



Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Vegetali XVIII Ciclo

**Contributo ad una migliore conoscenza
del genoma e del proteoma di endosperma di frumento
attraverso espressione eterologa e studi funzionali
di singoli polipeptidi**

settore scientifico-disciplinare AGR- 07

Relatore

Prof.ssa Stefania Masci

Dottoranda

Dr.ssa Paola Ferrante

Coordinatore del corso di Dottorato

Prof. Domenico Lafiandra

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto la Prof.ssa Stefania Masci che, oltre a seguirmi scrupolosamente ed attivamente nell'attività di ricerca svolta in questi tre anni di Dottorato, ha saputo trasmettermi parte dell'entusiasmo e della fiducia tipici del suo carattere solare e disponibile. Desidero inoltre ringraziare il Prof. Lafiandra per l'esperta supervisione dell'attività di ricerca svolta nel corso del Dottorato ed il Prof. Renato D'Ovidio per i materiali messi a disposizione ma soprattutto per i validi ed utili consigli relativi alla parte di Biologia Molecolare trattata in questa tesi.

Vorrei inoltre ringraziare Chiara Patacchini che mi ha introdotto allo studio delle proteine del glutine, Emanuele Cannarella e Francesco Sestili per avermi trasmesso parte delle loro valide conoscenze informatiche e bioinformatiche, Gabriella Razzino per la sua assistenza tecnica fornita nella parte riguardante la purificazione della γ -gliadina tramite RP-HPLC e Chiara Volpi per il suo valido aiuto nella parte riguardante la purificazione delle proteine eterologhe da *E. coli*.

Un grazie sentito e sincero va a Fabrizio e alla mia famiglia che mi hanno sostenuto ed incoraggiato durante tutto il periodo relativo al Dottorato di Ricerca, trascorso a Viterbo.

Ringrazio e saluto infine tutti i miei colleghi di laboratorio: Michela Di Giovanni, Anna Farina, Daniela Ferri, Angela Giovangrossi, Michela Janni, Anna Maria Monari, Arianna Saliola, Federico Scossa ed Alessia Tomassini.

INDICE

	RIASSUNTO.....	I
1	INTRODUZIONE	1
1.1	IL FRUMENTO	1
1.1.1	Importanza economica del frumento	1
1.1.2	Origine del frumento	2
1.1.3	Cenni sulla struttura e sulla composizione della cariosside	4
1.1.3.1	Amido	5
1.1.3.2	Lipidi	6
1.1.3.3	Proteine.....	6
1.1.4	Glutine e proprietà visco-elastiche	7
1.1.4.1	Gliadine	9
1.1.4.2	Glutenine	12
1.1.4.2.1	Subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS).....	12
1.1.4.2.2	Subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS).....	15
1.1.4.2.3	Sintesi, maturazione e trasporto delle LMW-GS	20
1.1.4.2.4	Struttura dei polimeri gluteninici.....	21
1.2	REOLOGIA.....	23
1.2.1	Strumenti per valutare le caratteristiche reologiche degli impasti	23
1.2.2	Mixografo: breve descrizione ed applicazioni	24
1.2.3	Test di addizione e di incorporazione.....	25
1.3	ESPRESSIONE ETEROLOGA	28
1.3.1	Espressione eterologa di proteine in <i>Escherichia coli</i>	28
1.3.2	Espressione eterologa di proteine in <i>Nicotiana benthamiana</i> tramite il virus PVX	29
2	SCOPO DEL LAVORO.....	31
3	MATERIALI E METODI	34
3.1	MATERIALI	34
3.1.1	Cloni codificanti la gliadina di tipo α e la gliadina di tipo γ	34

3.1.2	Clone codificante la LMW-GS B1133	34
3.1.3	Materiale vegetale.....	35
3.2	MANIPOLAZIONE DEL DNA.....	35
3.2.1	Clonaggio della LMW-i (LMW1A1) e subclonaggio delle gliadine di tipo α e di tipo γ nel vettore pDest 14 tramite la tecnologia <i>Gateway</i>	35
3.2.1.1	Tecnologia <i>Gateway</i> : descrizione del metodo.....	35
3.2.1.2	Isolamento del gene codificante la LMW1A1 dal DNA genomico di <i>Triticum durum</i> cv. Langdon.....	40
3.2.1.3	Preparazione dei prodotti di PCR corrispondenti alle sequenze geniche codificanti la LMW1A1 e le gliadine di tipo α e γ fiancheggiati dai siti attB	41
3.2.1.4	Reazione BP	42
3.2.1.5	Reazione LR	43
3.2.2	Subclonaggio della sequenza genica codificante la LMW-GS B1133 (<i>wild type</i> e T23N) e clonaggio del gene LMW-GS 42K (<i>wild type</i> e N23T) in pPVX201 per l'espressione transiente in <i>Nicotiana benthamiana</i>	44
3.2.2.1	Clonaggio della LMW-GS 42K nel vettore pBluescript SK (+/-).....	44
3.2.2.1.1	Isolamento delle sequenze geniche codificanti la LMW-GS 42K dal DNA genomico di <i>Triticum durum</i> cv. Yecora Rojo e clonaggio nel vettore pCR-Blunt II-TOPO	44
3.2.2.1.2	Subclonaggio della LMW-GS 42K nel vettore pBluescript SK (+/-)	45
3.2.2.2	Mutagenesi T23N della LMW-GS B1133 e N23T della LMW-GS 42K tramite il <i>QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (Stratagene).....	46
3.2.2.3	Subclonaggio della LMW-GS B1133 <i>wild type</i> e mutata (T23N) nel vettore pPVX201	48
3.2.2.4	Subclonaggio della LMW-GS 42K <i>wild type</i> e mutata (N23T) nel vettore pPVX201	48
3.2.3	Reazioni di sequenziamento dei cloni ottenuti	49
3.2.4	Digestione di DNA con enzimi di restrizione	50
3.2.5	Reazione di ligazione	50
3.2.6	Elettroforesi di DNA su gel di agarosio	51
3.3	PURIFICAZIONE DI DNA	51
3.3.1	Estrazione di DNA genomico.....	51

3.3.2	Minipreparazione di DNA plasmidico da <i>E. coli</i>	52
3.3.3	Midipreparazione di DNA plasmidico da <i>E. coli</i>	53
3.3.4	Purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio	54
3.4	TECNICHE MICROBIOLOGICHE	54
3.4.1	Ceppi batterici	54
3.4.1.1	Ceppi batterici per la propagazione di DNA plasmidico	54
3.4.1.2	Ceppi batterici per l'espressione in <i>Escherichia coli</i>	55
3.4.2	Mezzi di coltura batterica	55
3.4.3	Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	56
3.4.4	Trasformazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	56
3.5	ESPRESSIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI	57
3.5.1	Espressione in <i>Escherichia coli</i>	57
3.5.1.1	Preinoculo	57
3.5.1.2	Inoculo ed induzione	57
3.5.1.3	Cinetica di accumulo del polipeptide eterologo	57
3.5.2	Espressione transiente in <i>Nicotiana benthamiana</i>	58
3.5.2.1	Crescita di piante di <i>Nicotiana benthamiana</i>	58
3.5.2.2	Infezione di piante di <i>Nicotiana benthamiana</i>	58
3.6	TECNICHE BIOCHIMICHE	58
3.6.1	Estrazione di proteine	58
3.6.1.1	Estrazione delle proteine totali da <i>E. coli</i>	58
3.6.1.2	Estrazione dei corpi di inclusione da colture di <i>E. coli</i> indotte	59
3.6.1.3	Estrazione delle proteine totali da tessuto fogliare di <i>Nicotiana benthamiana</i>	59
3.6.1.4	Purificazione della LMW-GS B1133 da tessuto fogliare di <i>Nicotiana benthamiana</i>	60
3.6.1.5	Estrazione della frazione gluteninica da farina ottenuta dalla macinazione di cariossidi o dall'impasto ricostituito e di controllo liofilizzato per analisi IEF X SDS-PAGE	60
3.6.1.6	Riduzione ed alchilazione della LMW1A1 e della γ -gliadina estratte dai corpi di inclusione di <i>E. coli</i> per l'analisi IEF X SDS-PAGE	61
3.6.2	Tecniche elettroforetiche, trasferimento su membrana PVDF per rilevamento con anticorpo (Western blotting) e sequenziamento N-terminale	61

3.6.2.1	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE).....	61
3.6.2.2	Western blotting	62
3.6.2.3	Analisi elettroforetica bidimensionale: isoelettrofocalizzazione in prima dimensione e SDS-PAGE in seconda dimensione (IEF X SDS-PAGE).....	63
3.6.2.4	Trasferimento su membrana PVDF per il sequenziamento N-terminale	64
3.6.3	Tecniche cromatografiche	64
3.6.3.1	Cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) per l'isolamento della γ -gliadina modificata dalla frazione gluteninica della cv. Lira biotipo 45	64
3.6.3.2	RP-HPLC delle frazioni gliadiniche e gluteniniche estratte da impasti ricostituiti e di controllo ottenuti dalla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45	65
3.6.3.3	SE-HPLC delle frazioni polimeriche solubili ed insolubili estratte da impasti ricostituiti e di controllo ottenuti dalla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45	66
3.6.4	Digestione proteolitica della γ -gliadina alchilata e purificata	66
3.7	TECNICHE MICRO-MIXOGRAFICHE	67
3.7.1	Determinazione del contenuto di umidità percentuale e del contenuto proteico della semola della cv. Lira biotipo 42 e 45.....	67
3.7.2	Determinazione del contenuto di umidità percentuale e del contenuto proteico della farina della cv. Kukri	67
3.7.3	Esperimenti di incorporazione.....	68
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	70
4.1	CLONAGGIO ED ESPRESSIONE ETEROLOGA DELLA LMW1A1 IN <i>E. COLI</i>	70
4.1.1	Isolamento del gene codificante la LMW1A1 dal DNA genomico di <i>Triticum durum</i> cv. Langdon.....	70
4.1.2	Clonaggio della LMW1A1 nel vettore di espressione pDest14	70
4.1.3	Espressione della LMW-1A1 in <i>E. coli</i>	73
4.1.4	Dimostrazione dell'espressione <i>in vivo</i> del polipeptide LMW1A1 e localizzazione nella frazione polimerica del glutine	76
4.2	SUBCLONAGGIO DELLE GLIADINE DI TIPO α E γ NEL VETTORE DI ESPRESSIONE pDEST14 ED ANALISI	

DELL'ESPRESSIONE ETEROLOGA.....	78
4.2.1 Subclonaggio dell' α gliadina e della γ -gliadina nel vettore di espressione pDest14.....	78
4.2.2 Espressione della γ -gliadina in <i>E. coli</i>	80
4.2.3 Analisi elettroforetica bidimensionale (IEF X SDS-PAGE) per individuare lo spot corrispondente alla γ -gliadina in frumento duro cv. Lira biotipo 45	83
4.2.4 Dimostrazione dell'espressione <i>in vivo</i> della γ -gliadina modificata e della sua appartenenza alla frazione aggregata del glutine.....	83
4.2.5 Espressione dell' α -gliadina in <i>E. coli</i>	88
4.3 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLA LMW1A1 E DELLA γ -GLIADINA MODIFICATA TRAMITE ESPERIMENTI DI INCORPORAZIONE EFFETTUATI MEDIANTE IL MICRO-MIXOGRAFO	90
4.3.1 Test preliminari per mettere a punto le condizioni di incorporazione.....	90
4.3.2 Test di incorporazione in frumento tenero	91
4.3.3 Test di incorporazione in frumento duro cv. Lira biotipo 42 e 45.....	93
4.3.4 Dimostrazione della localizzazione della LMW1A1 e della γ -gliadina modificata nella frazione gluteninica degli impasti della cv. Lira biotipo 42 e 45 tramite elettroforesi bidimensionale (IEF X SDS-PAGE), SE-HPLC, RP-HPLC	95
4.3.5 Considerazioni finali riguardanti gli esperimenti di incorporazione eseguiti in frumento duro.....	98
4.4 ESPRESSIONE IN <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> DELLA LMW-GS B1133 E DELLA LMW-GS 42K, <i>WILD TYPE</i> E MUTAGENIZZATE NEL SITO 23	100
4.4.1 Subclonaggio della LMW-GS B1133 <i>wild type</i> e mutagenizzata nel sito 23 (LMW-GS B1133T23N) nel vettore di espressione pPVX201.....	100
4.4.1.1 Mutagenesi del sito 23 della LMW-GS B1133 e clonaggio in pPVX201.....	100
4.4.1.2 Subclonaggio della LMW-GS B1133 <i>wild type</i> nel vettore pPVX201	103
4.4.1.3 Infezione ed analisi dell'espressione della LMW-GS B1133 <i>wild type</i> e della LMW-GS B1133T23N in <i>Nicotiana benthamiana</i>	105
4.4.1.4 Purificazione della LMW-GS B1133 <i>wild type</i> e della LMW-GS B1133T23N dal tessuto infetto di <i>Nicotiana benthamiana</i>	107

4.4.2	Clonaggio della LMW-GS 42K <i>wild type</i> e mutata nel sito 23 (LMW-GS 42KN23T) nel vettore di espressione pPVX201	108
4.4.2.1	Clonaggio del gene codificante la LMW-GS 42K nel vettore pCR-Blunt II- TOPO.....	108
4.4.2.2	Mutagenesi sito-specifica N23T della LMW-GS 42K.....	114
4.4.2.3	Inserimento di una coda di istidine al C-terminale della LMW-GS 42K <i>wild type</i> e della LMW-GS 42KN23T.....	115
4.4.2.4	Analisi dell'espressione della LMW-GS 42K nel tessuto fogliare di tabacco.....	115
5	CONCLUSIONI	117
6	BIBLIOGRAFIA	123

1 INTRODUZIONE

1.1 IL FRUMENTO

1.1.1 Importanza economica del frumento

Il frumento è attualmente la specie più largamente coltivata, in un'area che va dalla Scandinavia all'Argentina, comprendendo anche zone ad una elevata altitudine nelle regioni tropicali e subtropicali (Tabella 1). Inoltre, è il prodotto primario più consumato al mondo, di cui circa il 65% viene utilizzato per l'alimentazione umana, il 21% per quella animale, l' 8% come semente ed il restante 6% per altri usi compreso quello industriale (Orth and Shellenberger, 1988).

Area geografica	produzione nel 2004 (milioni di tonnellate)
Mondo	624.093.306
Africa	21.203.517
Asia	253.816.080
Europa	216.731.771
Nord e Centro America	85.856.007
Oceania	22.843.010
Sud America	23.642.921

Tab. 1 Produzione mondiale di frumento nel 2004
(dati F.A.O. rilevati sul relativo sito Internet)

L'estesa coltivazione del frumento su scala mondiale trova spiegazione nel buon profilo nutrizionale, nella facilità di conservazione e trasporto delle relative cariossidi e nella grande versatilità degli impasti ottenuti mescolando la farina o la semola di frumento ad acqua. Per quanto concerne il profilo nutrizionale, la cariosside di frumento è un'ottima fonte di carboidrati, essendo costituita per l' 80% da amido, ed inoltre presenta un discreto contenuto di fibre, proteine, vitamine e minerali. Il contenuto

proteico della cariosside di grano è compreso fra il 10% ed il 18% del peso secco ma, come gran parte delle proteine di origine vegetale, esse sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali, quali la lisina ed il triptofano. Tali amminoacidi devono essere integrati nella dieta dall'assunzione di proteine in cui questi amminoacidi sono abbondanti, presenti nella carne, nel pesce, nei formaggi e nelle uova.

Dal punto di vista fisiologico le proteine di frumento sono per la maggior parte proteine di riserva che vengono accumulate nell'endosperma in maturazione e rappresentano una fonte energetica di carbonio ed azoto per l'embrione nelle fasi precoci di germinazione (Shewry *et al.*, 1995). Per un caso del tutto accidentale e a noi fortunato, le proteine di riserva della cariosside conferiscono proprietà reologiche uniche agli impasti di frumento, andando a formare un complesso proteico denominato *glutine*. Tali caratteristiche reologiche sono responsabili della grande versatilità degli impasti di frumento, permettendone il processamento in una vasta gamma di prodotti, quali la pasta, il pane, il cous-cous, i biscotti e tanti altri, e determinando, quindi, l'alto valore tecnologico proprio delle farine di questo cereale.

1.1.2 Origine del frumento

Tassonomicamente il frumento appartiene al genere *Triticum*, sottotribù *Triticinae*, tribù *Triticeae*, famiglia *Graminaceae*.

Il suo centro di origine e differenziazione corrisponde alla zona del Medio Oriente, compresa tra la costa del Mediterraneo e la pianura del Tigri e dell'Eufrate, dove, da studi effettuati su cariossidi ritrovate durante scavi archeologici, ebbe inizio la coltivazione del frumento (*T. monococcum* e *T. dicoccum*) circa 10000 anni fa.

Il frumento, come altri cereali, ha avuto un ruolo basilare nello sviluppo delle prime civiltà indoeuropee; nell'Italia preistorica ne erano già coltivati diversi tipi e, dal periodo pre-romano, il frumento divenne uno dei più importanti fattori di sviluppo socio-economico.

Il frumento coltivato consiste di varie specie, a diverso livello di ploidia (diploidi, tetraploidi, esaploidi, con numero di base $x = 7$) che hanno avuto origine da specie selvatiche attraverso il fenomeno dell'anfiploidia, un processo in cui poliploidi fertili si sono formati in seguito ad incroci spontanei tra specie selvatiche diploidi e poliploidi aventi un diverso assetto cromosomico (ibridazione), seguiti dal raddoppiamento spontaneo dei cromosomi.

La classificazione dei frumenti è stata, ed è tuttora, oggetto di numerose dispute e di continue revisioni; tali difficoltà derivano principalmente dal vasto numero di specie, sia selvatiche che coltivate, e dall'elevata capacità di incrocio interspecifico. Molti studi sono stati condotti, utilizzando diversi approcci, per scoprire i progenitori selvatici delle specie coltivate e per definire una classificazione. Un passo fondamentale in questo senso è costituito dagli studi del giapponese Kihara (1924) il quale, analizzando l'appaiamento cromosomico alla meiosi in ibridi di specie ritenute più o meno affini, identificò diversi tipi di genomi e raggruppò i frumenti in diploidi ($2n = 2x = 14$) con genoma denominato AA, tetraploidi ($2n = 4x = 28$) con genoma AABB ed esaploidi ($2n = 6x = 42$) con genoma AABBDD.

In Fig. 1 è rappresentato uno schema semplificato dell'origine delle specie di frumento attualmente coltivate. Dall'incrocio spontaneo di specie diploidi fertili si sono generate specie tetraploidi (AABB) che, in seguito ad un successivo incrocio con specie diploidi (DD), hanno generato frumenti a corredo genomico esaploide (AABBDD). Mentre il donatore del genoma A è costituito verosimilmente da *T. urartu* Tuman., e il donatore del genoma D da *Aegilops squarrosa* L. (o *Ae. tauschii* Coss.), non è stato ancora identificato con certezza il donatore del genoma B, ma sembra che debba essere ricercato tra gli appartenenti alla sezione *Sitopsis* (comprendente l'*Ae. speltoides* Taush, l'*Ae. bicornis* (Forsk.) Jaub.&Spach., l'*Ae. searsii* Feld.& Kiss. e l'*Ae. longissima* Scwinf & Muschi.) (Konarev, 1983; Dvorak *et al.*, 1993; Lafiandra *et al.*, 1993).

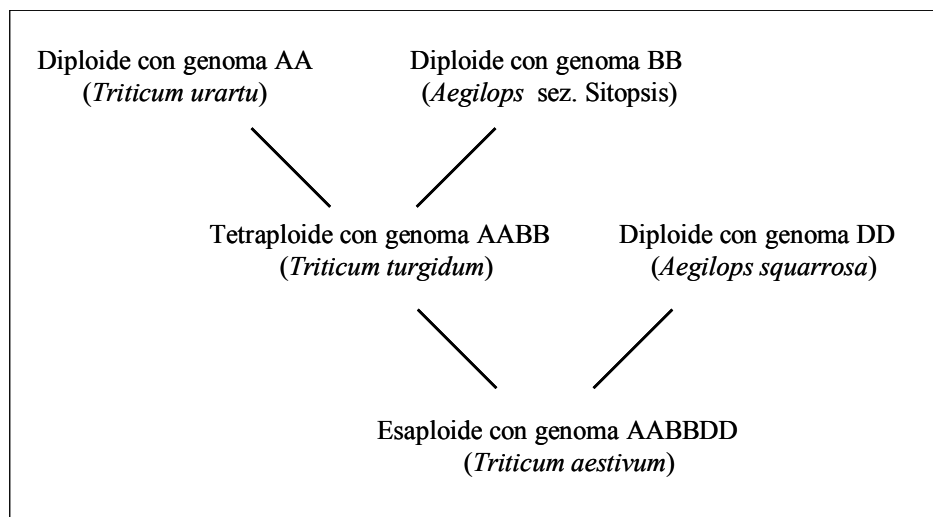


Fig. 1 Schema semplificato dell'origine dei frumenti coltivati attraverso il fenomeno dell'anfiploidia

L'ipotesi iniziale di una sostanziale differenza fra i genomi A, B e D è stata successivamente smentita grazie soprattutto agli studi di Sears (1953-1966) che, in relazione all'elevato grado di somiglianza tra i tre genomi, stabilì che ogni cromosoma di un genoma di frumento tenero possiede un cromosoma simile in ognuno degli altri due genomi (cromosoma omeologo). Gli studi di Riley e Chapman (1967) dimostrarono inoltre che, nel frumento esaploide, durante la meiosi, ogni dato cromosoma si appaia con uno specifico partner (accoppiamento omologo) e non con uno qualsiasi dei 5 potenziali (appaiamento omeologo). La soppressione dell'appaiamento omeologo (che condurrebbe ad una ridotta stabilità della specie) è mantenuta dal gene Ph, situato sul braccio lungo del cromosoma 5B. Infatti, in assenza del gene Ph o dell'intero cromosoma 5B, l'appaiamento si verifica anche fra i cromosomi omeologhi.

I frumenti attualmente coltivati appartengono in larga parte a specie tetraploidi ed esaploidi rappresentate rispettivamente da frumenti duri (*T. durum*, AABB) e teneri (*T. aestivum*, AABBDD). Il frumento duro è coltivato, nell'ambito comunitario, solo nei paesi mediterranei (Italia, Francia, Grecia, stati iberici), mentre nel resto del mondo viene coltivato quasi esclusivamente negli Stati Uniti, in Australia ed in alcune zone della Russia, in quanto necessita di particolari condizioni di crescita caratterizzate da climi caldi e secchi. Il frumento duro è utilizzato prevalentemente per la produzione di pasta (di cui l'Italia è il primo produttore mondiale) e di pane, specialmente in alcune regioni dell'Italia meridionale.

Il frumento tenero, invece, presenta una coltivazione più largamente diffusa su scala mondiale, rappresentando il 95% della produzione totale di frumento (Dick *and* Matsuo, 1988). La grande espansione della coltivazione di frumento tenero rispetto al frumento duro, è in relazione alla sua maggiore adattabilità a diverse condizioni idro-climatiche e alle sue ottime caratteristiche panificatorie che sono state da ultimo correlate alla presenza del genoma D. La maggiore adattabilità a diverse condizioni climatiche trova invece spiegazione nella natura esaploide di questa specie di *Triticum*.

1.1.3 Cenni sulla struttura e sulla composizione della cariosside

Quello che comunemente viene indicato come seme, in realtà è un frutto secco indeiscente denominato cariosside (Fig. 2).

La cariosside matura è formata da tre parti fondamentali: il germe o embrione, la crusca e l'endosperma (Evers *and* Millart, 2002). L'endosperma, ricco di

amido, rappresenta più dell'80% della massa della cariosside ed è rivestito esternamente da uno strato di cellule aleuroniche ed al suo interno contiene l'embrione (germe di grano) che rappresenta circa il 3% della cariosside. La crusca è formata dagli strati di rivestimento della cariosside (pericarpo all'esterno e residui dei tegumenti seminali all'interno) e dallo strato di aleurone e rappresenta circa il 14% del frutto.

Nei cereali la cariosside è la sede di accumulo dei prodotti della fotosintesi e del metabolismo dell'azoto; essa infatti contiene una limitata quantità di proteine (7-15%) e di lipidi (2-9%) ed un elevato contenuto di carboidrati (65-75%) principalmente sotto forma di amido.

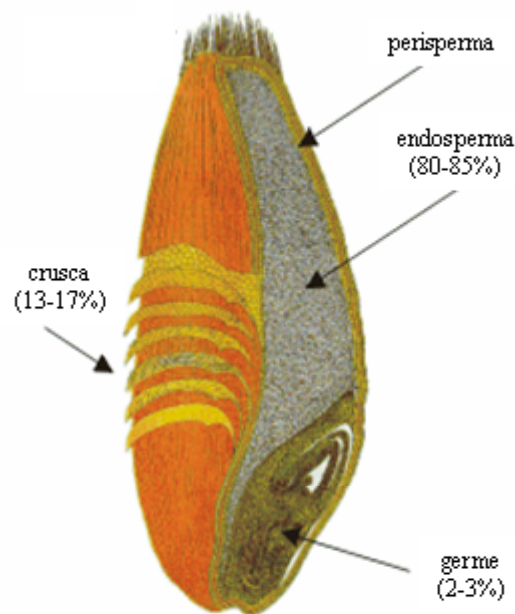


Fig. 2 Struttura schematica della cariosside di frumento

1.1.3.1 Amido

L'amido è la componente principale dell'endosperma di frumento e si accumula in massima parte negli amiloplasti delle cellule aleuroniche in forma semi-cristallina. L'amido è un polimero di glucosio costituito da due catene glucidiche, l'amilosio e l'amilopectina, che differiscono nella loro lunghezza e nel grado di ramificazione e sono normalmente presenti in rapporto di 1:3. L'amilosio è caratterizzato principalmente da molecole lineari formate da unità di D-glucosio unite da legami α -glicosidici (1 $\rightarrow$ 4) con un grado di polimerizzazione compreso fra 10^3 e 10^4 unità (Ball *et al.*, 1998). L'amilopectina è invece un polimero di glucosio altamente ramificato con circa il 4-5% dei legami glicosidici che sono del tipo α -(1 $\rightarrow$ 6) (Morell *et*

al.,1995; Rahman *et al.*, 2000) e con un grado di polimerizzazione compreso fra 10^5 e 10^7 unità.

Studi recenti hanno dimostrato che anche la composizione dell'amido, in particolare la sua struttura e il relativo rapporto amilosio/amilopectina, influenzano le caratteristiche qualitative ed i possibili usi finali della farina di frumento (Lee *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2002).

1.1.3.2 Lipidi

I lipidi presenti nella cariosside di frumento sono sia di tipo polare (glicolipidi e fosfolipidi) sia di tipo non polare (soprattutto trigliceridi). Una parte dei lipidi è legata all'amido a formare gli amido-lipidi (Morrison, 1995), un'altra parte si lega alle proteine della farina durante la lavorazione dell'impasto ed è di determinante importanza nel definirne le caratteristiche reologiche. In particolare, un'elevata quantità di lipidi presenti ed un alto rapporto lipidi polari/lipidi non polari sono caratteristiche correlate a buone qualità panificatorie (Chung, 1985).

1.1.3.3 Proteine

Sebbene la composizione dell'amido e la quantità e qualità dei lipidi presenti nella cariosside di grano, siano fattori importanti nel determinare le caratteristiche tecnologiche delle farine, della semole e dei prodotti finiti, le proprietà funzionali uniche degli impasti di frumento sono in massima parte ascrivibili alla frazione proteica, ed in particolare, alle proteine di riserva della cariosside.

Una prima classificazione delle proteine della cariosside di frumento realizzata da Osborne (1924), le divideva in quattro gruppi in base alla loro relativa solubilità: albumine (acqua), globuline (soluzioni saline), gliadine (70% EtOH) e glutenine (alcali o acidi diluiti).

Le albumine sono le proteine a più basso peso molecolare, seguite dalle globuline, dalle gliadine ed infine dalle glutenine. Albumine e globuline costituiscono il 20% delle proteine della cariosside e sono rappresentate in massima parte da proteine fisiologicamente attive. Esse sono presenti nell'involucro del seme, nelle cellule aleuroniche e nel germe, mentre sono relativamente poco abbondanti nell'endosperma.

Le globuline, in particolare, sono rappresentate maggiormente da enzimi con attività α e β -amilasica, che rivestono un ruolo importante nei processi di lievitazione degli impasti, in quanto catalizzano l'idrolisi dell'amido presente nei granuli danneggiati, producendo i substrati necessari per l'attività fermentativa del lievito.

Le gliadine e le glutenine rappresentano circa l'80% delle proteine della cariosside e sono collettivamente denominate prolammine, in relazione al loro elevato contenuto in prolina e glutammina. Le prolammine sono accumulate esclusivamente nell'endosperma e hanno il ruolo fisiologico di proteine di riserva. Inoltre esse sono i maggiori costituenti del glutine (Fig. 3), che è costituito dalla massa visco-elastica che si forma dopo la rimozione dell'amido e delle proteine solubili in acqua e che è responsabile delle proprietà visco-elastiche uniche degli impasti ottenuti da farine di frumento.



Fig. 3 Glutine ottenuto da farina di frumento

1.1.4 Glutine e proprietà visco-elastiche

La qualità e la quantità delle proteine costituenti il glutine sono i maggiori fattori che influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento ed in particolare le proprietà visco-elastiche degli impasti da esse ottenute, quali l'estensibilità, l'elasticità e la loro forza (Shewry *and* Tatham, 1997).

Le proprietà reologiche degli impasti di frumento sono in relazione alle caratteristiche fisico-chimiche delle proteine costituenti il glutine (gliadine e glutenine), che si organizzano in un reticolo complesso stabilizzato da legami covalenti (legami disolfuro) e da legami di natura secondaria (legami ad idrogeno e di natura idrofobica) (Belton, 1999; Shewry *et al.*, 2001). In particolare, mentre le glutenine sono proteine polimeriche le cui singole unità componenti sono unite fra di loro da legami disolfuro

inter-molecolari e conferiscono agli impasti le caratteristiche di forza ed elasticità, le gliadine sono proteine monomeriche che prendono parte alla formazione del glutine mediante legami idrogeno inter-catena, grazie ai numerosi residui di glutammina presenti, e mediante legami di natura idrofobica fra le catene non polari degli amminoacidi. Le gliadine sono i componenti più importanti nel determinare le caratteristiche di estensibilità dei relativi impasti (Khatkar *et al.*, 2002).

Dal punto di vista commerciale, per produrre un prodotto di ottima qualità, sono necessarie chiaramente opportune tecnologie di trasformazione ma, soprattutto, è indispensabile una combinazione di specifiche proprietà visco-elastiche che trovano origine nella specifica composizione qualitativa e quantitativa del glutine. A titolo di esempio, la produzione del pane richiede un impasto con un rapporto bilanciato di elasticità ed estensibilità, quella dei biscotti o crackers richiede un impasto estremamente estensibile e poco elastico, mentre il famoso dolce di Natale Italiano, il Panettone, è prodotto da impasti molto elastici e poco estensibili.

Da un punto di vista industriale, sono stati definiti alcuni parametri fondamentali che determinano le intrinseche qualità panificatorie e pastificatorie degli impasti e quindi il loro successivo impiego per la produzione di specifici prodotti. Per quanto concerne le qualità panificatorie, anche se i criteri di valutazione variano molto a seconda delle tradizioni ed usi di ogni singolo paese, alcuni criteri sono rappresentati dall'assorbimento di acqua da parte dell'impasto, dal volume di lievitazione del pane, dalla struttura della mollica, dal colore e dalla capacità di conservazione (MacRitchie, 1984). Di norma, un pane di buona qualità è prodotto con impasti forti ed estensibili che sono in grado espandersi in seguito ai processi di respirazione del lievito, di trattenere la CO₂ prodotta e di non collassare a processo di cottura ultimato. E' inoltre preferibile utilizzare farine e semole con un alto assorbimento di acqua per ovvi motivi economici. Buone qualità pastificatorie si hanno invece quando il prodotto finito è di un forte colore giallo ambrato, è resistente ad una eccessiva cottura, rimanendo "al dente" e mantenendo la sua forma, e quando l'acqua di cottura rimane priva di amido. Queste caratteristiche vengono raggiunte mediante impiego di impasti estremamente forti, che siano in grado di trattenere l'amido durante la cottura.

Poiché da un punto di vista funzionale, le caratteristiche visco-elastiche degli impasti sono determinate dalla struttura e dalla quantità relativa delle singole subunità gliadiniche e gluteniniche componenti il glutine, nei paragrafi successivi verranno approfonditi alcuni aspetti circa la loro struttura ed i relativi *loci* codificanti.

1.1.4.1 Gliadine

Le gliadine sono proteine monomeriche in quanto naturalmente prive di residui cisteinici o in quanto tutte le cisteine presenti formano legami disolfuro intramolecolari. Inoltre esse sono considerate il fattore principale che causa la malattia celiaca (Ellis *et al.*, 2003; Dewar *et al.*, 2004; Londei *et al.*, 2005), la più comune intolleranza umana al glutine. Recenti dati epidemiologici mostrano che attualmente nel mondo occidentale il morbo celiaco interessa un individuo su duecento, considerando sia le forme latenti che quelle ad un evidente stadio clinico della malattia (Mäki *and* Collin, 1997; Accomando *and* Cataldo, 2004; Koning, 2005).

Le gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 25.000 e 50.000 Da e sono state classificate in quattro gruppi, α , β , γ e ω -gliadine (Woychik *et al.*, 1961), a seconda della loro mobilità elettroforetica su gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) (Fig. 4). Le gliadine sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi omeologhi dei gruppi 1 e 6 (Du Cros *et al.*, 1983; Lafiandra *et al.*, 1984). I *loci* che codificano per la maggior parte delle α e β -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 6 e sono indicati come *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*), mentre quelli codificanti la maggior parte delle γ e ω -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 1 e sono indicati come *Gli-1* (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*) (Fig. 5).

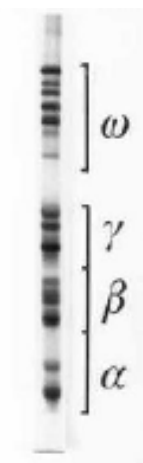


Fig. 4 Gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) di gliadine di frumento.

Pur mostrando una diversa migrazione in A-PAGE, le α e le β -gliadine hanno una struttura primaria molto simile (Anderson *et al.*, 1984; Rafalski *et al.*, 1984; Kasarda *et al.*, 1987), caratterizzata dalla presenza di tre distinte regioni (Fig. 6, in alto): un breve dominio N-terminale non ripetuto, un dominio centrale ripetuto privo di cisteine,

formato da ripetizioni di due sequenze ricche in prolina e glutammina (eptapeptide: Pro-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe-Pro e pentapeptide: Pro-Gln-Gln-Pro-Tyr non necessariamente alternati) ed infine un lungo dominio C-terminale contenente i sei residui di cisteina e la maggior parte degli amminoacidi carichi. Le α e le β -gliadine hanno un peso molecolare compreso fra 30.000 e 45.000 Da.

