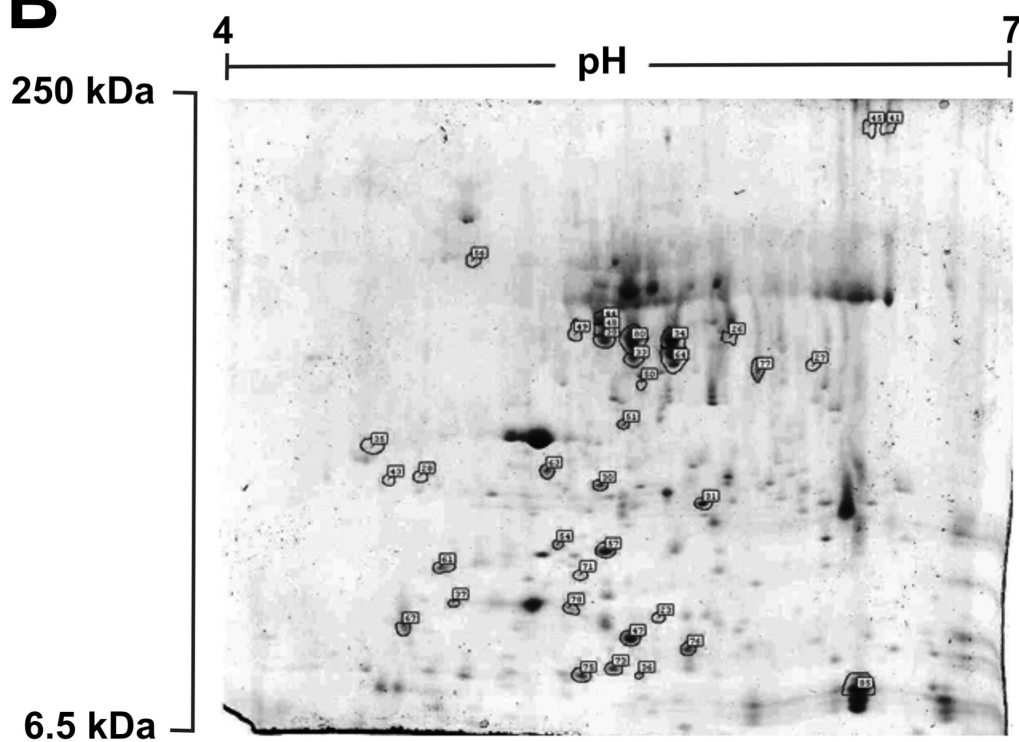
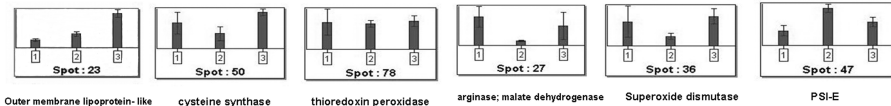


Figura 19. Immagini dei gel 2D IEF SDS PAGE colorati con il colorante “Blue Silver”. A. Gel 2D IEF SDS PAGE delle foglie basali dopo 0, 5 e 18 giorni di trattamento e relativa cinetica del trattamento. B. Immagine della “master map” che rappresenta il gel riassuntivo dopo l’analisi di immagine. Ogni spot differenzialmente espresso è indicato con il suo numero relativo.

Up Regulated



Tended to Up Regulation

Down Regulated

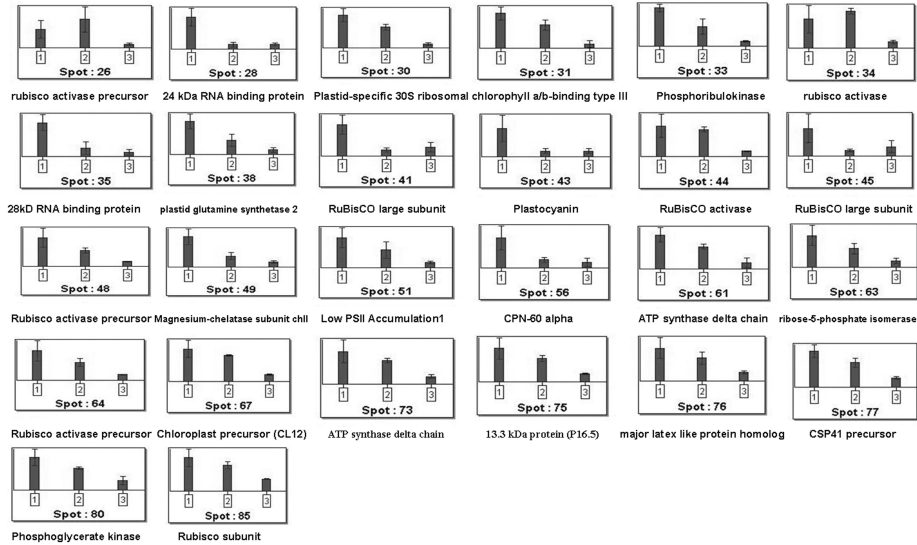


Figura 20. Istogrammi degli spot modulati dopo analisi di immagine dei gel 2D IEF SDS PAGE dell'estratto proteico totale delle foglie apicali. Ogni spot viene mostrato relativamente alla sua espressione durante il trattamento con il Cd. La casella 1 rappresenta lo spot presente nella mappa delle foglie apicale dopo 0 giorni di trattamento, la casella 2 e 3 sono inerenti agli spot presenti nelle varie mappe dopo 5 e 18 giorni di trattamento, rispettivamente.

Tabella 4. Lista delle protein identificate tramite MS nelle foglie basali trattate con il Cd.

Response to oxidative stress protein

N°Spot*	Protein name**	Peptides identified by MS/MS				NCBI*** Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
23	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	830.31 719.56 943.93 543.53	3+ 2+ 3+ 2+	79-102 184-196 184-211 212-222	GTSNVEGVVTLTQEDDGPTTVNVR ALVVHELEDDLK ALVVHELEDDLKGGHESPTTGNAGGR LACGVVGLTPV	gi 134686
27	arginase [Arabidopsis thaliana]	551.05 870.39 935.56 513.62 457.08 478.23 400.12 579.94	2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	36-45 91-106 145-169 199-207 208-215 216-223 217-223 236-244	VIDASLTIR EAIWCGSTNSATEEGK LVMEEEPLRPLVLGGDHSISYPVVR YSHASSFAR IMEGGYAR + Oxid.M RLLQVGIR LLQVGIR FGVEQYEMR	gi 15236640
36	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	689.80 696.37 987.63	2+ 3+ 1+	115-127 115-134 143-152	AVVVHAEPDDLGR AVVVHAEPDDLGRGGHELK VACGIHLQG	gi 134628
78	thioredoxin peroxidase	525.52	2+	130-138	YALLVDDLK	gi 18654477

Carbohydrate metabolism

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
26	rubisco activase precursor	1143.71 1045.20 498.04 927.23 637.68 701.61 866.53 823.65	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+	180-202 276-294 311-319 331-347 358-369 358-370 376-390 408-430	LGINPIMMSAGELESGNAGEPAK VPIIVTGNDSTLYAPLIR IGVCTGIFK LVDAFPQGSIDFFGALR WVNSVGVDNVGK WVNSVGVDNVGKK DGPPVFEQPEMTLQK VQLADQYMSSAALGDANKDAIDR + Oxid M	gi 170129
27	malate dehydrogenase [Nicotiana tabacum]	674.15 825.68 501.67	2+ 2+ 2+	56-67 127-142 172-180	MELVDAAFPLK VLVVANPANTNALILK LNVQVSDVK	gi 10798652
33	Phosphoribulokin ase, chloroplast precursor (PRKase) (PRK) (Phosphopentokin ase)	737.03 435.99 719.06 584.05	2+ 2+ 2+ 2+	130-141 216-223 230-241 298-307	ANDFDLMEQVK GHSLESIK KPDFDAYIDPQK KLTCYSGIK	gi 125579
34	rubisco activase precursor	612.63 460.86 577.33 615.12 1143.66 575.54 415.98 1045.46 498.09	2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+	75-84 75-84 155-165 170-179 180-202 208-217 210-217 276-294 311-319	DFSDDQLDIR DFSDDQLDIRR IPLILGVWGGK SFQCELVFAK LGINPIMMSAGELESGNAGEPAK YREAADLIAK EAADLIAK VPIIVTGNDSTLYAPLIR IGVCTGIFK	gi 170129

		408.32 927.14 448.58 512.41 510.90 637.69 701.67 858.90 963.04 694.65 875.51 941.58 818.28	3+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 3+ 2+ 3+	320-330 331-347 350-356 350-356 357-370 358-369 358-370 376-390 391-406 391-407 407-430 408-425 408-430	TDKVPAEHVVK LVDAFPGQSIDFFGALR VYDDEVVR VYDDEVVRK KWVNSVGVDNVGKK WVNSVGVDNVGK WVNSVGVDNVGKK DGPPVFEQPEMTLQK LMEYGNMLVQEENVK LMEYGNMLVQEENVKR RVQLADQYMSSAALGDANKDAIDR + Oxid M VQLADQYMSSAALGDANK VQLADQYMSSAALGDANKDAIDR	
41	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit)	708.53 395.45 733.58 455.93 369.50 726.71 631.78 908.07 657.86 457.12 631.76 559.28	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+	135-146 140-146 147-159 188-194 195-201 202-213 218-227 237-252 237-253 296-303 340-350 422-431	LEDLRIPVAYVK IPVAYVK TFQGPPIHQVER AVYECLR GGLDFTK DDENVNSQPFMR FLFCAEAIYK GHYLNATAGTCEDMMK + Oxid M GHYLNATAGTCEDMMKR + Oxid M AMHAVIDR DITLGFVDLLR VALEACVKAR	gil2500656
44	Ribulose biphosphate carboxylase/oxyg enase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase) (RA)	612.61 795.23 537.08 577.19 615.08 1151.66 575.65 416.15 1045.17 470.99 498.07 927.34 637.87 701.68 858.96 963.02 870.37 941.60 823.65 986.01 566.55	2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 2+	75-84 119-138 146-154 155-165 170-179 180-202 208-217 210-217 276-294 301-307 311-319 331-347 358-369 358-370 376-390 391-406 407-430 408-425 408-430 437-455 463-472	DFSDDQLDIR KYDIDNMLGDFYIAPAFMDK + Oxid M NFLNLPNIK IPLILGVWGGK SFQCELVFAK LGINPIMMSAGELESGNAGEPAK + Oxid M YREAADLIAK EAADLIAK VPIIVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR IGVCTGIFK LVDAFPGQSIDFFGALR WVNSVGVDNVGK WVNSVGVDNVGKK DGPPVFEQPEMTLQK LMEYGNMLVQEENVK RVQLADQYMSSAALGDANKDAIDR VQLADQYMSSAALGDANK VQLADQYMSSAALGDANKDAIDR + Oxid M AAQQVSLPVAQCTDPEAK SDDGSCTYNL	gil12643998
45	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit)	798.89 708.59 395.49 733.63 734.53 474.11 908.02 1023.59 456.95 732.81 631.91 1007.13 762.32 521.48 774.31 714.31 536.95	3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+	22-41 135-146 140-146 147-159 202-213 228-236 237-252 259-285 296-303 320-334 340-350 340-356 340-358 351-358 451-463 464-475 467-475	LTYYTPEYETLDTDILAAFR LEDLRIPVAYVK IPVAYVK TFQGPPIHQVER DDENVNSQPFMR + Oxid M AQAETGEIK GHYLNATAGTCEDMMK + Oxid M ELGVPIVMHDYLTGGFTANTTLSHYCR AMHAVIDR + Oxid M LSGGDHIHSGTVVGK DITLGFVDLLR DITLGFVDLLRDDYTEK DITLGFVDLLRDDYTEKDR DDYTEKDR WSPELAAACEVWK EIKFEFPAMDTV FEFPAMDTV	gil132051
48	rubisco activase precursor	592.68 612.56 405.80 537.08	2+ 2+ 2+ 2+	65-74 75-84 135-145 146-154	NTDKWAHLAK DFSDDQLDIR LVVHITK NFLNLPNIK	gil170129