Anche le γ -gliadine sono formate da tre distinte regioni (Fig. 6, al centro): un breve dominio N-terminale, un dominio centrale ripetuto formato dalla ripetizione di una sequenza ricca in prolina e glutammina (eptapeptide: Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln) ed infine un dominio C-terminale contenente gli otto residui di cisteina e la maggior parte degli amminoacidi carichi (Bartels *et al.*, 1986). Le γ -gliadine hanno un peso molecolare compreso fra 30.000 e 45.000 Da e hanno una composizione amminoacidica simile alle α -gliadine ed alle LMW-GS tipiche, sebbene differiscano considerevolmente nelle loro sequenze.

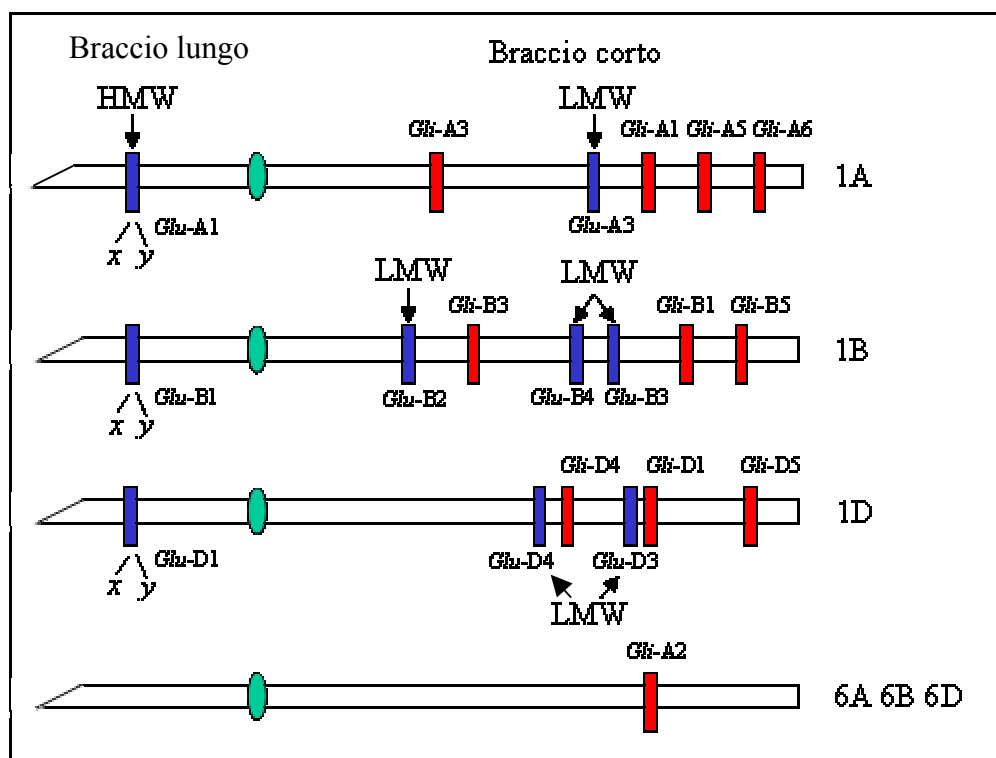
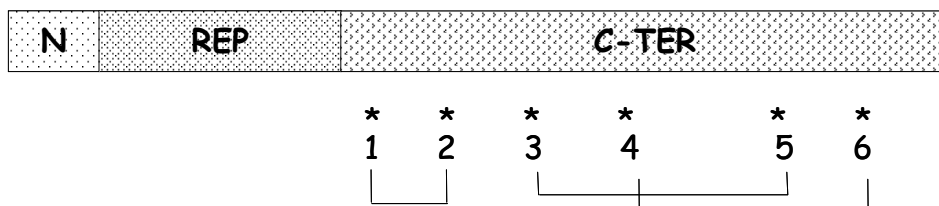


Fig. 5 Schema relativo alla localizzazione cromosomica dei geni codificanti le diverse proteine di riserva del frumento. I *loci* indicati dalle sigle HMW o LMW codificano rispettivamente per le HMW-GS (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare) e LMW-GS (subunità gluteniniche a basso peso molecolare); tutti gli altri *loci* (compresi quelli minori) sono relativi alle gliadine. L'ovale verde corrisponde al centromero.

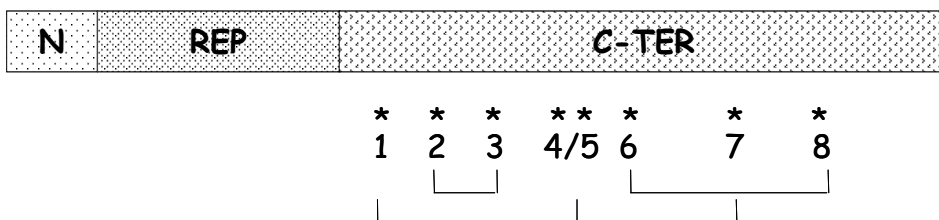
Infine le ω -gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 44.000 e 74.000 Da e mostrano una composizione amminoacidica ed una struttura del tutto diversa da quella delle α/β e γ -gliadine (Fig. 6, in basso). Le ω -gliadine sono naturalmente prive di residui di cisteina, sono costituite quasi esclusivamente dal dominio ripetuto ed infine l'80% dei residui amminoacidi è costituito da glutammina, acido glutammico, prolina e fenilalanina (Hsia *and* Anderson, 2001).

Per quanto riguarda la struttura secondaria delle gliadine, studi spettroscopici hanno evidenziato la presenza prevalente di “ β -turns” nella regione N-terminale delle α e β -gliadine, nella regione ripetuta vicino all' N-terminale delle gliadine di tipo γ e nelle ω -gliadine. Tratti ad α -elica sono stati invece individuati soprattutto nella regione C-terminale delle gliadine di tipo α e γ (Purcell *et al.*, 1988; Tatham *et al.*, 1990; Tatham *and* Shewry, 1985).

α/β gliadine



γ -gliadine



ω -gliadine



Fig. 6 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica di α/β , γ ed ω -gliadine. N, dominio N-terminale; REP, dominio ripetuto, C-TER, dominio C-terminale. Gli asterischi indicano la posizione dei residui cisteinici. Sono riportati inoltre i ponti disolfuro intra-molecolari nelle α/β e γ -gliadine.

1.1.4.2 Glutenine

Le glutenine, o polimeri gluteninici, sono polimeri con un peso molecolare che può variare da 60.000 Da fino all'ordine di diversi milioni, costituendo i polimeri di maggiori dimensioni presenti in natura (Wrigley, 1996).

Le dimensioni dei polimeri gluteninici costituiscono il fattore più importante nel determinare le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento. In particolare, maggiori sono le dimensioni di questi polimeri e migliori sono le caratteristiche di forza, elasticità tipiche degli impasti. Di converso, farine con ridotte dimensioni dei polimeri gluteninici mostrano scarse qualità tecnologiche (Schropp *and* Wieser, 1996; Weegels *et al.*, 1996; Gras *et al.*, 2001).

In seguito a riduzione dei ponti disolfuro inter ed intra-molecolari, le subunità gluteniniche possono essere separate su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) in due gruppi a diversa mobilità elettroforetica, costituiti da subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS) e subunità a basso peso molecolare (LMW-GS).

Le HMW-GS sono rappresentate da un numero ridotto di subunità che varia da 3 a 5 (raramente 6), mentre le LMW-GS sono molto più abbondanti ed eterogenee. Dati recenti basati su analisi di Southern blotting stimano infatti che le LMW-GS siano circa una trentina in frumento tenero (Cassidy *et al.*, 1998).

1.1.4.2.1 Subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS)

Nonostante rappresentino solo il 5-10% delle proteine totali nella cariosside matura, le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS) costituiscono il gruppo di prolamine di frumento più ampiamente studiato. Le HMW-GS hanno un peso molecolare compreso tra 80.000 e 120.000 Da e, diversamente dalle altre proteine del frumento, hanno un alto contenuto in glicina e un più basso contenuto in prolina (Shewry *et al.*, 1986).

Le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sui bracci lunghi dei cromosomi 1A, 1B, 1D (Payne *et al.*, 1981a) e sono indicati come *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1*) (Fig. 5). Ognuno di questi *loci* è costituito da due geni strettamente associati che codificano per due subunità proteiche con differente struttura e peso molecolare, denominate subunità *x* e *y*, rispettivamente a maggiore e minore peso molecolare. Tutte le cv. di frumento tenero possiedono le

subunità 1Bx, 1Dx e 1Dy, mentre possono avere la subunità 1By e/o la 1Ax. Nei frumenti teneri coltivati il gene codificante per la subunità *y* al locus *Glu-A1* è risultato sempre inattivo, anche se è stata individuata la presenza della subunità 1Ay in una linea di frumento esaploide svedese (Margiotta *et al.*, 1996). Di norma, invece, la subunità è espressa nei frumenti diploidi.

Le subunità HMW-GS di tipo *x* e di tipo *y* sono costituite da tre domini, un dominio N-terminale di circa 100 residui, un dominio centrale di circa 400-600 residui, formato da una lunga serie di sequenze amminoacidiche ripetute, ed infine un breve dominio C-terminale, di circa 50 residui (Fig. 7). Fondamentalmente, la differenza di grandezza tra le varie subunità è dovuta alla diversa estensione del dominio ripetuto ed in particolare al diverso numero di ripetizioni presenti. Questi tratti ripetuti, inoltre, non sono perfettamente conservati, ma differiscono leggermente tra le subunità di tipo *x* e di tipo *y*. In entrambi i tipi la sequenza amminoacidica Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln è, comunque, ampiamente rappresentata.

HMW-GS di tipo *x*



HMW-GS 1Dx5



HMW-GS di tipo *y*



Fig. 7 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica delle HMW-GS di tipo *x* e di tipo *y*. E' riportata, oltre alla struttura delle HMW-GS di tipo *x* canoniche (in alto) e delle HMW-GS di tipo *y* (in basso), anche quella della subunità 1Dx5 (al centro) che presenta un'addizionale cisteina localizzata all'inizio del dominio ripetuto. I numeri indicano i residui di cisteina. I ponti disolfuro non sono stati riportati in quanto la loro organizzazione non è stata ancora determinata con certezza.

Una caratteristica delle HMW-GS è la presenza, in prossimità delle estremità N e C-terminali, di residui di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intra-

ed inter-molecolari. Le subunità di tipo x possiedono quattro residui di cisteina per catena polipeptidica, di cui tre localizzati nell'estremità N-terminale ed uno nella sequenza C-terminale. L'unica eccezione ad oggi nota è rappresentata dalla subunità 1Dx5 che presenta, oltre alle quattro cisteine tipiche delle subunità di tipo x , un addizionale residuo di cisteina localizzato nel dominio ripetuto, in prossimità della regione N-terminale. La subunità 1Dx5 è presente in varietà di frumento tenero le cui farine mostrano elevate qualità tecnologiche, in particolar modo per quanto riguarda i processi di panificazione.

Le subunità di tipo y possiedono sette residui cisteinici, di cui cinque localizzati nel dominio N-terminale e due in quello C-terminale. La differenza che si osserva tra le subunità di tipo x e quelle di tipo y relativamente al numero di cisteine presenti nel dominio N-terminale, è imputabile verosimilmente ad un evento di delezione che ha coinvolto due delle cinque cisteine presenti nell'estremità N-terminale delle subunità di tipo y (Shewry *et al.*, 1992).

La struttura terziaria delle HMW-GS è caratterizzata dalla presenza di regioni globulari ricche in α -elica alle estremità N e C-terminali e da una regione centrale a spirale formata da " β -turns".

Dal punto di vista funzionale, le HMW-GS agiscono come elementi di allungamento o di ramificazione dei polimeri gluteninici. Come elementi di allungamento, esse formano legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche mediante due delle cinque cisteine presenti nella catena polipeptidica, una localizzata nel dominio N-terminale, l'altra nel dominio C-terminale. Alcune HMW-GS, come la subunità 1Dx5, possono agire anche da punti di ramificazione dei polimeri gluteninici, in virtù della cisteina addizionale localizzata nel dominio centrale. In realtà, vi sono delle teorie che considerano la possibilità che tutte o quasi le HMW-GS agiscano come elementi di ramificazione (Kasarda, 1999) o vadano a costituire dei "centri di aggregazione" a cui le LMW-GS si legano a formare i polimeri gluteninici (Graveland, 1985). Agendo da elementi di allungamento e/o di ramificazione, le HMW-GS contribuiscono positivamente alle caratteristiche tecnologiche degli impasti, in quanto la loro incorporazione causa un incremento di dimensioni dei polimeri gluteninici, fattore, questo, correlato a buone caratteristiche di forza ed elasticità degli impasti (Huebner *and* Wall, 1976; Field *et al.*, 1983).

Payne (1987) e Payne *et al.* (1981a, 1981b, 1987a, 1987b) hanno descritto la correlazione esistente tra specifiche forme alleliche codificanti le HMW-GS e le qualità

panificatorie di varietà di frumento tenero coltivate in Europa. In particolare, Payne (1987) ha assegnato un punteggio a ciascuna delle subunità o coppia di subunità presenti nelle singole varietà di frumento tenero Europee, che tiene conto delle specifiche caratteristiche panificatorie dei relativi impasti. Sommando i singoli punteggi relativi alle singole subunità espresse in una data varietà, è possibile calcolare il punteggio totale che è una stima delle caratteristiche panificatorie e, più in generale qualitative, della varietà in oggetto di studio.

1.1.4.2.2 Subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS)

Le subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS) sono un gruppo di proteine molto vasto ed eterogeneo e per questo motivo la loro struttura, organizzazione e correlazione con i parametri qualitativi è ad uno stadio di caratterizzazione ancora incompleto. In base alla loro mobilità elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), le LMW-GS sono state classificate in tre gruppi distinti, gruppo B, C e D (Payne *and* Corfield, 1979). Questa classificazione, inizialmente basata sulla diversa mobilità elettroforetica, riflette di fatto le differenti caratteristiche biochimiche e strutturali dei polipeptidi (D'Ovidio *and* Masci, 2004).

Il gruppo D comprende subunità con peso molecolare di circa 40.000 Da e corrisponde a ω -gliadine modificate che hanno acquisito un residuo cisteinico in seguito ad un evento di mutazione spontanea, tramite il quale prendono parte alla formazione dei polimeri gluteninici, formando legami inter-molecolari con le altre subunità (Masci *et al.*, 1993; Masci *et al.*, 1999).

Il gruppo C include almeno trenta proteine, con peso molecolare compreso tra 30.000 e 35.000 Da, di cui la maggior parte corrisponde a gliadine di tipo α/β e γ , modificate nel numero e/o nella posizione dei residui cisteinici. In virtù di questa caratteristica, prendono parte alla formazione della frazione polimerica (aggregata), come anche le subunità appartenenti al gruppo D.

Dal punto di vista funzionale, le LMW-GS di tipo D e C agiscono da elementi di terminazione dei polimeri gluteninici, avendo un solo residuo cisteinico disponibile alla formazione di legami disolfuro inter-molecolari. Come tali, esse contribuiscono negativamente alle proprietà di forza ed elasticità degli impasti, in quanto causano una diminuzione delle dimensioni medie dei polimeri gluteninici, caratteristica questa correlata a scarse qualità tecnologiche delle farine.

Infine il gruppo B include subunità con peso molecolare compreso tra 35.000 e 42.000 Da ed ad esso appartengono le LMW-GS propriamente dette. Queste a loro volta sono state ulteriormente distinte in tre sottogruppi sulla base del primo residuo amminoacidico della sequenza polipeptidica matura, rispettivamente serina (LMW-s), metionina (LMW-m) ed isoleucina (LMW-i).

Analisi di sequenziamento N-terminale hanno mostrato che le LMW-s sono più abbondanti rispetto alle LMW-m sia in frumento duro sia in frumento tenero mentre, antecedentemente al presente lavoro di tesi, nessuna sequenza amminoacidica N-terminale corrispondente alle LMW-i era stata individuata. In particolare, le sequenze di tipo “i” erano note solo sulla base della sequenza amminoacidica dedotta di sequenze geniche isolate e, pertanto, non vi erano dati certi circa l’eventuale espressione delle LMW-i *in vivo*.

Per quanto concerne la struttura polipeptidica, le LMW-s e LMW-m sono caratterizzate da pesi molecolari compresi fra 35.000-50.000 Da (LMW-s) e 30.000-40.000 Da (LMW-m) (Tao *and* Kasarda, 1989; Lew *et al.*, 1992; Masci *et al.*, 1995) e sono organizzate in tre domini distinti (Fig. 8, pannello A). Il primo dominio è caratterizzato da una breve regione N-terminale di 13 residui amminoacidici che, nella maggior parte delle sequenze presenti in banca dati, contiene il primo residuo cisteinico; il secondo dominio è costituito da sequenze ripetute ricche in glutamina e formate dalla successione non necessariamente alternata della sequenza Pro-Pro-Phe-Ser-Gln-Gln-Gln-Gln; infine, il terzo dominio è caratterizzato da una regione C-terminale contenente le rimanenti sette cisteine. La differente grandezza di peso molecolare delle diverse LMW-m e LMW-s risiede in massima parte nelle dimensioni del dominio ripetuto ed, in particolare, nel numero di unità ripetute che lo compongono, che variano da 12 a 25.

Sia le LMW-s sia le LMW-m contengono otto residui cisteinici, di cui il primo e il settimo sono verosimilmente coinvolti nella formazione di legami disolfuro intermolecolari con le altre subunità gluteniniche, agendo pertanto da un punto di vista funzionale da elementi di allungamento dei polimeri gluteninici.

La sequenza N-terminale delle LMW-s corrisponde a SHIPGL-, mentre quella delle LMW-m è più variabile, includendo sequenze di tipo METSHIPGL-, METSRIPGL-, e METSCIPGL- (Kasarda *et al.*, 1988; Tao *and* Kasarda, 1989; Lew *et al.*, 1992; Masci *et al.*, 1995). Poiché il confronto tra le sequenze N-terminali delle LMW-m e LMW-s rivela che esse differiscono essenzialmente per la presenza nelle

LMW-m dei primi tre amminoacidi MET (Tabella 2), è stato recentemente ipotizzato che l'assenza degli amminoacidi MET nelle LMW-s sia dovuta ad un loro diverso processamento N-terminale ad opera di una asparaginil endoproteasi che porterebbe al taglio della sequenza amminoacidica MEN nelle sequenze polipeptidiche corrispondenti a LMW-s (Masci *et al.*, 1998).

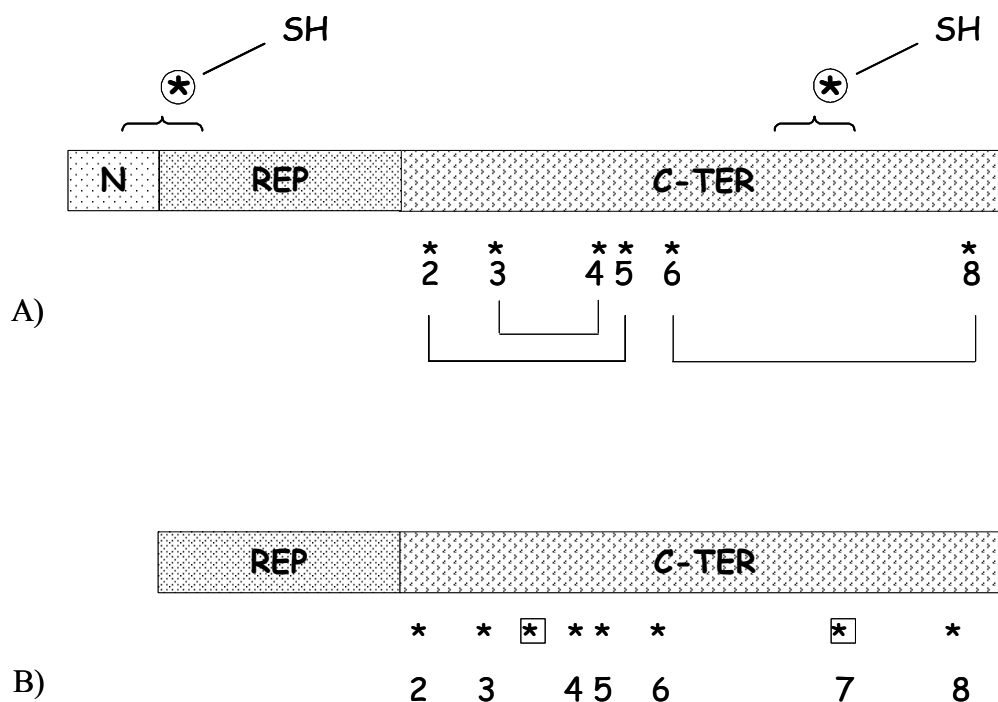


Fig. 8 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica matura delle LMW-GS tipiche con particolare riferimento alla posizione delle cisteine. Pannello A, LMW-s e LMW-m; Pannello B, LMW-i. N, regione N-terminale; REP, dominio ripetuto; C-TER, regione C-terminale. Nel pannello A la posizione dei residui cisteinici è indicata da un asterisco, in particolare i residui 2, 3, 4, 5, 6 ed 8 sono verosimilmente impegnati nella formazione di legami intra-molecolari, mentre i residui 1 e 7 (indicati da -SH) formano legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche. Nel pannello B, i probabili residui coinvolti nella formazione dei legami inter-molecolari sono indicati da un box.

Tipo di LMW-GS	Sequenza N-terminale
LMW-s	SHIPGL-
LMW-m	MET SHIPGL- MET SCIPGL- MET SRIPGL-

Tab. 2 Confronto tra le sequenze amminoacidiche N-terminali delle LMW-GS di tipo s (LMW-s) e di tipo m (LMW-m). Si nota che i due gruppi differiscono principalmente per la presenza/assenza dei primi tre amminoacidi (MET, in grassetto).

Per quanto concerne le LMW-i, esse, pur presentando una struttura molto simile a quella delle LMW-m e LMW-s (Fig. 8, pannello B), mancano della breve regione N-terminale e la sequenza del polipeptide maturo inizia direttamente con il dominio ripetuto.

Nonostante siano prive della regione N-terminale, nella quale è solitamente presente il primo residuo cisteinico, la presenza di un addizionale residuo tra la cisteina in posizione 3 e quella in posizione 4, fa sì che LMW-i mantengano inalterato il numero di cisteine caratteristico delle LMW-GS tipiche, pari a 8. Sebbene non ci siano dati certi circa l'organizzazione dei ponti disolfuro nelle LMW-i, in relazione alla posizione dei residui cisteinici rispetto a quella delle LMW-m e LMW-s, si ritiene che esse formino dei legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche, tramite la cisteina aggiuntiva localizzata fra C3 e C4 e la cisteina in posizione 7, agendo pertanto da elementi di allungamento dei polimeri gluteninici (Cloutier *et al.*, 2001).

Jackson *et al.* (1983) e Payne *et al.* (1984, 1985) hanno dimostrato che la maggior parte delle LMW-GS, sia di tipo B, C e D sono codificate da geni presenti sui bracci corti dei cromosomi della serie 1, ovvero 1A, 1B e 1D, negli stessi *loci*, o strettamente associati, ai *loci* complessi *Gli-1* dove sono presenti i geni codificanti le γ e ω -gliadine (Fig. 5). I *loci* per le LMW-GS sono stati designati come *Glu-3*. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che alcune LMW-GS di tipo C sono codificate da geni presenti sui bracci corti dei cromosomi del gruppo 6 (6A, 6B, 6D).

Studi spettroscopici, predizioni di struttura e costruzioni di modelli molecolari hanno evidenziato che il dominio N-terminale delle LMW-GS forma dei “ β -turns” distribuiti irregolarmente mentre nel dominio C-terminale prevalgono strutture ad α -elica (Tatham *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1994). Inoltre, predizioni di struttura di una tipica LMW-GS (LMW-GS 42K) hanno indicato che la regione N-terminale è priva di strutture regolari, la regione C-terminale presenta probabilmente α -eliche mentre il dominio ripetuto, soprattutto in corrispondenza delle stringhe di glutammina, risulta molto flessibile (Masci *et al.*, 1998).

Diversamente dalle HMW-GS che sono strettamente correlate alle caratteristiche qualitative del frumento tenero, le LMW-GS, ed in particolare le subunità codificate dai geni presenti sul cromosoma 1B, sono i fattori determinanti della qualità delle semole di frumento duro, utilizzate principalmente nei processi di pastificazione (Josephides *et al.*, 1987; Pogna *et al.*, 1988).

Esistono due varianti alleliche delle LMW-GS, la variante LMW-1 e la variante LMW-

2. Quest'ultima, è fortemente correlata a buone qualità pastificatorie e panificatorie del frumento duro (Payne *et al.*, 1984; Boggini and Pogna, 1989; Peña *et al.*, 1994) e comprende un gruppo di polipeptidi codificati al *locus Glu-B3*, che mostra una forte associazione con il *locus Gli-B1*, codificante γ ed ω -gliadine le cui varianti alleliche sono state denominate rispettivamente γ -45/ ω -35 e γ -42/ ω -33-35-38. La maggior parte delle cv. di frumento duro oggi coltivate, possiede le varianti alleliche LMW-2/ γ -45 (ω -35) mentre le varianti LMW-1/ γ -42 (ω -gliadine 33, 35 e 38) sono associate a frumenti con caratteristiche tecnologiche più scadenti (Fig. 9).

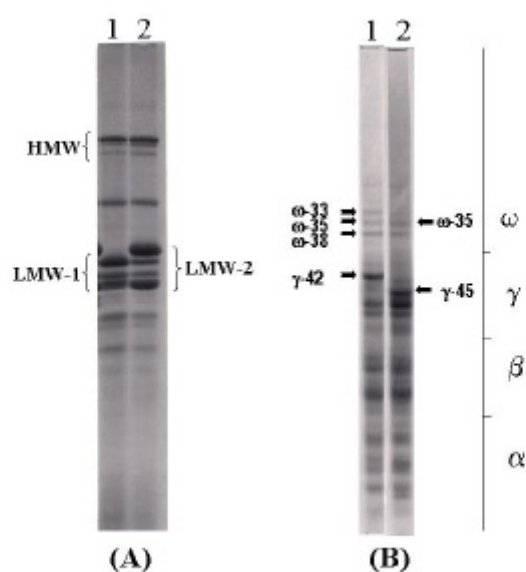


Fig. 9 (A) SDS-PAGE delle subunità gluteniniche e (B) A-PAGE delle subunità gliadiniche relativi ai due biotipi della cv. di frumento duro Lira (biotipo 42 e 45) con diversa variante allelica ai loci *Gli-B1/Glu-B3*. Corsia 1, biotipo 42 con variante allelica LMW-1, γ -42 e ω -33, 35, 38; corsia 2, biotipo 45 con variante allelica LMW-2, γ -45, ω -35. Le varianti alleliche LMW-1, γ -42 e ω -33, 35, 38 e LMW-2, γ -45, ω -35 sono correlate rispettivamente a scarse e buone caratteristiche tecnologiche delle relative semole.

Le varianti alleliche LMW-1 ed LMW-2 codificano per polipeptidi appartenenti al gruppo B di glutenine a basso peso molecolare e differiscono principalmente per la presenza nella variante LMW-2 di una proteica con peso molecolare pari a 42.000 Da (Masci *et al.*, 1995), denominata LMW-GS 42K (Masci *et al.*, 1998). La LMW-GS 42K è costantemente la proteina più abbondante nella variante allelica LMW-2 e si ritiene che contribuisca notevolmente a determinare le differenze qualitative tra le semole con variante allelica LMW-2 e quelle con variante LMW-1 (Masci *et al.*, 1995). Sebbene differenze qualitative strutturali fra le singole subunità espresse nelle due varianti alleliche non siano del tutto escluse (Masci *et al.*, 1998;

D'Ovidio *et al.*, 1999), attualmente si ritiene che le migliori caratteristiche tecnologiche dei frumenti duri con variante allelica LMW-2 siano da ricercare in differenze quantitative a livello delle singole subunità espresse in quest'ultima variante allelica rispetto alla LMW-1 (Autran *et al.*, 1987; D'Ovidio *et al.*, 1992; Masci *et al.*, 1995).

Per quanto riguarda il contributo delle LMW-GS nell'influenzare le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento tenero, sembra che diverse forme alleliche delle LMW-GS svolgano un ruolo addirittura più importante di quello esercitato dalle HMW-GS (Payne *et al.*, 1987b; Gupta *et al.*, 1989; Gupta and MacRitchie, 1994). Recentemente, la presenza della LMW-GS 42K è stata riscontrata anche in un frumento tenero di buona qualità (Masci *et al.*, 2000), anche se la variante allelica LMW-2 non è stata riscontrata nella sua completezza. Come in frumento duro, anche in quello tenero, il parametro più strettamente correlato alle caratteristiche qualitative degli impasti sembra essere rappresentato dalla quantità assoluta di LMW-GS, più che dalle loro differenze strutturali e qualitative.

1.1.4.2.3 Sintesi, maturazione e trasporto delle LMW-GS

Il momento esatto in cui inizia la produzione delle LMW-GS è attualmente oggetto di dispute. Secondo Gupta *et al.* (1996) questo processo inizia contemporaneamente a quello delle HMW-GS, tra 5 e 13 giorni dopo la fioritura, a seconda del genotipo e delle condizioni di crescita, e continua fino a maturità, ovvero quando comincia il processo di disidratazione del seme. Secondo altri autori (Panozzo *et al.*, 2001), la sintesi delle LMW-GS è successiva a quella delle HMW-GS, in quanto inizia in modo significativo solo a 14 giorni dalla fioritura.

Come le altre prolamine, le LMW-GS sono proteine secretorie che vengono sintetizzate sul reticolo endoplasmatico rugoso e sono successivamente traslocate nel *lumen*, dove si ripiegano e formano aggregati insieme alle altre prolamine mediante la formazione di legami disolfuro inter-molecolari. Non è noto se nel processo di *folding* le LMW-GS siano assistite dagli *chaperon* molecolari (Shewry, 1999).

Le LMW-GS vengono depositate nei corpi proteici insieme alle altre proteine del glutine. Rubin *et al.* (1992) hanno individuato due tipi di corpi proteici (denominati rispettivamente leggeri e pesanti) diversi per morfologia, densità e contenuto proteico. I corpi leggeri contengono la maggior parte delle gliadine ed occasionalmente la proteina BiP (*Binding Protein*), la principale chaperonina del reticolo endoplasmatico che,

invece, è costantemente presente nei corpi proteici pesanti, in cui si accumulano prevalentemente le HMW-GS.

Recentemente è stato ipotizzato che esistano due diverse vie per la formazione dei corpi proteici in cui si accumulano le prolamine a seconda della natura, monomerica o polimerica della proteina in questione. Una prima via, sarebbe quella seguita in massima parte dalle gliadine che, dopo la traslocazione nel reticolo endoplasmatico, passano nell'apparato del Golgi e quindi vengono accumulate nel vacuolo. L'altra via, sarebbe quella seguita dalle glutenine che, invece, si accumulano direttamente nel *lumen* del reticolo endoplasmatico a causa della loro relativa insolubilità, causata dalla formazione di aggregati ad alto peso molecolare con le altre subunità gluteniniche. La formazione dei corpi proteici avverrebbe in seguito a processi di esocitosi dal reticolo endoplasmatico. Sebbene non esista nessuna ricerca specifica limitata al trasporto delle sole LMW-GS, è molto probabile che, almeno le LMW-GS propriamente dette, seguano quest'ultima via. Per quanto riguarda le subunità LMW-GS di tipo C e D, sembra probabile che esse formino polimeri di piccole dimensioni che possono seguire la stessa via delle gliadine, dal reticolo endoplasmatico fino al vacuolo. Non è escluso, comunque, che variazioni di sequenza nella regione C-terminale possano determinare in alternativa o contestualmente la scelta della specifica via secretoria.

1.1.4.2.4 Struttura dei polimeri gluteninici

Le LMW-GS sono la componente maggiormente rappresentata all'interno dei polimeri gluteninici, essendo 5-6 volte più abbondanti delle HMW-GS (Kasarda, 1989). Esse possono formare oligomeri aggregandosi ad altre LMW-GS oppure polimeri misti a maggior peso molecolare interagendo con le HMW-GS.

La dinamica di formazione dei polimeri gluteninici è ancora oggetto di studio. In particolare, non è noto se le LMW-GS vengano incorporate casualmente nei polimeri o se vi siano dei vincoli dettati dalla loro struttura, dal momento della loro sintesi e dal coinvolgimento di enzimi specifici. Esistono svariati modelli molecolari ipotetici della struttura dei polimeri gluteninici di cui uno dei primi, proposto da Ewart (1979) e successivamente elaborato da Kasarda (1989), propone che le HMW-GS e le LMW-GS siano legate tra di loro casualmente, in modo più o meno lineare. Tale modello si basa sull'assunzione che ogni singola subunità gluteninica (HMW-GS e LMW-GS del gruppo B) è in grado di formare solo due legami disolfuro con le altre

subunità e, pertanto, l'incorporazione nel polimero in crescita di una subunità in grado di formare un solo ponte disolfuro (come le LMW-GS appartenenti ai gruppi D e C) determinerebbe l'arresto della crescita del polimero. Sulla base di quanto esposto, secondo tale modello le dimensioni dei polimeri gluteninici variano in maniera lineare.

Una serie di fatti, come ad esempio l'esistenza di una subunità *x* delle HMW-GS (la subunità 1Dx5) che si suppone sia in grado di formare tre legami disolfuro intermolecolari dando luogo ad una ramificazione, contraddice questo modello. Inoltre sono stati identificati frammenti (costituiti da due peptidi) di HMW-GS connessi tramite ponti disolfuro che sono principalmente derivati da subunità *x* e *y* (ma anche da due subunità *x*) (Keck *et al.*, 1995; Khöler *et al.*, 1993; Tao *et al.*, 1992; Werner *et al.*, 1992) che inducono a ritenere che esista un legame preferenziale tra questi due tipi di subunità.

A conferma di quanto esposto, è stato riportato che una proteina ricombinante di fusione, costituita dal dominio N-terminale della subunità 1Dy10 e dal dominio ripetuto e C-terminale della subunità 1Dx5, è presente principalmente in forma monomerica nell'endosperma di frumento (Shimoni *et al.*, 1997). La presenza della proteina come monomero è dovuta alla formazione di un legame disolfuro intra-molecolare tra la cisteina presente nel dominio C-terminale della subunità 1Dx5 e quella all'estremità N-terminale della subunità 1Dy10. Questi fatti dimostrano che esiste una marcata affinità tra il dominio N-terminale della subunità *y* ed quello C-terminale della subunità *x*.