		577.35 615.07 1151.63 575.61 416.04 1045.66 471.06 498.08 408.57 927.53 448.66 512.62 701.78 637.62 701.69 858.95 963.06 694.67 680.29 875.63 941.60 823.65 986.01 566.53	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 3+ 3+ 3+ 2+ 3+ 2+ 2+	155-165 170-179 180-202 208-217 210-217 276-294 301-307 311-319 320-330 331-347 350-356 350-357 357-369 358-369 358-370 376-390 391-406 391-407 407-425 407-430 408-425 408-430 437-455 463-472	IPLILGVWGGK SFQCELVFAK LGINPIMMSAGELESGNAGEPAK + Oxid M YREAADLIAK EAADLIAK VPIIVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR IGVCTGIFK TDKVPAEHVVK LVDAFPGQSIDFFGALR VYDDEVVR VYDDEVVRK KWNNSVGVDNVGK WVNNSVGVDNVGK RWNNSVGVDNVGKK DGPPVFQEPMETLQK LMEYGNMLVQEQENVK LMEYGNMLVQEQENVKR RVQLADQYMSSAALGDANK RVQLADQYMSSAALGDANKDAIDR + Oxid M VQLADQYMSSAALGDANK VQLADQYMSSAALGDANKDAIDR + Oxid M AAQVSLPVAQGCTDPEAK SDDGSCTYNL	
49	Phosphoglycerate kinase, chloroplast precursor	1001.56 600.34 911.23 773.16 816.67	2+ 2+ 2+ 2+ 2+	51-68 111-121 133-149 377-393 418-433	ADLNVPLDDSQNITDDTR LSELLGLQVVK LVAELPEGGVLLLENVR GATTIIGGGDSVAAVEK QLPGLVALLNEADPPVPV	gil1346698
56	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha (60 kDa chaperonin subunit alpha) (CPN-60 alpha)	866.78 592.25 522.64 886.07 819.27 855.96 402.06 450.22 646.12 710.31 422.57	1+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	57-65 66-77 91-100 101-117 123-139 144-160 261-267 310-318 422-433 422-434 479-486	AAIQAGIDK LADAVGLTLGPR VVNDGVTIAR AIELPDAMENAGAALIR + Oxid M TNDSAGDGTITASVLAR LGLLSVTSGANPVSILKR VLVDQK GILNVAAIK VGAATETELEDK VGAATETELEDK LGADIVQK	gil3790441
63	chloroplast ribose-5-phosphate isomerase	899.65 444.46 572.12 697.65 1013.06 714.20 942.14 1035.64 437.39 812.09 783.25 806.94	2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 1+ 2+ 2+ 2+ 1+	75-93 94-102 103-113 115-134 135-153 162-180 164-180 172-180 181-189 190-202 208-220 214-220	SGMVLGLGTGSTAAFAVSR + Oxid M IGEILLSAGK LTNIVGIPTSK TAEQAASLGIPLSVLDDHPR IDLAIDGADEVDPDLNLVK EKMVEAASDKFIVVVDDTK + Oxid M MVEAASDKFIVVVDDTK + Oxid M FIVVVDDTK LVDGLGGSR LAMPVEVVQFCWK + Oxid M LQEIFKELGCEAK ELGCEAK	gil18654317
64	rubisco activase precursor	592.59 612.68 1113.27 405.62 537.01 577.26 615.09 1144.12 575.77 415.93 1045.18 471.04 498.16 408.57 439.91 927.17	2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+	65-74 75-84 88-118 139-145 146-154 155-165 170-179 180-202 208-217 210-217 276-294 301-307 311-319 320-330 323-330 331-347	NTDKWAHLAK DFSDDQLDIR GMVDSLQAPADAGTHVPIQSSFEYESQGLR LVVHITK NFLNLPNIK IPLILGVWGGK SFQCELVFAK LGINPIMMSAGELESGNAGEPAK YREAADLIAK EAADLIAK VPIIVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR IGVCTGIFK TDKVPAEHVVK VPAEHVVK LVDAFPGQSIDFFGALR	gil170129

		448.40 512.33 701.74 765.63 637.79 701.84 858.91 963.11 694.70 685.65 941.66 818.36	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 3+ 2+ 3+	350-356 350-357 357-369 357-370 358-369 358-370 376-390 391-406 391-407 407-425 408-425 408-430	VYDDEV VYDDEV KWVNSVGVDNVGK KWVNSVGVDNVGKK WVNSVGVDNVGK WVNSVGVDNVGKK DGPPVFEQPEMTLQK LMEYGNMLVQEENVK LMEYGNMLVQEENVKR RVQLADQYMSSAALGDANK VQLADQYMSSAALGDANK VQLADQYMSSAALGDANKDAIDR	
75	Chain A, Activated Spinach Rubisco Complexed With 2- Carboxyarabinitol Bisphosphate	733.61 724.23 732.64 762.30 774.08 721.99 536.38	2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+	147-159 195-213 320-334 340-358 451-463 464-475 467-475	TFQGPPIGQVER GGLDFTEDDENVNSQPFMR LSGGDHIHSGTVVGK DITLGFVDLLRDDYTEKDR WSPELAAACEVWK EIKFEFPAMDTV + Oxid M FEFPAMDTV + Oxid M	gil1827835
80	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxyg enase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase)	592.08 612.67 1113.35 790.10 1120.11 405.53 537.11 577.18 615.02 1143.73 575.49 1045.31 497.95 408.39 927.15 637.72 701.57 866.67 694.64 680.23 823.67 985.58	2+ 2+ 3+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 3+ 3+ 2+	65-74 75-84 88-118 119-138 120-138 139-145 146-154 155-165 170-179 180-202 208-217 276-294 311-319 320-330 331-347 358-369 358-370 376-390 391-407 408-425 408-430 437-455	NTDKWAHLAK KDFSDDQLDIR GMVDSLFPAPADAGTHVPIQSSFEYESQGLR KYDIDNMLGDFYIAPAFMDK YDIDNMLGDFYIAPAFMDK LVVHITK NFLNLPNIK IPLILGVWGGK SFQCELVFAK LGINPIMMSAGELESGNAGEPAK YREAADLIAK VPIIHTGDNFSTLYAPLIR IGVCTGIFK TDKVP AEHVVK LVDAFPQSIDFFGALR WVNSVGVDNVGK WVNSVGVDNVGKK DGPPVFEQPEMTLQK LMEYGNMLVQEENVKR VQLADQYMSSAALGDANK VQLADQYMSSAALGDANKDAIDR + Oxid M AAQQVSLPVAQGCTDPEAK	gil12643998
85	ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase small subunit [Spinacia oleracea]	502.42 1069.27 661.26 553.98 685.85 707.44 914.57 789.97 832.43 569.60 991.61 461.82	2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 1+ 3+ 3+ 2+ 1+ 2+	60-67 68-85 69-85 86-94 95-110 111-122 123-128 129-148 129-149 149-157 150-157 158-165	VWPTQNMK RYETLSYLPPLTTDQLAR YETLSYLPPLTTDQLAR QVDYLLNNK WVPCLEFETDHGFVYR EHHNSPGYYDGR Glu->pyro-Glu (N-term E) YWTMWK LPMFGCTDPAQVLNELEECK + Oxid M LPMFGCTDPAQVLNELEECK + Oxid M KEYPNAFIR KEYPNAFIR Glu->pyro-Glu (N-term E) IIGFDSNR	gil2529378

Photosynthesis

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
31	chlorophyll a/b- binding protein type III	646.58 837.69	2+ 2+	24-34 35-51	WLAYGEIINGR FAMLGAVGAIAPEILGK + Oxid M	gil7271947
43	Plastocyanin, chloroplast precursor	848.03 957.16	3+ 2+	100-123 124-140	NNAGFPHNVVFEDEEIPSGVDAK ISMSEEDLLNAPGETYK + Oxid M	gil130285

47	Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor (PSI-E)	635.97	2+	82-94	GVGSVVAVDQDPK	gi 131178
73	ATP synthase delta chain, chloroplast precursor	814.29 701.99 626.72	3+ 2+ 2+	78-101 172-185 186-196	YASALADVADVTGTLEATNSDVEK ITGTEVAVVTSVVK LENDHLAQIAK	gi 114584

PR Pathogen Related Protein

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
23	outer membrane lipoprotein-like	628.75 564.59 486.48 692.18	2+ 2+ 2+ 2+	16-25 58-67 59-67 59-71	WYEIAFSPSR RGFIEGSAYK GFIEGSAYK GFIEGSAYKDPK	gi 21553811
76	major latex like protein homolog	900.86 653.09	1+ 2+	87-94 87-97	IIEGDLLK IIEGDLLKEFK	gi 14594813

Cysteine biosynthesis

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
26	S-adenosylmethionine synthetase 2 (AdoMet synthetase 2) (Methionine adenosyltransferase 2) (MAT 2)	727.30 918.24 811.73 883.99 727.75	2+ 2+ 3+ 3+ 2+	52-64 79-95 96-117 192-215 242-256	TNLVMVFGEITTK EIGFVSPDVGLDADNCK VLVYIEQQSPDIAQGVHGLTK VHTVLISTQHDETVTNDEIAADLK FVIGGPHGDAGLTGR	gi 127046
50	cysteine synthase[Spinacia oleracea]	633.67 693.54 720.33 666.72 698.90 910.06 875.99 668.46 664.17	2+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 3+ 2+ 2+	78-88 111-122 130-151 173-185 200-217 218-232 259-284 352-363 364-374	TPMVYLNNSVK IGYSMIDDAEQK + Oxid M TTLVEPTSGNTGIGLAFIAAAR AFGAELVLTDPK KTPDSYMLQQFDNPANPK IHYETTGPFIWEDTK NPGVQVIGIEPTESNILSGGKPGPHK LIAVVFPSFGER YLSSILFQSIR	gi 303902

Protein folding

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
28	24 kDa RNA binding protein	388.66 698.67	2+ 2+	146-152 153-165	VDDDALK TLFSETGDVVEAK	gi 1015370

35	28kD RNA binding protein	798.62 816.84 735.41 594.80 509.93 968.68 357.47	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 3+	50-63 90-104 105-117 158-167 173-181 184-211 215-223	LFVGNLPYDVSSEK GFGFVTMSTVEEAEK GFGFVTMSTVEEAEK + Oxid M LEQLFSEHGK VVSRETGR GFGFVTMSSESEVNDIAALDGGTLDGR + Oxid M VNVAEERPR	gi 21309
----	--------------------------	--	--	--	---	--------------------------

Chlorophyll biosynthesis

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
26	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	728.23 636.75 779.15 889.08 812.45 708.77	2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+	64-77 66-77 164-177 191-205 206-223 380-393	AKELMPGGVNSPVR ELMPGGVNSPVR FVNSGTEACMGVLR + Oxid M FEGCYHGHADPFLVK AGSGVATLGLPDSPGVPK ITGELTQGILDAGK	gi 19875
49	Magnesium-chelatase subunit chlI, chloroplast precursor (Mg-protoporphyrin IX chelatase)	785.29 791.65	3+ 1+	259-279 416-421	FILIGSGNPEEGELRPQLLDR FYEVFS	gi 3334150

Protein synthesis

N°Spot	Protein name	Peptides identified by MS/MS				NCBI Accession Number
		m/z	charge state	start-end	sequence	
30	Plastid-specific 30S ribosomal protein 2, chloroplast precursor (PSRP-2)	734.94 544.52 466.67 494.50 1024.12 842.92 493.53 415.49 595.09 487.95 552.02 1080.86 439.78 836.39	3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+ 2+ 2+ 2+ 3+ 2+ 2+	62-84 85-93 86-93 94-101 102-119 102-123 126-133 127-133 134-144 145-153 145-154 157-185 186-193 194-207	AVVTEETSSSTASSSDGEGAR RLYVGNIPR LYVGNIPR NLNDELRL TIVEEHGAIEIAEVMYDK TIVEEHGAIEIAEVMYDKYSGR RFGFVTMK + Oxid M FGFVTMK TVEDANAVIEK LNDTEIGGR LNDTEIGGRK VNITEKPLEGMDIATTQAEDSQFVESPYK VYIGNLAK TVTNELLKDFSEK	gi 75275079
51	Low PSII Accumulation1	713.71 400.86 501.75	3+ 2+ 2+	132-151 152-157 283-290	VIATSAVFGTEIWPAAEYGR TMYTIR + Oxid M SGYEDFKR	gi 18405391
67	50S ribosomal protein L12, chloroplast precursor (CL12)	929.88 558.56 893.17 840.14 814.58	2+ 2+ 3+ 2+ 1+	64-80 81-89 90-119 120-134 178-185	IEQLGTQLSGLTLEEAR VLVDWLQDK LGVSAASFAPAAVAAPGAPADAAPAV EEK TEFDVSDIEVPSNAR QLEDAGAK Gln->pyro-Glu (N-term Q)	gi 133085

77	chloroplast mRNA-binding protein CSP41 precursor	725.90	3+	112-132	ELLGSGHQVTFTVGDEGSDK	gil1532135
		812.41	3+	112-134	ELLGSGHQVTFTVGDEGSDKMK	
		499.12	2+	141-150	FSEITSAGGK	
		730.17	2+	178-190	DLETVPVVDWAK	
		739.37	2+	222-235	SSASHVAVEDYIAK	
		753.71	3+	236-255	TFGSWAVFRPQYMIGSGNNK	
		652.75	2+	256-264	DCEEWFFDR	
		721.61	3+	268-287	DRPVLIPGSGMQLTNISHVK	
		952.36	3+	288-314	DLSSMLTVAVENPSAASGNIFNCVSDR	
		389.13	3+	355-363	NMHFYAEPR	
		501.49	2+	364-372	AAQDILGWK	
		718.69	2+	373-384	ATTYLPEDLKER	
		749.51	3+	373-390	ATTYLPEDLKERYEYVK	
		562.03	2+	397-405	DIKFEIDDK	

* Il numero degli spot rappresenta lo spot presente sulla mappa.

** La funzione o il nome della protein sono ottenuti tramite il software Mascot.

*** il numero di accesso è il numero corrispondente nel database NCBI nr.

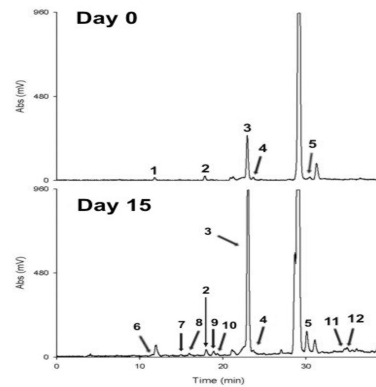
3.4 Proteine carbonilate come biomarker della generazione dei ROS

La presenza di proteine ossidate all'interno della foglia è stata misurata come contenuto totale di gruppi carbonilici attraverso la reazione degli stessi con 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), assumendo che le proteine carbonilate sono un marker per la generazione dei ROS (Levine *et al.*, 1994). Le proteine carbonilate appaiono già dopo 5 giorni di trattamento con il Cd nelle foglie basali e aumentano nel corso dello stress, mentre non sono state determinate nelle foglie apicali (dati non presentati).

3.5 Determinazione delle fitochelatine

Le fitochelatine (PCs) sono state separate e identificate tramite RP-HPLC on line con la spettrometria di massa. I campioni estratti dalle foglie basali dopo 0, 10 e 18 giorni di trattamento con il Cd sono stati iniettati in una colonna C18 per la separazione cromatografica. La tabella 5 riporta la struttura delle fitochelatine identificate, il peso molecolare, il relativo m/z determinato dopo derivatizzazione con il mBBr e il relativo retention time. Nelle foglie controllo, è stato possibile osservare piccoli quantitativi di PC2, PC3, PC4, desGLU(PC3) e desGLU(PC4), ma questi aumentano significativamente nelle foglie trattate con il Cd dopo 15 giorni di 3, 1.5, 7.5, 2 e 2 volte rispettivamente (figura 21A). Nuove fitochelatine compaiono, inoltre, nelle foglie basali, le quali sono state identificate come homoPC2, homoPC3, isoPC3(ser), isoPC4(ser), PC4 e desGLU PC4. L'analisi semi-quantitativa dei cambiamenti della concentrazione delle fitochelatine nelle foglie durante lo stress da Cd è mostrata nella figura 21B sono stati ripetuti, inoltre, gli stessi esperimenti nelle foglie apicali dopo 15 giorni di trattamento con Cd. La concentrazione di fitochelatine è stata trovata essere la stessa rispetto alle piante controllo, suggerendo che il Cd non sia presente in tali foglie e quindi nessun danneggiamento sia occorso in esse (dati non presentati).

A Phytochelatins qualitative analysis



B Phytochelatins semiquantitative analysis

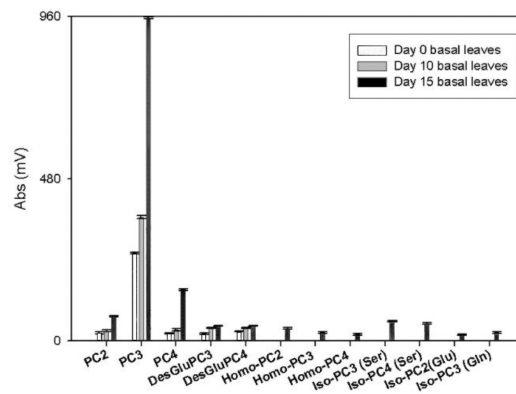


Figura 21. A. RP-HPLC Cromatogrammi comparativi delle fitochelatine. A. I profili HPLC degli estratti derivatizzato con mBBR delle foglie basali dopo 0 giorni e dopo 15 giorni di trattamento con il Cd. Il numero dei picchi mostrano le seguenti fitochelatine: 1, PC2; 2, DesGluPC4; 3, PC3; 4, DesGluPC3; 5, PC4; 6, Homo-PC4(β -Ala); 7, Iso-PC2(Glu); 8, Iso-PC3(Gln); 9, Homo-PC2(β -Ala); 10, Homo-PC3(β -Ala); 11, Iso-PC4(Ser); 12, Iso-PC3(Ser). È anche indicato il picco del mBBR non reagito. Tutti i valori sono la media di triplicati $\pm$ deviazione standard. B. livelli delle PCs, homo-PCs e Iso-PCs registrati nelle foglie basali trattate con il Cd a 0, 10 e 15 giorni. Tutti i valori sono medie di triplicati $\pm$ deviazione standard. Test ANOVA significativo con $P < 0.01$.

Tabella 5. PCs, homo-PCs and iso-PCs caratterizzate in estratti da piante di *Spinacia Oleracea*.