Nel 1985, Graveland ha proposto un differente modello secondo cui le subunità HMW-GS di tipo *x* e di tipo *y* sono unite insieme in successione alternata da legami disolfuro a formare una catena lineare principale a cui le subunità LMW-GS sono legate, formando ponti disolfuro con le HMW-GS di tipo *y* ed andando a formare ramificazioni laterali. Secondo questo modello sono presenti uno o relativamente pochi polimeri gluteninici in quanto, in virtù dei numerosi punti di ramificazione presenti nel polimero gluteninico, l'incorporazione di un terminatore di catena non è in grado di arrestarne completamente la crescita. Sebbene il modello proposto da Graveland tenga conto dell'affinità intrinseca fra le subunità di tipo *x* e quelle di tipo *y*, non dà spiegazione del fatto che le dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici, almeno quelle al di sotto del milione, varino linearmente.

In base a quanto esposto è evidente che sia il modello proposto da Ewart, e successivamente elaborato da Kasarda, sia quello di Graveland presentano dei punti deboli. E' verosimile che la reale struttura dei polimeri gluteninici sia rappresentata da una fusione elaborata di entrambi i modelli. In particolare, è possibile che una subunità

di tipo x ed una di tipo y si leghino tra di loro e che altre subunità (principalmente LMW-GS ma anche HMW-GS e gliadine modificate) si leghino a loro volta a questo dimero (Fig. 10). Tale modello potrebbe spiegare la variazione lineare delle dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici ed anche la presenza di dimeri x - y e x - x .

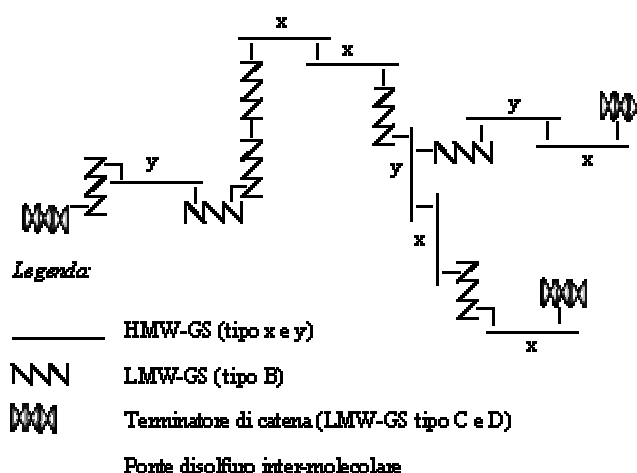


Fig. 10 Modello ipotetico della struttura dei polimeri gluteninici dedotto sulla base della marcata affinità tra le subunità di tipo x e quelle di tipo y

1.2 REOLOGIA

1.2.1 Strumenti per valutare le caratteristiche reologiche degli impasti

Come già ampiamente discusso, le proprietà reologiche degli impasti dipendono in massima parte dal glutine ed, in particolare, dalla sua composizione e dalla struttura dei polimeri gluteninici. La distribuzione dei pesi molecolari dei polimeri gluteninici ed il rapporto fra le HMW-GS e le LMW-GS sono fattori fortemente correlati alle proprietà di elasticità-forza dell'impasto. In particolare, maggiori sono le dimensioni dei polimeri gluteninici e maggiore è il rapporto HMW-GS/LMW-GS di questi polimeri, migliori sono le caratteristiche panificatorie degli impasti (Schropp *and* Wieser, 1996; Weegels *et al.*, 1996; Gras *et al.*, 2001).

Poiché la comprensione delle proprietà reologiche di un impasto è un fattore critico nel predirne il comportamento durante la lavorazione e la qualità del prodotto finale, nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi metodi finalizzati a studiare le proprietà visco-elastiche degli impasti (Walker *and* Hazelton, 1996). Questi metodi

prevedono l'impiego di strumenti quali l'alveografo, l'estensografo, il farinografo ed il mixografo. Per motivi storici e commerciali, l'impiego del farinografo e dell'alveografo si è diffuso soprattutto in Europa, mentre l'uso del mixografo e dell'estensografo si è limitato all'America ed all'Australia. Il farinografo ed il mixografo sono strumenti in grado di registrare la potenza richiesta per lo sviluppo di un impasto, l'alveografo misura la resistenza dell'impasto alla deformazione ed infine l'estensografo misura l'estensibilità degli impasti e la resistenza all'estensione.

Negli studi riportati nella presente tesi, è stato utilizzato un tipo di mixografo denominato micro-mixografo (o 2 g mixografo, in quanto richiede 2 g di farina per sviluppare l'impasto, Fig. 11, pannello A) e pertanto ne verrà fornita una descrizione più approfondita nel paragrafo seguente.

1.2.2 Mixografo: breve descrizione ed applicazioni

Il mixografo è uno strumento utilizzato per produrre un impasto e monitorarne lo sviluppo nel corso del tempo (Hoseney, 1985; Walker *et al.*, 1997). Quando l'acqua è aggiunta alla farina ed inizia il processo di mescolamento, la resistenza che l'impasto offre alle forze di mescolamento cresce fino ad arrivare ad un valore massimo e poi, o si mantiene su un valore costante (*plateau*), o decresce più o meno rapidamente.

Lo sviluppo di un impasto può essere descritto da alcuni parametri desumibili dall'analisi del relativo grafico, il micro-mixogramma, (Fig. 11, pannello B) che sono il *mixing time* (MT), il *peak resistance* (PR) e la *resistance to break down* (RBD). Il MT misura il tempo necessario ad un impasto per raggiungere lo stadio ottimale di sviluppo e coincide con il tempo richiesto per raggiungere la massima altezza della curva micro-mixografica. In particolare il MT è un parametro strettamente correlato alla dimensione dei polimeri gluteninici, in quanto maggiori sono le dimensioni dei polimeri, maggiore è il valore di MT. Il PR è, invece, la resistenza massima offerta dall'impasto alle forze di mescolamento e coincide con la massima altezza della curva. Infine, la RBD misura la tolleranza dell'impasto al fenomeno dell'*over-mixing* ed è indice della perdita delle caratteristiche elastiche dell'impasto durante il mescolamento. La RBD è espressa come la differenza percentuale fra il PR e la resistenza dell'impasto tre minuti dopo.

Poiché il MT e il PR rispecchiano la forza dell'impasto, mentre la RBD la capacità di mantenere inalterate le caratteristiche elastiche anche in condizioni di mescolamento

eccessive, da un punto di vista commerciale farine che presentano un elevato MT e PR e una scarsa RBD sono desiderabili, in quanto questo si traduce in una forza elevata ed in una maggiore finestra di opportunità di fermare il mescolamento dell'impasto senza che le sue caratteristiche elastiche siano peggiorate.

Nei laboratori di reologia sono di norma utilizzati tre tipi di mixografo, il 35-g mixografo, il 10-g mixografo ed infine il 2 g mixografo, classificati sulla base del quantitativo di farina necessaria per produrre l'impasto, rispettivamente 35 g, 10 g e 2 g. Il 35 g mixografo è normalmente utilizzato per la produzione di impasti che sono successivamente impiegati per effettuare prove di *micro-baking*, che consistono nella produzione di panini analizzati per alcuni parametri correlati alla reale qualità panificatoria dell'impasto utilizzato, quali la tessitura della mollica ed il volume di lievitazione (Uthayakumaran *et al.*, 2000a).

Il 10 g e il 2 g mixografo sono, invece, normalmente impiegati per lo studio dell'ereditarietà delle caratteristiche di *mixing* in programmi di incrocio ed, in particolare, l'uso del 2 g mixografo è indicato per lo studio delle prime generazioni, dato l'esiguo quantitativo di farina richiesto. Un'ulteriore applicazione del 2 g mixografo è costituita dai test di incorporazione e di addizione in cui singole subunità gluteniniche (test di incorporazione) e gliadiniche (test di addizione) vengono aggiunte ad un impasto base e le loro proprietà funzionali dedotte sulla base della loro influenza sulle caratteristiche di *mixing* dell'impasto.

1.2.3 Test di addizione e di incorporazione

I test di incorporazione e di addizione rappresentano un valido approccio per determinare i rapporti struttura-funzione delle singole subunità gluteniniche e gliadiniche, rispettivamente incorporate ed addizionate ad un impasto base. Le gliadine, essendo proteine monomeriche, necessitano di essere semplicemente addizionate all'impasto base e ne determinano un indebolimento nelle caratteristiche di forza ed elasticità, riducendo il MT e il PR e incrementando la RBD (Khatkar *et al.*, 2002).

Per quanto concerne le glutenine, esse, essendo proteine polimeriche, necessitano di essere incorporate chimicamente nell'impasto mediante un processo di riduzione-ossidazione parziale messo a punto inizialmente da Bèkès *et al.* (1994) in frumento tenero.

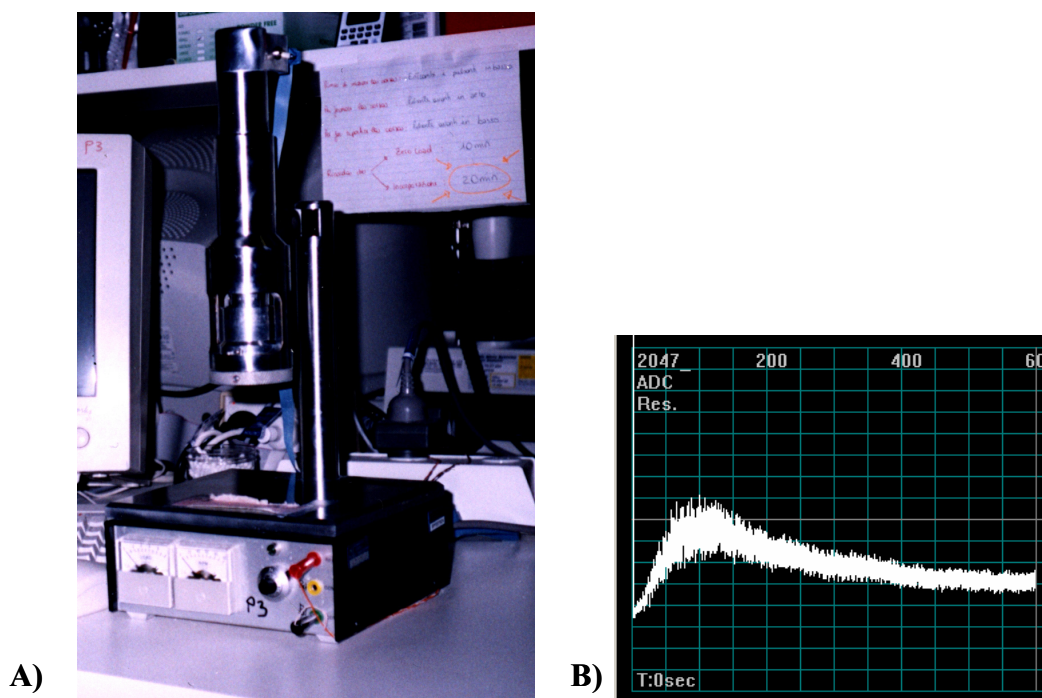


Fig. 11 Pannello A micro-mixografo; pannello B, esempio di curva micro-mixografica. Il mixografo riportato in figura è un prototipo realizzato nei laboratori di ingegneria dello CSIRO (Canberra, Australia) ed è stato utilizzato per effettuare gli esperimenti di incorporazione descritti nella presente tesi di Dottorato. La curva mixografica riportata nel pannello B si riferisce ad un impasto ottenuto dalla semola della cv. di frumento duro Lira, biotipo 42. Sull'asse delle x è riportato il valore di tempo (10 min), mentre sull'asse delle y il valore di resistenza espresso in unità arbitrarie. Come è evidente, la curva micro-mixografica rispecchia la natura debole dell'impasto, caratterizzato da una scarsa tolleranza all'*over-mixing* (la curva, raggiunto il MT, decresce rapidamente) e da una modesta elasticità (la curva ha uno scarso spessore).

Mediante i test di incorporazione è stato possibile stabilire che le HMW-GS influenzano fortemente le caratteristiche di forza ed elasticità degli impasti in relazione sia al tipo sia alla quantità di subunità incorporata (Bèkès *et al.*, 1995; Uthayakumaran *et al.*, 2000b; Beasley *et al.*, 2002), mentre le LMW-GS sembrano avere un'importanza secondaria (Gupta *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1999). Il ruolo subordinato esercitato dalle LMW-GS è in parte correlato alla loro ridotta dimensione rispetto a quella delle HMW-GS, in quanto minore è la grandezza della subunità incorporata, minore è l'incremento apportato alle dimensioni dei polimeri gluteninici (Bèkès *et al.*, 1995) e di qui minore è l'incremento del MT. Inoltre, data l'ampia eterogeneità strutturale delle LMW-GS (paragrafo 1.4.2.2.2 dell'Introduzione), è atteso che esse contribuiscano in modo assai diversificato alle caratteristiche visco-elastiche degli impasti a seconda della loro appartenenza al gruppo B (elementi di allungamento dei polimeri gluteninici) C e D

(elementi di terminazione dei polimeri gluteninici). Infatti caratteristiche strutturali delle LMW-GS, come la distribuzione dei residui cisteinici lungo la sequenza polipeptidica (Shewry *and* Tatham, 1997) e la loro composizione amminoacidica (Bloksma *and* Bushuk, 1988; Pomeranz, 1988) si sono dimostrati fattori determinanti nell'influenzare le caratteristiche reologiche degli impasti in cui vengono incorporate. In generale, comunque, è stato dimostrato che diverse frazioni purificate da frumento corrispondenti a LMW-GS incrementano l'estensibilità (Gupta *and* Shepherd, 1988; Gupta *et al.*, 1989; Gupta *et al.*, 1991) e il MT di impasti in cui sono state incorporate (Sissons *et al.*, 1997).

Le subunità incorporate ed addizionate all'impasto base possono essere purificate da frumento o prodotte mediante espressione eterologa. L'espressione eterologa si presenta un valido strumento per ottenere le proteine da aggiungere all'impasto (Bèkès *et al.*, 1994; Dowd *and* Bèkès, 2002) in quanto, spesso, data la marcata somiglianza nelle caratteristiche fisico-chimiche delle prolamine, il loro isolamento dalla farina ad un elevato grado di purezza ed omogeneità è ostacolato dalla presenza di proteine contaminanti che vengono co-purificate. Un ulteriore vantaggio dell'espressione eterologa è costituito dalla possibilità di poter esprimere proteine mutate in specifici residui e correlare la presenza di una data caratteristica strutturale a determinati effetti sulle caratteristiche di *mixing* dell'impasto (Tamàs *et al.*, 2002).

Una prova molto evidente della validità e della riproducibilità degli esperimenti di incorporazione, qui brevemente descritti, è costituita dagli esperimenti condotti da Bèkès *et al.* (1998), utilizzando impasti ricostituiti con alcune HMW-GS e farine di frumento tenero transgeniche che esprimevano lo stesso tipo di subunità incorporata. In questi esperimenti, i risultati ottenuti dall'incorporazione di specifiche HMW-GS e dalle curve micro-mixografiche relative alla farine transgeniche sono risultati del tutto confrontabili e riproducibili.

1.3 ESPRESSIONE ETEROLOGA DI PROTEINE

1.3.1 Espressione eterologa di proteine in *Escherichia coli*

Tra i molti sistemi disponibili per la produzione di proteine eterologhe, il batterio Gram-negativo *Escherichia coli* è uno dei più utilizzati per la sua capacità di crescere rapidamente ad alta densità su terreni poco costosi, per i suoi meccanismi genetici ampiamente conosciuti e per la disponibilità di un gran numero di vettori di clonaggio e di ceppi mutanti ospiti. Sebbene non ci sia nessuna garanzia che il prodotto genico ricombinante sia accumulato in *E. coli* ad alti livelli in una forma completa e biologicamente attiva, molti sforzi sono stati diretti verso il miglioramento della prestazione e della versatilità di questo microrganismo. Il problema maggiore dell'espressione eterologa in *E. coli* è rappresentato dall'incapacità dei microrganismi procarioti di eseguire modifiche post-traduzionali che sono invece presenti nelle proteine eucariotiche, quali la glicosilazione, la fosforilazione, l'acetilazione, l'acilazione, la solfatazione, la maturazione di precursori proteici e la γ -carbossilazione che sono spesso necessarie per la produzione di un prodotto stabile e funzionale (Weickert *et al.*, 1996; Baneyx, 1999; Swartz, 2001; Sørensen and Mortensen, 2005).

Recentemente Novagen ha introdotto sul mercato la serie dei vettori pET per l'espressione di proteine ricombinanti in cellule batteriche. Nel sistema pET, i geni bersaglio sono situati in un plasmide di espressione a medio numero di copie, a valle del promotore della RNA Polimerasi del fago T7, codificata *in trans* dal cromosoma dell'ospite. L'espressione della RNA polimerasi del fago T7 è indotta dall'aggiunta di isopropil β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) al mezzo di coltura batterico e culmina con la trascrizione e traduzione del gene di interesse. La T7 RNA Polimerasi presenta un così elevato grado di processività e selettività per il suo promotore, che incanala la gran parte delle risorse della cellula batterica verso l'espressione della proteina ricombinante, i cui livelli possono raggiungere il 50% delle proteine cellulari totali dopo poche ore di induzione (Studier and Moffat, 1986).

Accanto ai tradizionali sistemi di clonaggio basati sulla serie dei vettori pET, Invitrogen ha recentemente introdotto sul mercato una tecnologia di clonaggio basata sulla ricombinazione sito specifica del fago λ , denominata *Gateway*, che permette il trasferimento del gene di interesse da un vettore donatore a tutta una serie di vettori riceventi di espressione in cellule batteriche, in cellule di insetto ed in pianta, rendendo

possibile il clonaggio e l'espressione di proteine di interesse ad un elevato grado di processività in tempi relativamente brevi (Stevens, 2000; Betton, 2004). La tecnologia *Gateway* (ampiamente discussa nel paragrafo 3.2.1.1 dei Materiali e Metodi) è stata utilizzata per il clonaggio ed espressione in cellule batteriche di geni codificanti una gliadina di tipo α e rare subunità gluteniniche a basso peso molecolare, impiegate poi per l'allestimento di test funzionali di incorporazione. La scelta di esprimere le subunità gluteniniche in *E. coli* è stata dettata dal fatto che le prolammine sono generalmente prive di modificazioni post-traduzionali, ad eccezione della presenza di ponti disolfuro intra e inter-catena. La mancanza dei ponti disolfuro nelle proteine ricombinanti espresse è considerata un fatto trascurabile al fine di studiare la loro funzionalità negli esperimenti di incorporazione, in quanto esse vengono aggiunte alla farina congiuntamente ad un agente riducente la cui funzione è quella di ridurre parzialmente i polimeri gluteninici e quindi anche la proteina eterologa aggiunta.

1.3.2 Espressione eterologa di proteine in *Nicotiana benthamiana* tramite il virus PVX

Attualmente le piante rivestono una grande importanza come bio-fabbriche per la produzione di proteine ricombinanti su larga scala. Rispetto ad altri sistemi di produzione di proteine e peptidi, quali ad esempio la fermentazione, le piante presentano numerosi vantaggi in termini di flessibilità e di costi ed inoltre permettono di esprimere proteine eucariotiche che presentino eventuali modificazioni post-traduzionali.

Accanto ai tradizionali metodi di trasformazione basati sul metodo biolistico o su *Agrobacterium tumefaciens*, recentemente sono stati sviluppati vettori virali vegetali di tipo episomale che permettono un'espressione transiente del polipeptide di interesse. Tali vettori presentano talvolta problemi di instabilità genetica che viene ampiamente compensata da alcuni vantaggi, come la facilità di inserimento e di diffusione autonoma del vettore virale nelle piante (Ahlquist *and* Pacha, 1990; Hull, 1990; Joshi *et al.*, 1990) e l'alto numero di cicli di replicazione per cellula del genoma virale (Lacomme *et al.*, 1998). Inoltre, l'espressione transiente si rende di particolare utilità nel caso in cui la proteina ricombinante risulti tossica per la pianta durante la fase di rigenerazione.

Un virus molto utilizzato come vettore per l'espressione *in planta* è il virus X della

patata (PVX) (Chapman *et al.*, 1992). Questo virus che appartiene alla classe dei Potexvirus, presenta un'ampia specificità d'ospite, in particolare per la famiglia delle *Solanaceae*. PVX ha forma bastoncellare, possiede un genoma costituito da RNA a singolo filamento positivo che si avvolge a spirale lungo un asse longitudinale, associato alle proteine di rivestimento. Il suo genoma, le cui dimensioni sono comprese fra 2 e 2.5×10^6 bp, presenta sequenze 5' e 3' maturate come tutti gli mRNA eucariotici essendo presenti rispettivamente il cappuccio 5' (7 metil-Gppp) e la coda di poliadenilazione. L'organizzazione genomica di PVX e di molti altri virus appartenenti alla classe dei Potexvirus consiste nella presenza di cinque moduli di lettura aperti (ORF) il primo dei quali inizia 108 nucleotidi a valle dell'estremità 5' e codifica per RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp), l'enzima di circa 147 kDa che consente la replicazione virale nelle cellule ospiti. L'ORF disposta al 3' del genoma codifica per la *Coat Protein*, la proteina di rivestimento virale con massa molecolare di 21 kDa, la cui sequenza aminoacidica risulta essere molto conservata all'interno della classe dei Potexvirus. Esperimenti condotti da Dolja *et al.* (1987) hanno indicato che questa proteina è tradotta da un RNA subgenomico che viene prodotto dalla RdRp nel corso dell'infezione. Le ORF 2 e 3 codificano proteine di membrana coinvolte nel movimento intercellulare del virus *via* plasmodesmi, dando origine a un'infezione sistemica. Infine, la ORF 4 codifica una piccola elicasi con massa molecolare di 7 kDa coinvolta nella replicazione virale (Beck *et al.*, 1991).

Recentemente sono stati prodotti differenti costrutti utilizzando il genoma di PVX, basati su sistemi sia di inserzione che di sostituzione ed entrambi hanno riportato una buona efficienza di espressione. Uno di questi, denominato pPVX201 e basato su un sistema di inserzione, è stato impiegato per la produzione eterologa di alcune LMW-GS *wild type* e mutate in uno specifico residuo amminoacidico situato in posizione 23, al fine di studiare il processamento N-terminale a cui vengono verosimilmente sottoposte le LMW-GS.

2 SCOPO DEL LAVORO

Le proprietà tecnologiche uniche delle farine di frumento sono dovute principalmente ad una classe di proteine di riserva denominate prolammine, in relazione al loro elevato contenuto in prolina e glutammina. Le prolammine sono state classificate in due gruppi distinti a seconda della loro natura monomerica (gliadine) o polimerica (glutenine) e conferiscono specifiche proprietà di elasticità, estensibilità e forza ai relativi impasti. In particolare, le gliadine sono largamente responsabili delle caratteristiche di estensibilità degli impasti e sono considerate il fattore principale che causa la malattia celiaca (Ellis *et al.*, 2003; Dewar *et al.*, 2004; Londei *et al.*, 2005), la più comune intolleranza umana al glutine che attualmente nel mondo occidentale interessa un individuo su duecento (Mäki and Collin, 1997; Accomando and Cataldo, 2004; Koning, 2005). Delle tre classi in cui le gliadine sono state classificate sulla base della loro mobilità in elettroforesi acida, α/β , γ ed ω -gliadine, i polipeptidi appartenenti alla classe α sembrano essere quelli maggiormente responsabili dell'instaurarsi della risposta immune glutine-mediata negli individui celiaci (Picarelli *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2002; Mowat, 2003).

Per quanto concerne invece le glutenine, esse sono responsabili delle caratteristiche di elasticità e forza degli impasti e sono state classificate in due gruppi diversi a seconda della loro mobilità elettroforetica in condizioni denaturanti, costituiti dalle subunità gluteniniche ad alto (HMW-GS) ed a basso peso molecolare (LMW-GS). Mentre le HMW-GS sono state fino ad ora ampiamente studiate e caratterizzate da un punto di vista funzionale e strutturale, in relazione al relativo esiguo numero di subunità espresse (3 e 5, rispettivamente in frumento duro e tenero), lo studio delle LMW-GS è ancora ad uno stadio incompleto, a causa dell'ampio numero di subunità espresse nell'endosperma di frumento (circa una trentina in frumento tenero, Cassidy *et al.*, 1998) ed a causa della loro marcata somiglianza nelle caratteristiche fisico-chimiche, che ne rende difficoltosa la purificazione per le successive analisi.

Le LMW-GS sono state classificate in tre gruppi a seconda della loro mobilità elettroforetica e dei relativi punti isoelettrici, in subunità di tipo B, C e D. Mentre le subunità di tipo B corrispondono alle LMW-GS tipiche, le subunità appartenenti al gruppo C e D sono costituite da α/β , γ ed ω -gliadine che hanno verosimilmente acquisito o perso uno o più residui cisteinici ed, in virtù di questa caratteristica, prendono parte alla formazione dei polimeri gluteninici. Per le ω -gliadine è stato ampiamente dimostrato

che l'acquisizione di un residuo cisteinico, causa la loro incorporazione nei polimeri gluteninici (Masci *et al.*, 1993, 1999), mentre per quanto concerne le α/β , γ -gliadine questo è stato solamente ipotizzato sulla base della presenza nei polimeri gluteninici di frammenti corrispondenti a tali sequenze (Tao *and* Kasarda, 1989; Masci *et al.*, 1995; Muccilli *et al.*, 2005).

Per quanto concerne le LMW-GS tipiche (tipo B), esse sono state ulteriormente classificate in LMW-s, LMW-m e LMW-i, a seconda della natura del primo amminoacido costituente la catena polipeptidica matura. Mentre sequenze N-terminali corrispondenti a LMW-m e LMW-s sono ampiamente documentate (Tao *and* Kasarda, 1989; Lew *et al.*, 1992; Masci *et al.*, 1995), quelle corrispondenti a LMW-i non sono mai state identificate e, sebbene dati indiretti siano stati riportati a favore dell'espressione *in vivo* di tali subunità (Cloutier *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2004), antecedentemente al presente lavoro di tesi mancava una chiara indicazione circa la loro eventuale espressione.

Un altro punto non chiaro circa le LMW-GS tipiche, è relativo alla diversità delle sequenze N-terminali dei polipeptidi maturi appartenenti alle classi s ed m. Infatti, il confronto delle sequenze N-terminali delle LMW-m e delle LMW-s mostra che esse differiscono principalmente per la presenza, nelle sequenze di tipo m, dei primi tre amminoacidi MET che, secondo una recente ipotesi (Masci *et al.*, 1998), sarebbero eliminati dalle sequenze di tipo s ad opera di un'asparaginil endoproteasi che, in base al modello proposto, riconosce l'asparagina in posizione 23 nelle sequenze di tipo s (DuPont *et al.*, 2004).

Sulla base di tali premesse, le finalità del presente lavoro di tesi sono state quelle di contribuire ad una maggiore comprensione di alcuni aspetti strutturali, funzionali e tossicologici, riguardanti le proteine di riserva di frumento, con particolare riferimento ad una LMW-i (LMW1A1), ad una γ -gliadina che presenta un residuo cisteinico addizionale (clone pTD9, verosimilmente corrispondente ad una LMW-GS di tipo C), ad una LMW-m (B1133), ad una LMW-s (LMW42K) ed infine ad una gliadina di tipo α (clone pTS63).

In particolare, si era interessati a dimostrare l'eventuale espressione *in vivo* della LMW-i e della γ -gliadina modificata ed alla verifica della loro appartenenza alla frazione monomerica o polimerica del glutine. Inoltre, in relazione alla loro particolare struttura primaria (paragrafi 3.1.1 e 3.2.1.2 dei Materiali e Metodi), si voleva comprendere il loro ruolo svolto nel determinare le proprietà visco-elastiche del glutine.

A tal fine tali polipeptidi sono stati espressi in *E. coli*, prodotti su larga scala ed infine impiegati in test di incorporazione mediante l'ausilio di un micro-mixografo presso il laboratorio di “*Dough Rheology*”, divisione di *Plant Industry*, CSIRO, Canberra, Australia. Questi test sono test funzionali *in vitro*, in cui la singola subunità oggetto di studio viene ad essere incorporata in un impasto base mediante un processo di riduzione-ossidazione parziale ed i suoi effetti sulle proprietà reologiche degli impasti sono valutati mediante confronto con l'impasto di controllo, costituito dalla stessa farina base semplicemente ridotta ed ossidata.

Per quanto concerne invece gli aspetti tossicologici, è stata espressa in *E. coli* una subunità gliadinica di tipo α , isolata da *Triticum aestivum* sottospecie *spelta* (Kasarda and D'Ovidio, 1999). L'espressione in *E. coli* di tale subunità è stata finalizzata ad un suo successivo impiego in test tossicologici *in vitro*, che verranno eseguiti in collaborazione con il gruppo del Prof. Picarelli del Policlinico Umberto I di Roma, al fine di una migliore comprensione delle caratteristiche della risposta immune glutine-mediata, montata dalla mucosa intestinale degli individui celiaci.

Infine, un altro aspetto analizzato nel presente lavoro di tesi è stato quello di comprendere il processamento N-terminale a cui vengono verosimilmente sottoposte le LMW-m e le LMW-s. Come esposto precedentemente, ci sono delle indicazioni che la diversità delle sequenze amminoacidiche N-terminali proprie delle LMW-s e LMW-m siano dovute ad un taglio proteolitico operato da un'asparaginil endoproteasi in corrispondenza dell'asparagina in posizione 23 delle LMW-s. Per dimostrare tale ipotesi, alla luce della conservazione dei processi di modificazione post-traduzionali nel regno vegetale, sono state espresse in *Nicotiana benthamiana* una LMW-m (LMW-GS B1133), una LMW-s (LMW-GS 42K) *wild type* e mutagenizzate nel residuo 23 (mutagenesi T23N per la LMW-m e mutagenesi N23T per la LMW-s). Se l'ipotesi del diverso processamento a cui le LMW-s e LMW-m sono sottoposte si dimostra corretta, per quanto concerne la LMW-GS B1133, è atteso che la sequenza N-terminale del polipeptide eterologo *wild type* sia METSCISGL e quella relativa al polipeptide mutato (T23N) sia SCISGL, mentre la sequenza attesa della LMW-GS 42K *wild type* sia SHIPGL e quella del polipeptide mutato (N23T) sia METSHIPGL.

3 MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALS

3.1.1 Cloni codificanti la gliadina di tipo α e la gliadina di tipo γ

I geni codificanti l' α -gliadina (numero di accessione AJ130948) e la γ -gliadina (numero di accessione X77963) sono stati gentilmente forniti dal Prof. Renato D'Ovidio (Università della Tuscia, Viterbo). I geni sono stati isolati rispettivamente da *Triticum aestivum* sottospecie *spelta* (Kasarda and D'Ovidio, 1999) e da *Triticum durum* cv. Lira biotipo 45 (D'Ovidio *et al.*, 1995), clonati in pUC18 e denominati rispettivamente pTS63 e pTD9.

Il clone pTS63 contiene l'intera sequenza genica di una tipica gliadina di tipo α (la cui struttura è schematizzata in Fig. 6 dell'Introduzione) e codifica un polipeptide di 288 amminoacidi con peso molecolare teorico di 33.203 Da. Il clone pTD9 contiene, invece, l'intera sequenza genica codificante una gliadina di tipo γ di 302 amminoacidi (peso molecolare teorico 34.302 Da) che presenta, oltre alle otto cisteine tipiche delle γ -gliadine, un'ulteriore cisteina in posizione 26, all'inizio del dominio ripetuto. In virtù di questa particolare caratteristica strutturale, si farà riferimento alla gliadina di tipo γ in termini di γ -gliadina modificata, sottintendendo che la modificazione riguarda il numero delle cisteine presenti. La struttura schematica di tale polipeptide è riportata in Fig. 12.

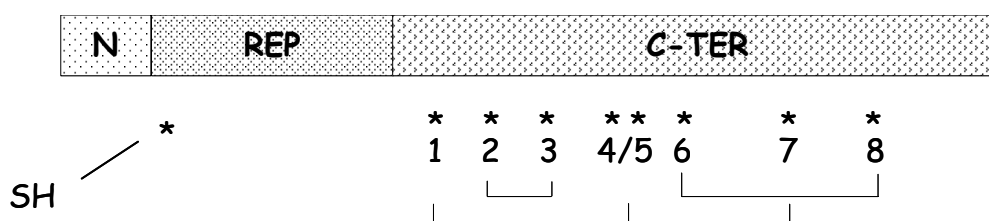


Fig. 12 Rappresentazione schematica della γ -gliadina modificata nel numero di cisteine (clone pTD9). I numeri da 1 a 8 indicano i residui di cisteina la cui posizione è conservata rispetto alle γ -gliadine tipiche. L'asterisco accompagnato da -SH, indica la cisteina aggiuntiva, localizzata all'inizio del dominio ripetuto.

3.1.2 Clone codificante la LMW-GS B1133

Il gene codificante la LMW-GS B1133 isolato dalla cv. di frumento tenero Cheyenne è stato gentilmente fornito dal Dr. Ceriotti (IBBA, CNR, Milano) clonato nel

vettore pDHA (Orsi *et al.*, 2001). Esso codifica un polipeptide di 304 amminoacidi con un peso molecolare calcolato pari a 34.213 Da e corrisponde ad una LMW-GS tipica la cui struttura è riportata nel pannello A della Fig. 8 dell'Introduzione.

3.1.3 Materiale vegetale

Poiché il gene codificante la LMW1A1 è localizzato sul cromosoma 1A di *Triticum durum* cv. Langdon (D'Ovidio *et al.*, 1997), per dimostrare l'eventuale espressione *in planta* del polipeptide corrispondente, abbiamo utilizzato, oltre alla cv. Langdon, le linee di sostituzione cromosomica inter-varietale LDN 1D(1A) e LDN 1D(1B). In queste linee i cromosomi 1A e 1B della cv. Langdon di frumento duro sono stati sostituiti con la coppia di cromosomi 1D della cv. di frumento tenero Chinese Spring.

Il biotipo 45 della cv. Lira di frumento duro è stato invece utilizzato per dimostrare l'espressione *in vivo* del polipeptide codificato dal gene corrispondente alla γ -gliadina modificata.

La cv. Yecora Rojo di *Triticum aestivum* è stata impiegata per isolare il gene corrispondente alla LMW-GS 42K.

Infine, per effettuare gli esperimenti micro-mixografici in frumento duro è stata utilizzata la semola dei biotipi 42 e 45 della cv. Lira, gentilmente fornita dalla Società Produttori Sementi Italiana (Bologna). Gli esperimenti di incorporazione in frumento tenero sono stati condotti utilizzando la farina della cv. Kukri, fornita dai laboratori della Divisione di *Plant Industry* dello CSIRO di Canberra (Australia).

3.2 MANIPOLAZIONE DEL DNA

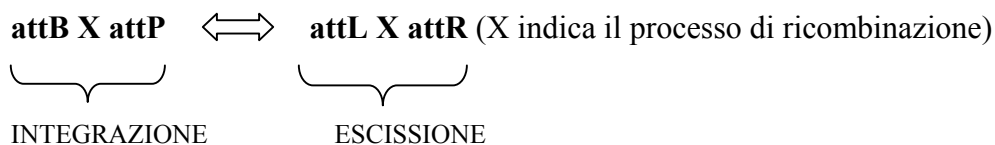
3.2.1 Clonaggio della LMW-i (LMW-1A1) e subclonaggio delle gliadine di tipo α e di tipo γ nel vettore pDest14 tramite la tecnologia Gateway

3.2.1.1 Tecnologia Gateway: descrizione del metodo

Il sistema *Gateway* (Invitrogen) è un sistema di clonaggio che si basa sulla ricombinazione sito-specifica del batteriofago λ in *Escherichia coli*.

Quando il batteriofago λ infetta cellule batteriche di *E. coli* può intraprendere il ciclo litico o lisogenico. Nel primo caso, il batteriofago penetra nella cellula batterica e si riproduce attivamente sfruttando le risorse dell'ospite. Al termine del ciclo litico, il batteriofago e la sua progenie vengono rilasciati all'esterno in seguito ad un processo di lisi della cellula ospite indotto dal batteriofago stesso. Nel ciclo lisogenico, di converso, il batteriofago si integra nel genoma di *E. coli* grazie ad un processo di ricombinazione sito-specifica e viene trasmesso alle cellule figlie di generazione in generazione, fino quando non si verificano condizioni adatte alla sua escissione dal genoma. A questo punto il batteriofago inizia lo stadio litico del suo ciclo vitale.

I processi tramite i quali il batteriofago si integra e si escinde dal genoma di *E. coli* sono mediati da proteine prodotte sia dal batteriofago sia dalla cellula ospite. Queste reazioni di ricombinazione sito-specifica, allestite *in vitro*, sono alla base della tecnologia *Gateway* e possono essere riassunte nel seguente modo:



I quattro siti *att* sono siti di ricombinazione del batteriofago λ e contengono i siti di riconoscimento per le proteine coinvolte nei processi di integrazione ed escissione. In particolare la reazione attB X attP media il processo di integrazione, mentre la reazione attL X attR media il processo di escissione dal genoma. Tramite combinazione delle reazioni descritte, è possibile clonare e trasferire geni in diversi vettori di espressione eterologa (batterio, pianta, cellule d'insetto), mantenendo inalterato l'orientamento e il quadro di lettura. Questo rende la tecnologia *Gateway* altamente versatile ed ad alta processività.

L'applicazione del metodo *Gateway* prevede l'amplificazione per PCR del gene di interesse tramite una coppia di oligonucleotidi che contengono, oltre alla sequenza specifica del gene, i siti attB, necessari per la ricombinazione, e la sequenza Shine-Dalgarno di legame al ribosoma batterico. In particolare, il prodotto di PCR ottenuto è costituito dal gene di interesse fiancheggiato dalle sequenze attB di 25 bp (attB1 che si trova al 5' del gene e attB2 che si trova al 3'

del gene) e viene successivamente utilizzato per allestire la reazione BP in cui un vettore donatore (pDONR201, rappresentato schematicamente in Fig. 13), contenente le sequenze attP, si ricombina specificatamente con il prodotto di PCR. Tale processo, la cui efficienza teorica è stimata intorno al 90%, dà origine ad un vettore ricombinante contenente il gene di interesse fiancheggiato dalle sequenze attL (Fig. 14).

Il vettore ricombinante così ottenuto, viene poi utilizzato per allestire la reazione LR in cui avviene una ricombinazione specifica fra il vettore donatore (plasmide ricombinante) e il vettore di destinazione (pDest14, schematizzato in Fig. 15) contenente le sequenze attR (Fig. 16).

Il metodo *Gateway* qui sommariamente descritto (per i dettagli si rimanda al manuale Invitrogen), è stato utilizzato per clonare la LMW1A1 e subclonare i geni codificanti la gliadina di tipo α e di tipo γ nel vettore di espressione *Gateway* pDest14, per l'espressione eterologa in *E. coli*.

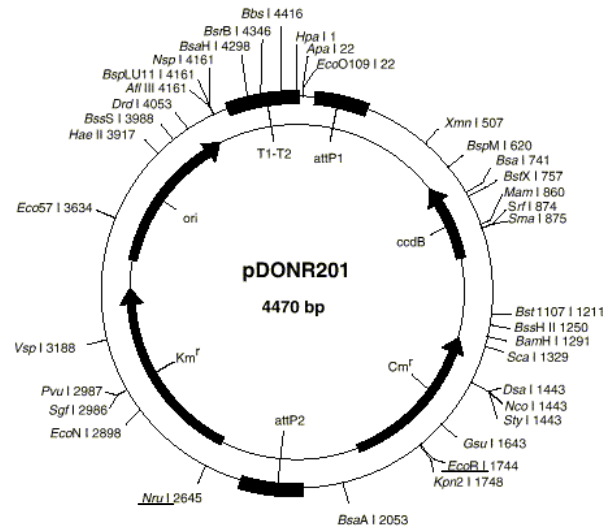


Fig. 13 Rappresentazione schematica del vettore pDONR201. Il vettore pDONR201 è stato impiegato per allestire la reazione BP con i prodotti di PCR codificanti la LMW1A1, l' α -gliadina e la γ -gliadina fiancheggiati dai siti attB.

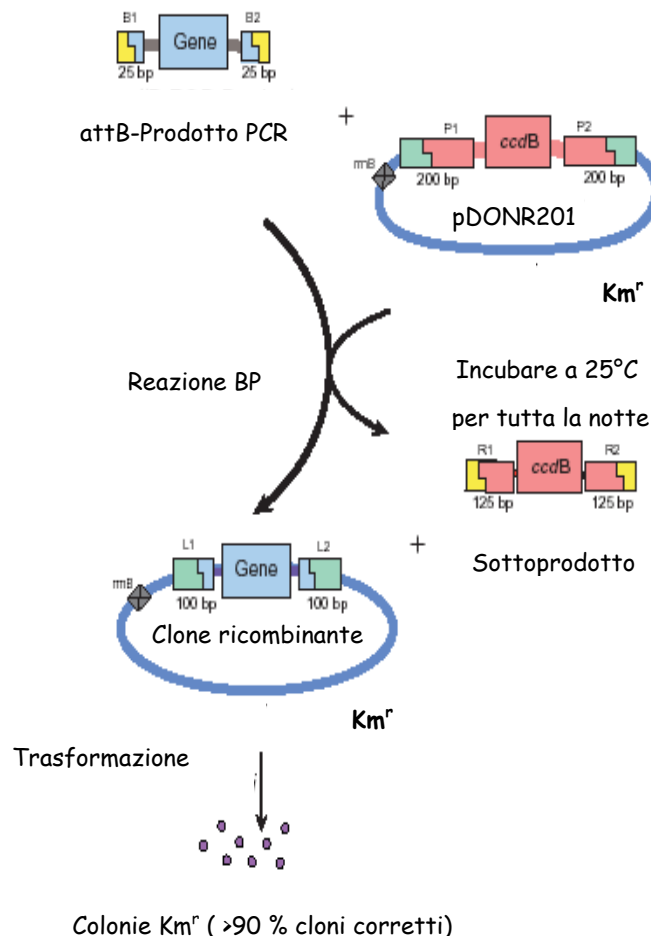


Fig. 14 Rappresentazione schematica della reazione BP. Il prodotto di PCR (gene) è clonato nel vettore donatore (pDONR201) tramite il processo di ricombinazione specifica tra i siti attB presenti nel prodotto di PCR e i siti attP presenti nel vettore donatore.

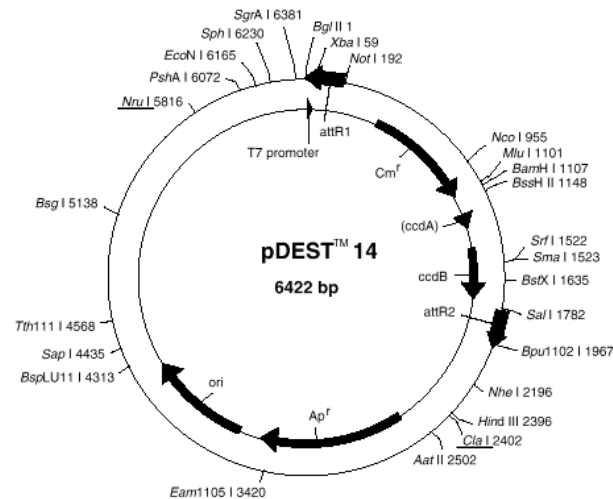


Fig. 15 Rappresentazione schematica del vettore di espressione pDest14. I geni codificanti la LMW1A1 e le gliadine di tipo α e di tipo γ sono stati inseriti in questo vettore per l'espressione eterologa.

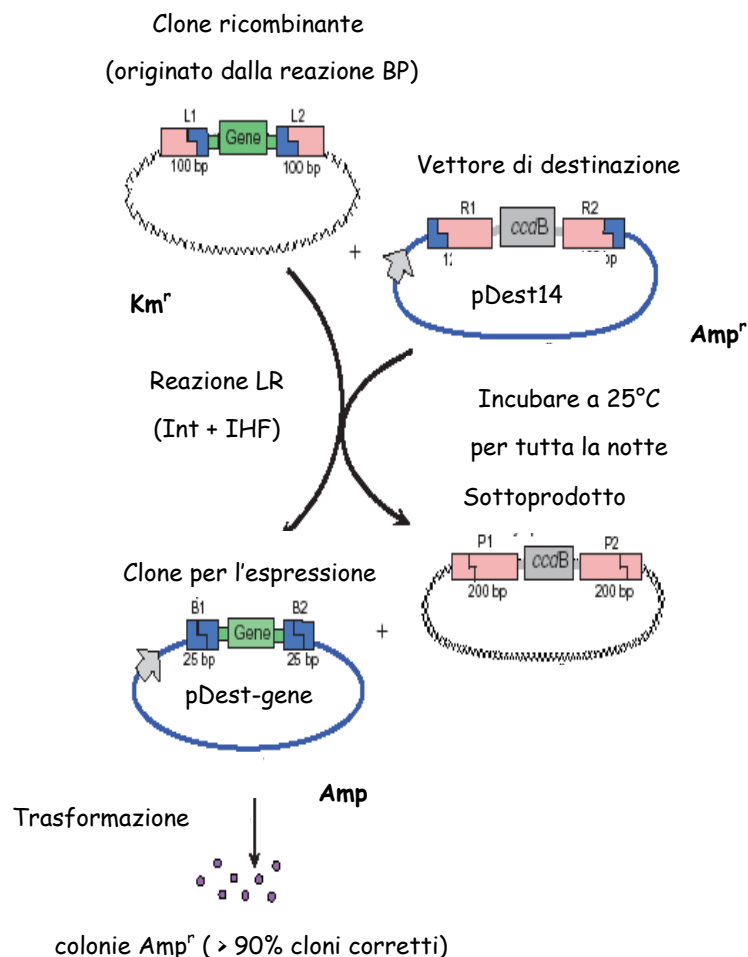


Fig. 16 Rappresentazione schematica della reazione LR. Nella reazione LR il clone ricombinante ottenuto dalla reazione BP, ricombina con il vettore di destinazione pDest14 ed origina il vettore ricombinante pDest-gene che viene utilizzato per l'espressione eterologa.

3.2.1.2 Isolamento del gene codificante la LMW1A1 dal DNA genomico di *Triticum durum* cv. Langdon

Il gene codificante la LMW1A1 è stato isolato dal DNA genomico di *Triticum durum* cv. Langdon. In particolare, il DNA genomico della cv. Langdon è stato amplificato con la coppia di oligonucleotidi specifici DOV8/VT103 che producono un unico inserto di dimensioni paria a 1258 bp, corrispondente al gene codificante la LMW1A1 e parte della sequenza promotrice di 97 bp. La porzione codificante dell'amplificato è caratterizzata da un quadro di lettura aperto di 1161 bp e codifica una proteina di 387 amminoacidi con un peso molecolare teorico di 44.499 Da. In base alla sequenza amminoacidica dedotta, la LMW1A1 manca della breve regione N-terminale caratteristica delle LMW-GS tipiche, in cui è localizzata di norma la prima cisteina; di conseguenza, il polipeptide maturo inizia direttamente con la sequenza codificante la zona ripetuta. La presenza di un'ulteriore cisteina (C*) localizzata fra C₃ e C₄, oltre alle sette cisteine localizzate in posizione conservata nel dominio C-terminale, fa sì che la LMW-1A1 mantenga inalterato il numero di cisteine caratteristico delle LMW-GS tipiche, pari ad 8 (Fig. 17).

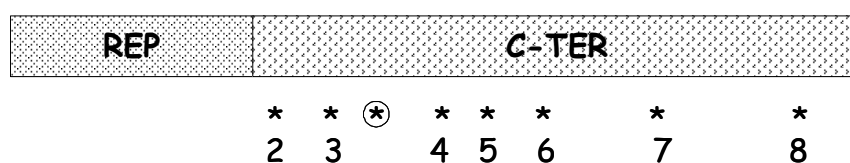


Fig. 17 Rappresentazione schematica del polipeptide maturo corrispondente alla LMW1A1. I numeri da 2 a 8 indicano i residui di cisteina conservati rispetto alle LMW-GS tipiche, mentre l'asterisco cerchiato indica la cisteina addizionale (C*).

Qui di seguito è riportata la sequenza degli oligonucleotidi DOV8/VT103 utilizzati per isolare il gene LMW1A1 dal DNA genomico della cv. Langdon.

DOV8

5'AGGTGGTGTCCCGCAACTAT3'

VT103

5'GTAGGCACCAACTCCGGTGC3'

3.2.1.3 Preparazione dei prodotti di PCR corrispondenti alle sequenze geniche codificanti la LMW1A1 e le gliadine di tipo α e γ fiancheggiati dai siti attB

Il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione con gli oligonucleotidi DOV8 e VT103 del DNA genomico di frumento duro cv. Langdon, è stato purificato da gel di agarosio e sottoposto ad un'ulteriore reazione di amplificazione con gli oligonucleotidi GWLMWI2F e GWLMW1BR per l'inserimento dei siti attB e della sequenza di riconoscimento del ribosoma.

I cloni pTS63 e pTD9 (vedi paragrafo 3.1.1) sono stati sottoposti alle reazioni di PCR rispettivamente con le coppie di oligonucleotidi GW α GF/GW α 2GR e GW γ GF/GW γ GR.

Qui di seguito è riportata la sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per le reazioni di amplificazione. In particolare, la sequenza attB (attB1 nell'oligonucleotide *forward* ed attB2 nell'oligonucleotide *reverse*) è evidenziata in grigio, la sequenza di legame al ribosoma Shine-Dalgarno è in corsivo, l'ATG di inizio traduzione e il CTA di STOP in grassetto. Infine, la sequenza specifica del gene è sottolineata. Le quattro guanine al 5' degli oligonucleotidi sono necessarie per rendere le sequenze attB un efficiente substrato per la reazione BP.

GWLMWI2F

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGGAGATAGAACCATGA
TTTCACAGCAACAACAACCACCACC 3'

GWLMW1BR

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGTAGGCACCAACTCCGG
T 3'

GW α GF

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGGAGATAGAACCATGG
TTAGAGTTCCAGTG 3'

GW α 2GR

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTAGTACCGAAGATGC
C3'

GW γ GF

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGGAGATAGAACCATGA
ATATGCAAGTCGACCC 3'

GW γ GR

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTGGCCACCAATGCCAG
C3'

La PCR è stata eseguita utilizzando una *PCR Express* (HYBAID) e usando la DNA polimerasi Platinum *Pfx* (GIBCO BRL). Le reazioni sono state allestite in 50 μ l contenenti 5 μ l del tampone di PCR 10X, 300 μ M dNTPs, 1 mM MgSO₄, 200 ng di ogni oligonucleotide, 1.25 unità della DNA polimerasi Platinum *Pfx* e circa 100 ng di DNA. Il programma di PCR seguito è stato il seguente: 94°C 2 min, 1 ciclo; 94°C 15 s, 55°C 30 s, 68°C 1 min, 30 cicli; 68°C 2 min, 1 ciclo; 4°C ∞ .

Poiché oltre ai prodotti delle dimensioni attese, erano presenti anche altri prodotti contaminanti, è stato necessario caricare tutto il prodotto di PCR su gel di agarosio allo 1.2% e recuperare i prodotti delle dimensioni attese.

3.2.1.4 Reazione BP

La reazione BP ha come scopo quello di inserire il gene di interesse fiancheggiato dalle sequenze attB nel vettore donatore pDONR201.

La reazione BP è stata allestita in un volume finale di 20 μ l costituiti da:

- 2 μ l del vettore pDONR201 (corrispondenti a 300 ng)
- 30-60 ng del prodotto PCR fiancheggiato dalle sequenze attB (ottenuto secondo quanto descritto nel paragrafo 3.2.1.3)
- 4 μ l del tampone di reazione BP
- 4 μ l miscela enzimatica contenente la proteina integrasi (Int) e il fattore di integrazione dell'ospite (IHF)

- tampone TE fino a 20 μ l

La reazione è stata allestita in ghiaccio ed incubata a 25°C per tutta la notte. Successivamente 2 μ l di proteinasi K sono stati aggiunti alla miscela di reazione che è stata incubata a 37°C per 10 minuti. 5 μ l della miscela di reazione BP così ottenuta sono stati usati per trasformare cellule competenti DH5 α .

3.2.1.5 Reazione LR

La reazione LR è finalizzata al trasferimento del gene di interesse dal vettore donatore pDONR201 al vettore di destinazione pDest14, per l'espressione del gene di interesse in batterio.

La reazione LR è stata allestita in un volume finale di 20 μ l costituiti da:

- 2 μ l del vettore pDest14 (corrispondenti a 300 ng)
- 100 ng del plasmide ricombinante ottenuto tramite reazione BP
- 4 μ l del tampone di reazione LR
- 4 μ l miscela enzimatica contenente la proteina integrasi (Int), la proteina di escissione (Xis) e il fattore di integrazione dell'ospite (IHF)
- tampone TE fino a 20 μ l

La reazione è stata allestita in ghiaccio ed incubata a 25°C per tutta la notte. Successivamente 2 μ l di proteinasi K sono stati aggiunti alla miscela di reazione, che è stata incubata a 37°C per 10 minuti. 5 μ l della miscela di reazione LR così ottenuta sono stati usati per trasformare cellule competenti DH5 α .

3.2.2 Subclonaggio della sequenza genica codificante la LMW-GS B1133 (*wild type* e T23N) e clonaggio del gene LMW-GS 42K (*wild type* e N23T) in pPVX201 per l'espressione transiente in *Nicotiana benthamiana*

3.2.2.1 Clonaggio della LMW-GS 42K nel vettore pBluescript SK (+/-)

3.2.2.1.1 Isolamento delle sequenze geniche codificanti la LMW-GS 42K dal DNA genomico di *Triticum durum* cv. Yecora Rojo e clonaggio nel vettore pCR-Blunt II-TOPO

Le sequenze geniche codificanti la LMW-42K (numero di accessione Y17845) sono state isolate dal DNA genomico di *Triticum durum* cv. Yecora Rojo utilizzando la coppia di oligonucleotidi VT102 e VT103 che, in questo genotipo, producono tre bande di amplificazione di cui la più alta (1144 bp) corrisponde a parte della sequenza genica codificante la LMW-42K (Masci *et al.*, 1998). La reazione di amplificazione è stata allestita in un volume di 50 µl contenenti 5 µl di tampone 10X addizionato di MgCl₂, 100 ng di DNA genomico, 400 µM di ciascun nucleotide, 200 ng di ciascun oligonucleotide, 2.5 unità di *Fast Start High Fidelity* DNA polimerasi (Roche). Il programma di PCR è stato il seguente: 95°C 2 min, 1 ciclo; 95°C 1 min, 62°C 2 min, 72°C 2 min, 30 cicli; 72°C, 7 min; 4°C ∞. Il prodotto di amplificazione di 1144 bp è stato recuperato da gel di agarosio all'1.2% e nuovamente amplificato con la coppia di oligonucleotidi LMW42KClalF e LMW42KSalIR per l'inserimento dei siti di restrizione ClaI e SalI, utili per il clonaggio in pPVX201 e delle sequenze mancanti al 5' del gene. Qui di seguito è riportata la sequenza degli oligonucleotidi utilizzati. I siti ClaI (nell'oligonucleotide *forward*) e SalI (nell'oligonucleotide *reverse*) sono in corsivo, la sequenza aggiunta al 5' del prodotto di amplificazione ottenuto con la coppia VT102/VT103 è evidenziata in grigio, infine la sequenza specifica del gene è sottolineata.

LMW42KClalF

5'TTGTATCGATGAAGACCTTCCTCATCTTTGCCCTCCTCGCCGTTGCGGCGACAAGTGCAATTGC3'

LMW42KSalIR

5'CGCGTCGACTCAGTAGGCACCAACTCCGGTGC3'

Le reazioni sono state allestite in 50 µl contenenti 5 µl del tampone di PCR 10X, 200 ng di ciascun oligonucleotide, 100 ng dell'inserto LMW-42K ottenuto tramite amplificazione del DNA genomico della cv. Yecora Rojo con gli oligonucleotidi VT102/VT103, 1 unità di *AccuPrime Pfx* DNA polimerasi. Il programma di PCR è stato il seguente: 95°C 2 min, 1 ciclo; 95°C 15 s, 62°C 30 s, 68°C 1min, 30cicli; 68°C, 7 min; 4°C ∞.

Il prodotto di amplificazione ottenuto è stato purificato da gel di agarosio e quindi clonato nel vettore pCR-Blunt II-TOPO (Fig. 18) tramite il *ZeroBlunt TOPO PCR Cloning kit* (Invitrogen). In particolare, la reazione è stata allestita in un volume finale di 6 µl contenenti 10 ng del prodotto di PCR ottenuto tramite amplificazione con gli oligonucleotidi LMW42KClalF e LMW42KSalIR, 1 µl di una soluzione salina, 10 ng di vettore pCR-Blunt II-TOPO. La miscela di reazione è stata quindi incubata a 23°C per 30 minuti e 2 µl sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti TOP10 (Invitrogen). Diverse colonie sono state ottenute da cui è stato estratto il DNA plasmidico e controllato mediante analisi di restrizione. Il plasmide ricombinante ottenuto è stato denominato pTOPOLMW42K.

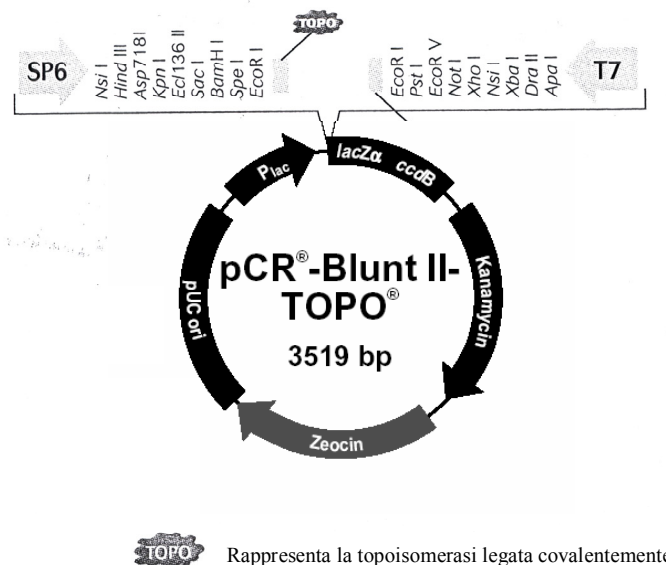


Fig. 18 Rappresentazione schematica del vettore pCR-Blunt II-TOPO. I siti utilizzati per il controllo dei cloni sono stati i due siti EcoRI presenti a monte e a valle del punto di inserimento del gene esogeno.

3.2.2.1.2 Subclonaggio della LMW-GS 42K nel vettore pBluescript SK (+/-)

In seguito ad una marcata instabilità del clone LMW-42K nelle cellule TOP10 e DH5α, è stato necessario subclonare il gene LMW-42K nel vettore

pBluescriptSK(+/-) (Fig. 19) per propagarlo nel ceppo Sure 2 (Stratagene). Il ceppo Sure 2 è un ceppo ingegnerizzato al fine di poter clonare geni che presentino strutture secondarie e terziarie non canoniche che causano riarrangiamenti e delezioni nel batterio. Questo subclonaggio è stato reso necessario dal fatto che il plasmide pCR-Blunt II-TOPO ha marker di resistenza che sono presenti nel ceppo Sure 2 (Kanamicina e Zeocina), rendendo quindi non attuabile la selezione per resistenza all'antibiotico. Il subclonaggio nel vettore pBluescript SK(+/-) è stato eseguito digerendo il vettore pTOPOLMW42K con gli enzimi ClaI e SalI e, dopo corsa su gel di agarosio del prodotto di digestione, si è recuperato l'inserto a più alto peso molecolare (1187 bp) che è stato ligato al vettore pBluescript SK(+/-). Il prodotto risultante è stato denominato pBSLMW42K *wild type*.

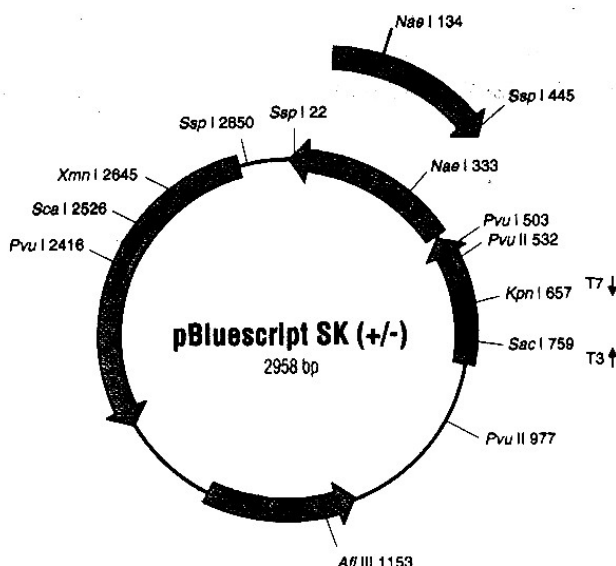


Fig. 19 Rappresentazione schematica del vettore pBluescript SK(+/-). I siti di restrizione utilizzati per il clonaggio in questo vettore sono stati ClaI e SalI, presenti nella sequenza MCS.

3.2.2.2 Mutagenesi T23N della LMW-GS B1133 e N23T della LMW-GS 42K tramite il *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Statagene)

Le reazioni di mutagenesi sito-specifica T23N (sostituzione della treonina in posizione 23 con un'asparagina) del clone pDH4A (contenente l'intera sequenza genica codificante la LMW-B1133, paragrafo 3.1.2, Materiali e Metodi) e N23T (sostituzione dell'asparagina in posizione 23 con una treonina) del clone pBSLMW42K *wild type*, sono state effettuate utilizzando il *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Statagene). Le reazioni sono state allestite in 50 µl contenenti 5 µl del tampone di PCR

10X, 1 µl mistura dNTPs, 125 ng di ogni oligonucleotide, 2.5 unità di *Pfu Ultra HF* DNA polimerasi e 10-20 ng di plasmide. In particolare il plasmide pDH4A è stato amplificato con la coppia di oligonucleotidi B1133F e B1133R mentre il plasmide pBSLMW42K *wild type* è stato amplificato con gli oligonucleotidi LMW42KN23TF e LMW42KN23TR. In basso è riportata la sequenza degli oligonucleotidi utilizzati; in grassetto è evidenziato il nucleotide responsabile della mutazione introdotta (ACT→ AAT per la mutazione T23N; AAT→ ACT per la mutazione N23T).

B1133F

5'CATTGCACAGATGGAGA**A**TAGCTGCATCTCTGG 3'

B1133R

5' CCAGAGATGCAGCTATTCTCCATCTGTGCAATG 3'

LMW42KN23TF

5' CAATTGCACAAATGGAGACTAGCCACATCCCTGG 3'

LMW42KN23TR

5'CCAGGGATGTGGCTAG**T**CTCCATTTGTGCAATTG 3'

Il programma di PCR seguito è stato il seguente: 95°C 30 s, 1 ciclo; 95°C 30 s, 55°C 1 min, 68°C 5 min, 12 cicli; 4°C ∞. Al termine della reazione, 10 µl sono stati caricati su gel di agarosio all'1% per controllare la presenza del prodotto di amplificazione corrispondente ai plasmidi pDH4A e pBSLMW42K. Successivamente 1 µl dell'enzima DpnI (10 U/ µl) è stato aggiunto ai rimanenti 40 µl e la miscela di reazione incubata a 37°C per 1 h al fine di permettere la digestione del DNA parentale metilato ed emimetilato. 1 µl della miscela di reazione di PCR digerita con DpnI è stato quindi utilizzato per trasformare cellule supercompetenti XL1-Blue (Stratagene). Il DNA plasmidico estratto dalle colonie trasformate è stato quindi controllato tramite sequenziamento utilizzando oligonucleotidi specifici per verificare l'inserimento della mutazione T23N nelle sequenze codificanti la B1133 e della mutazione N23T in quelle codificanti la LMW-42K. Una volta individuati i cloni mutagenizzati, questi sono stati denominati rispettivamente pDH4AB1133T23N e pBSLMW42KN23T. I cloni non mutati sono stati denominati pDH4AB1133 *wild type* e pBSLMW42K *wild type*. Per i

dettagli circa il *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) si rimanda all'apposito manuale disponibile in rete (www.stratagene.com).

3.2.2.3 Subclonaggio della LMW-GS B1133 *wild type* e mutata (T23N) nel vettore pPVX201

Al fine di clonare la LMW-B1133 nel vettore pPVX201 è stato necessario inserire a monte e a valle del gene i siti di restrizione ClaI e SalI. I plasmidi pDH4AB1133 *wild type* e pDH4AB1133T23N sono stati amplificati con le coppie di oligonucleotidi B1133ClaIF e LMW42KSalIR e gli amplificati delle dimensioni attese sono stati ligati in pPVX201 dando origine ai costrutti pPVXB1133 *wild type* e pPVXB1133T23N. L'amplificazione dei plasmidi pDH4AB1133 *wild type* e pDH4AB1133T23N con la coppia di oligonucleotidi B1133ClaIF e HLMW42KSalIR ha permesso di ottenere i costrutti pPVXHB1133 *wild type* e pPVXHB1133T23N in cui, al termine della porzione codificante, è presente una coda di sei istidine. La sequenza degli oligonucleotidi è riportata qui di seguito, in corsivo sono evidenziati i siti di restrizione per ClaI e SalI, la sequenza codificante la coda di sei istidine è evidenziata in grigio, mentre la sequenza specifica è sottolineata.

B1133ClaIF

5'TTGTATCGATGAAGACCTTCCTCGTCTTTGC 3'

LMW42KSalIR

5'CGCGTCGACTCAGTAGGCACCAACTCCGGTGC 3'

HLMW42KSalIR

5'CGCGTCGACTCAGTGATGGTGGTGGTGGTAGGCACCAACTCCGGTGC3',

3.2.2.4 Subclonaggio della LMW-GS 42K *wild type* e mutata (N23T) nel vettore pPVX201

Per subclonare il gene codificante la LMW-42K nel vettore pPVX201, i plasmidi pBSLMW42K *wild type* e pBSLMW42KN23T sono stati digeriti con ClaI e

SalI e gli inserti risultanti ligati nel vettore pPVX201. I costrutti ottenuti sono stati denominati pPVXLMW42K*wild type* e pPVXLMW42KN23T. Inoltre al fine di ottenere i costrutti contenenti la coda di istidine al C-terminale, i plasmidi sono stati amplificati con la coppia di oligonucleotidi LMW42KClaIF e HLMW42KSalIR, gli amplificati ottenuti digeriti con ClaI e SalI e ligati in pPVX201. I plasmidi ricombinanti risultanti sono stati denominati pPVXHLMW42K*wild type* e pPVXHLMW42KN23T. La sequenza degli oligonucleotidi è riportata rispettivamente nei paragrafi 3.2.2.1.1 e 3.2.2.3.

3.2.3 Reazioni di sequenziamento dei cloni ottenuti

Le reazioni di sequenziamento sono state condotte utilizzando il sequenziatore del nostro Dipartimento (*310 Genetic Analyzer*, Applied Biosystem). La temperatura di appaiamento scelta è stata pari a 60°C.

Per ogni costrutto è riportato l'elenco degli oligonucleotidi impiegati con la relativa sequenza.

pDest-LMW1A1:

Oligonucleotide T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Oligonucleotide DESTR: 5' GCCAACTCAGCTTCCTTTTCG 3'

Oligonucleotide BIO2A: 5' TGCTGCTGGAGGAATACC 3'

pDest- α gliadina:

Oligonucleotide T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Oligonucleotide DESTR: 5' GCCAACTCAGCTTCCTTTTCG 3'

Oligonucleotide VT99: 5' GTTAGTACCGAAGATGCCAA 3'

pDest- γ gliadina:

Oligonucleotide T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Oligonucleotide DESTR: 5' GCCAACTCAGCTTCCTTTTCG 3'

Oligonucleotide PGAMMAR: 5' TGCATCACCTGGCAATCACT 3'

pDH4AB1133T23N:

Oligonucleotide 35S-P1: 5' ACTATCCTTCGCAAGACC 3'

Oligonucleotide B1133S1: 5' CCTATTGTTTCAGCCATCC 3'

Oligonucleotide VT103: 5' GTAGGCACCAACTCCGGTGC 3'

pPVXB1133 *wild type*, pPVXHB1133 *wild type*, pPVXB1133T23N, pPVXHB1133T23N:

Oligonucleotide PVXUP: 5' GGGCCATTGCCGATCTC 3'

Oligonucleotide PVXDOWN: 5' CTATGGGCTGTGTTGTGC 3'

pBSLMW42K *wild type*, pBSLMW42KN23T:

Oligonucleotide T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Oligonucleotide T3: 5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'

Oligonucleotide RD30: 5' CGGATTGCATCATAGCGGGA 3'

pPVXLMW42K *wild type*, pPVXHLMW42K *wild type*, pPVXLMW42KN23T, pPVXHLMW42KN23T:

Oligonucleotide PVXUP: 5' GGGCCATTGCCGATCTC 3'

Oligonucleotide PVXDOWN: 5' CTATGGGCTGTGTTGTGC 3'

Oligonucleotide RD30: 5' CGGATTGCATCATAGCGGGA 3'

3.2.4 Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Le digestioni di DNA plasmidico sono state effettuate in reazioni di 20 µl contenenti 0.5- 2 µg circa di DNA plasmidico, 10 unità dello specifico enzima di restrizione ed un tampone che fornisce le migliori condizioni di funzionamento dell'enzima. La miscela di reazione è incubata a 37°C o diversamente, come indicato dalla casa produttrice, per 1 ora e mezza.

Nel caso di doppie digestioni di DNA, le condizioni di reazione sono state modificate per permettere l'attività del secondo enzima o il DNA è stato purificato utilizzando il *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham Biosciences) e quindi digerito con il secondo enzima. Gli enzimi di restrizione utilizzati sono prodotti di Biolabs, Promega, Gibco BRL ed Invitrogen.