Peak	Compound	Molecular weight	m/z +mBBr ^a	Retention time
1	PC ₂ : (γGlu-Cys) ₂ -Gly	540.60	920.41	12.35
2	DesGluPC ₄ : Cys-(γGlu-Cys) ₄ -Gly	874.98	1635.84	18.60
3	PC ₃ : (γGlu-Cys) ₃ -Gly	772.92	1341.63	23.77
4	DesGluPC ₃ : Cys-(γGlu-Cys) ₂ -Gly	642.72	1213.63	24.41
5	PC ₄ : (γGlu-Cys) ₄ -Gly	1003.11	1764.84	31.06
6	Homo-PC ₄ (β-Ala): (γGlu-Cys) ₄ -Ala	1018.14	1778.84	11.95
7	Iso-PC ₂ (Glu): (γGlu-Cys) ₂ -Glu	611.65	992.42	15.44
8	Iso-PC ₃ (Gln): (γGlu-Cys) ₃ -Gln	842.93	1413.63	16.47
9	Homo-PC ₂ (β-Ala): (γGlu-Cys) ₂ -Ala	553.61	934.42	19.53
10	Homo-PC ₃ (β-Ala): (γGlu-Cys) ₃ -Ala	785.88	1356.63	19.97
11	Iso-PC ₄ (Ser): (γGlu-Cys) ₄ -Ser	1034.13	1794.84	35.94
12	Iso-PC ₃ (Ser): (γGlu-Cys) ₃ -Ser	801.87	1372.63	36.10

^a Electrospray positive ionization mode

3.6 Discussione

La pianta di spinacio è insolitamente resistente ad alte concentrazioni di Cd e come tale potrebbe essere preso in considerazione come un buon sistema modello per valutare gli effetti di una prolungata esposizione al Cd (Fagioni *et. al.*, 2008). Questo fatto è molto interessante in quanto la maggior parte delle indagini effettuate sino ad ora sono coinvolte in esposizioni a breve termine e poche informazioni esistono su come le piante rispondono a lunghi trattamenti. In questo lavoro, viene riportato come il Cd gradatamente si accumuli nelle foglie basali le quali tentano di espellere il metallo pesante il quale raggiunge eventualmente le foglie apicali solo in tempi di esposizione molto lunghi (40-42 giorni). Nella pianta di spinacio i visibili segni di clorosi cominciano dal bordo della foglia per poi estendersi nella parte centrale. La clorosi rimane localizzata nelle foglie basali grazie ad una sovrapproduzione di fitochelatine (PCs), le quali permettono la chelazione intracellulare del Cd e la sua compartimentalizzazione all'interno dei vacuoli (Salt *et al.*, 1998). Questo limita il quantitativo di Cd libero che potrebbe circolare nelle foglie apicali e potrebbe rappresentare una strategia di detossificazione adottata dalle piante, probabilmente come parte di un meccanismo generale che viene messo in funzione per escludere l'eccesso di anioni tossici come il Cl^- (Bongi e Loreto, 1989). Dopo un lungo periodo di esposizione, le foglie clorotiche si seccano e si distaccano dalla pianta, espellendo così il Cd catturato e rimuovendolo completamente e in tal modo prevenendo ogni possibile accesso alle foglie apicali. Queste ultime rimangono efficienti per più di 40 giorni di trattamento, con una più alta velocità di fotosintesi rispetto a quella osservata normalmente e tale attività provvede a tutta l'energia necessaria al resto della pianta per la sopravvivenza. Quindi la pianta sembra dividersi in due differenti parti aventi funzioni differenti ma complementari. Questo è quanto emerge dai due differenti e complementari profili proteomici, emersi nelle foglie basali e apicali.

Il Cd riduce la crescita di tutta la pianta. Le foglie delle piante trattate con il Cd sono circa il 60% più piccole di quelle del controllo e della stessa età. In un precedente lavoro, le piante esposte ad una soluzione 100 μM di CdCl_2 mostravano un aumento nella citochina ossidasi, un enzima indotto per incrementare la concentrazione di ABA, il quale solitamente interviene in stress ambientali, causando una minore divisione cellulare e danneggiando, quindi, il normale sviluppo (Brugière *et al.*, 2003). Comunque è importante sottolineare che la clorosi osservata in piante cresciute in presenza di Cd è differente rispetto alle piante cresciute in Fe-deficienza, dove sia le foglie apicali che le foglie basali mostravano un'estesa clorosi su tutta la superficie della foglia già dopo 4-5 giorni di stress

(Timperio *et al.*, 2007). In queste piante, la clorosi appariva sull'intera foglia, mentre nel trattamento con il Cd essa comincia dal bordo della foglia per poi estendersi verso la vena principale. Sintomi visibili di clorosi si sono manifestati nei cotiledoni già dopo 3-5 giorni di stress, mentre le prime sue foglie basali (1-2) hanno mostrato clorosi dopo 5-7 giorni e le più alte foglie basali (3-4) dopo 10-12 giorni. Inoltre, i sintomi della tossicità sono sembrati essere meno pronunciati nelle piante di spinacio rispetto alle piante di pioppo in quanto si venivano a formare larghe necrosi, mentre in queste ultime avevano piccoli necrosi maggiormente vicino alla vena principale della foglia (Kieffer *et. al.*, 2008). Inoltre, nel pioppo il Cd viene accumulato ad una maggiore velocità nello stelo per poi incrementare linearmente nelle foglie, sebbene rimanga in concentrazione più bassa rispetto che negli steli. Tutto questo mette in evidenza la variabilità genetica che è stata trovata in differenti specie e all'interno di una stessa specie in risposta all'esposizione al Cd, per esempio nel genotipo del pisello (Repetto *et al.*, 2003). Ogni pianta, quindi, viene danneggiata in modo diverso e tutto ciò dipende da come il Cd viene traslocato, distribuito e di conseguenza accumulato.

3.6.1 Il Cd raggiunge le foglie apicali dopo un lungo periodo di esposizione

È interessante che nello spinacio e in brassica (Fagioni *et al.*, 2008), e presumibilmente in molte altre specie, le foglie apicali non vengono raggiunte dagli ioni Cd, se non dopo una lunga esposizione. Nel caso dello spinacio questo accade dopo 40 giorni di trattamento, quando nuove foglie cominciano a germogliare. Le foglie apicali sono rimaste verdi e non è stato osservato nessun sintomo visibile di danneggiamento, nonostante l'alta concentrazione di Cd di 100 μM . Le misurazioni di Cd, così come quelle del contenuto di clorofilla, hanno mostrato l'assenza di Cd all'interno delle foglie apicali e oltretutto, la concentrazione di clorofilla totale è stata trovata leggermente aumentata rispetto alle piante controllo. In accordo con questo, alcune proteine coinvolte nella fotosintesi sono state trovate essere "up-regolate" così come le proteine coinvolte nella fissazione della CO_2 , come la Rubisco e l'anidrasi carbonica.

Il rapporto F_v/F_m , che rappresenta la massima resa quantica della reazione fotochimica del PSII, mostra un leggero aumento, suggerendo che la fotosintesi aumenta in queste foglie. In accordo con tutto questo, le proteine coinvolte nella produzione di O_2 , come OEC1 e OEC2, vengono "up-regolate". Inoltre, gli enzimi della glicolisi sono anch'essi "up-regolati", in modo tale da provvedere all'energia necessaria al resto della pianta e sono indice di un'aumentata attività biologica di tali cellule.

3.6.2 Le foglie basali sono maggiormente affette dal Cd

3.6.3 Danni all'apparato fotosintetico delle foglie basali

Nelle foglie basali, è stata riscontrata una significativa “down-regolazione” sia della magnesium chelatasi che della glutamato-1-semialdeide-2,1-aminomutasi. Il primo enzima interviene nel primo passaggio della biosintesi della clorofilla e batterio-clorofilla con l'inserzione dello ione Mg^{2+} nell'anello porfirinico IX (Sirijovski *et al.*, 2008), mentre il secondo è uno degli enzimi principali nella biosintesi della clorofilla (Kieffer *et al.*, 2008). Quindi non è sorprendente che la concentrazione della clorofilla *a* è stata trovata diminuire nel corso dello stress da Cd, essendo la prima clorofilla ad essere sintetizzata e successivamente convertita in clorofilla *b*. La diminuzione specifica della clorofilla *a* di conseguenza induce ad una generale e progressiva diminuzione delle antenne del PSI, le quali contengono più clorofilla *a* rispetto alla *b*. La diminuzione del PSI è associato con la scomparsa dei maggiori supercomplessi proteici. Nel precedente lavoro, è stato riportato come il Cd accumuli un “incompleto” PSI il quale a sua volta, è associato ad una sovra espressione della proteina ferredossina NADP ossido riduttasi (FNR) (Fagioni *et al.*, 2008). Questa porta ad una sovrapproduzione di H^+ , ATP e $NADPH^+$, i quali sono necessari per la produzione delle fitochelatine (PCs). In accordo con questi dati, tali analisi rilevano un aumento del PSI-E. Questa proteina stabilizza l'interazione tra PsaC e il core del PSI, assistendo al corretto assemblaggio tra la ferredossina e il PSI e interagisce con la FNR (Rousseau *et al.*, 1993). Inoltre in questo studio è stato trovato un decremento della Plastocianina (Pc): una piccola proteina contenente rame (10.5 kDa) trovata nel lumen dei tilacoidi all'interno dei cloroplasti e svolge la funzione di trasportatrice di elettroni tra il citocromo b_6f e il PSI. I livelli del citocromo b_6f e del complesso dell'ATP sintasi, i quali non contengono clorofilla, rimangono inalterati durante i primi giorni di trattamento (Fagioni *et al.*, 2008), ma è stata registrata una riduzione nel tempo del quantitativo della subunità delta dell'ATP sintasi, appartenente alla famiglia della catena delta dell'ATP sintasi. Contrariamente a quanto osservato nel PSI, non è stata riscontrata nessuna inibizione di proteine specifiche del PSII durante i primi 9-15 giorni, oltre che un significativo accumulo del complesso monometrico mancante della CP43 (Fagioni *et al.*, 2008). In accordo con questo, in questa analisi, è stata determinata una “down-regolazione” della proteina Low PSII accumulation 1 (LPA1). Tale proteina appare essere una caperonina interna alla membrana che è richiesta per un corretto assemblamento del

PSII, probabilmente attraverso la diretta interazione del centro di reazione del PSII con la proteina D1 durante gli stress abiotici (Peng *et al.*, 2006).

3.6.4 “Down regolazione” delle proteine coinvolte nei pathway energetici e metabolici

Le proteine trovate “down-regolate” coinvolte nel metabolismo dei carboidrati hanno incluso la Ribuloso bifosfato carbossilasi/ossigenasi attivase (Rubisco attivasi), la piccola subunità della Rubisco, con conseguente abbassamento nell'efficienza nella fissazione della CO₂ (Kieffer *et al.*, 2008). In accordo con quanto trovato, nelle piante di pioppo, la fissazione del carbonio e il ciclo di Calvin hanno mostrato numerose proteine chiave che risultano meno abbondanti, incluso la Rubisco attivasi, 60kDa caperonina, ribuloso-fosfato-3 epimerasi e le aldolasi (Kieffer *et al.*, 2009).