3.2.5 Reazioni di ligazione

Le reazioni di ligazione sono condotte in modo tale che il rapporto tra la

concentrazione molare dell'inserto e quella del vettore sia di 3:1. Le reazioni sono effettuate in una soluzione contenente 30 femtomoli di vettore, 90 femtomoli di inserto, 4 µl del tampone 5X per la T4 DNA ligasi, 0.1 U di T4 DNA ligasi (Invitrogen) e acqua fino al volume finale di 20 µl. La miscela di reazione è incubata per una notte a 14°C e poi conservata a -20°C.

3.2.6 Elettroforesi di DNA su gel di agarosio

Il DNA è frazionato su gel di agarosio orizzontale a diverse concentrazioni (dall'1% fino al 2%), a seconda delle esigenze sperimentali, in un tampone 1X TBE (89 mM Tris, 2 mM EDTA, 89 mM acido borico) contenente l'agente intercalante bromuro d'etidio 0.5 µg/ml. Per valutare le dimensioni del DNA analizzato sono stati utilizzati i marcatori di peso molecolare forniti da Fermentas (1 Kb DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder Plus, λ DNA/Hind III Fragments). Terminata l'elettroforesi, il DNA è visualizzato su un transilluminatore a luce UV (312 nm).

3.3 PURIFICAZIONE DI DNA

3.3.1 Estrazione di DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto secondo quanto riportato da Tai e Tanksley (1991). Il tessuto fogliare (3-5 g) è stato campionato ed omogeneizzato in azoto liquido utilizzando un mortaio ed un pestello. Il materiale, ridotto ad una polvere finissima, è stato trasferito in un tubo da 50 ml e risospeso in 23 ml di tampone di estrazione pre-riscaldato a 65°C (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 1,25% SDS, 8,3 mM NaOH, 0,38% bisolfito di sodio). Il campione è stato quindi incubato a 65°C per 15 min, sono stati aggiunti 7.1 ml di potassio acetato 5 M, e, successivamente, il campione è stato posto in ghiaccio per 20 minuti. Il sopranatante, ottenuto centrifugando a 3000 x g per 15 minuti a 4°C, è stato filtrato utilizzando la carta *Miracloth* e quindi trasferito in un nuovo tubo a cui sono stati aggiunti 19 ml di isopropanolo. Il campione è stato accuratamente mescolato, posto 1 ora a -20°C e quindi centrifugato a 3000 x g per 30 minuti a 4°C. Il pellet risultante è stato lavato con EtOH al 70% per due volte e asciugato all'aria per circa 1 minuto e quindi risospeso in 0.72 ml di tampone T5E (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8), agitato con il Vortex

per circa 10 secondi e lasciato a T_{amb} per circa 30 minuti. Il campione è stato trasferito in un tubo eppendorf, sono stati quindi aggiunti 0.48 ml di acetato di ammonio 7.4 M e il campione è stato agitato con il Vortex e centrifugato per 5 minuti a $12000 \times g$ a T_{amb} . Il sopranatante è stato recuperato in un tubo eppendorf a cui successivamente sono stati aggiunti 0.73 ml di isopropanolo. Il campione è stato accuratamente mescolato invertendo il tubo ripetutamente e quindi centrifugato a $12000 \times g$ per 10 minuti a T_{amb} . Il DNA, costituito dal pellet ottenuto, è stato lavato due volte con EtOH al 70%, asciugato all'aria e quindi risospeso con 1 ml di tampone TE, agitando con il Vortex. Il campione è stato quindi incubato a 65°C per 5 minuti e il DNA precipitato aggiungendo 0.73 ml di isopropanolo e centrifugando a $12000 \times g$ a T_{amb} per 5 minuti. Infine il DNA è stato lavato con EtOH al 70% per due volte, asciugato in una centrifuga da vuoto e risospeso in 0.3 ml di TE per tutta la notte a 4°C . Il giorno successivo il campione è stato agitato tramite Vortex, incubato a 65°C per 5 minuti e quindi congelato a -20°C .

3.3.2 Minipreparazione di DNA plasmidico da *E. coli*

Una singola colonia batterica contenente il DNA plasmidico è utilizzata per inoculare 1,5 ml di terreno di coltura Luria-Bertani Medium (LB) in presenza dell'opportuno antibiotico. La coltura è incubata a 37°C o a 30°C , dove specificatamente indicato, in agitazione costante, per circa 16 ore, e quindi centrifugata a $12000 \times g$ per 1 min. Il pellet dei batteri viene risospeso in 150 μl di tampone SET (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, saccarosio 20%). Si aggiungono poi 350 μl di soluzione litica (0.2 M NaOH, SDS 1%) e, dopo aver mescolato delicatamente, la sospensione è lasciata in ghiaccio per 10 min. Successivamente sono addizionati 250 μl di una soluzione di acetato di potassio 3 M, pH 4.2 e la sospensione viene lasciata in ghiaccio per 20 min. Dopo una centrifugazione di 10 min a $12000 \times g$ a 4°C , viene recuperato il sopranatante che contiene il DNA plasmidico ed il DNA è quindi precipitato aggiungendo un ugual volume di isopropanolo freddo e centrifugando a $12000 \times g$ per 10 min a 4°C . Il pellet di DNA viene lavato con 1 ml di EtOH freddo al 70% e centrifugato a $12000 \times g$ per 5 min a 4°C . Dopo aver lasciato asciugare il pellet all'aria, il DNA è risospeso in 20 μl di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) o di acqua sterile. Alla soluzione si aggiunge 1 μl di RNasi 1 mg/ml per degradare l'RNA residuo e la miscela di reazione è lasciata a 37°C per 15 min. La resa media realizzata con questa

tecnica è di circa 3 µg di DNA plasmidico per ogni 1,5 ml di coltura batterica stazionaria.

3.3.3 Midipreparazione di DNA plasmidico da *E.coli*

Per ottenere una maggiore quantità di DNA plasmidico si parte da 50 ml di coltura batterica (per plasmidi ad alto numero di copie) o da 100 ml (per plasmidi a basso numero di copie) che si ottengono nel modo descritto nel precedente paragrafo.

La coltura batterica è centrifugata a 6000 x g per 10 min a 4°C, si rimuove completamente il sopranatante e si lava il pellet con 5 ml di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA); infine si centrifuga di nuovo a 6000 x g per 10 min a 4°C. Il DNA plasmidico è stato purificato dal pellet dei batteri utilizzando il *Kit Nucleobond AX* (Macherey-Nagel).

Il pellet dei batteri è risospeso in 4 ml di tampone S1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNasi A/ml, pH 8.0) e alla sospensione, trasferita in tubi di “Nalgene”, vengono aggiunti 4 ml di tampone di lisi S2 (200 mM NaOH, 1% SDS). La sospensione si mescola delicatamente e si lascia a T_{amb} per 5 min. Si aggiungono quindi 4 ml di tampone di neutralizzazione S3 (2.8 M acetato di potassio, pH 5.1) e, dopo aver mescolato delicatamente la sospensione, si lascia per 5 min su ghiaccio per far precipitare le proteine. Si centrifuga poi a 12000 x g per 30 min a 4°C; recuperato il sopranatante, esso viene filtrato e caricato su una colonna cromatografica (Nucleobond AX 100) contenente una resina capace di legare il DNA plasmidico. La colonna viene precedentemente equilibrata con 4 ml di tampone N2 (100 mM Tris, 15% EtOH, 900 mM KCl, 0.15% Triton X-100) e, dopo aver caricato il sopranatante contenente il DNA plasmidico, essa è lavata con 5 ml di tampone N3 (100 mM Tris, 15% EtOH, 1.15 M KCl). Il DNA plasmidico infine è eluito con 5 ml di tampone N5 (100 mM Tris, 15% EtOH, 1 M KCl) e precipitato aggiungendo 0.7 volumi di isopropanolo e centrifugando per 30 min a 12000 x g a 4°C. Il pellet ottenuto viene lavato con EtOH al 70% centrifugando a 12000 x g per 10 min; rimosso l’etanolo, il pellet è lasciato asciugare all’aria e risospeso in un volume di circa 400 µl di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Il DNA è precipitato aggiungendo 1/10 del volume di 3 M acetato di sodio pH 5.2 e 2.5 volumi di EtOH al 100%. Dopo un’ora a -80°C o 2 ore a -20°C la miscela viene centrifugata a 12000 x g per 30 min; rimosso il sopranatante, il pellet di DNA è lavato

due volte con EtOH al 70% e centrifugato ogni volta a 12000 x g per 5 min a 4°C. Il pellet è lasciato asciugare all'aria e successivamente risospeso in acqua sterile. Con questa procedura si ottengono quantità di 20-100 µg di DNA plasmidico.

3.3.4 Purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio

Frammenti di DNA sono stati purificati da gel di agarosio utilizzando il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). La porzione del gel contenente il frammento di DNA da purificare viene tagliata con un bisturi e trasferita in un tubo "eppendorf". Si aggiungono 10 µl di "capture buffer" ogni 10 mg di gel e si agita il campione vigorosamente. La miscela viene incubata a 60°C per circa 10-15 minuti in modo da permettere la completa solubilizzazione del gel e quindi trasferita in una mini-colonna. Il campione è quindi centrifugato a 12000 x g per 1 minuto, e la colonna è lavata con 500 µl di "wash buffer" centrifugando per 1 minuto a 12000 x g. Il DNA viene quindi eluito con 50 µl di acqua distillata o TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

3.4 TECNICHE MICROBIOLOGICHE

3.4.1 Ceppi batterici

3.4.1.1 Ceppi batterici per la propagazione di DNA plasmidico

I ceppi utilizzati vengono descritti qui di seguito:

***E. coli* DH5α:** [F⁺/endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁻), supE44, thil1, recA1, gyrA(Nal^r), gyrA96(Nal^r), relA1, Δ(lacIZYA-argF)U169, deoR (Φ80dlac Δ(lacZ) M15)] in grado di α-complementazione. È stato usato per la propagazione e la preparazione di DNA plasmidico contenente i geni codificanti la LMW1A1, l'α-gliadina, la γ-gliadina e la LMW-GS B1133.

***E. coli* XL1-Blue Supercompetent cells:** [recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F⁺ proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]. È stato usato per la trasformazione con i costrutti derivanti dalle reazioni di mutagenesi effettuata sui

costrutti pDH4A B1133 *wild type* e pBSLMW42K *wild type*.

***E. coli* SURE 2 Supercompetent cells:** [e14⁻ (McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC (F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]. È stato utilizzato per la propagazione di DNA plasmidico contenente il gene codificante la LMW-42K.

***E. coli* TOP10:** [F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lac ZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1nupG]. È stato utilizzato per la trasformazione con i costrutti ottenuti dalla reazione di clonaggio con il *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* (Invitrogen).

***E.coli* JM110:** [rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK gal Tara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) F' traD36 proAB lacI^q ZΔM15] È stato usato per l'amplificazione del plasmide pPVX201.

3.4.1.2 Ceppi batterici per l'espressione in *Escherichia coli*

***E. coli* BL21(DE3)pLysS:** [F⁻ ompT hsdS_B(r_B-m_B⁻) gal dcm rne131(DE3) pLysS (Cam^r)]. È stato utilizzato per l'espressione della gliadina di tipo α e di tipo γ.

***E. coli* BL21 Codon plus-RIPL:** [B F⁻ ompT hsdS (r_B-m_B⁻) dcm Tet^r gal λ (DE3) endA Hte (argU proL Cam^r) (argU ileY leuW Strep/Spec^r). È stato usato per l'espressione della LMW1A1.

3.4.2 Mezzi di coltura batterica

LB: 10 g/l Bacto-triptone, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l NaCl, pH 7.0.

Per le piastre è stato aggiunto 1% bactoagar (Difco) prima della sterilizzazione in autoclave.

NZY⁺: 10 g/l NZ ammina (idrolizzato di caseina), 5 g/l estratto di lievito, 5 g/l NaCl, pH 7.5. Aggiunti dopo la sterilizzazione in autoclave MgCl₂, MgSO₄ e glucosio alle concentrazioni finali di 12.5 mM (MgCl₂, MgSO₄) e 0.4% (glucosio).

SOC Medium: 20 g/l Bacto-triptone, 5 g/l estratto di lievito, 0.5 g/l NaCl. Aggiunti dopo la sterilizzazione in autoclave MgCl₂, MgSO₄ e glucosio alle concentrazioni finali di 10 mM (MgCl₂, MgSO₄) e 0.4% (glucosio)

3.4.3 Preparazione di cellule competenti di *E. coli*

Il protocollo seguito per la preparazione delle cellule competenti dei ceppi DH5 α , SURE 2, JM110, BL21(DE3) pLysS, BL21 Codon plus-RIPL è quello di Hanahan (1983). 5 μ l di cellule già competenti sono utilizzati per inoculare 1.5 ml di terreno liquido LB e la coltura cresciuta per circa 12-16 ore a 37°C a 250 rpm. 500 μ l della coltura così preparata sono utilizzati per inoculare 50 ml di LB e la coltura è incubata a 37°C in agitazione costante a 250 rpm, fino al raggiungimento di una OD₆₀₀ di circa 0.5 (stadio in cui il ceppo è in fase esponenziale). La coltura viene posta in ghiaccio per 5 min e centrifugata a 4°C per 10 min a 3000 x g. Il pellet dei batteri viene delicatamente risospeso in ghiaccio con 1/3 del volume della coltura iniziale (50 ml) di tampone RF1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato di potassio, 10 mM CaCl₂, 15% glicerolo, pH 5.8). La sospensione è incubata per 1 ora in ghiaccio e centrifugata a 3000 x g per 10 min; il pellet dei batteri è delicatamente risospeso in 1/12,5 del volume della coltura iniziale (50 ml) di tampone RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% glicerolo, pH 6.8). La sospensione è incubata in ghiaccio per 15 min, aliquotata in tubi eppendorf, le aliquote congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

3.4.4 Trasformazione di cellule competenti di *E. coli*

La trasformazione di cellule di *E. coli* competenti è condotta come descritto da Sambrook *et al.* (1989). Un'aliquota di cellule competenti, conservata a -80°C, viene lasciata a scongelare in ghiaccio per 10-15 min. Metà volume della miscela di reazione di ligazione o 20-50 ng di DNA plasmidico vengono aggiunti alle cellule competenti e il tutto lasciato in ghiaccio per 30 min. Le cellule sono sottoposte a shock termico a 42°C per 90 secondi e poi poste in ghiaccio per 2 min. Si aggiunge successivamente 1 ml di terreno LB e dopo incubazione per circa un'ora ad agitazione lenta a 37°C, o a 30°C dove specificatamente indicato, i batteri vengono piastrati su terreno solido contenente l'opportuno antibiotipo ed incubati a 37°C o a 30°C per 16-18 ore. Le colonie sono testate attraverso estrazione di DNA plasmidico, e digestione con enzimi di restrizione e PCR.

3.5 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI

3.5.1 Espressione in *Escherichia coli*

3.5.1.1 Preinoculo

Il preinoculo è stato effettuato ponendo a crescere 4-5 colonie prelevate da una trasformazione fresca in 5 ml di terreno LB, a cui sono stati aggiunti gli opportuni antibiotici. Il preinoculo è stato posto in agitazione (250 rpm) per 15-18 ore a 30°C o a 37°C a seconda della proteina espressa.

3.5.1.2 Inoculo ed induzione

Un dato volume di terreno LB, a cui sono stati aggiunti gli antibiotici alle opportune concentrazioni, sono stati inoculati in rapporto di 1:100 con la coltura del preinoculo ottenuta secondo quanto descritto nel paragrafo 3.5.1.1. Dalla coltura sono stati prelevati, in tempi successivi, campioni di 1 ml di cui è stata misurata l'assorbanza a 600 nm. A valori di assorbanza pari a $\geq 0,3$, la coltura è stata indotta aggiungendo isopropil β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) alla concentrazione finale 0,5 mM.

3.5.1.3 Cinetica di accumulo del polipeptide eterologo

Al fine di determinare la cinetica di accumulo delle proteine eterologhe espresse, dalla coltura batterica è stato prelevato 1 ml a 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h (o 5 h), 18 h (o 21 h) dall'aggiunta di IPTG al mezzo di coltura. Di ciascuna aliquota è stata misurata l'assorbanza a 600 nm, quindi ognuna di esse è stata centrifugata a 12000 x g per 1 minuto ed il pellet conservato a -20°C per l'estrazione totale delle proteine cellulari (vedi paragrafo 3.6.1.1).

3.5.2 Espressione transiente in *Nicotiana benthamiana*

3.5.2.1 Crescita di piante di *Nicotiana benthamiana*

Le piante di *Nicotiana benthamiana* sono state cresciute presso la struttura *Floramiata* (Piancastagnaio, Siena) e, raggiunto lo stadio ottimale per l'infezione, trasportate nel nostro laboratorio. Le piante sono state esposte a cicli di 12 ore di luce e 8 ore di buio ad una temperatura di 24°C. Prima dell'infezione le piante sono state poste al buio per 4 ore.

3.5.2.2 Infezione di piante di *Nicotiana benthamiana*

L'infezione con i costrutti pVX_{B1133} *wild type*, pVX_{HB1133} *wild type*, pVX_{B1133T23N}, pVX_{HB1133T23N}, pVX_{LMW42K} *wild type* pVX_{HLMW42K} *wild type*, pVX_{LMW42KN23T} e pVX_{HLMW42KN23T} è stata effettuata distribuendo manualmente una soluzione di 60 µg di DNA plasmidico sulla seconda coppia di foglie apicali (30 µg per foglia) precedentemente trattate con bentonite, al fine di creare microlesioni che favoriscano la penetrazione del costrutto infettivo.

Le foglie sintomatiche sono state campionate, congelate immediatamente in N₂ liquido e conservate a -80°C fino al momento dell'uso.

3.6 TECNICHE BIOCHIMICHE

3.6.1 Estrazione di proteine

3.6.1.1 Estrazioni delle proteine totali da *E.coli*

I pellet relativi alla coltura prelevata ai diversi tempi dell'induzione (paragrafo 3.5.1.3, Materiali e Metodi) sono stati risospesi in un tampone di estrazione contenente Tris-HCl 0,07 M pH 6,8, sodio dodecilsolfato (SDS) 2%, glicerolo 10%, 1,4-ditiotreitolo (DTT), 1%, dimetilformammide (DMF) 1,5 M e γ -pironina 0,02 % come tracciante. L'estrazione totale delle proteine cellulari prodotte è stata eseguita risospendendo il pellet derivato dalla coltura prelevata a 0 h di induzione in 50 µl del

tampone di estrazione ed i campioni corrispondenti agli altri tempi sono stati di seguito risospesi in volumi proporzionali alla loro densità ottica. I campioni sono stati quindi incubati a 100°C per 5 minuti e centrifugati a 12000 x g per 10 minuti a T_{amb}. Un'aliquota (15 µl) del sopranatante così ottenuto, costituito dalle proteine totali estratte, è stata caricata su gel SDS-PAGE per l'analisi elettroforetica.

3.6.1.2 Estrazione dei corpi di inclusione da colture di *E. coli* indotte

La procedura utilizzata per la purificazione dei corpi di inclusione è quella riportata nel manuale *Protein Refolding Kit* (Novagen).

La coltura cellulare indotta (500 ml) è stata centrifugata a 4°C a 6500 x g per 15 minuti ed il sopranatante è stato accuratamente eliminato. Il pellet è stato risospeso in ghiaccio attraverso una forte agitazione in rapporto di 1:10 con un tampone di lavaggio contenente Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, Triton X-100 1%. Per lisare le cellule, è stato aggiunto lisozima ad una concentrazione finale di 100 µg/ml ed il campione è stato incubato a 30°C per 15 minuti e quindi sonicato in ghiaccio (*High intensity ultrasonic processor, 50 Watt Model*, Sonics), fino ad ottenere una sospensione a bassa viscosità. Il lisato così ottenuto è stato centrifugato a 10000 x g per 10 minuti a 4°C ed il pellet, costituito dai corpi di inclusione, è stato lavato per due volte in rapporto di 1:10 con lo stesso tampone di lavaggio e centrifugato ogni volta a 10000 x g per 10 minuti a 4°C. Infine il pellet è stato risospeso in 5 ml di acetonitrile (ACN) al 50 % contenente acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,025 %, solvente in cui le prolamine sono solubili. La risospensione è stata centrifugata a 10000 x g per 15 minuti a T_{amb}, ed il sopranatante, costituito dalle proteine estratte dai corpi di inclusione, congelato in azoto liquido e quindi liofilizzato. Per controllare il grado di purezza dei corpi di inclusione, un'aliquota della risospensione in ACN al 50% e TFA 0,025% è stata prelevata prima del congelamento, essiccata in centrifuga sotto vuoto (SAVANT) e quindi caricata su gel SDS-PAGE.

3.6.1.3 Estrazione delle proteine totali da tessuto fogliare di *Nicotiana benthamiana*

Foglie sintomatiche di piante di *N. benthamiana* sono state campionate e omogeneizzate in azoto liquido. Gran parte dei pigmenti sono stati rimossi con ripetuti

lavaggi di EtOH assoluto fino a quando non si è ottenuto un pellet di color bianco. Il pellet è stato quindi risospeso in rapporto di 1:2 con un tampone di estrazione contenente Tris-HCl 0,07 M pH 6,8, SDS 2%, glicerolo 10%, 1,4- DTT 1%, DMF 1,5 M e γ -pironina 0,02 % come tracciante. Le proteine totali sono state estratte a 100°C per 5 min e 20 μ l del sopranatante, ottenuto tramite centrifugazione a 12000 x g per 10 min, sono stati caricati su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) per controllo.

3.6.1.4 Purificazione della LMW-GS B1133 da tessuto fogliare di *Nicotiana benthamiana*

Foglie sintomatiche di piante di *N. benthamiana* sono state campionate e omogeneizzate in azoto liquido ed i pigmenti rimossi secondo quanto descritto nel paragrafo precedente. Il pellet ottenuto dopo l'ultimo lavaggio è stato seccato in SAVANT e quindi risospeso in rapporto di 1:2 con EtOH 70%, DTT 1%. Il campione è stato agitato mediante Vortex, posto sotto flusso gorgogliante di N₂ per 20 s ed estratto per 1 ora a T_{amb}. Il sopranatante ottenuto mediante centrifugazione dell'estratto a 120000 x g per 30 min è stato quindi alchilato, aggiungendo 1,4 μ l di 4-vinilpiridina per 100 μ l di estratto. L'ossigeno presente nell'estratto è stato rimosso ponendo il campione per 30 s sotto flusso gorgogliante di N₂ per 20 s e l'alchilazione effettuata per 30 min a 60°C. L'estratto alchilato è stato quindi precipitato aggiungendo 4 volumi di acetone freddo e ponendo i campioni a -20°C per circa 2 ore. Il pellet risultante è stato quindi asciugato in SAVANT ed analizzato mediante SDS-PAGE.

3.6.1.5 Estrazione della frazione gluteninica da farina ottenuta dalla macinazione di cariossidi o dall'impasto ricostituito e di controllo liofilizzato per analisi IEF X SDS-PAGE

Circa 100 mg di sfarinato proveniente da cariossidi macinate o dall'impasto ricostituito e di controllo liofilizzato relativo agli esperimenti di micro-mixografia, sono stati sottoposti a tre lavaggi successivi con 1 ml di propanolo al 50%, per eliminare la frazione monomerica ed oligomerica. Le subunità gluteniniche presenti nel residuo sono state estratte ed alchilate con una soluzione contenente propanolo 50%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, DTT 1%, EDTA 1 mM, iodoacetammide 10 mM, in rapporto 1:10 (mg/ μ l) rispetto al peso iniziale dello sfarinato, per almeno 1 ora. Dopo aver centrifugato a

12000 x g per 10 minuti, il sopranatante è stato recuperato e le subunità gluteniniche sono state precipitate aggiungendo quattro volumi di acetone freddo per due ore a -20°C. Le proteine precipitate sono state recuperate tramite centrifugazione a 12000 x g per 10 minuti a 4°C, dissolte in ACN al 50% e TFA 0.1% e la concentrazione proteica calcolata mediante la lettura allo spettrofotometro a 276 nm ($\epsilon_M=0.75$). Sono state quindi preparate aliquote da 100 µg e da 150 µg che sono state seccate in SAVANT e conservate a -20°C fino al momento dell'uso.

3.6.1.6. Riduzione ed alchilazione della LMW1A1 e della γ -gliadina estratte dai corpi di inclusione di *E. coli* per l'analisi IEF X SDS-PAGE

Le proteine eterologhe purificate dai corpi di inclusione sono state ridotte e alchilate per 1 ora a T_{amb} nel tampone di estrazione costituito da propanolo 50%, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8, DTT 1%, EDTA 1 mM, iodoacetammide 10 mM. L'estratto è stato quindi centrifugato a 12000 x g e precipitato aggiungendo 4 volumi di acetone freddo. Le proteine precipitate sono state quindi risospese in ACN al 50% e TFA allo 0.025 % e il loro titolo ricavato mediante lettura allo spettrofotometro (ϵ pari a 0.2 per la LMW-1A1 e a 0.3 per la γ -gliadina, in base alla sequenza amminoacidica dedotta). Sono state quindi preparate aliquote da 15 µg che sono state poste a secco in SAVANT e conservate a -20°C fino al momento dell'uso.

3.6.2 Tecniche elettroforetiche, trasferimento su membrana PVDF per rilevamento con anticorpo (Western blotting) e sequenziamento N-terminale

3.6.2.1 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)

Le analisi di SDS-PAGE sono state condotte utilizzando un apparecchio *Mini-Protean II Cell* (Bio-Rad) e gel di spessore pari a 0,75 mm.

La composizione del gel di corsa è la seguente: percentuale di monomeri ($T = \% \text{ acrilammide} + \% \text{ bis-acrilammide}$) pari al 15% e di cross-linking ($C = 100 \times [\text{grammi di bis-acrilammide} / (\text{grammi di acrilammide} + \text{grammi di bis-acrilammide})]$) pari allo 0,5%, Tris-HCl 0,36 M pH 8.8, SDS 0,1%. La composizione del gel spaziatore è la seguente:

percentuale di monomeri pari al 3,75% e di cross-linking pari al 2,67%, Tris-HCl 0,125 M pH 6.8, SDS 0,1%. La polimerizzazione dell'acrilammide è stata indotta utilizzando N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED) alla concentrazione finale dello 0,2% ed ammonio persolfato (APS) allo 0,1 %.

La corsa è stata condotta ad un voltaggio costante (200 Volts) a T_{amb} , in un tampone contenente glicina 0,18 M, Tris-HCl 0,025 M pH 8.8, SDS 0,1 %.

I gel sono stati colorati per tutta la notte in lenta agitazione in una soluzione contenente solfato di ammonio 8%, acido fosforico 0,8%, coomassie colloidale (CBBG-250) 0,08%, metanolo 20%. La decolorazione è stata effettuata con acqua corrente e le immagini acquisite mediante il programma 1D Image Analysis System (Kodak Digital Science).

3.6.2.2 Western Blotting

Le analisi di Western Blotting sono state condotte al fine di determinare l'identità delle proteine eterologhe espresse.

Il gel SDS-PAGE, preparato secondo quanto riportato nel paragrafo precedente, è stato trasferito su una membrana PVDF (*Immuno-Blot PVDF membrane* 0,2 μ m, Bio-Rad) utilizzando il *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Il gel è stato trasferito sulla membrana in un tampone contenente Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 1,3 mM per 1 ora a 4°C, ad un voltaggio costante pari a 100 V. Terminato il trasferimento, la membrana PVDF è stata posta nella soluzione di bloccaggio (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, latte liofilizzato 5%) per 1 ora in agitazione a T_{amb} . La membrana è stata lavata con una soluzione di lavaggio costituita da Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0,2% ed incubata con un anticorpo primario anti-LMW-GS o anti-gliadine (SIGMA, G 9144) rispettivamente in rapporto di 1:10.000 e 1:40.000 per tutta la notte in agitazione lenta. La membrana è stata successivamente lavata con il tampone di lavaggio sopra indicato ed incubata con l'anticorpo secondario (anti-rabbit, Santa-Cruz Biotechnology) in rapporto di 1:20.000 per 1 ora. Per il rilevamento è stato utilizzato il kit di chemiluminescenza della Santa Cruz Biotechnology.

Per ogni membrana è stata eseguita una replica SDS-PAGE che è stata colorata con coomassie colloidale come precedentemente descritto e successivamente decolorata con acqua corrente.

Come riferimento per i pesi molecolari, sono stati utilizzati il marker *Biotinylated SDS-PAGE Standard Broad Range* (Bio-Rad) per l'analisi di Western blotting e il marker *SDS-PAGE Molecular Weight Standard Broad Range* (Bio-Rad) per la replica SDS-PAGE. Entrambi i marker sono stati trattati secondo quanto riportato nella brochure informativa del prodotto.

3.6.2.3 Analisi elettroforetica bidimensionale: isoelettrofocalizzazione in prima dimensione e SDS-PAGE in seconda dimensione (IEF x SDS-PAGE)

Le aliquote preparate secondo quanto riportato nei paragrafi 3.6.1.5 e 3.6.1.6, corrispondenti alle frazioni gluteniniche ed alle proteine ricombinanti LMW1A1 e γ -gliadina ridotte ed alchilate, sono state risospese nel tampone di lisi costituito da Urea 7 M, Tiourea 2 M, Triton X 4%, Tris 40 mM, EDTA 1 mM.

La prima dimensione è stata effettuata con lo strumento *IPG phorTM Isoelectric Focusing System* (Amersham Pharmacia Biotech) o, in alternativa, con lo strumento *Protean IEF system 90-240 VAC* (BIORAD), usando strisce da 7 e 13 cm con un gradiente lineare di pH pari a 3-10 e a 6-11 rispettivamente. Le strisce sono state reidratate insieme al campione nel tampone di reidratazione composto da Urea 7 M, Tiourea 2 M, Triton X 2%, blu di bromofenolo in tracce, DTT 0.28% e IPG buffer 3-10 o 6-11. La reidratazione è avvenuta per 15 ore a 20°C, quindi le strisce sono state sottoposte a focalizzazione alla stessa temperatura seguendo diversi protocolli a seconda del campione analizzato e dello strumento impiegato.

Terminata la prima dimensione, le strisce da 13 cm sono state equilibrate per 15 minuti a T_{amb} in un tampone contenente Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Glicerolo 30%, SDS 2%, DTT 1% e blu di bromofenolo in tracce. Le strisce sono state quindi caricate su dei gel 18 cm X 16 cm di spessore pari a 1 mm, utilizzando l'apparato *HoeferTM SE 600*.

Il tampone di corsa e la composizione dei gel sono identici a quanto riportato nel paragrafo 3.6.2.1, ad eccezione della concentrazione dei monomeri e del cross-linking nel gel di corsa, pari a $T=11$ e $C=2.67$. La corsa è stata effettuata a 4°C a valori di amperaggio costante pari a 30 mA.

Diversamente, le strisce da 7 cm sono state caricate su dei gel *pre-cast* (Novex, Invitrogen) che presentano un gradiente di poliacrilammide dal 4 al 12%. Le condizioni della fase di equilibrio e di corsa sono le stesse riportate nel manuale di istruzioni dei gel *pre-cast*.

La colorazione è la medesima riportata nel paragrafo 3.6.2.1. L'analisi di immagine dei gel è stata effettuata con il programma *Image Master* (Amersham).

3.6.2.4 Trasferimento su membrana PVDF per il sequenziamento N-terminale

Il trasferimento delle proteine per il sequenziamento N-terminale su membrana PVDF è stato effettuato mediante il *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Il gel SDS-PAGE, preparato secondo quanto riportato nel paragrafo 3.6.2.1, è stato trasferito su membrana PVDF (*Immuno-Blot PVDF membrane* 0,2 μm , Bio-Rad) a 4°C nel tampone CAPS 10 mM, pH 11 per 1 ora a 70 V. Avvenuto il trasferimento, la membrana è stata colorata con amido black 0.1%, acido acetico 7%, MeOH 45% o, in alternativa, con MeOH al 50% e coomassie R allo 0.1%.

Le bande di interesse sono state ritagliate con un bisturi sterile ed analizzate mediante il sequenziatore *Procise 494* (Applied Biosystems) della Molecular Structure Facility, Università della California a Davis.

3.6.3 Tecniche cromatografiche

3.6.3.1 Cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) per l'isolamento della γ -gliadina modificata dalla frazione gluteninica della cv. Lira biotipo 45

Le subunità gluteniniche della cv. di frumento duro Lira biotipo 45 sono state ottenute attraverso lavaggi successivi con propanolo al 50%, come descritto nel paragrafo 3.6.1.5, quindi estratte in rapporto di 1:10 (mg: μl) in un tampone contenente propanolo 50%, Tris-HCl 8 mM pH 8, DTT 1% per 30 minuti a T_{amb} . L'estratto ottenuto è stato centrifugato a 12000 x g per 10 minuti ed il sopranatante filtrato attraverso una membrana in PVDF con pori di dimensioni 20 μm . 250 μl dell'estratto così ottenuto sono stati iniettati in un sistema HPLC Beckman (pompe 126 e detector 166), dotato di una colonna cromatografica semi-preparativa (10 mm x 250 mm) C₈ *Vidaq* (Esperya, CA, USA) equilibrata a 50°C.

Sono stati utilizzati i seguenti solventi: (A) H₂O contenente 0,07% TFA; (B) ACN contenente 0,05% TFA. Il gradiente utilizzato per la separazione è stato il seguente: 3 minuti al 26% di B, dal 26% al 55% di B in 33 minuti, dal 55% al 26% di B in 3 minuti,

infine 9 minuti al 26% (flusso 2,5 ml/min). La lettura è stata eseguita a 210 nm.

La γ -gliadina eterologa purificata dai corpi di inclusione è stata risospesa nello stesso tampone di estrazione utilizzato per estrarre le glutenine e 250 μ l di tale estratto iniettati nel sistema HPLC nelle medesime condizioni descritte precedentemente. Una volta identificato il picco con lo stesso tempo di ritenzione della γ -gliadina eterologa nella frazione gluteninica del biotipo 45, questo è stato raccolto, essiccato ed alchilato secondo quanto segue: la proteina purificata dal picco raccolto è portata a secco in SAVANT e risospesa in 500 μ l di tampone contenente Urea 4 M e Tris-HCl 50 mM pH 8. Per eliminare l'ossigeno presente, il campione è posto sotto flussi di azoto per 2 min e quindi la riduzione effettuata aggiungendo 2,6 μ mol di DTT per circa 4 ore a T_{amb} . Il campione è successivamente alchilato aggiungendo 9 μ mol di 4-vinilpiridina e l'alchilazione effettuata al buio per tutta la notte a T_{amb} . Successivamente la reazione è bloccata aggiungendo 10 μ l di acido acetico puro.

Infine, per ottenere i campioni con un grado di purezza adeguata all'analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF, le proteine purificate ridotte ed alchilate, ottenute secondo quanto precedentemente esposto, sono state nuovamente iniettate nel sistema HPLC, i corrispondenti picchi recuperati e seccati in SAVANT.

3.6.3.2 RP-HPLC delle frazioni gliadiniche e gluteniniche estratte da impasti ricostituiti e di controllo ottenuti dalla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45

Le analisi di RP-HPLC sono state condotte su 25 mg di impasto ricostituito e di controllo ottenuto dalla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45 precedentemente congelato in azoto liquido e liofilizzato. Le gliadine sono state estratte con 1 ml di EtOH al 70% mediante agitazione per 30 min a 1500 rpm. Gli estratti sono stati centrifugati a 12000 x g ed i supernatanti ottenuti filtrati (filtri in PVDF, 0,45 μ m) ed iniettati nel sistema HPLC (Waters HPLC). I pellet risultanti sono stati lavati con 1 ml di propanolo al 50% per 30 min a 1500 rpm e quindi estratti con 1 ml di 50% propanolo, 2 M Urea, 0,2 M Tris-HCl pH 6.6, 1% DTT per 1 ora a 60°C. I campioni sono stati alchilati aggiungendo 10 μ l di 4-vinilpiridina a 60°C per 15 min ed infine centrifugati a 12000 x g per 5 min. Il sopranatante ottenuto è stato filtrato (filtri in PVDF, 0,45 μ m) e quindi iniettato nel sistema HPLC. Gliadine e glutenine sono state iniettate in una colonna

Vydac C₁₈ 218TP104 (Vydac, Hesperia, CA, USA) equilibrata a 70°C e separate mediante un gradiente di ACN (flusso 0,5 ml/min). Soluzione (A): ACN contenente TFA allo 0,05%; soluzione (B): H₂O contenente TFA allo 0,05%. Nel caso delle gliadine il gradiente scelto è costituito da un gradiente lineare 25%-50% di ACN in 45 min mentre quello per le glutenine 24%-45% in 55 min. La lettura è stata eseguita a 214 nm.

3.6.3.3 SE-HPLC delle frazioni polimeriche solubili ed insolubili estratte da impasti ricostituiti e di controllo ottenuti dalla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45

Le analisi di SE-HPLC sono state condotte su 10 mg di impasto ricostituito e di controllo ottenuto dalla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45, precedentemente congelato in azoto liquido e liofilizzato. I polimeri solubili sono stati estratti con 1 ml di ACN al 50% contenente 0,05 % TFA, posti in agitazione per 15 min a 1500 rpm e centrifugati a 12000 x g per 15 min. I polimeri insolubili sono stati estratti aggiungendo 1 ml di ACN al 50% contenente 0,05 % TFA e sonicando per 20 s (ampiezza 25%) utilizzando un sonicatore *Branson Digital Sonifier*. I campioni sono stati centrifugati a 12000 x g ed i supernatanti filtrati (filtri in PVDF, 0,45 µm) ed iniettati nel sistema HPLC (Beckman System Gold HPLC, pompe 126 e detector 166) costituito da una colonna *Shodex KW-204* (Showa Denko K.K., Tokyo, Giappone). Le frazioni corrispondenti ai polimeri solubili ed insolubili sono state separate in un solvente costituito da ACN 50% e TFA 0,05% (flusso 0,5 ml/min) e dal loro valore è stato calcolato il valore di UPP% (percentuale di polimeri non estraibili). La lettura è stata eseguita a 214 nm.

3.6.4 Digestione proteolitica della γ -gliadina alchilata e purificata

Circa 50 µg di proteina alchilata e purificata (eterologa ed espressa *in vivo*) ottenuta secondo quanto riportato nel paragrafo 3.6.3.1, sono stati risospesi in un volume finale di 100 µl di tampone di digestione (Urea 2 M, Tris-HCl 50 mM pH 8), contenente chimotripsina (*sequencing grade*, Roche) in rapporto 1:100 (µg:µg). La digestione è stata effettuata a 37°C per circa 18 ore e quindi fermata mediante acidificazione con TFA alla concentrazione finale dello 0,1%. I digesti sono stati quindi analizzati mediante

spettrometria di massa MALDI-TOF [modello Voyager DE-STR (Applied Biosystems)] presso il Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università di Roma La Sapienza dalla Dr.ssa Benedetta Mattei.

3.7 TECNICHE MICRO-MIXOGRAFICHE

3.7.1 Determinazione del contenuto di umidità percentuale e del contenuto proteico della semola della cv. Lira biotipo 42 e 45

Il quantitativo di umidità percentuale della semola della cv. Lira, biotipo 42 e 45 è stato determinato secondo il metodo AACC 44-15A (America Association of Cereal Chemists).

Due scodelle di alluminio per campione sono state poste in una stufa a 130°C per 30 min e successivamente poste in una campana da vuoto per 20 min. Il peso delle scodelle è stato quindi annotato ed un dato quantitativo di semola accuratamente pesato in esse. Le scodelle contenenti la semola sono state successivamente poste a 130°C per 1 ora, per favorire l'evaporazione dell'acqua contenuta, e quindi in campana da vuoto per 20 min. Le scodelle contenenti la semola sono state quindi pesate e dalla sottrazione del loro peso con quello relativo alle scodelle vuote precedentemente annotato, è stato ricavato il contenuto di acqua della semola che poi, diviso per il quantitativo di semola pesato, ha dato il quantitativo di umidità percentuale. I dati di umidità ottenuti dalla semola di Lira 45 biotipo 42 e 45 sono stati rispettivamente pari a 11,57% e 11,84%.

Il contenuto proteico della semola di entrambi i biotipi è stato ricavato secondo il metodo di Dumas utilizzando uno spettrometro di massa (Europa 20-20, Sercon) dotato di un sistema preparativo ANCA. Il contenuto proteico della semola del biotipo 42 è risultato 14,59%, mentre il contenuto proteico della semola del biotipo 45 è di 14,22%.

3.7.2 Determinazione del contenuto di umidità percentuale e del contenuto proteico della farina della cv. Kukri

Il quantitativo di umidità e di proteine presenti nella farina della cv. Kukri sono stati determinati mediante spettroscopia NIR (NIR system 500). Umidità percentuale: 12,90%, contenuto proteico 14,54%.

3.7.3 Esperimenti di incorporazione

Gli esperimenti di incorporazione sono stati condotti utilizzando un micro-mixografo prototipo realizzato dagli ingegneri dei laboratori dello CSIRO di Canberra (Australia), rappresentato in Fig. 11 dell'Introduzione. Gli esperimenti sono stati condotti in una camera a temperatura controllata pari a 25°C ad un assorbimento costante di acqua pari al 60%, aggiungendo 25 mg di proteina eterologa. La velocità delle pinze rotanti è stata pari a 88 rpm. Sono state effettuate due repliche e, quando possibile, tre repliche per ogni esperimento.

Per mettere a punto le condizioni di incorporazione, differenti quantità dell'agente riducente DTT e dell'agente ossidante KIO₃ sono state aggiunte alla semola della cv. Lira biotipo 42 e 45 e alla farina della cv. Kukri. In particolare sono stati aggiunti alla farina/semola 25, 35, 50, 60, 65, 75 µl di una soluzione contenente DTT (2 mg/ml in acqua distillata) e l'impasto mescolato per 30 s e quindi riposato per 4 min per permettere la riduzione parziale dei polimeri gluteninici. Successivamente 8, 16, 24 µl di una soluzione contenente KIO₃ (5 mg/ml in acqua distillata) sono stati aggiunti all'impasto che è stato mescolato per 30 s e quindi riposato per 5 min. Infine lo sviluppo dell'impasto è stato monitorato per 10 min. I parametri analizzati sono stati: il tempo di mescolamento (MT), la resistenza massima (PR), la resistenza alla rottura (RBD), lo spessore della curva relativa al picco di massima resistenza (BW@PR) e relativa al momento di rottura (BW@BD), il tempo necessario per raggiungere il massimo spessore della curva (TMBW), l'energia necessaria per effettuare il mescolamento (ENER). Tuttavia nella discussione dei risultati si farà riferimento esclusivamente al MT, PR, RBD in quanto questi parametri sono considerati i più importanti negli esperimenti di incorporazione (Bèkès *et al.*, 1994).

Le condizioni scelte per effettuare gli esperimenti di incorporazione utilizzando la semola di frumento duro sono state: 50 µl di DTT (2 mg/ml in acqua distillata) e 16 µl di KIO₃ (5 mg/ml in acqua distillata). Per gli esperimenti effettuati utilizzando la farina di frumento tenero sono stati utilizzati invece 60 µl di DTT (2 mg/ml in acqua distillata) e 24 µl di KIO₃ (5 mg/ml in acqua distillata).

Come controllo di ciascun esperimento, sono stati utilizzati impasti di frumento duro e tenero ridotti ed ossidati con le stesse quantità di DTT e KIO₃ impiegate per effettuare l'incorporazione delle proteine eterologhe. Al MT e al momento della rottura dell'impasto (3 min dopo il MT, BK) parte degli impasti sono stati prelevati,

congelati in azoto liquido e liofilizzati. Gli impasti liofilizzati sono stati quindi ridotti ad una polvere fine tramite omogeneizzazione con un mortaio ed un pestello per le successive analisi di RP-HPLC e SE-HPLC.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CLONAGGIO ED ESPRESSIONE ETEROLOGA DELLA LMW1A1 IN *E. COLI*

4.1.1 Isolamento del gene codificante la LMW1A1 dal DNA genomico di *Triticum durum* cv. Langdon

Il gene codificante la LMW1A1 è stato isolato dal DNA genomico di frumento duro della cv. Langdon, tramite amplificazione con la coppia di oligonucleotidi DOV8/VT103. Tale reazione produce un unico prodotto di amplificazione di dimensioni pari a 1258 bp, corrispondente al gene codificante la LMW1A1 e parte della sequenza promotrice (Fig. 20, corsia 1). Questo prodotto, corrispondendo al gene LMW1A1 codificato dal cromosoma 1A della cv. Langdon (D'Ovidio *et al.*, 1997), è assente nella reazione di amplificazione eseguita con la stessa coppia di oligonucleotidi sul DNA genomico della linea di sostituzione Langdon 1D(1A) [abbreviato LDN1D(1A)] (Fig. 20, corsia 2) mentre è presente nella linea di sostituzione Langdon1D(1B) [abbreviato LDN 1D (1B)] (Fig. 20 corsia 3).

Il carattere estremamente specifico di questa reazione di amplificazione è da attribuirsi all'oligonucleotide DOV8, che si appaia nella zona promotrice della LMW1A1, 97 bp a monte dell'ATG di inizio traduzione. La sequenza nucleotidica dell'oligonucleotide DOV8 è stata ricavata tramite confronto delle zone promotrici delle LMW-GS disponibili in banca dati e nel nostro laboratorio (D'Ovidio, dati non pubblicati). La presenza di alcune sostanziali differenze nella zona promotrice della LMW1A1 interessata all'appaiamento con l'oligonucleotide DOV8, ha permesso l'isolamento di questo specifico gene.

4.1.2 Clonaggio della LMW1A1 nel vettore di espressione pDest14

L'amplificato ottenuto tramite PCR dal DNA genomico della cv. Langdon con la coppia di oligonucleotidi DOV8/VT103, ottenuto secondo quanto riportato nel paragrafo precedente, è stato sottoposto ad un'ulteriore reazione di PCR con la coppia di oligonucleotidi GWLMW12F e GWLMW1BR per l'inserimento delle sequenze attB e della sequenza Shine-Dalgarno di riconoscimento del ribosoma, necessarie per il

clonaggio secondo la metodologia *Gateway* (paragrafo 3.2.1.1, Materiali e Metodi). Inoltre, in virtù della struttura dell'oligonucleotide GWLMWI2F, tale amplificazione ha permesso di rimuovere la sequenza codificante il peptide segnale della LMW1A1 e l'inserimento dell'ATG di inizio di traduzione per l'espressione in batterio. A causa della bassa temperatura di appaiamento utilizzata, necessaria tuttavia per permettere l'appaiamento di oligonucleotidi caratterizzati da un'ampia sequenza aspecifica, sono stati ottenuti diversi prodotti di amplificazione (dati non mostrati), fra cui l'amplificato delle dimensioni attese (1183 bp) che è stato recuperato da gel di agarosio e quindi utilizzato per l'allestimento della reazione BP. La trasformazione di cellule competenti DH5 α con un'aliquota della reazione BP, ha permesso di isolare alcune colonie contenenti il vettore ricombinante pDONRLMW1A1 che, successivamente, è stato impiegato per l'allestimento della reazione LR.

In Fig. 21, è riportata l'analisi di restrizione effettuata digerendo con ClaI e NruI i plasmidi estratti da alcune colonie trasformate con un'aliquota della reazione LR. La presenza delle due bande attese di 2277 bp e 3414 bp, dimostra come tutti i cloni analizzati siano positivi per la presenza dell'inserto LMW1A1 (la digestione dei plasmidi non ricombinanti pDest14 avrebbe invece generato frammenti di 3008 bp e 3414 bp, che non sono stati osservati). Il clone n°1 è stato infine controllato tramite sequenziamento ed infine utilizzato per gli esperimenti di espressione eterologa.

A scopo illustrativo, in Fig. 22 è riportato uno schema riassuntivo della strategia seguita per il clonaggio del gene LMW1A1 nel vettore di espressione pDest14.

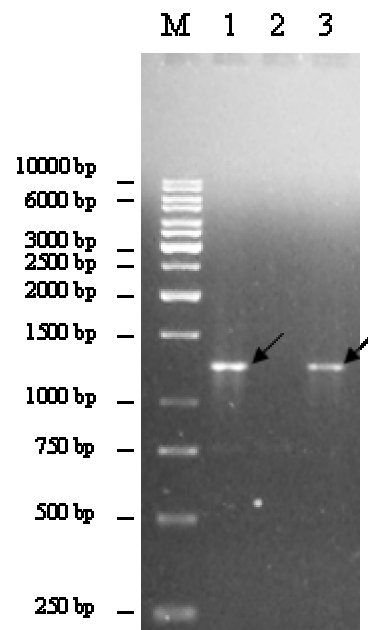


Fig. 20 Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1.2% dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA genomico della cv. LDN (corsia 1), delle linee di sostituzione LDN 1D(1A) (corsia 2), LDN 1D(1B) (corsia 3) con la coppia di oligonucleotidi DOV8/VT103. Le frecce indicano l'amplificato corrispondente al gene LMW1A1 comprendente parte della sequenza promotrice, di dimensioni pari a 1258 bp. M, Marker 1 kb DNA Ladder, Fermentas.

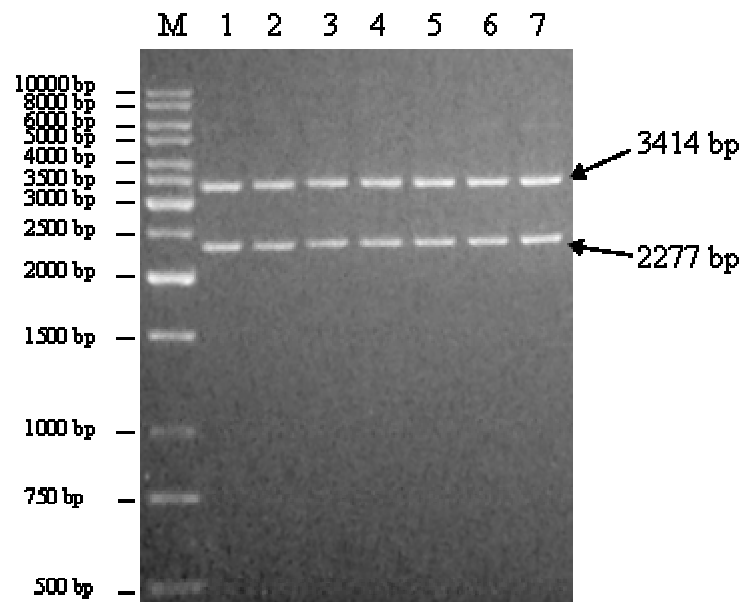


Fig. 21 Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1% del DNA plasmidico estratto da alcune colonie ottenute dalla trasformazione di cellule DH5 α con un'aliquota della reazione LR relativa alla LMW1A1. In tutti i cloni (da 1 a 7) si evidenzia la presenza dei due frammenti attesi dalla digestione del plasmide ricombinante pDestLMW1A1 con le endonucleasi di restrizione ClaI e NruI (rispettivamente 3414 bp e 2277 bp). M, Marker 1 kb DNA Ladder, Fermentas.

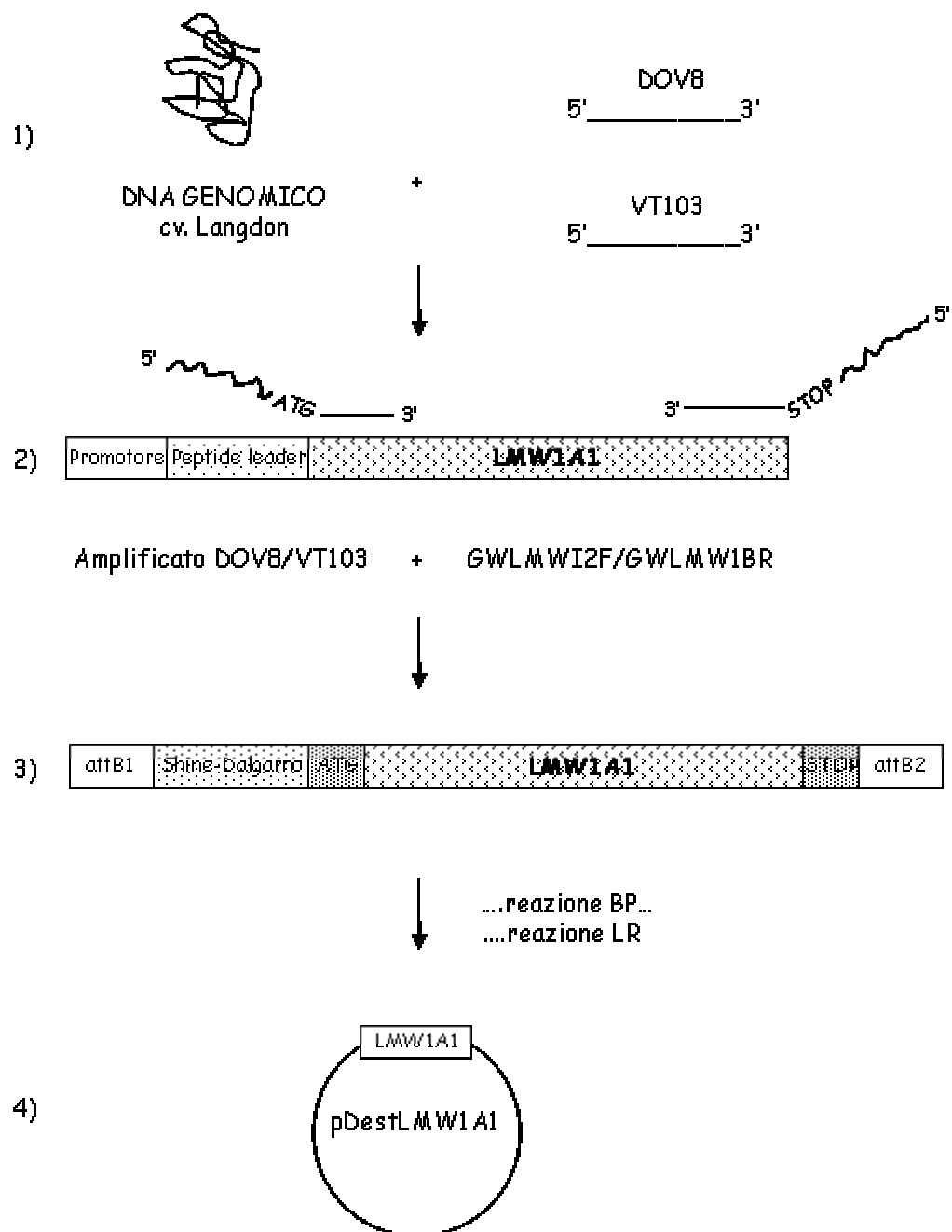


Fig. 22 Rappresentazione schematica della strategia seguita per il clonaggio della LMW1A1 in pDest14. I dettagli sono forniti nel testo.

4.1.3 Espressione della LMW-1A1 in *E. coli*

Per l'espressione della LMW1A1 in *E. coli*, il costrutto pDestLMW1A1 è stato utilizzato per trasformare cellule competenti dei ceppi BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL e BL21 (DE3) pLysS. La cinetica di espressione è stata monitorata mediante analisi su gel di poliaccrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) delle proteine totali estratte a 0, 1, 2, 3, 4 e 18 ore, da 1 ml di coltura batterica indotta a 30°C e a 37°C

con IPTG 0.5 mM. In particolare, in figura 23 è riportato il profilo di espressione della LMW1A1, prodotta tramite induzione a 30°C dal ceppo di *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL che, rispetto al ceppo BL21 (DE3) pLysS, ha mostrato maggiori livelli di espressione della proteina eterologa e, per questo, è stato scelto per la produzione della LMW-1A1 su larga scala. La scelta di indurre la coltura batterica a 30°C è stata dettata dal fatto che in colture batteriche indotte a 37°C si è rivelata occasionalmente la presenza di un banda di induzione aggiuntiva la cui natura non è stata ulteriormente investigata (dati non mostrati) ma che, probabilmente, corrisponde ad una forma deleta della LMW1A1. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è che a 37°C, temperatura ideale di crescita del ceppo, si verificano errori a livello trascrizionale, traduzionale o a livello della duplicazione del DNA, causati dalla presenza di regioni altamente ripetute nel gene LMW1A1, che culminano in un'erronea traduzione del polipeptide eterologo. Questo fenomeno è già noto per le HMW-GS e per alcune LMW-GS (comunicazione personale del Prof. D'Ovidio) e, di solito, può essere ridotto o eliminato abbassando la temperatura di induzione da 37°C a 30°C o meno.

L'analisi della Fig. 23 rivela che la mobilità elettroforetica della LMW-1A1 (PM apparente 55.650 Da) è minore di quella attesa sulla base del peso molecolare dedotto dalla sequenza amminoacidica della proteina (PM 42.632 Da). Non abbiamo ulteriormente approfondito i motivi di quest'anomala mobilità ma, verosimilmente, essa è imputabile alla presenza del dominio ripetuto ricco in residui di prolina che determina la presenza di una residua struttura secondaria. Infatti, altre proteine ricche in prolina mostrano una minore mobilità elettroforetica rispetto all'attesa e, nel caso delle HMW-GS, questo fatto è stato direttamente correlato alla presenza del dominio ripetuto ricco in prolina (Shewry *et al.*, 1992).

Poiché l'espressione di proteine eterologhe in *E. coli* spesso è accompagnata dalla formazione dei corpi di inclusione (Lilie *et al.*, 1998), abbiamo voluto verificare la presenza del polipeptide LMW1A1 in questa sede. In Fig. 24, pannello B, corsia 3, è stata analizzata un'aliquota dei corpi di inclusioni estratti da una coltura batterica a tre ore di induzione con IPTG. È evidente come il processo di purificazione della LMW1A1 dai corpi di inclusione, sia caratterizzato da un elevato grado di purezza e omogeneità, non essendo presenti bande contaminanti corrispondenti a proteine dell'ospite. La formazione dei corpi di inclusione da parte della LMW1A1 è stata una caratteristica sfruttata per la purificazione su larga scala della proteina ricombinante, che è stata prodotta con rese di circa 20-30 mg/litro di coltura batterica indotta.

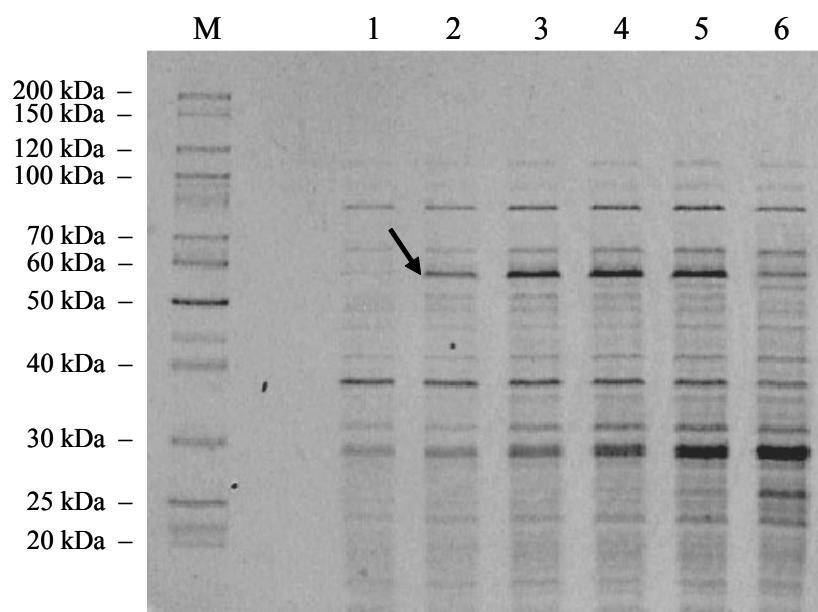


Fig. 23 Mini gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) effettuato per analizzare la cinetica di accumulo della proteina eterologa LMW1A1 prodotta dal ceppo BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. M, Marker Fermentas Protein Ladder 10-200 kDa; 1, 2, 3, 4, 5, 6 estratto proteico totale ottenuto da coltura batterica indotta con 0.5 mM IPTG a 30°C rispettivamente a 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 18h. La freccia indica la banda corrispondente alla LMW1A1.

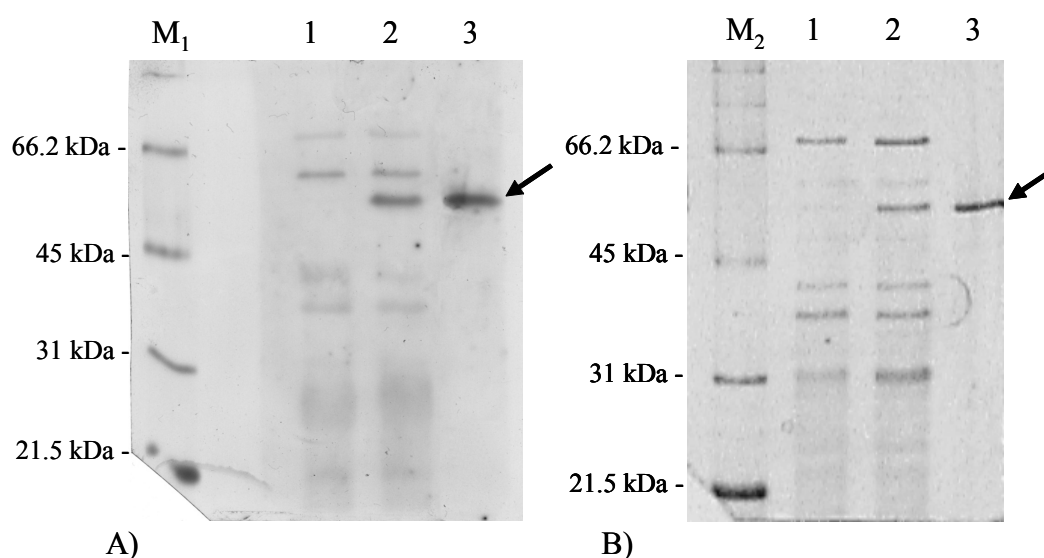


Fig. 24 (A) Western Blotting eseguito per confermare l'identità della LMW1A1 prodotta mediante espressione eterologa nel ceppo BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL; **(B)** Relativa replica SDS-PAGE. In entrambi i casi: 1, 2, estratto proteico totale a 0 e a 3 ore dall'induzione con IPTG 0.5 mM a 30°C; 3, 5 µg di LMW1A1 purificata dai corpi di inclusione estratti a 3 ore di induzione. M₁, Biotinylated SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIORAD; M₂, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIORAD. Le frecce indicano la banda corrispondente alla LMW1A1.

L'identità della proteina ricombinante purificata è stata stabilita mediante Western Blotting (Fig. 24, pannello A) eseguito con l'anticorpo anti-gliadine (SIGMA, G 9144) su estratti totali ottenuti da colture batteriche non indotte (corsia 1), a 3 ore di induzione (corsia 2) e su 5 µg di proteina eterologa purificata dai corpi di inclusione (corsia 3, indicata dalla freccia).

4.1.4 Dimostrazione dell'espressione *in vivo* del polipeptide LMW1A1 e localizzazione nella frazione polimerica del glutine

Poichè il clone LMW-1A1 isolato è di tipo genomico, abbiamo voluto verificare l'espressione *in vivo* del polipeptide corrispondente e la sua eventuale presenza nella frazione aggregata del glutine. A tal proposito, abbiamo allestito coppie di gel bidimensionali (IEF X SDS-PAGE) della proteina espressa eterologamente e della frazione gluteninica della cv. Langdon. La sovrapposizione dei due profili bidimensionali ha permesso di identificare uno spot nel gel relativo alla cv. Langdon avente la stessa mobilità elettroforetica della proteina ricombinante (Fig. 25, in alto). Per confermare l'identità dello spot individuato, sono state eseguite coppie di gel bidimensionali relativi ad estratti gluteninici della cv. Langdon con le rispettive linee di sostituzione cromosomica inter-varietale LDN 1D(A) e LDN 1D(1B). Come atteso, essendo il gene LMW1A1 codificato dal cromosoma 1A, lo spot presente nella cv. Langdon, che ipoteticamente corrisponde alla LMW1A1, è assente nella preparazione gluteninica ottenuta da Langdon 1D(1A) (Fig. 25, in basso) mentre è presente nell'estratto gluteninico ottenuto dalla linea di sostituzione Langdon 1D(1B) (Fig. 25, al centro). Questi dati rappresentano sicuramente una buona indicazione dell'espressione *in vivo* della LMW1A1, ma non sono un dato di per sè sufficiente a tutti gli effetti. Per dimostrare l'effettiva presenza della LMW1A1 nell'endosperma di frumento, il gel bidimensionale corrispondente alla preparazione gluteninica della cv. Langdon è stato trasferito su membrana PVDF (dati non mostrati) e lo spot ipoteticamente corrispondente alla LMW1A1 sottoposto a sequenziamento amminoacidico N-terminale. La sequenza ottenuta è stata IXQQQQP, che corrisponde alla sequenza attesa (ISQQQQP) in base alla sequenza amminoacidica dedotta del gene LMW1A1 (il secondo amminoacido non è stato identificato probabilmente perchè la serina è di difficile identificazione secondo il metodo della degradazione di Edman).

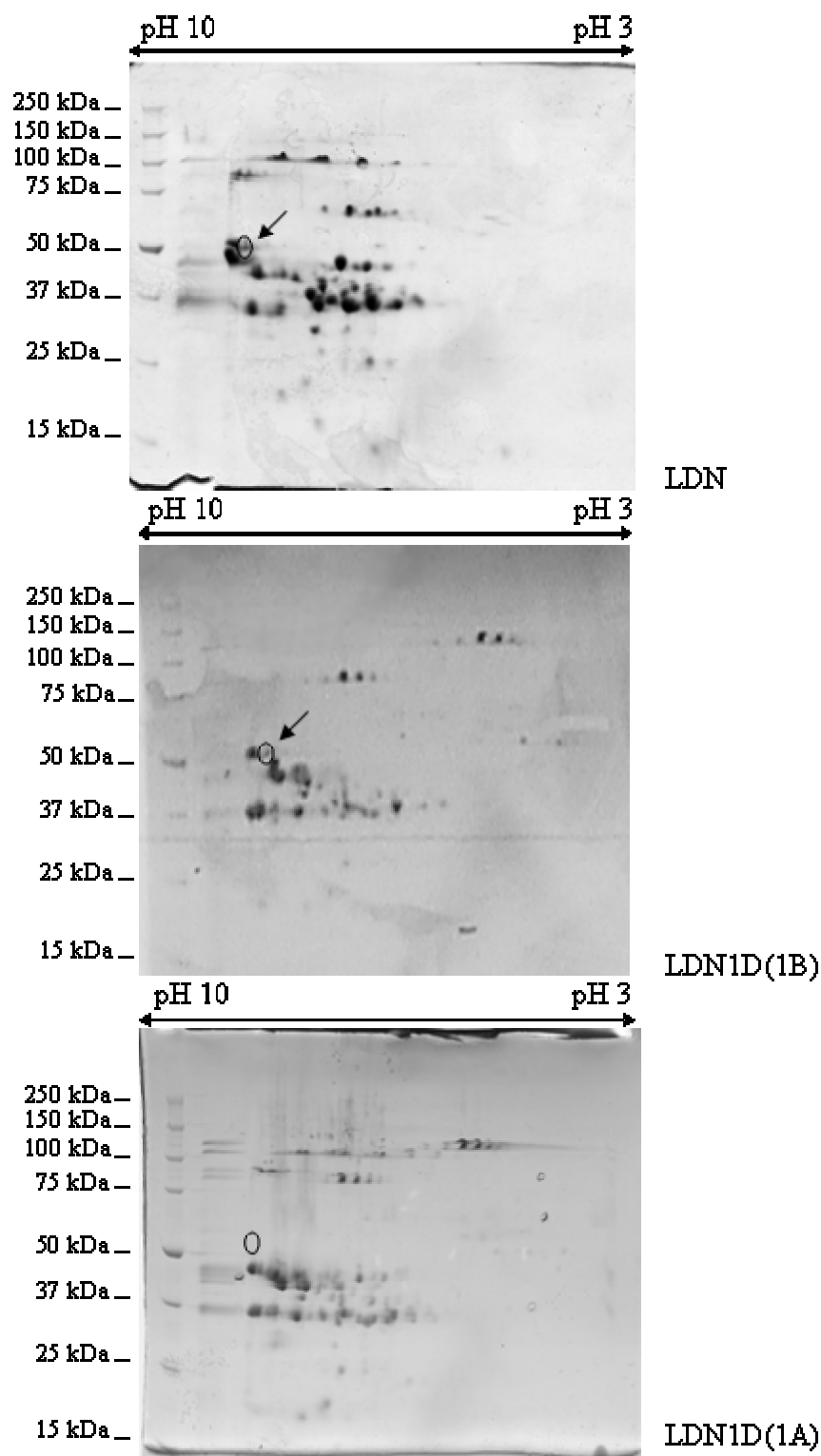


Fig. 25 Confronto dei profili bidimensionali (IEF x SDS-PAGE) relativi ad estratti gluteninici della cv. di frumento duro LDN (in alto), LDN 1D(1B) (al centro) e LDN 1D(1A) (in basso). La freccia indica la LMW1A1. A sinistra sono riportati i pesi molecolari del marker usato (Precision Protein Standard, BIORAD) mentre la freccia in alto indica l'intervallo di pH utilizzato per effettuare la prima dimensione.

Come discusso nel paragrafo 1.1.4.2.2 dell'Introduzione, antecedentemente al presente lavoro di tesi, non vi erano chiare indicazioni circa l'espressione *in vivo* delle

LMW-i, ma soltanto indicazioni indirette (Cloutier *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2004). Il lavoro da noi svolto, ha dimostrato in modo inequivocabile l'espressione *in vivo* delle LMW-i (in particolare del polipeptide LMW-1A1) e loro appartenenza alla frazione aggregata del glutine.