Alla stessa maniera tutti questi enzimi sono stati trovati “down-regolati” nelle foglie di riso dopo trattamento con il Cd e in molti altri organismi (Hajdich *et al.*, 2001). In *Clamidomonas*, l'effetto maggiore da esposizione da Cd è la riduzione di abbondanza di entrambe le sub unità piccola e grande della Rubisco, in relazione con molti altri enzimi coinvolti nella fotosintesi (Gillet *et al.*, 2006). Negli sferoplasti dei cianobatteri trattati con il Cd, l'attività della Rubisco diminuisce del 40% rispetto ai livelli del controllo, e nei cloroplasti di spinacio trattati con il Cd scende fino a solo il 2.5% del livello del controllo, a dimostrazione che il Cd compromette seriamente l'attività della Rubisco nelle piante (Nováková *et al.*, 2004). In *Synechocystis* PCC 6803 esposti al Cd la capacità di produrre ossigeno viene diminuita al 10% dal suo massimo in 15 min, indicando che il Cd è capace di penetrare rapidamente nella cellula e bloccare l'attività foto sintetica così come inattivare i diversi enzimi contenenti metallo, come l'anidrasi carbonica, nella quale il metallo pesante sostituisce lo Zn (Sas *et al.*, 2006).

Oltre alla fissazione del carbonio, sono state trovate ridotte quantità di altre proteine coinvolte nel metabolismo dei carboidrati, come la fosforibulochinasi, la fosfoglicerato chinasi e la ribosio -5- fosfato isomerasi (RPI). La fosforibulochinasi è un enzima coinvolto nell'acquisizione e assimilazione del carbonio inorganico, e inoltre è stato dimostrato che diminuisce durante lo stress da metallo pesante in uno studio esaminante l'espressione genica di tale proteina (Houot *et al.*, 2007). La fosfoglicerato chinasi è un enzima chiave nella glicolisi e catalizza la formazione di 3-fosfoglicerato da 1,3-difosfoglicerato. Questa è un'ulteriore evidenza che il pathway della glicolisi è severamente danneggiato nelle foglie basali trattate con il Cd.

La down regolazione della RPI, un enzima chiave nel ciclo di Calvin Benson, indica ulteriormente che nelle foglie basali il meccanismo di difesa è attivato soltanto contro il Cd e non per la produzione di energia.

Inoltre, mentre nei periodi brevi di esposizione la risposta più evidente allo stress da Cd nelle cellule vegetali è l'attivazione dei cicli dell'azoto e dello zolfo, come ultimo sforzo per sostenere la cellula in termini di richiesta di energia (Sarry *et al.*, 2006), dopo una lunga esposizione al Cd questi enzimi tornano ad essere "down-regolati". Sorprendentemente, MDH è "up-regolato". Essa catalizza l'interconversione NAD/NADH dipendente dei substrati malato e ossalato nel metabolismo dei carboidrati, con una sovrapproduzione di NADH, necessario per la sintesi delle fitochelatine.

3.6.5 Sovrapproduzione delle fitochelatine

Nelle foglie basali, è stato osservato un rapido aumento delle fitochelatine già esistenti e la comparsa *ex novo* di fitochelatine nelle varie forme isomeriche, le quali sono simile a quanto osservato nelle cellule di *Arabidopsis* (Sarry *et al.*, 2006). Le fitochelatine sono dei piccoli peptidi contenenti cisteina, glutammato e glicina, i quali diventano rapidamente la classe di composti tiolici maggiormente presenti nelle cellule delle radici. Il Cd induce una sovrapproduzione di PCs che spesso è accompagnato da una diminuzione in quantità del glutatione (GSH) come indice di richiesta addizionale di zolfo (Nocito *et al.*, 2007). Il ruolo del metabolismo degli aminoacidi contenenti zolfo nelle piante stressate con il Cd è stato oltremodo analizzato in quanto le cisteine partecipano come precursori dei peptidi (glutatione o fitochelatine) capaci di chelare i metalli pesanti (Rauser, 1995) e facilitare la detossificazione da specie attive dell'ossigeno (Smirnoff, 1995). Infatti, un aumento della biosintesi delle cisteine potrebbe essere un rimedio della pianta per limitare lo stress ossidativo e la propagazione dei ROS (Kieffer *et al.*, 2008). In accordo con questo, le foglie basali nelle piante trattate con il Cd "up-regolano" la cisteina sintasi e la S-adenosilmetionina sintasi 2, entrambe coinvolte nella biosintesi delle cisteine (Matthews, 1999). La cisteina sintasi è inoltre coinvolta nell'assorbimento degli ioni solfato (Moontongchoon *et al.*, 2008), mentre la S-adenosilmetionina sintasi 2 è uno dei più importanti cofattori e gioca un ruolo chiave in un gran numero di cicli metabolici essenziali. Essa rappresenta, dunque, un enzima cardine per numerose funzioni come la crescita e la divisione cellulare, come la metilazione biologica e la biosintesi di poliamine. Comunque, sebbene la sintesi delle varie classi di iso-fitochelatine si pensi differire tra pianta e pianta, il profilo metabolico osservato dimostra come lo spinacio sia in grado di

sintetizzare tutte le classi di PCs o peptidi relativi alle PCs, i quali sono stati descritti in altre specie di piante. Di conseguenza, questi risultati rinforzano l'ipotesi che è la presenza del substrato (per es. le isoforme del GSH), e non la specificità dell'enzima, che determina la natura delle fitochelatine sintetizzate (Sarry *et al.*, 2006).

3.6.6 Senescenza

Nelle foglie basali, tra le proteine “up-regolate” un buon numero sono proteine che sono coinvolte nel meccanismo in risposta allo stress ossidativo. La presenza del Cd probabilmente ha creato delle condizioni all'interno della cellula di stress ossidativo e si sovrapproduzione di ROS, portando all'attivazione di proteine in risposta a stress ossidativi, come le Pathogen Related (PR), normalmente associate a reazione ossidative radicali che durante gli stress biotici (Liu *et al.*, 2006). Sono state osservate aumentare anche le proteine Outer membrane lipoprotein-like o lipocaline. Esse sono implicate in molti ruoli importanti, come la regolazione della crescita e del metabolismo cellulare, facilitare il legame ai recettori presenti sulla superficie cellulare, biogenesi e riparo della membrana, induzione dell'apoptosi, carattere dell'animale e risposta a stress ambientali (Frenette-Charron *et al.*, 2005).

Questa idea di stress ossidativo è supportata da misure dirette dei ROS e dalla comparsa di sintomi, come macchie necrotiche e una sostanziale riduzione della crescita. Inoltre, le proteinasi, generalmente espresse durante le PCD e in tessuti senescenti, sono aumentate. È stato già dimostrato che la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è una risposta principale della pianta alla presenza di ioni Cd (Bae *et al.*, 2004). Nelle nostre analisi, infatti, una sovrapproduzione di ROS è stata evidente già dopo 5 giorni di trattamento con il Cd e ha continuato ad aumentare durante il corso dell'esperimento. La superossidismutasi, un enzima del sistema antiossidante, gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del quantitativo delle forme attive dell'ossigeno e, in particolare, i radicali anionici superossidi presenti in qualsiasi organismo. Quindi l'“up-regolazione” di tale enzima dovrebbe essere molto utile per detossificare i radicali anionici prodotti dallo stress da Cd. È stata trovata aumentare, inoltre, un'isoforma della tioredossina perossidasi. Quest'ultima è particolarmente attiva come antiossidante ed è regolata da stimoli endogeni o ambientali sia a livello di trascritti che a livello proteico (Dietz e Scheibe, 2004). Le tre isoforme della classe III delle perossidasi sono state viste essere “up-regolate” come risposta iniziale al Cd in *Arabidopsis thaliana* e *Arabidopsis halleri* (Cho *et al.*, 2003),

indicando che la stimolazione del metabolismo del solfato è quindi la più pronunciata e prominente risposta al Cd il quale induce un elevato consumo di zolfo ridotto.

È risaputo che in presenza di ROS il trasmettitore chimico NO può reagire con l'ossigeno e i superossidi, dando origine così a specie reattive dell'azoto (RNS) (Rinalducci *et al.*, 2008), tra i quali la forma protonata del perossinitrile (ONOOH) è la più reattiva (Halliwell e Gutteridge, 1981). Poiché entrambi i ROS e i RNS sono molecole altamente attive, esse ossidano ogni sorta di componente cellulare. In questo contesto, non sorprende di trovare l'arginasi essere "up-regolata". Questo enzima inibisce la produzione di ossido nitrico (NO) attraverso molti possibili meccanismi, incluso la competizione con NO sintasi (NOS) per il substrato L-Arginina (Durante *et al.*, 2007). L'arginasi catalizza anche la formazione della prolina, un aminoacido con numerosi e diversi ruoli in condizioni di stress osmotico, come la stabilizzazione della struttura della proteina, della membrana e della struttura cellulare così come funzioni di protezione della cellula attraverso la cattura o "scavenging" delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Kishor *et al.*, 2005).

Quando le specie reattive come ROS e RNS vengono sovraprodotte, la pianta può proteggersi a sua volta riducendo le altre attività, incluso la biosintesi delle proteine. In accordo con quanto premesso, la proteina chloroplast mRNA-binding CSP41, la 24kDa RNA binding, la 28 kDa RNA binding, la plastid-specific 30S e la 50S ribosomiale L12 sono state trovate tutte "down-regolate". La proteina chloroplast mRNA-binding CSP41 è una endoribonucleasi coinvolta nella sintesi della petD e/o nella degradazione del RNA (Yang *et al.*, 1996). Entrambe le proteine a 24 e a 28 kDa binding sono coinvolte in molteplici processi cellulari come il metabolismo, maturazione e stabilizzazione dell'mRNA (Loza-Tavera *et al.*, 2006). La proteina 50S ribosomiale L12 è anch'essa coinvolta nella sintesi delle proteine e svolge numerosi ruoli essenziali nell'accumulo di mRNA nel cloroplasto per uno svolgimento ottimale della sintesi proteica (Ferreira *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2003).

Infine. È stato notato che in un processo di esposizione prolungata a stress da Cd (circa 40 giorni) frammenti di proteina cominciano ad apparire nella regione a bassi pesi molecolari dei gel. Questo fatto molto probabilmente, è dovuto ad un aumento dell'attività proteolitica delle proteine denaturate, fenomeno precedentemente osservato in piante di *Arabidopsis* trattate con Cd (Sarry *et al.*, 2006) e comune quando i ROS vengono sovraprodotti (D'Amici *et al.*, 2007). In accordo con tutto ciò, la presenza del proteasoma 20S è in linea con quanto trovato e riportato da Kieffer (2008) che ha mostrato la sovra espressione della

sub unità α del proteasoma 20S, il quale conferisce resistenza al nichel, al Cd e al cobalto nel mais.