4.2 SUBCLONAGGIO DELLE GLIADINE DI TIPO α E γ NEL VETTORE DI ESPRESSIONE pDEST14 ED ANALISI DELL'ESPRESSIONE ETEROLOGA

4.2.1 Subclonaggio dell' α -gliadina e della γ -gliadina nel vettore di espressione pDest14

I cloni pTS63 e pTD9 contenenti rispettivamente l'intera sequenza genica codificante l' α -gliadina isolata da *Triticum spelta* e la γ -gliadina isolata da *Triticum durum* cv. Lira biotipo 45 (paragrafo 3.1.1, Materiali e Metodi) sono stati amplificati rispettivamente con le coppie di oligonucleotidi GW α GF/GW α 2GR e GW γ GF/GW γ GR (Fig. 26, pannello A e B rispettivamente) per l'inserimento dei siti attB, della sequenza Shine-Dalgarno, dell'ATG di inizio traduzione e per la rimozione della regione codificante il peptide di secrezione.

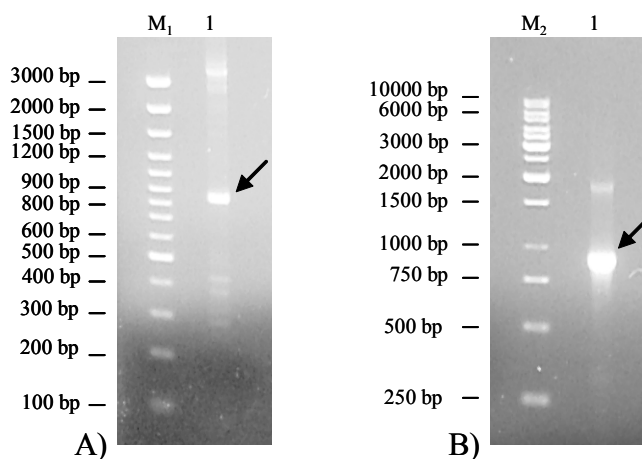


Fig. 26 Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1% dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione dei plasmidi pTS63 (pannello A) e pTD9 (pannello B) rispettivamente con le coppie di oligonucleotidi GW α GF/GW α 2GR e GW γ GF/GW γ GR. I prodotti indicati dalle frecce di dimensioni pari 886 bp (corsia 1, pannello A) e 931 bp (corsia 1, pannello B) sono stati recuperati da gel di agarosio ed impiegati per l'allestimento della reazione BP. M₁, Marker 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas; M₂, Marker 1 kb DNA Ladder, Fermentas.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati purificati da gel ed impiegati per l'allestimento della reazione BP. La trasformazione di cellule DH5 α con un'aliquota della reazione BP ha prodotto numerose colonie che sono state controllate per la presenza degli inserti codificanti l' α -gliadina e la γ -gliadina tramite digestione con endonucleasi di restrizione (dati non mostrati). Tali analisi ha portato ad evidenziare la presenza di alcuni cloni ricombinanti, di cui due, denominati rispettivamente pDONR α -gliadina e pDONR γ -gliadina sono stati scelti per l'allestimento della reazione LR. La trasformazione di cellule competenti DH5 α con i prodotti delle reazioni LR, ha prodotto diverse colonie da cui è stato estratto il DNA plasmidico per il controllo tramite digestione con endonucleasi di restrizione. In Fig. 27 è riportata l'analisi eseguita digerendo con ClaI e NruI i plasmidi estratti rispettivamente dalle colonie trasformate con la reazione LR relativa all' α -gliadina (pannello A) e alla γ -gliadina (pannello B). I prodotti attesi dalla digestione dei plasmidi ricombinanti contenenti gli inserti codificanti l' α -gliadina e la γ -gliadina hanno dimensioni attese rispettivamente di 3414 bp e 2036 bp e di 3414 bp e 2068 bp. È evidente dall'analisi della Fig. 27 come tutti i cloni analizzati siano positivi per la presenza degli inserti corrispondenti all' α -gliadina ed alla γ -gliadina. Due di questi cloni, denominati pDest α -gliadina e pDest γ -gliadina (rispettivamente in corsia 1 di entrambi i pannelli di Fig. 27), sono stati sottoposti all'analisi di sequenziamento per verificare la correttezza delle sequenze clonate nel vettore di espressione pDest14 ed infine impiegati per l'espressione eterologa in *E. coli*.

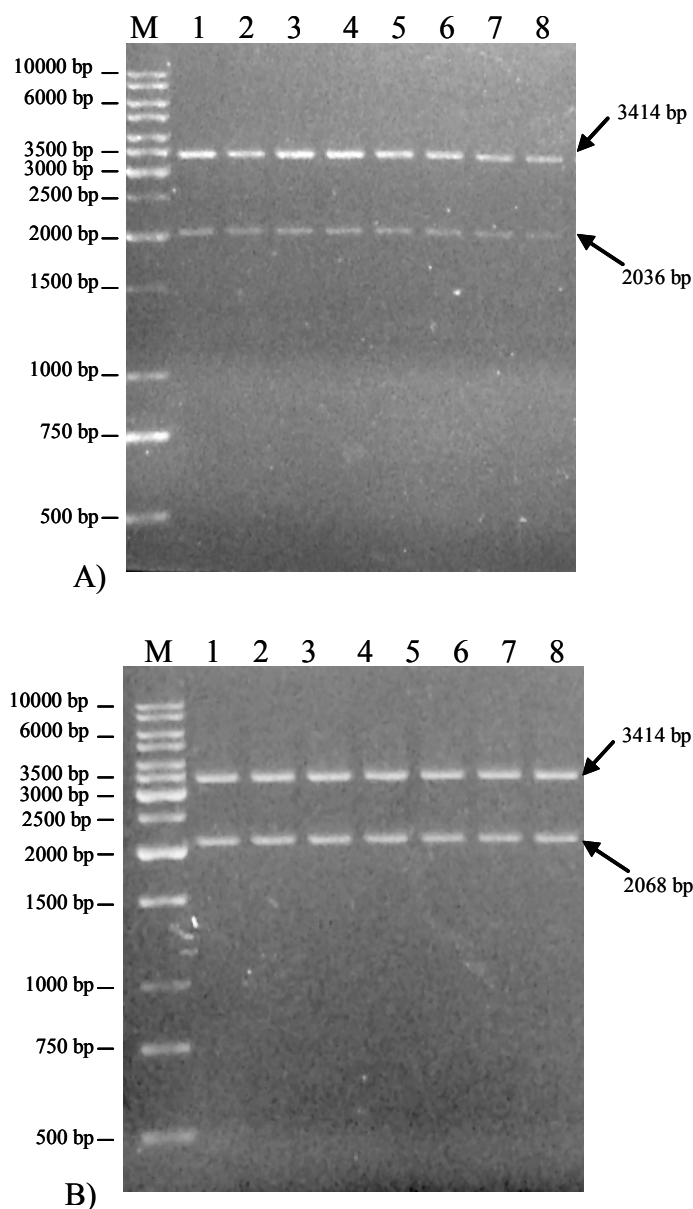


Fig. 27 Analisi mediante endonucleasi di restrizione del DNA plasmidico estratto da alcune colonie ottenute dalla trasformazione di cellule DH5 α con un'aliquota della reazione LR relativa all' α -gliadina (pannello A) ed alla γ -gliadina (pannello B). I cloni sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione ClaI e NruI ed i prodotti di digestione ottenuti analizzati su gel di agarosio allo 1%. In tutti i cloni (da 1 a 8) di entrambi i pannelli si evidenzia la presenza dei due frammenti attesi dalla digestione dei plasmidi ricombinanti pDest α -gliadina (3414 bp e 2036 bp) e pDest γ -gliadina (3414 bp e 2068 bp). M, Marker 1 kb DNA Ladder, Fermentas.

4.2.2 Espressione della γ -gliadina in *E. coli*

Per l'espressione eterologa della γ -gliadina modificata, è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* BL21Star (DE3)pLysS (Invitrogen). Il ceppo è stato trasformato con il

costruito pDest γ -gliadina e la coltura indotta con 0.5 mM IPTG a 37°C. In Fig. 28 è riportata l'analisi SDS-PAGE eseguita sugli estratti proteici totali ottenuti dalla coltura batterica non indotta e a 1, 2, 3, 4, 5 e 21 ore dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura. Sulla base dell'intensità della banda indotta, si può stabilire che la massima espressione è a circa 3-4 ore dopo l'induzione. Anche la γ -gliadina, come la LMW1A1, mostra una minore mobilità elettroforetica (PM apparente 40.630 Da) rispetto a quella attesa (PM teorico 32.406 Da). Per le spiegazioni circa l'anomala mobilità elettroforetica, si rimanda a quanto già esposto per la LMW1A1 (paragrafo 4.1.3, Risultati e Discussione).

Per confermare l'identità della proteina ricombinante purificata, è stata condotta un'analisi di Western Blotting con l'anticorpo anti-gliadine (Fig. 29, pannello A) su estratti totali ottenuti da colture batteriche non indotte, a 3 ore di induzione e su un'aliquota della proteina eterologa purificata dai corpi di inclusione. L'analisi di Western blotting e di SDS-PAGE eseguita sui corpi di inclusione estratti (Fig. 29, pannello A e B rispettivamente) ha rivelato la presenza della proteina eterologa in questa sede e, anche in questo caso, la localizzazione nella frazione insolubile è stata sfruttata per la purificazione su larga scala (rese finali, 30-40 mg/litro di coltura batterica indotta).

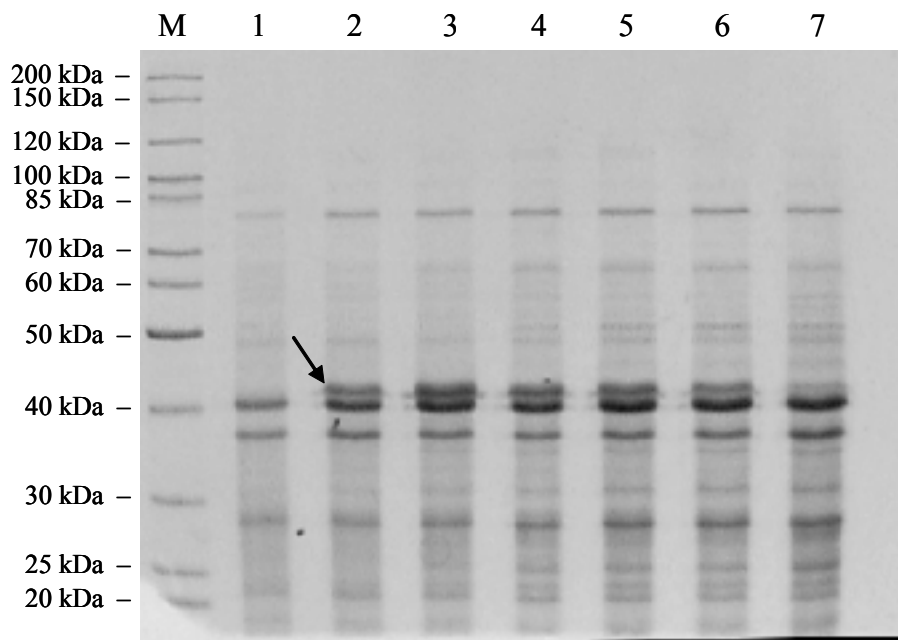


Fig. 28 SDS-PAGE effettuata sugli estratti proteici totali di una coltura di cellule BL21Star (DE3) pLysS indotta a 37°C con 0.5 mM IPTG. M, Marker Protein Ladder 10-200 kDa, Fermentas; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 estratto proteico totale ottenuto dalla coltura batterica a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 21 ore dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura. La freccia indica la γ -gliadina.

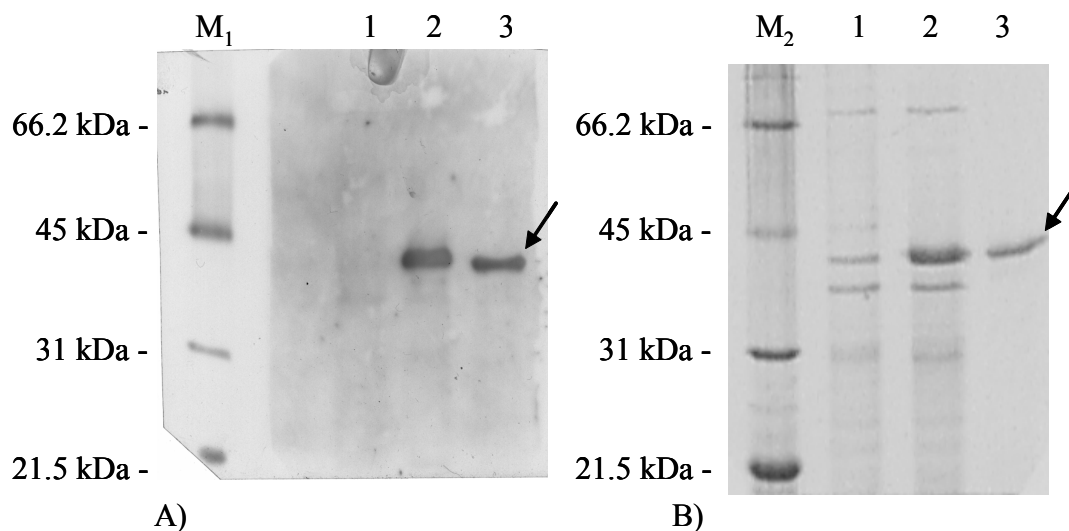


Fig. 29 (A) Western Blotting eseguito per confermare l'identità della γ -gliadina prodotta in *E. coli*, ceppo BL21Star (DE3)pLysS; (B) Relativa replica SDS-PAGE. In entrambi i casi: 1, 2, estratto proteico totale a 0 ed a 3 ore dall'induzione con IPTG 0.5 mM a 37°C; 3, 5 μ g di γ -gliadina purificata dai corpi di inclusione estratti a 3 ore di induzione. M₁, Biotinylated SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIORAD; M₂, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIORAD. Le frecce indicano la banda corrispondente alla γ -gliadina eterologa.

4.2.3 Analisi elettroforetica bidimensionale (IEF x SDS-PAGE) per individuare lo spot corrispondente alla γ -gliadina in frumento duro cv. Lira biotipo 45

Per dimostrare l'espressione *in vivo* della γ -gliadina modificata e la sua eventuale appartenenza alla frazione polimerica, sono state allestite coppie di gel bidimensionali (IEF X SDS-PAGE) della γ -gliadina prodotta in *E. coli* e di una preparazione gluteninica ottenuta dalla cv. di frumento duro Lira biotipo 45, da cui è stato isolato il gene. La sovrapposizione dei due profili elettroforetici ha permesso di identificare un singolo spot nella preparazione gluteninica della cv. Lira avente la stessa mobilità elettroforetica della proteina eterologa (Fig. 30).

Lo spot con la stessa mobilità elettroforetica della γ -gliadina presente nella cv. Lira biotipo 45 e lo spot corrispondente alla γ -gliadina ricombinante, sono stati sottoposti a digestione *in gel* con la coppia di enzimi tripsina/endopeptidasi AspN e con la chimotripsina. L'analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF eseguita sui peptidi ottenuti da entrambe le digestioni, non è stata tuttavia in grado di determinare l'identità delle proteine a causa della relativa scarsità dei peptidi ottenuti (dati non mostrati). Il motivo della scarsa efficienza con cui sono stati ottenuti i peptidi da entrambe le digestioni non è stato ulteriormente investigato ma, ritenendo che il problema potesse risiedere nella scarsità del materiale di partenza e nell'intrinseca inefficienza dei protocolli di digestione seguiti, si è deciso di purificare i due polipeptidi tramite RP-HPLC e di sottoporli a digestione con chimotripsina.

4.2.4 Dimostrazione dell'espressione *in vivo* della γ -gliadina modificata e della sua appartenenza alla frazione aggregata del glutine

Sia la γ -gliadina ricombinante sia la preparazione gluteninica della cv. Lira biotipo 45 sono state analizzate tramite cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC). Sovrapponendo i relativi cromatogrammi è stato individuato un picco nella preparazione gluteninica che presenta lo stesso tempo di ritenzione (33,9 min) del picco principale presente nel campione contenente la proteina eterologa (Fig. 31). Entrambi i picchi, sono stati purificati per RP-HPLC, alchilati con la 4-vinilpiridina ed infine desalificati tramite RP-HPLC. Come atteso, il tempo di ritenzione delle proteine alchilate è risultato inferiore (27,1 min) in quanto la 4-VP, nelle condizioni

acide in cui avviene la separazione cromatografica, introduce una maggior carica positiva, diminuendo perciò l'idrofobicità superficiale delle molecole cui è legata (Burnouf *and* Bietz, 1984).

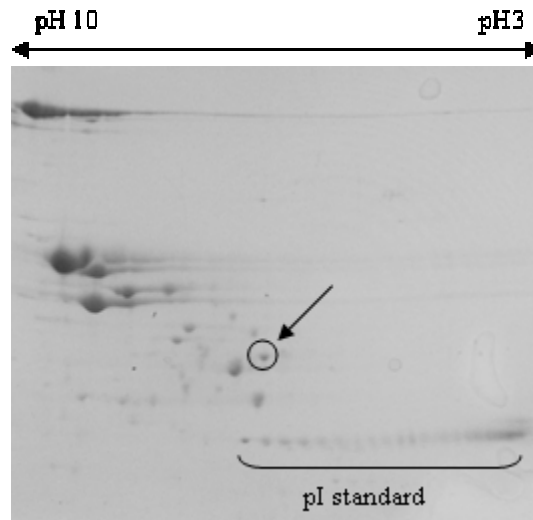


Fig. 30 Profilo elettroforetico bidimensionale dell'estratto gluteninico ottenuto dalla cv. Lira biotipo 45. Lo spot indicato dalla freccia mostra la stessa mobilità elettroforetica della γ -gliadina ricombinante. pI standard, treno di carbammilazione dell'anidrasi carbonica (Amersham Biosciences). La freccia in alto indica l'intervallo di pH utilizzato per effettuare la prima dimensione.

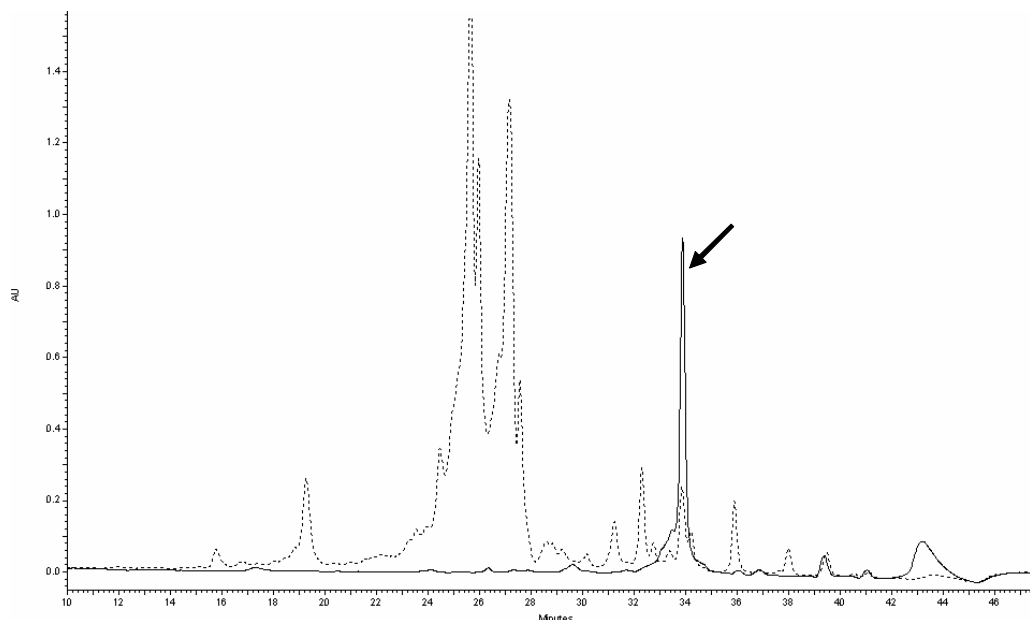


Fig. 31 Sovrapposizione dei due profili cromatografici RP-HPLC della γ -gliadina ricombinante e della preparazione gluteninica della cv. Lira biotipo 45. La freccia indica il picco di sovrapposizione fra i cromatogrammi relativi alla γ -gliadina ricombinante (linea continua) ed alla preparazione gluteninica della cv. Lira biotipo 45 (linea tratteggiata).

I campioni recuperati sono stati quindi digeriti con chimotripsina che, sebbene sia caratterizzata da un tipo di attività aspecifica, ha permesso di ottenere un certo numero di frammenti diagnostici. Come è evidente dalla Tabella 3, sono stati identificati dieci peptidi di cui otto in comune tra la γ -gliadina ricombinante ed il presunto corrispondente polipeptide espresso *in vivo*. Le sequenze corrispondenti ai peptidi in comune sono evidenziati nella sequenza amminoacidica relativa alla γ -gliadina riportata in Fig. 32. Complessivamente, è stata confermata l'identità di circa il 30 % della sequenza polipeptidica. Inoltre, il peptide n°7 di massa attesa pari a 1913,92 Da, corrispondente alla sequenza CEQPQRTIPQPHQTF e contenente il residuo di cisteina addizionale in posizione 26, è stato ulteriormente caratterizzato e la sequenza amminoacidica confermata mediante analisi di tandem MS.

Questi dati dimostrano che nella frazione gluteninica dell' endosperma sono presenti, oltre alle subunità gluteniniche ad alto e a basso peso molecolare propriamente dette, anche delle sequenze di tipo gliadinico, che ne entrano a far parte in virtù della presenza di residui addizionali di cisteina.

Polipeptide purificato dalla cv. Lira biotipo 45				γ-gliadina ricombinante		
Massa osservata MH+	Massa attesa	Sequenza amminoacidica	Massa osservata MH+	Massa attesa	Sequenza amminoacidica	
1	1274.56.00	1273,62	KTLPTMCNVY	1273,62	KTLPTMCNVY	
2	1409.59.00	1408,67	VPPDCSTINVPY	1408,67	VPPDCSTINVPY	
3	1455.62	1454,68	LQQQMNPCKNF	1454,68	LQQQMNPCKNF	
		1454,68	QQQMNPCKNFL	1454,68	QQQMNPCKNFL	
4	1486.71	1485,77	VLKTLPTMCNVY	1485,77	VLKTLPTMCNVY	
5	1565.73	1564,81	VSIILPRSDCQVM	1564,81	VSIILPRSDCQVM	
6	1847.92	1847,03	GHIQPQPAQLEGIRSL	1847,03	GHIQPQPAQLEGIRSL	
7	1914.82	1913,92	CEQPQRTIPQPHQTF	1913,92	CEQPQRTIPQPHQTF	
8	2060.04.00	2059,18	GHIQPQPAQLEGIRSLVL	2059,18	GHIQPQPAQLEGIRSLVL	
9	2605.22.00	2604,44	FQLAQGLGHIQPQPAQLEGIRSL	2816,59	FQLAQGLGHIQPQPAQLEGIRSLVL	
10	3082.29.00	3081,54	LQQQMNPCKNFL	3191,58	VSSLVSIILPRSDCQVMQQQCCQQLA	
				3191,67	LLQQCNHVSLVSSLVSIILPRSDCQVM	

Tab. 3 Lista dei peptidi ottenuti dall'analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF eseguita sul digesto chimotriptico del polipeptide purificato dalla frazione gluteninica della cv. Lira biotipo 45 e della γ -gliadina ricombinante. In grassetto sono evidenziati i peptidi in comune fra le due proteine.

4.2.5 Espressione dell' α -gliadina in *E. coli*

L' α -gliadina è stata espressa sia nel ceppo BL21Star (DE3)pLysS sia nel BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. In Fig. 33 è riportata l'analisi della cinetica di espressione relativa al ceppo BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL di una coltura indotta a 37°C con 0.5 mM IPTG. Come è evidente già dopo un'ora dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura, si osservano due bande di induzione che sono inoltre presenti nei corpi di inclusione estratti dopo tre ore di induzione. La presenza di tale bande è stata riscontrata anche abbassando la temperatura di induzione da 37°C a 30°C ed anche in colture del ceppo BL21Star (DE3)pLysS (dati non mostrati). Poichè entrambe le bande sono riconosciute dall'anticorpo anti-LMWGS in Western Blotting (Fig. 34, Pannello A), abbiamo pensato che la banda a mobilità elettroforetica maggiore potesse essere la forma deleta di quella a minore mobilità. Tale ipotesi è stata dimostrata mediante analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF, eseguita sui digesti chimotryptici dei due polipeptidi corrispondenti alle bande di induzione a maggiore e minore mobilità elettroforetica.

L' α -gliadina è stata prodotta su larga scala e purificata dai corpi di inclusione con una resa di 30-40 mg/l di coltura batterica. L' α -gliadina verrà impiegata in test di caratterizzazione tossicologica per la celiachia che verranno eseguiti dal gruppo del Prof. Picarelli del Policlinico Umberto I di Roma.

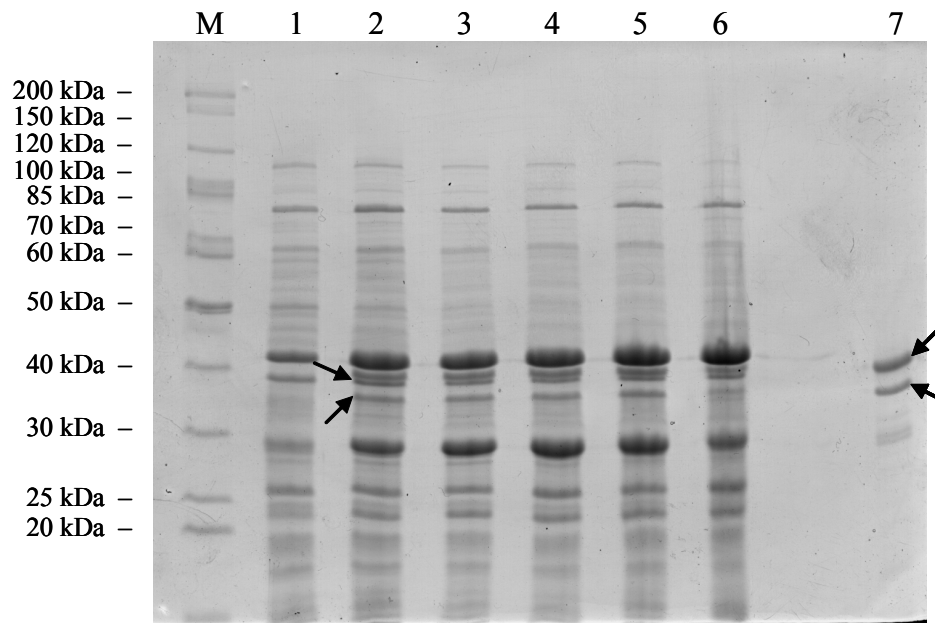


Fig. 33 SDS-PAGE effettuata sugli estratti proteici totali di una coltura di cellule **BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL** indotta a 37°C con 0.5 mM IPTG. M, Marker Protein Ladder 10-200 kDa, Fermentas; 1, 2, 3, 4, 5, 6, estratto proteico totale ottenuto dalla coltura batterica a 0, 1, 2, 3, 4, 21 ore dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura. 7, corpi di inclusione estratti a tre ore dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura. Le frecce indicano le due forme dell' α -gliadina a diversa mobilità elettroforetica.

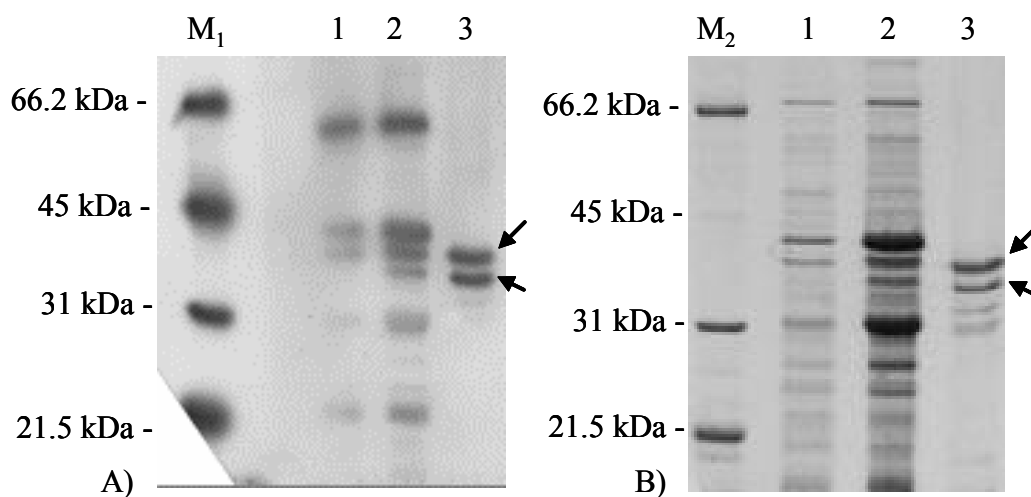


Fig. 34 (A) Western Blotting eseguito per confermare l'identità dell' α -gliadina prodotta in *E. coli*, ceppo **BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL**; **(B) Relativa replica SDS-PAGE**. In entrambi i casi: 1, 2, estratto proteico totale a 0 ed a 3 ore dall'induzione con IPTG 0.5 mM a 37°C; 3, α -gliadina purificata dai corpi di inclusione estratti a 3 ore di induzione. M₁, Biotinylated SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIORAD; M₂, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIORAD. Le frecce indicano le bande a diversa mobilità elettroforetica corrispondenti all' α -gliadina.

4.3 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLA LMW1A1 E DELLA γ -GLIADINA MODIFICATA TRAMITE ESPERIMENTI DI INCORPORAZIONE EFFETTUATI MEDIANTE IL MICRO-MIXOGRAFO

4.3.1 Test preliminari per mettere a punto le condizioni di incorporazione

Come discusso nei Materiali e Metodi (paragrafo 3.7.3), prima di eseguire gli esperimenti di incorporazione, è stato necessario effettuare una serie di esperimenti preliminari per mettere a punto le condizioni di incorporazione sia in frumento duro (cv. Lira, biotipo 42 e 45) sia in frumento tenero (cv. Kukri). Questi test consistono nell'aggiungere alla farina della cv. con la quale si vuole costituire l'impasto base in cui incorporare la proteina di interesse, diverse quantità di agente riducente (DTT) ed ossidante (KIO_3), al fine di valutare quali sono le quantità che causano i minimi cambiamenti nel tempo di *mixing* (MT) rispetto a quello dell'impasto di controllo, costituito dalla farina a cui è stata aggiunta acqua invece del DTT e del KIO_3 . La motivazione della scelta del MT come parametro di riferimento, risiede nel fatto che il MT è strettamente correlato alla grandezza dei polimeri gluteninici e, se non varia in modo considerevole, si può assumere che la distribuzione dei pesi molecolari dei polimeri gluteninici è essenzialmente recuperata dopo il processo di riduzione-ossidazione parziale (Bèkès *et al.*, 1994). In Fig. 35 è riportato, a titolo d'esempio, uno di questi test preliminari effettuato utilizzando la semola della cv. Lira, biotipo 45. In particolare, è evidente una relazione inversa fra il MT e la quantità di DTT aggiunto (Fig. 35, pannello A) che può essere spiegata considerando che il DTT riduce la dimensione dei polimeri gluteninici, causando una diminuzione del tempo necessario all'impasto per raggiungere il suo stadio ottimale di sviluppo, definito, appunto, come MT. In Fig. 35 pannello B, si osserva invece una relazione lineare fra il MT e la quantità di KIO_3 , il quale, essendo un agente ossidante, aumenta di converso la dimensione dei polimeri e causa un aumento del MT. Le quantità di DTT e KIO_3 scelte per effettuare gli esperimenti di incorporazione nella cv. Lira biotipo 45 sono state pari a 100 μg e 80 μg , in quanto causano i minimi cambiamenti nel MT rispetto a quello dell'impasto di controllo, rispettivamente dello 1,64% (test relativi al pannello A, Fig. 35) e dello 8,3% (test relativi al pannello B, Fig. 35).

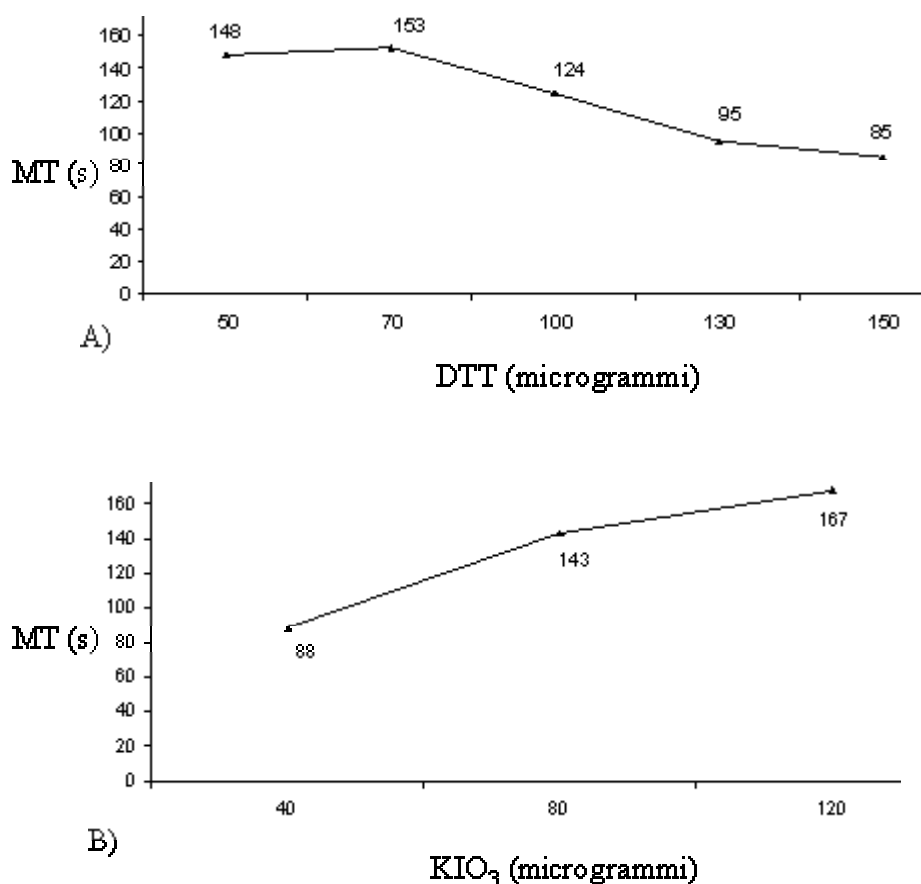


Fig. 35 Test preliminari per mettere a punto le condizioni di incorporazione nella cv. Lira biotipo 45. Pannello A, relazione esistente fra il MT e le diverse quantità di DTT (50, 70, 100, 130, 150 µg) aggiunte alla semola della cv. Lira biotipo 45, mantenendo costante la quantità di KIO₃ (80 µg). **Pannello B,** relazione esistente fra il MT e le diverse quantità di KIO₃ (40, 80, 120 µg) aggiunte alla semola della cv. Lira biotipo 45, mantenendo costante la quantità di DTT (100 µg). I numeri riportati sulle curve corrispondono al valore di MT espresso in secondi.