La modulazione di tutti questi enzimi nello spinacio e la comparsa di proteine frammentate, potrebbe essere interpretato con l'inizio di un meccanismo di risposta della cellula che potrebbe portare, se necessario, all'apoptosi.

Una domanda ricorrente in Fisiologia è inerente agli stress abiotici: quali dei cambiamenti osservati sotto certe condizioni sono specifici allo stimolo e quali sono le risposte secondarie al danneggiamento dovuto allo stress? Chiaramente, durante la senescenza, la "border line" è persa. Comunque, prendendo in considerazione tutti i dati ottenuti da questa analisi, un quadro emerge di cosa potrebbe accadere nelle foglie di spinacio durante lo stress da Cd. La pianta sembra reagire sovraproducendo fitochelatine per bloccare il Cd nelle foglie più basse, mentre induce alle foglie apicali di aumentare la velocità di fotosintesi per accumulare l'energia necessaria per l'intera pianta. Il metabolismo delle foglie basali viene concentrato esclusivamente sull'attivazione dei cicli dell'azoto e dello zolfo, richiesti per la sintesi di aminoacidi e molecole coinvolte nella chelazione del Cd fino a quando ci sarà una sovrapproduzione di ROS e probabilmente anche di RNS che obbligano la cellula a focalizzare la propria azione di difesa verso lo stress ossidativo e eventualmente convergere verso un'irreversibile senescenza. Come la foglia morta si stacca dalla pianta, essa espelle anche il Cd accumulato, e perciò lo rimuove completamente dalla pianta, prevenendo così ogni possibile accesso alle foglie apicali. Sebbene le foglie apicali originali vengano raggiunte da una piccola quantità di Cd, nuove foglie apicali continuano a crescere, permettendo alla pianta di espellere il suo antagonista quanto più possibile e fino alla durata dell'esposizione al metallo pesante. Tutti questi eventi potrebbero rappresentare un'attiva strategia di detossificazione nelle piante.

4. Bibliografia

Abdel-Basset, R.; Issa, A.A.; Adam, M.S. Chlorophyllase activity: effects of heavy metals and calcium. *Photosynthetica* **1995**, *31*, 421-425.

Adam, D.O.; Yang, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 170-174.

Alcántara, E.; Romera, F.J.; Cañete, M.; De la Guardia, M.D. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis Sativus* L.) plants. *J. Exp. Bot.* **1994**, *45*, 1893-1898.

Anelli, G.; Pelosi, P.; Galoppini, C. Influence of mercury on the amino acidic composition of tobacco leaves. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 1579-1582.

Aravind, P.; Prasad, M.N.V. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. *Plant Sci.* **2004**, *166*, 1321-1327.

Aro, E.M.; Soursa, M.; Rokka, A.; Allahverdiveva, Y.; Paakkarinen, V.; Saleem, A.; Battchikova, N.; Rintamaki, E. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 347-356.

Axelrod, H.L.; Abresch, E.C.; Paddock, M.L.; Okamura, M.Y.; Feher, G. Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} and Zn^{2+} in bacterial reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1542-1547.

Bae, W.; Chen, X. Proteomic study for the cellular responses to Cd^{2+} in *Schizosaccharomyces pombe* through amino acid-coded mass tagging and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mol. Cell Prot.* **2004**, *3*, 596-607.

Bandyopadhyay, D.; Chatterjee, A.K.; Datta, A.G. Effect of cadmium on purified hepatic flavokinase: involvement of reactive-SH group(s) in the inactivation of flavokinase by cadmium. *Life Sci.* **1997**, *60*, 1891-1903.

Barber, J. Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 619-631.

Baryl, A.; Carrier, P.; Frank, F.; Coulomb, C.; Sahut, C.; Havaux, M. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **2001**, *212*, 696-709.

Böddi, B.; Oravecz, A.R.; Lehoczi, E. Effect of Cadmium on organization and photoreduction of photochlorophyllide in dark-grown leaves and etioplast inner membrane preparations of wheat. *Photosynthetica* **1995**, *31*, 411-420.

Bolwell, G.P.; Bindsschedler, L.V.; Blee, K.A.; Butt, V.S.; Davies, D.R.; Gardner, S.L.; Gerrish, C.; Minibayeva, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1367-1376.

Bongi, G.; Loreto, F. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 533-545.

Brugière, N.; Jiao, S.; Hantke, S.; Zinselmeier, C.; Roessler, J.A.; Niu, X.; Jones, R.J.; Habben, J.E. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature and is induced by cytokinins, abscisic acid and abiotic stress. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1228–1240.

Cho, M.; Chardonnens, A.N.; Dietz, K.J. Differential heavy metal tolerance of *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*: a leaf slice test. *New Phytol.* **2003**, *158*, 287-293.

Ciambella, C.; Roepstorff, P.; Aro, E.M.; Zolla, L. A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* **2005**, *5*, 746-757.

Connolly, E.L.; Felt, J. P.; Guerinot, M. L. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **2002**, *14*, 1347-1357.

Dafré, A.L.; Sies, H.; Akerboom, T. Protein S-thiolation and regulation of microsomal glutathione transferase activity by the glutathione redox couple. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *332*, 288–294.

Dall'Osto, L.; Lico, C.; Alric, J.; Giuliano, G.; Havaux, M.; Bassi, R. Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light. *BMC Plant Biol.* **2006**, *6*, 32.

Dalle Donne, I.; Scaloni, A.; Butterfield, D.A. in *Redox Proteomics from protein modifications to cellular dysfunction and disease*. **2006**, Ed 1, Hoboken, NJ.

D'Amici, G.M.; Timperio, A.M.; Zolla, L. Coupling of native liquid phase isoelectrofocusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation. *J. Prot. Res.* **2008**, *7*, 1326-1340.

Das, P.; Samantaray, S.; Rout, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Poll.* **1998**, *96*, 29-36.

Davies, M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, *305*, 761-770.

De Knecht, J.A.; Van Dillen, M.; Koevoets, P.L.M.; Schat, H.; Verkleij, J.A.C.; Ernst, W.H.O. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci.* **1995**, *106*, 9-18.

Dekker, J.P.; Boekema, E.J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1706*, 12-39.

Dietz, K.J.; Scheibe, R. Redox regulation: an introduction. *Physiol. Plant.* **2004**, *120*, 1-3.

Durante, W.; Johnson, F.K.; Johnson, R.A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 906–911.

Fagioni, M.; D'Amici, G.M.; Timperio, A.M.; Zolla, L. Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J Prot Res* **2008**, ahead to reprint.

Fath, A.; Bethke, P.; Beligni, V.; Jones, R. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1273-1282.

Ferreira, S.; Hjerno, K.; Larsen, M.; Wingsle, G.; Larsen, P.; Fey, S.; Roepstorff, P.; Pais, M.S. Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. *Ann. Bot.* **2006**, *98*, 361-377.

Frenette Charron, J.B.; Ouellet, F.; Pelletier, M.; Danyluk, J.; Chauve, C.; Sarhan, F. Identification, expression and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 2017-2028.

Fuhrer, J. Early effects of excess cadmium uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* **1982b**, *5*, 263-270.

Fuhrer, J. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **1982a**, *70*, 162-167.

Gillet, S.; Decottignies, P.; Chardonnet, S.; Le Maréchal, P. Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. *Photosynth. Res.* **2006**, *89*, 201-211.

Goering, P.L.; Waalkes, M.P.; Klaassen, C.D. in: R.A. Goyer, M.G. Cherian (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 115, Toxicology of Metals, Biochemical Effects, Springer, New York, **1994**, pp. 189–214.

Greger, M.; Lindberg, S. Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beets (*Beta Vulgaris*). II. Net uptake and distribution of Mg²⁺, Ca²⁺ and Fe²⁺/Fe³⁺. *Physiol. Plant.* **1987**, *69*, 81-86.

Gries, G.E.; Wagner, G.J. Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta* **1998**, *204*, 390-396.

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

Grzyb, J.; Waloszek, A.; Latowski, D.; Więckowski, S. Effect of cadmium on ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase activity. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *8*, 1338-1346.

Gulisano, M.; Pacini, S.; Punzi, T.; Morucci, G.; Quagliata, S.; Delfino, G.; Sarchielli, E.; Marini, M.; Vannelli, G.B. Cadmium modulates proliferation and differentiation of human neuroblasts. *J. Neurosci. Res.* **2008**, 228-237.

Hajduch, M.; Rakwal, R.; Agrawal, G.K.; Yonekura, M. *et al.* High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa*) leaves: drastic reductions/ fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related protein. *Electrophoresis* 2001, *22*, 2824-2831.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* **1981**, *128*, 347-352.

Hernandez, L.F.; Carpena-Ruiz, R.; Garate, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutr.* **1996**, *19*, 1581-1598.

Hershko, A. Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15237-15240.

Hildebrandt, U.; Regvar, M.; Bothe, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 139-146.

Horváth, G., Droppa, M.; Oravecz, A.; Raskin, V.I.; Marder, J.B. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of the cadmium-poisoned barley leaves. *Planta* **1996**, *199*, 238-243.

Houot, L.; Floutier, M.; Marteyn, B.; Michaut, M.; Picciocchi, A.; Legrain, P.; Aude, J.C.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator. *BMC Genomics* **2007**, *8*, 350.

Iametti, S.; Uhlmann, H.; Sala, N.; Bernhardt, R.; Raggi, E.; Bonomi, F. Reversible, non-denaturing metal substitution in bovine adrenodoxin and spinach ferredoxin and the different reactivities of [2Fe-2S]-cluster-containing proteins. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 818-826.

Iannelli, M.A.; Pietrini, F.; Fiore, L.; Petrilli, L.; Massacci, A. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 977-982.

Ievinsh, G.; Romanovskaya, O.I. Accelerated lignification as a possible mechanism of growth in winter rye seedlings caused by ethephon and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiol. Biochem.* **1991**, *29*, 327-331.

Inouhe, M.; Ninomiya, S.; Tohoyama, H.; Joho, M.; Murayama, T. Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants. *J. Plant Res.* **1994**, *107*, 201-207.

International Agency for Research on Cancer Monographs, vol. 58, Cadmium, IARC Press, Lyon, **1993**, pp. 119–238.

Jansson, S.; Andersen, B.; Scheller, H.V. Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant. Physiol.* **1996**, *112*, 409-420.

Jungmann, J.; Reins, H.A.; Schobert, C.; Jentsch, S. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* **1993**, *361*, 369-371.

Kieffer, P.; Dommes, J.; Hoffmann, L.; Hausman, J.F.; Renaut, J. Quantitative changes in protein expression of Cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* **2008a**, *8*, 2514-2530.

Kieffer, P.; Planchon, S.; Oufir, M.; Ziebel, J.; Dommes, J.; Hoffmann, L.; Hausman, J.F.; Renaut, J. Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *J. Prot. Res.* Ahead to reprint.

Kishor, P.B.K., Sangam, S.; Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P.; Naidu, K.R.; Rao, K.R.S.S.; Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* **2005**, *88*, 424-438.

Klaassen, C.D. Pharmacokinetics in metal toxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1981**, *1*, 353.

Klaassen, C.D.; Liu, J., Choudhuri, S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, *39*, 267-294.

Kneer, R.; Zenk, M.H. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2663-2667.

Krotz, R.M.; Evangelou, B.P.; Wagner, G.J. Relationship between cadmium, zinc, Cd-binding peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* **1989**, *91*, 781-787.

Krupa, Z. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex II in radish cotyledons. *Physiol. Plant.* **1987**, *73*, 518-524.

Krupa, Z.; Baszyński, T. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol. Plant* **1995**, *17*, 177-190.

Küpper, H.; Küpper, F.; Spiller, M. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynth. Res.* **1998**, *58*, 123-133.

Latowski, D.; Kruk, J.; Strzałka, K. Inhibition of zeaxanthin epoxidase activity by cadmium ions in higher plants. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2081-2087.

Leita, L.; Analysis of intracellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *J. Plant Nutr.* **1996**, *19*, 527-533.

Lemaire, S.; Keryer, E.; Stein, M.; Schepens, I.I.; Issakidis-Bourguet, E.; Gérard-Hirne, C.; Miginiac-Maslow, M.; Jacquot, J.P. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Physiol.* **1999**, *120*, 773-778.

Levine, R.L.; Williams, J.A.; Stadtman, E.R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Met. Enzimol.* **1994**, *233*, 346-357.

Liu, D.; Jiang, W.; Wang, W.; Zhai, L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test. *Isr. J. Plant Sci.* **1995**, *43*, 125–133.

Liu, J.J.; Ekramoddoullah, A.K.M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant. Path.* **2006**, *68*, 3-13.

Loeffler, S.; Hochberger, A.; Grill, E.; Gekeler, W.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metal by the reaction product. *FEBS Lett.* **1989**, *258*, 42-46.

Loza-Tavera, H.; Vargas-Suarez, M.; Diaz-Mireles, E.; Torres-Marquez, M.E.; De La Vara, L.E.; Moreno-Sanchez, R.; Gruissem, W. Phosphorylation of the spinach chloroplast 24 kDa RNA-binding protein (24RNP) increases its binding to petD and psbA 3' untranslated regions. *Biochimie* **2006**, *88*, 1217-1228.

Matthews, B.F. Lysine, threonine and methionine biosynthesis. In Singh BK (ed) *Plant amino acids. Biochemistry and biotechnology.* **1999** Marcel Dekker p206.

Mehra, R.K.; Tripathi, R.D. Phytochelatins and metal tolerance. In Environmental and metal tolerance. pp 367-379

Moontongchoon, P.; Chadchawan, S.; Leepipatpiboon, N.; Akaracharanya, A.; Shinmyo, A.; Sano, H. Cadmium-tolerance of transgenic *Ipomoea aquatica* expressing serine acetyltransferase and cysteine synthase. *Plant Biotech.* **2008**, *25*, 201-203.

Mullet, J.E. Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *39*, 475–502.

Neumann, D.; Lichtenberger, O.; Gunther, D.; Tschiersch, K.; Nover, L. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in igher plants. *Planta* **1994**, *194*, 360-367.

Nishizono, H.; Kubota, K.; Suzuki, S.; Ishii, F. Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* root from metalliferous habitats. *Plant Cell Physiol.* **1989**, *30*, 595-598.

Nocito, F.F.; Lancilli, C.; Giacomini, B.; Sacchi, G.A. Sulfur metabolism and cadmium stress in higher plants. *Plant Stress* **2007**, *1*, 142–156.

Nomata, J.; Ogawa, T.; Kitashima, M.; Inoue, K.; Fujita, Y. NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters. *FEBS Letters* **2008**, *582*, 1346-1350.

Nováková, M.; Matějova, E., Sofrová, D. Cd²⁺ effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus Elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Photosynthetica* **2004**, *42*, 425-430.

Paddock, M.L.; Graige, M.S.; Feher, G.; Okamura, M.Y. Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: inhibition of proton transfer by binding of Zn²⁺ or Cd²⁺. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6183-6188.

Padmaja, K.; Prasad, D.D.K.; Prasad, A.R.K. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* **1990**, *24*, 399-405.

Peng, L.; Ma, J.; Chi, W.; Guo, J.; Zhu, S.; Lu, Q.; Lu, C.; Zhanga, L. Low PSII accumulation¹ is Involved in Efficient Assembly of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **2006**, *18*, 955-969.

Pennazio, S.; Roggero, P. Effect of cadmium and nickel on ethylene biosynthesis in soybean. *Biol. Plant.* **1992**, *34*, 345-349.

Perfus-Barbeoch, L.; Leonhardt, N.; Vavasseur, A.; Forestier, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* **2002**, *32*, 539–548.

Pietrini, F.; Iannelli, M.A.; Pasqualini, S.; Massacci, A. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant. Physiol.* **2003**, *133*, 829-837.

Prasad, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Env. Exp. Bot.* **1995**, *35*, 525-545.

Ramos, I.; Esteban, E.; Lucena, J.J.; Garate, A. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci.* **2002**, *162*, 761–767.

Rauser, W.E. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant. Physiol.* **1995**, *109*, 1141–1149.

Rea, G.; Volpicella, M.; De Leo, F.; Zolla, L.; Gallerani, R.; Ceci, L.R. Characterization of three members of the multigene family coding for isoforms of the chlorophyll a/b binding protein Lhcb1 in spinach. *Physiol. Plant.* **2007**, *130*, 167-176.

Repetto, O.; Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Berta, G.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae* inoculated pea roots. *New Phytol.* **2003**, *157*, 555–567.

Requena, N.; Perez-Solis, E.; Azcon-Aguilar, C.; Jeffries, P.; Barea, J.M. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Micro.* **2001**, *67*, 495-498.

Rigon, A.P.; Cordova, F.M.; Oliveira, C.S.; Posser, T.; Costa, A.P.; Silva, I.G.; Santos, D.A.; Rossi, F.M.; Rocha, J.B.T.; Leal, R.B. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38. *Neurotoxicology* **2008**, *29*, 727-734.

Rinalducci, S.; Murgiano, L.; Zolla, L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3781 - 3801.

Rodecap, K.D.; Tingey, D.T.; Tibbs, J.H. Cadmium-induced ethylene production in bean plants. *Z Pflanzenphysiol.* **1981**, *105*, 65-74.

Rousseau, F.; Sétif, P.; Lagoutte, B. Evidence for the involvement of PSI-E subunit in the reduction of ferredoxin by photosystem I. *EMBO J.* **1993**, *12*, 1755-1765.

Salt, D.E.; Prince, R.C.; Pickering, I.J.; Raskin, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* **2004**, *109*, 1427-1433.

Sandalio, L.M.; Dalurzo, H.C.; Gómez, M.; Romero-Puertas, M.C.; del Río, L.A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 2115-2126.

Sanità di Toppi, L.; Gabrielli, R. Repsonde to cadmium in higher plants. *Env. Exp. Bot.* **1999**, *41*, 105-130.

Sarry, J.E.; Kuhn, L.; Ducruix, C.; Lafaye, A.; Junot, C.; Hugouvieux, V.; Jourdain, A.; Bastien, O.; Fievet, J.B.; Vailhen, D.; Amekraz, B.; Moulin, C.; Ezan, E.; Garin, J.; Bourguignon, J. The early response of *Arabidopsis Thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **2006**, *6*, 2180-2198.

Sárvári, É.; Fodor, F.; Cseh, E.; Varga, A.; Záray, G.; Zolla, L. Relationship between changes in ion content of leaves and chlorophyll- protein composition in cucumber under Cd and Pb stress. *Z Naturforsch* **1999**, *54c*, 746-753.

Sas, K.N.; Kovács, L.; Zsíros, O.; Gombos, Z.; Garab, G.; Hemmingsen, L.; Danielsen, E. Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria *in vivo* and *in vitro* studies using perturbed angular correlation of γ -rays. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 725-734.

Scheller, H.V.; Huang, B.; Hatch, E.; Goldsbrough, P.B. Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* **1987**, *85*, 1031-1035.

Schützendübel, A.; Nikolova, P.; Rudolf, C.; Polle, A. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 577-584.

Shah, K.; Dubey, R.S. Effect of cadmium on RNA levels as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **1995**, *33*, 577-584.

Siedlecka, A.; Krupa, Z. Cd/Fe interaction in higher plants- its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* **1999**, *36*, 321-331.

Siedlecka, A.; Baszyński, T. Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplast of Cd-treated plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiol. Plant.* **1993**, *87*, 199-202.

Sigfridsson, K.G.V.; Bernát, G.; Mamedov, F.; Styring, S. Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1659*, 19-31.

Sirijovski, N.; Lundqvist, J.; Rosenbäck, M.; Elmlund, H.; Al-Karadaghi, S.; Willows, R.D.; Hansson, M. Substrate-binding model of the chlorophyll biosynthetic magnesium chelatase BchH subunit. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11652-11660.

Slebos, R.J.C., Li, M.; Evjen, A.N.; Coffa, J.; Shyr, Y.; Yarbrough, W.G. Mutagenic effect of cadmium on tetranucleotide repeats in human cells. *Mut. Res.* **2006**, *602*, 92-99.

Smeets, K.; Cuypers, A.; Lambrechts, A.; Semane, B.; Hoet, P.; Van Laere, A.; Vangronsveld, J. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant. Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 437-444.

Smirnoff, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff N (ed), *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Accumulation*, BIOS Scientific Publishers, **1995**, Oxford. pp 217-243.

Somashekaraiah, B.V.; Padmaja, K.; Prasad, A.R.K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* **1992**, *85*, 85-89.

Speiser, D.M.; Abrahamson, S.L.; Banuelos, G.; Ow, D.W. *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulphide complex. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 817-821.

Stiborova, M. Cd²⁺ ions affect the quaternary structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from barley leaves. *Biochemia Physiologia Pflanzen* **1988**, *183*, 371-378.

Stobart, A. K.; Griffiths, W. T.; Ameen-Bukhari, I.; and Sherwood, R. P. The effects of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* **1985**, *63*, 293-298.

Strasdeit, H.; Duhme, A.K.; Kneer, R.; Zenk, M.H.; Hermes, C.; Nolting, H.F. Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1991**, *16*, 1129-1130.

Styring, S.; Rutherford, A.W. In the oxygen-evolving complex of photosystem II the S₀-state is oxidized to S₁-state by D⁺ (signal II_{slow}). *Acc. Pubbl. Biochem.* **1987**, *26*, 2401-2405.

Szalontai, B.; Horvath, L.I.; Debreczeny, M.; Droppa, M.; Horvath, G. Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform

infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photosynth. Res.* **1999**, *61*, 241-252.

Timperio, A.M.; D'Amici, G.M.; Barta, C.; Loreto, F.; Zolla, L. Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 3695-3710.

Timperio, A.M.; Egidi, M.G.; Zolla, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* **2008**, *71*, 391-411.

Tumová, E.; Sofrová, D. Response of intact cyanobacterial cells and their photosynthetic apparatus to Cd²⁺ ion treatment. *Photosynthetica* **2002**, *40*, 103–108.

Vassilev, A.; Yordanov, I.; Tsonev, T. Effects of Cd²⁺ on the physiological state and photosynthetic activity of young barley plants. *Photosynthetica* **1997**, *34*, 293-302.

Verkleij, J.A.C.; Koevoets, P.; Van't Riet, J.; Bark, R.; Mijdam, Y.; Ernst, W.H.O. poly(γ -glutamylcysteinyl)-glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant Cell Environ.* **1990**, *13*, 913-921.

Vögeli-Lange, R.; Wagner, G.J. Relationship between cadmium. Glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.* **1996**, *114*, 11-18.

Vranová, E.; Inzé, D.; Van Breusegem, F. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1227-1236.

Waalkes, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *79*, 241-244.

Wagner, G.J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* **1993**, *51*, 173-212.

Watanabe, M.; Henmi, K.; Ogawa, K.; Suzuki, T. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-

photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol Part C* **2003**, 134, 227–234.

Whitelaw, C.A.; Le Huquet, J.A.; Thurman, D.A.; Tomsett, A.B. The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol. Biol.* **1997**, 33, 503-511.

Whitelegge, J.P.; Laganowsky, A.; Nishio, J.; Souda, P.; Zhang, H.; Cramer, W.A. Sequencing covalent modifications of membrane proteins. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 1515-1522.

Whitfield, P.R., Bottomley, W. Organization and structure of chloroplast genes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1983**, 34, 270- 310.

Yamaguchi, K.; Subramanian, A.R. Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit: PSRP-2 (U1A-type domains), PSRP-3 α/β (ycf65 homologue) and PSRP-4 (Thx homologue). *FEBS J.* **2003**, 270, 190-205.

Yang, J.; Schuster, G.; Sternai, D.B. CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA protein, is an endoribonuclease. *Plant Cell* **1996**, 8, 1409-1420.

Yu, S.G., Romanowska, E., Xue, Z.T., [Albertsson, P.A.](#) Evidence for two different Rieske iron-sulfur proteins in the cytochrome bf complex of spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1185, 239-242.

Zhu, Y.L.; Pilon-Smits, E.A.H.; Tarun, A.S.; Weber, S.U.; Jouanin, L.; Terry, N. Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* **1999**, 121, 1169-1177.

Zolla, L.; Rinalducci, S.; Timperio, A.M.; Huber, C.G. Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species: analysis and comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Photosystem I. *Plant Physiol.* **2002**, 130, 1938-1950.

Zolla, L.; Rinalducci, S.; Timperio, A.M.; Huber, C.G.; Righetti, P.G. Intact mass measurements for unequivocal identification of hydrophobic photosynthetic photosystem I and II antenna proteins. *Electrophoresis* **2004**, 25, 1353-1366.

Zolla, L.; Timperio, A.M.; Walcher, W.; and Huber, C.G. Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species: analysis and comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Photosystem II. *Plant Physiol.* **2003**, 131, 198-214.

5. PUBBLICAZIONI

Proteomic investigation on Spinach root after long term exposure to Cd treatment.

Marco Fagioni and Lello Zolla. Journal of Proteome Research (submitted)

Does the different proteomic profile found in apical and basal leaves of spinach reveal a plant strategy towards cadmium pollution response?

Marco Fagioni and Lello Zolla. Journal of Proteome Research (submitted)

Thylakoid proteomics of Indian mustard grown under Fe-deficiency and Cd-stress using 2D Blue-native-SDS-PAGE and ESI-MS/MS.

Mohammed Irfan Qureshi, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, Sara Rinalducci, Lello Zolla. Electrophoresis (submitted)

Proteomic analysis of thylakoid membrane multiprotein complexes showing a structural reorganization in response to high cadmium treatment (in spinach basal leaves).

Marco Fagioni, Gian Maria D'Amici, Anna Maria Timperio, Lello Zolla, J. Prot. Res. (ahead to reprint)

Early production of phytoalexin resveratrol during grape flower infected by Botrytis cinerea.

Anna Maria Timperio, Marco Fagioni, Paolo Magro, Lello Zolla. J. Agric. Food Chem. (submitted)

Chemically enhanced liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of glutamic acid in the diffusion medium of retinal cells.

Timperio AM, Fagioni M, Grandinetti F, Zolla L. Biomed Chromatogr. 2007 Oct;21(10):1069-76.

6. COMUNICAZIONI A CONGRESSI

30 August- 2 September 2008 10th International *Fusarium* and *Fusarium* Genomics Workshop 2008 – Alghero (SS)

WHEAT TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING A BEAN PGIP SUPPORT A ROLE FOR POLYGALACTURONASE ACTIVITY IN THE INITIAL STAGE OF WHEAT INFECTION BY *FUSARIUM GRAMINEARUM*.

Janni, M.; Benedettelli, S.; Blechl A.E.; Favaron, F.; Stella, L.; Fagioni, M.; Zolla, L. and D'Ovidio, R.

11-14 june 2008 3rd ItPA (Italian Proteomic Association) annual national congress Fasano (Brindisi)

PROTEOMIC, PIGMENT COMPOSITION, AND ORGANIZATION OF THYLAKOID MEMBRANES IN CADMIUM TREATED SPINACH LEAVES

Fagioni, M.; D'Amici, G.M.; Timperio, A.M; Zolla, L.

26-29 June 2007 2nd ItPA (Italian Proteomic Association) annual national congress Acitrezza (Catania)

Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during storage. Gian Maria D'Amici, Sara Rinalducci, Marco Fagioni and Lello Zolla.

A new two dimensional blue native method coupled with mass spectrometry for proteomic study of thylakoid membrane proteins under stress conditions. Anna Maria Timperio, Sara Rinalducci, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni and Lello Zolla.

10-15 September 2006 XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana sci 2006 Firenze (Italy)

Studio cinetico delle alterazioni subite dalle proteine della membrana eritrocitaria durante i 42 giorni di stoccaggio del sangue ad uso trasfusionale. Gian Maria D'Amici, Francesca Rosetto, Sara Rinalducci, Anna Maria Timperio, Marco Fagioni and Lello Zolla.

Protome analysis in iron-deficient chloroplast of spinaci. Anna Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni and Lello Zolla.

2-4 July 2006 1st ItPA (Italian Proteomic Association) annual national congress “Proteomics: deciphering the phenotype”. Pisa (Italy)

Proteomic profile of iron-deficient spinach thylakoids by both blue native SDS-PAGE and chromatographic approaches. Anna Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni and Lello Zolla.

Proteomic study of proteins alterations of erythrocyte membrane proteins during blood storage for clinical use. Gian Maria D'Amici, Francesca Rosetto, Sara Rinalducci, Marco Fagioni, Anna-Maria Timperio and Lello Zolla.

5-8 November 2005 Life in Extreme Environments, organizzato dalla European Science Foundation (ESF). Sant Feiu de Guixols (Catalonia), Spain.

Formation of truncated proteins and high-molecular-mass aggregates upon short (soft) illumination of thylakoid membrane. Sara Rinalducci, Anna Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni and Lello Zolla.

28 Giugno-1 Luglio 2005 Massa 2005 Rome (Italy)

Protein pre-fractionation by three-phase system of thylakoid membrane proteins to facilitate 2D-IEF/SDS-PAGE and MS identification. Gian Maria D'Amici, Sara Rinalducci, Paolo Antonioli, Corrado Ciambella, Marco Fagioni, Anna-Maria Timperio, Pier Giorgio Rigetti and Lello Zolla.

27-29 May 2005 2nd IPSO Congress. Viterbo.

Proteomics of thylakoid membranes proteins from iron-deficient spinach plants. Corrado Ciambella, Peter Roepstorff, Sara Rinalducci, Anna-Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, and Lello Zolla.

Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography –mass spectrometry. Christian G. Huber, Walcher W., Anna-Maria Timperio, Troiani Sonia, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, and Lello Zolla.

Chemical modification, by environment friendly oxidative catalysis.

Mincione Enrico, Bernini Roberta, Provenzano Gianfranco, Fagioni Marco.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo lavoro desidero esprimere i miei più sentiti ringraziamenti innanzi tutto al Prof. Lello Zolla per i preziosi suggerimenti e le critiche costruttive e la fiducia

dimostratami in questi anni. Ringrazio in maniera particolare la Dr.ssa Anna Maria Timperio per il costante aiuto, incoraggiamento e i suoi preziosi insegnamenti. Ringrazio oltremodo la Dr.ssa Sara Rinalducci per la costanza nella sopportazione e nei continui suggerimenti.

Un pensiero particolare va a tutto il gruppo per la grande amicizia dimostratami e a tutte le persone incontrate in questi anni: Dr. Mohd Irfan Qureshi, Dr. Gian Maria D'Amici, Dr.ssa Fabiana Piccioni, Dr.ssa Maria Giulia Egidi, Dr. Leonardo Murgiano, Dr.ssa Federica Gevi e tutte coloro, nessuno escluso, che ho avuto il piacere di conoscere in questi anni.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia per la pazienza avuta e per il continuo appoggio.

Desidero infine ringraziare il Prof. Giorgio Prantera, Coordinatore del Dottorato in Genetica e Biologia Cellulare, per la sua infinita disponibilità.