4.3.2 Test di incorporazione in frumento tenero

Gli esperimenti di incorporazione in frumento tenero sono stati effettuati utilizzando la farina della cv. Kukri che, in virtù delle sue ottime caratteristiche tecnologiche, è stata classificata nella lista delle cv. “*Australian Prime Hard*”. In Tabella 4, sono riportati i risultati ottenuti dall’incorporazione della γ -gliadina modificata e della LMW1A1 nell’impasto ottenuto dalla farina di frumento tenero. È evidente che la γ -gliadina modificata esercita un effetto di indebolimento andando a ridurre il MT del 18,5%, la resistenza massima (PR) del 20,8% mentre causa un decremento della resistenza dell’impasto alla rottura (RBD) pari allo 11,1%. La LMW1A1, invece, non produce sostanziali cambiamenti nelle caratteristiche di *mixing* dell’impasto, in quanto incrementa il MT dello 0,7%, decrementa il PR dello 1,6% mentre non modifica affatto

la RBD.

CAMPIONE	MT	PR	RBD
Kukri + γ -gliadina	81.5	79.2	88.9
Kukri + LMW-1A1	100.7	98.4	100

Tabella 4 Incorporazione della γ -gliadina modificata e della LMW1A1 nella farina della cv. Kukri. MT, *mixing time*; PR, *peak resistance*; RBD, *resistance to breakdown*. I valori sono riportati in percentuale rispetto al controllo (100%) costituito dalla farina della cv. Kukri ridotta ed ossidata con le stesse quantità di DTT e KIO₃ utilizzate per gli esperimenti di incorporazione (120 μ g per ciascun reagente).

L'effetto di indebolimento esercitato dalla γ -gliadina modificata è probabilmente in relazione alla sua struttura primaria ed, in particolare, al numero ed alla posizione delle cisteine presenti. Infatti (paragrafo 3.1.1, Materiali e Metodi), la γ -gliadina modificata ha una cisteina aggiuntiva localizzata in posizione 26 del dominio ripetuto, mentre le altre otto cisteine sono tutte localizzate nel dominio C-terminale del polipeptide, in posizioni ben conservate rispetto alle γ -gliadine tipiche. Su tale base, riteniamo che le otto cisteine localizzate nel dominio C-terminale formino tra di loro legami intra-molecolari, mentre la cisteina aggiuntiva formi legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche, agendo come elemento di terminazione dei polimeri gluteninici, riducendone le dimensioni e avendo pertanto un effetto di indebolimento.

Per quanto concerne la LMW1A1, la mancanza di sostanziali cambiamenti apportati alle caratteristiche di *mixing* dell'impasto è dovuta sia alla struttura primaria del polipeptide sia alla natura estremamente forte della farina utilizzata. Per quanto riguarda il primo aspetto, sebbene la LMW1A1 manchi della breve regione N-terminale, essa mantiene inalterato il numero di cisteine presenti, in seguito all'acquisizione di un residuo cisteinico aggiuntivo (C*) localizzato fra C3 e C4 (paragrafo 3.2.1.2, Materiali e Metodi). Sulla base della conservazione della posizione degli altri residui cisteinici lungo la sequenza polipeptidica, è stato ipotizzato che le LMW-i formino legami con le altre subunità gluteniniche tramite la cisteina aggiuntiva (C*) e la C7. Poiché le cisteine C* e C7 sono molto vicine lungo la sequenza amminoacidica, è atteso che il loro contributo positivo alle caratteristiche di *mixing* dell'impasto sia trascurabile (Cloutier *et al.*, 2001). Inoltre, l'utilizzo di una farina dalle ottime caratteristiche tecnologiche, quale è quella della cv. Kukri, rende di difficile individuazione gli ipotetici lievi effetti positivi

esercitati dalla LMW1A1.

Al fine di valutare le proprietà funzionali della LMW-1A1, gli esperimenti di incorporazione dovrebbero essere condotti anche utilizzando una farina con scarse qualità tecnologiche in quanto, generalmente, più debole è la farina in cui si incorpora la proteina di interesse, più evidenti sono gli effetti di rafforzamento da essa esercitati. Di converso, effetti di indebolimento sono di facile identificazione incorporando la proteina di interesse in una farina classificata come forte o extra-forte (come è stato rivelato infatti per la γ -gliadina).

4.3.3 Test di incorporazione in frumento duro cv. Lira biotipo 42 e 45

La semola utilizzata per gli esperimenti di incorporazione in frumento duro deriva dai biotipi 42 e 45 della cv. Italiana Lira. Questi biotipi differiscono essenzialmente nei *loci Gli-B1* and *Glu-B3* codificanti rispettivamente le γ/ω gliadine e le LMW-GS. La presenza della variante allelica LMW-2 nel biotipo 45 e LMW-1 nel biotipo 42, fa sì che la semola derivante dai due biotipi abbia rispettivamente buone e scarse qualità tecnologiche (Paragrafo 1.1.4.2.2 dell' Introduzione).

L'analisi micro-mixografica condotta utilizzando la semola derivante dai due biotipi mostra infatti (Tabella 5, Figura 36) che il biotipo 45 ha un MT e un PR maggiori rispetto al biotipo 42, mentre presenta una maggiore tolleranza all'*overmixing*, come evidenziato dal basso valore di RBD. Le migliori caratteristiche del biotipo 45 rispetto al biotipo 42 trovano spiegazione nella presenza nel primo di una maggiore percentuale di polimeri non estraibili (UPP% biotipo 45: 32,22%; UPP% biotipo 42: 20,21%). Inoltre, analisi di RP-HPLC hanno mostrato che il biotipo 45 ha una maggiore proporzione di subunità gluteniniche rispetto al biotipo 42 (57,87% contro 51,26%) ed una minore quantità di gliadine (30.52% contro 36.06%), come già precedentemente osservato da Masci *et al.*, 1995.

Gli esperimenti di incorporazione eseguiti utilizzando la semola di entrambi i biotipi hanno mostrato che la LMW1A1 e la γ -gliadina modificata esercitano un effetto di indebolimento sulle caratteristiche di forza-elasticità dell'impasto. In particolare negli esperimenti di incorporazione eseguiti nel biotipo 42, la γ -gliadina decresce il MT e il PR del 16,3% e del 9,1% rispettivamente ed incrementa la RBD del 10,5%. La LMW1A1 esercita circa lo stesso effetto negativo andando a ridurre il MT e il PR del 17,5% e del 18,6% rispettivamente e ad incrementare la RBD del 10,5% (Tabella 6).

Negli esperimenti di incorporazione eseguiti utilizzando la farina del biotipo 45, l'effetto di indebolimento esercitato dalla γ -gliadina e dalla LMW1A1 è più evidente in quanto entrambi i polipeptidi riducono il MT rispettivamente del 35% e del 36,4%, il PR del 18% e dello 11,6% ed incrementano la RBD del 36,4% e del 72.7% (Tabella 7).

CAMPIONE	MT	PR	RBD
cv. Lira biotipo 42	107 ± 6.24	553 ± 24.02	23 ± 1.15
cv. Lira biotipo 45	196 ± 9.07	689 ± 24.25	9 ± 1.15

Tabella 5 relativa ai test micro-mixografici eseguiti utilizzando la semola della cv. Lira biotipo 42 e 45. Il valore che si accompagna ad ogni parametro è la deviazione standard calcolata sulla base di tre repliche eseguite. MT, *mixing time*; PR, *peak resistance*; RBD, *resistance to breakdown*.

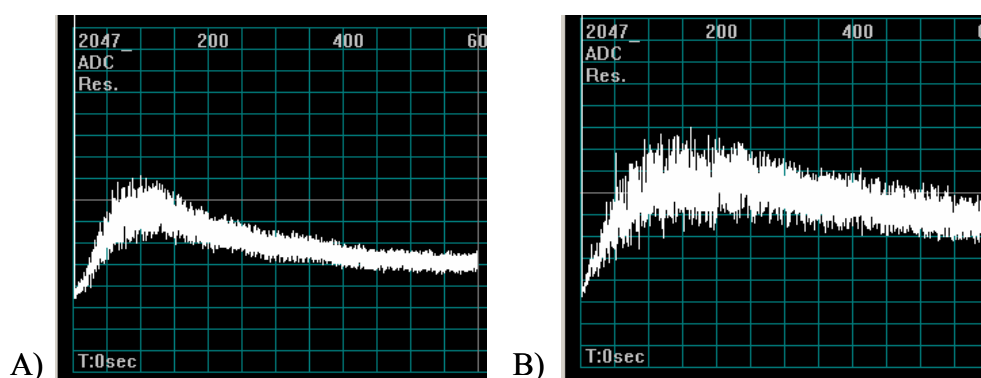


Fig. 36 Micro-mixogrammi relativi agli impasti ottenuti dalla semola del biotipo 42 (pannello A) e 45 (pannello B). Sull' asse delle x sono riportati i valori di tempo (in totale 10 min), sull' asse delle y i valori di resistenza (unità arbitrarie). In particolare si osserva come la curva relativa all'impasto ottenuto dal biotipo 42 (pannello A), abbia un limitato spessore (impasto poco elastico) e, raggiunta la massima resistenza, scenda rapidamente (impasto debole e poco tollerante all' *overmixing*). La curva relativa all'impasto del biotipo 45 (pannello B) è invece più spessa (impasto elastico) e più stabile (impasto forte, tollerante all'*overmixing*).

L'effetto di indebolimento esercitato dalla γ -gliadina modificata e dalla LMW1A1 potrebbe essere spiegato dal fatto che esse non vengano incorporate nella frazione polimerica del glutine, in quanto è noto dalla letteratura che gliadine aggiunte ad un impasto hanno un marcato effetto di indebolimento (Khatkar *et al.*, 2002). A

motivo di ciò, abbiamo voluto verificare la loro corretta incorporazione nella frazione aggregata del glutine mediante tecniche di elettroforesi bidimensionale (IEF X SDS-PAGE), RP-HPLC, SE-HPLC.

CAMPIONE	MT	PR	RBD
cv. Lira biotipo 42 + γ -gliadina	83.7	90.9	110.5
cv. Lira biotipo 42 +LMW-1A1	82.5	81.4	110.5

Tabella 6 Incorporazione della γ -gliadina modificata e della LMW1A1 nell'impasto ottenuto dalla semola della cv. Lira, biotipo 42. MT, *mixing time*; PR, *peak resistance*; RBD, *resistance to breakdown*. I valori sono riportati in percentuale rispetto al controllo (100%) costituito dalla farina della cv. Lira biotipo 42 ridotta ed ossidata con le stesse quantità di DTT e KIO₃ utilizzate per gli esperimenti di incorporazione (rispettivamente 100 μ g e 80 μ g).

CAMPIONE	MT	PR	RBD
cv. Lira biotipo 45 + γ -gliadina	65	82	136.4
cv. Lira biotipo 45 + LMW-1A1	63.6	88.4	172.7

Tabella 7 Incorporazione della γ -gliadina modificata e della LMW1A1 nell'impasto ottenuto dalla semola della cv. Lira, biotipo 45. MT, *mixing time*; PR, *peak resistance*; RBD, *resistance to breakdown*. I valori sono riportati in percentuale rispetto al controllo (100%) costituito dalla farina della cv. Lira biotipo 45 ridotta ed ossidata con le stesse quantità di DTT e KIO₃ utilizzate per gli esperimenti di incorporazione (rispettivamente 100 μ g e 80 μ g).

4.3.4 Dimostrazione della localizzazione della LMW-1A1 e della γ -gliadina modificata nella frazione gluteninica degli impasti della cv. Lira biotipo 42 e 45 tramite elettroforesi bidimensionale (IEF X SDS-PAGE), SE-HPLC, RP-HPLC

Al fine di verificare la presenza della LMW1A1 e della γ -gliadina nella frazione polimerica degli impasti ottenuti dalla semola della cv. Lira biotipo 42, abbiamo allestito coppie di gel bidimensionali fra la proteina eterologa e le frazioni gluteniniche ottenute dagli impasti del biotipo 42 ricostituiti e di controllo, prelevati al MT. In

particolare, dalla sovrapposizione di questi gel (Fig. 37) è stato individuato uno spot nella frazione gluteninica ottenuta dall'impasto ricostituito con la γ -gliadina, che mostra la stessa mobilità elettroforetica della γ -gliadina ricombinante ed, inoltre, questo spot si è mostrato assente nell'impasto di controllo, semplicemente ridotto ed ossidato. Questi stessi dati sono stati ottenuti anche per la LMW1A1 (dati non mostrati) e nell'insieme confermano la corretta incorporazione delle proteine eterologhe aggiunte alla semola della cv. Lira, biotipo 42.

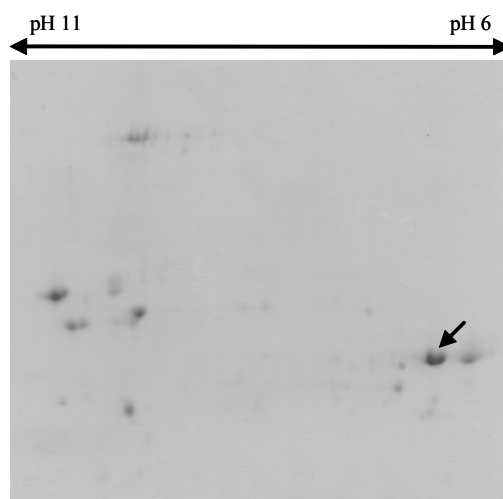


Fig. 37 Analisi bidimensionale (IEF X SDS-PAGE) relativa alla frazione gluteninica ottenuta dall'impasto della semola della cv. Lira biotipo 42, ricostituito con la γ -gliadina e prelevato al MT. La freccia indica la γ -gliadina addizionata all'impasto ottenuto dalla semola della cv. Lira biotipo 42. La prima dimensione è stata effettuata utilizzando strisce di gel di isoelettrofocalizzazione con intervallo di pH lineare pari a 6-11.

L'incorporazione delle due proteine negli impasti ottenuti dalla semola del biotipo 42 e 45, è stata dimostrata anche mediante analisi di cromatografia liquida ad alta prestazione ad esclusione molecolare (SE-HPLC). Infatti come è evidente dalla Tabella 8, gli impasti ricostituiti con entrambe le proteine ricombinanti mostrano una percentuale di polimeri non estraibili (UPP%) e un'area totale (comprensiva dei polimeri solubili e non solubili) maggiore rispetto ai valori ottenuti dall'analisi degli impasti di controllo, semplicemente ridotti ed ossidati, sia al tempo di *mixing* (MT) sia al tempo di rottura dell'impasto (BK, 3 minuti dopo il MT).

	Campione	UPP%	Area totale
Lira 42	MT	16,87%	42187644
	BK	14,74%	40801449
	γ -gliadina-MT	20,95%	45907618
	γ -gliadina-BK	25,06%	45248479
	LMW-1A1-MT	23,39%	45688942
	LMW-1A1-BK	23,14%	45721675
Lira 45	MT	23,88%	43709667
	BK	25,13%	43451286
	γ -gliadina-MT	30,66%	47263124
	γ -gliadina-BK	35,90%	46078154
	LMW-1A1-MT	29,03%	45059602
	LMW-1A1-BK	32,43%	47889937

Tabella 8 Analisi di SE-HPLC condotta sugli impasti della semola della cv. Lira biotipo 42 e 45, ricostituiti con la γ -gliadina modificata e con la LMW1A1 e sugli impasti di controllo. La Tabella mostra i diversi valori di UPP% e di area totale (comprensiva dei polimeri solubili e non solubili) ottenuti dall'analisi degli impasti ricostituiti e di controllo al tempo di *mixing* (MT) e al tempo di rottura (BK, 3 minuti dopo il tempo di *mixing*). È evidente come gli impasti ricostituiti con le proteine ricombinanti mostrino valori di UPP% e di area totale superiori al controllo, costituito dagli impasti semplicemente ridotti ed ossidati.

Infine, analisi di cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) condotte sugli estratti gliadinici e gluteninici ottenuti dagli impasti ricostituiti con la LMW-1A1 e la γ -gliadina ricombinanti e dagli impasti di controllo, hanno escluso la presenza dei due polipeptidi nella frazione monomerica e hanno dimostrato la loro esclusiva presenza nella frazione aggregata (dati non mostrati). In particolare, le analisi di RP-HPLC eseguite sulle frazioni gluteniniche hanno mostrato che gli impasti ricostituiti hanno un minore rapporto HMW-GS/LMW-GS rispetto agli impasti di controllo (Tabella 9), fattore che è indice dell'incorporazione delle due subunità nella frazione polimerica.

	Campione	HMW-GS/LMW-GS
Lira 42	MT	0,35
	BK	0,40
	γ -gliadina-MT	0,26
	γ -gliadina-BK	0,26
	LMW-1A1-MT	0,28
	LMW-1A1-BK	0,29
Lira 45	MT	0,21
	BK	0,19
	γ -gliadina-MT	0,16
	γ -gliadina-BK	0,17
	LMW-1A1-MT	0,16
	LMW-1A1-BK	0,16

Tabella 9 Analisi di RP-HPLC condotta sugli impasti della semola della cv Lira biotipo 42 e 45, ricostituiti con la γ -gliadina modificata e con la LMW1A1 e sugli impasti di controllo. La Tabella mostra il rapporto HMW-GS/LMW-GS relativo a frazioni gluteniniche ottenute dagli impasti ricostituiti con le proteine ricombinanti e di controllo, al tempo di *mixing* (MT) e al tempo di rottura dell'impasto (BK, 3 minuti dopo il tempo di *mixing*).

4.3.5 Considerazioni finali riguardanti gli esperimenti di incorporazione eseguiti in frumento duro

I dati ottenuti dagli esperimenti di incorporazione della LMW1A1 e della γ -gliadina effettuati in frumento duro, discordano da quelli ottenuti in frumento tenero (paragrafo 4.3.2 Risultati e Discussione) e suggeriscono che altri parametri debbano essere presi in considerazione nell'analisi dei dati.

Gli esperimenti di incorporazione sono ben documentati in frumento tenero (Bèkès *et al.* 1994; Bèkès *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1999; Uthayakumaran *et al.*, 2000b), mentre quanto esposto nel paragrafo 4.3.3 dei Risultati e Discussione rappresenta la prima prova documentata di incorporazione eseguita utilizzando la

semola di frumento duro; pertanto, non escludiamo l'ipotesi che le condizioni utilizzate per incorporare la γ -gliadina e la LMW1A1 in frumento duro siano state in parte inadeguate. Infatti, le condizioni seguite per incorporare le due proteine eterologhe nell'impasto ottenuto dalla semola di frumento duro di entrambi i biotipi, sono state stabilite in parte sulla base degli esperimenti condotti in frumento tenero da Bèkès *et al.* (1994). Tuttavia, la semola di frumento duro e la farina di frumento tenero potrebbero presentare alcune sostanziali differenze, come una diversa organizzazione dei polimeri gluteninici, una differente granulometria ed un diverso grado di rottura dei granuli d'amido che potrebbero determinare la necessità di seguire protocolli di incorporazione differenti. In particolare, la maggiore granulometria e il maggior grado di rottura dei granuli d'amido della semola di frumento duro rispetto alla farina di frumento tenero, sono causati dai processi di molitura a cui sono sottoposte le cariossidi e potrebbero modificare rispettivamente l'accessibilità della proteina ricombinante ai polimeri parzialmente ridotti e il quantitativo di acqua aggiunto alla semola necessario per il completo sviluppo dell'impasto. Tutti gli esperimenti di incorporazione effettuati sia in frumento duro sia in frumento tenero descritti in questa Tesi, sono stati effettuati infatti ad un valore costante di assorbimento di acqua pari al 60%, ma è ben noto che farine con un alto grado di rottura di granuli d'amido (come la semola di frumento duro) tendono ad assorbire un quantitativo maggiore di acqua rispetto a quelle con un grado minore (Dexter *et al.*, 1994).

Una spiegazione alternativa o contestuale per spiegare la discordanza dei dati ottenuti dai test di incorporazione delle proteine ricombinanti in frumento duro e tenero, potrebbe risiedere in una loro differente organizzazione dei polimeri gluteninici. Infatti, farine di frumento duro hanno un minore rapporto HMW-GS/LMW-GS rispetto a quelle di frumento tenero e, poiché la maggior parte delle LMW-GS (LMW-GS di tipo B) agiscono come elementi di allungamento dei polimeri gluteninici mentre le HMW-GS possono comportarsi da elementi di allungamento e di ramificazione (Kasarda, 1999), si può ipotizzare che l'organizzazione dei polimeri gluteninici in frumento tenero sia piuttosto ramificata mentre in frumento duro prevalentemente lineare. Queste differenze potrebbero determinare una diversa rottura dei polimeri gluteninici in seguito all'aggiunta dell'agente riducente e quindi modificare l'accessibilità della proteina ricombinante aggiunta.

Sulla base di quanto esposto riteniamo che non sia possibile dedurre alcun ruolo funzionale relativo alla LMW1A1 e alla γ -gliadina modificata sulla base degli

esperimenti di incorporazione effettuati in frumento duro. È infatti verosimile che debbano essere messe a punto condizioni di incorporazione più stringenti, che tengano conto delle potenziali ed effettive differenze fra la semola di frumento duro e la farina del frumento tenero.

4.4 ESPRESSIONE IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* DELLA LMW-GS B1133 E DELLA LMW-GS 42K, *WILD TYPE* E MUTAGENIZZATE NEL SITO 23

L'analisi di sequenziamento N-terminale effettuata sulle LMW-GS ha rivelato che una delle sostanziali differenze fra le LMW-s e quelle di tipo m, consiste nella presenza in queste ultime dei primi tre residui amminioacidici MET della sequenza polipeptidica matura. E' stato recentemente ipotizzato che tale differenza sia ascrivibile ad un diverso processamento N-terminale a cui le LMW-m e LMW-s sono soggette (Masci *et al.*, 1998). In particolare, la presenza di un'asparagina in posizione 23 nelle LMW-s, porterebbe al taglio della sequenza MEN effettuato da un'asparaginil-endoproteasi e quindi alla produzione di sequenze di tipo s (DuPont *et al.*, 2004). Di converso, la presenza di una treonina in posizione 23 nelle sequenze di tipo m, porterebbe al loro processamento canonico, caratterizzato esclusivamente dal taglio del peptide segnale (per i dettagli circa la classificazione e le sequenze N-terminali si rimanda al paragrafo 1.1.4.2.2. dell'Introduzione).

Al fine di dimostrare questa ipotesi e alla luce della conservazione dei processi di modificazione post-traduzionali nel regno vegetale, è stata effettuata la mutagenesi-sito specifica T23N di una LMW-m (LMW-B1133) e N23T di una LMW-s (LMW-42K). I costrutti *wild type* e mutagenizzati sono stati quindi clonati nel vettore di inserzione pPVX201 ed espressi in *Nicotiana benthamiana*.

4.4.1 Subclonaggio della LMW-GS B1133 *wild type* e mutagenizzata nel sito 23 (LMW-GS B1133T23N) nel vettore di espressione pPVX201

4.4.1.1 Mutagenesi del sito 23 della LMW-GS B1133 e clonaggio in pPVX201

La reazione di mutagenesi sito-specifica T23N relativa alla LMW-B1133 è stata effettuata mediante impiego del *QuikChange II Site Directed Mutagenesis kit*

(Stratagene). In particolare, il plasmide pDH4A, contenente l'intera regione codificante la LMW-GS B1133 (paragrafo 3.1.2 dei Materiali e Metodi), è stato amplificato con la coppia di oligonucleotidi B1133F e B1133R. Poiché entrambi gli oligonucleotidi si appaiano sulla stessa sequenza di DNA, ma su filamenti opposti, e contengono, al centro, la mutazione voluta (AAT→ACT), l'amplificazione porta alla produzione di un amplificato corrispondente al plasmide di 4370 bp, mutagenizzato nello specifico residuo (Fig. 38, corsie 1 e 2). La reazione di PCR è stata quindi sottoposta a digestione con DpnI al fine di eliminare il DNA parentale metilato ed emimetilato, ed un'aliquota è stata utilizzata per trasformare cellule supercompetenti XL1-Blue. L'analisi del DNA plasmidico estratto dalle colonie trasformate, ha evidenziato un'elevata efficienza di trasformazione in quanto tutti i cloni analizzati hanno mostrato di essere ricombinanti per la presenza del plasmide pDH4A (dati non mostrati).

Per controllare l'effettiva introduzione della mutazione T23N nelle sequenze geniche codificanti la B1133, sono stati sequenziati due cloni ed, in entrambi, è stata dimostrata la sostituzione del codone AAT, codificante una treonina, con il codone ACT, codificante una asparagina. Uno dei due cloni sequenziati, denominato pDH4AB1133T23N, è stato quindi amplificato con la coppia di oligonucleotidi B1133ClaIF e LMW42KSalIR al fine di introdurre i siti di restrizioni ClaI e SalI necessari per il clonaggio in pPVX201 (dati non mostrati). Inoltre, al fine di inserire una coda di sei istidine al C-terminale della B1133, che ne avrebbe facilitato la purificazione dal tessuto vegetale di tabacco, il plasmide pDH4AB1133T23N è stato amplificato con la coppia di oligonucleotidi B1133ClaIF e HLMW42KSalIR. In quest'ultimo oligonucleotide il codone di stop è stato spostato dalla sua posizione originaria e posto a valle di una sequenza codificante sei istidine. Gli inserti ottenuti dalle reazioni di PCR sopra specificate sono stati quindi digeriti con gli enzimi ClaI e SalI e ligati nel vettore pPVX201. L'analisi dei cloni ottenuti dopo trasformazione di cellule competenti DH5α con un'aliquota della reazione di ligazione, ha portato ad individuare diversi cloni ricombinati (Fig. 39) di cui due, denominati pPVXB1133T23N (corsia n°4) e pPVXHB1133T23N (corsia n°17), sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento al fine di verificare la correttezza delle sequenze clonate. I cloni sono stati quindi utilizzati per l'espressione *in planta*.

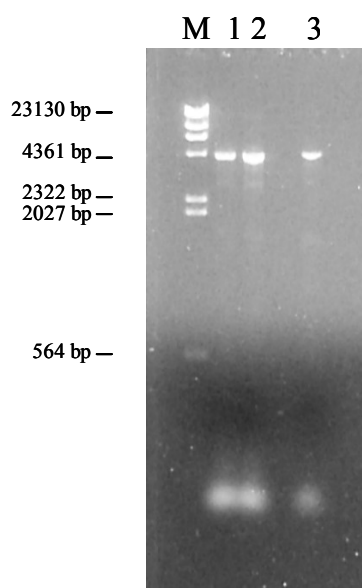


Fig. 38 Reazione di mutagenesi sito specifica T23N della LMW-GS B1133. Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1% dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione di 10 ng (corsia 1) e 20 ng (corsia 2) del plasmide pDH4A con la coppia di oligonucleotidi B1133F/B1133R al fine di introdurre la mutazione T23N. Corsia 3, amplificazione del plasmide *pWhitescript control plasmid* (Stratagene) con la coppia di oligonucleotidi specifici al fine di verificare l'efficienza di funzionamento del kit di mutagenesi. M, Marker λ DNA/Hind III Fragments, Fermentas.

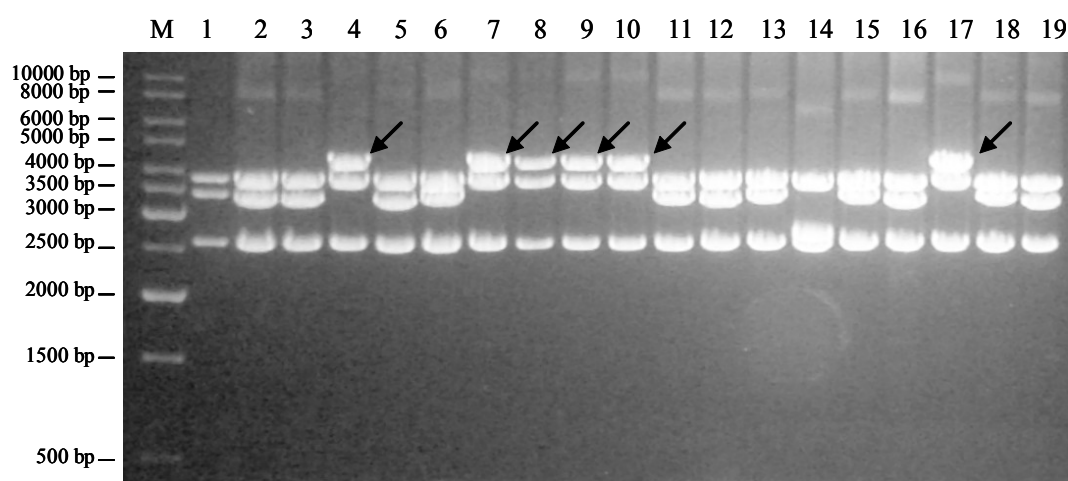


Fig. 39 Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1% dei cloni ottenuti dalla trasformazione di cellule DH5 α con un'aliquota della reazione di ligazione del vettore pPVX201 con gli inserti B1133T23N e HB1133T23N. Corsia 1, pPVX201 digerito con EcoRI utilizzato come controllo (frammenti attesi, 3806 bp, 3458 bp, 2616 bp); corsie da 2 a 19, cloni ottenuti dalla trasformazione di cellule DH5 α con un'aliquota della reazione di ligazione del vettore pPVX201 con gli inserti B1133T23N (corsie da 2 a 12) e HB1133T23N (corsie da 13 a 19). La presenza dei frammenti attesi di 4345 bp, 3806 bp, 2616 bp nei cloni in corsia 4, 7, 8, 9, 10 e dei frammenti di 4363 bp, 3806 bp, 2616 bp nella corsia 17 (i cloni sono indicati dalle frecce), dimostra che essi sono ricombinanti per gli inserti B1133T23N e HB1133T23N. M, Marker 1 kb DNA Ladder, Fermentas.

4.4.1.2 Subclonaggio della LMW-GS B1133 *wild type* nel vettore pPVX201

Al fine di subclonare la LMW-GS B1133 *wild type* nel vettore di espressione pPVX201, il plasmide pDH4A è stato amplificato con le stesse coppie di oligonucleotidi utilizzati per l'inserimento dei siti ClaI e SalI negli inserti B1133T23N e HB1133T23N, in quanto l'oligonucleotide *forward* B1133ClaIF si appaia nella zona codificante il peptide di secrezione della B1133, quindi a monte del codone mutagenizzato. La reazione di PCR condotta con la coppia di oligonucleotidi B1133ClaIF e LMW42KSalIR ha dato come prodotto l'inserto B1133 *wild type*, corrispondente all'intera regione codificante la LMW-GS B1133 comprensiva dei siti di restrizione ClaI e SalI. La reazione condotta con la coppia B1133ClaIF e HLMW42KSalIR ha dato origine al prodotto di amplificazione corrispondente all'inserto HB1133 *wild type*, codificante la LMW-B1133 comprensiva della coda di sei istidine C-terminale e dei siti di restrizione ClaI e SalI (dati non mostrati). Gli inserti B1133 *wild type* e HB1133 *wild type* sono stati ligati nel vettore pPVX201 e dall'analisi dei cloni trasformati è stato possibile individuare diversi plasmidi ricombinanti. Due di questi, denominati pPVXB1133 *wild type* e pPVXHB1133 *wild type*, sono stati scelti per l'analisi di sequenziamento e, verificata la correttezza delle sequenze nucleotidiche clonate, utilizzati per l'espressione *in planta*.

In Fig. 40 è riportata a scopo riassuntivo la struttura schematica delle sequenze clonate nel vettore pPVX201, corrispondenti agli inserti B1133 *wild type*, HB1133 *wild type*, B1133T23N, HB1133T23N. In Fig. 41, è mostrata l'analisi di restrizione effettuata con le endonucleasi ClaI e SalI sui cloni pPVXB1133T23N, pPVXHB1133T23N, pPVXB1133 *wild type* e pPVXHB1133 *wild type*, controllati tramite sequenziamento e utilizzati per l'espressione *in planta*. E' evidente lo slittamento di banda (18 bp) fra gli inserti B1133T23N e B1133 *wild type* (corsie n°1 e 3) e gli stessi forniti della coda di istidine (HB1133T23N e HB1133 *wild type* , rispettivamente nelle corsie 2 e 4).

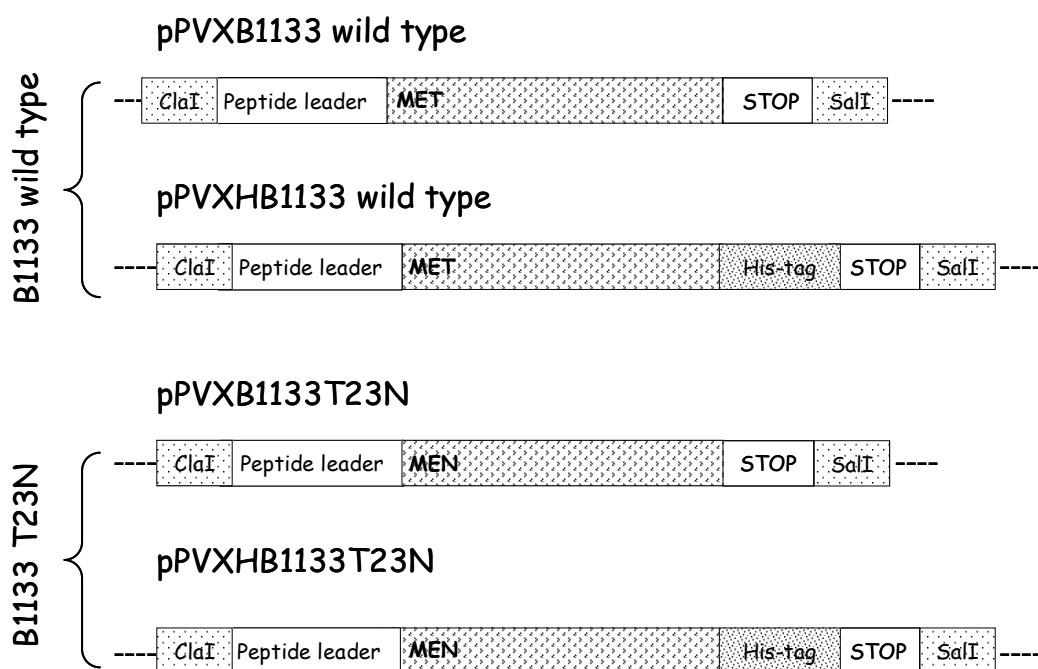


Fig. 40 Rappresentazione schematica dei cloni pPVXB1133 *wild type*, pPVXHB1133 *wild type*, pPVXB1133T23N e pPVXHB1133T23N con particolare riferimento alla sequenza codificante la LMW-GS B1133. Le spiegazioni sono fornite nel testo, il disegno non è in scala.

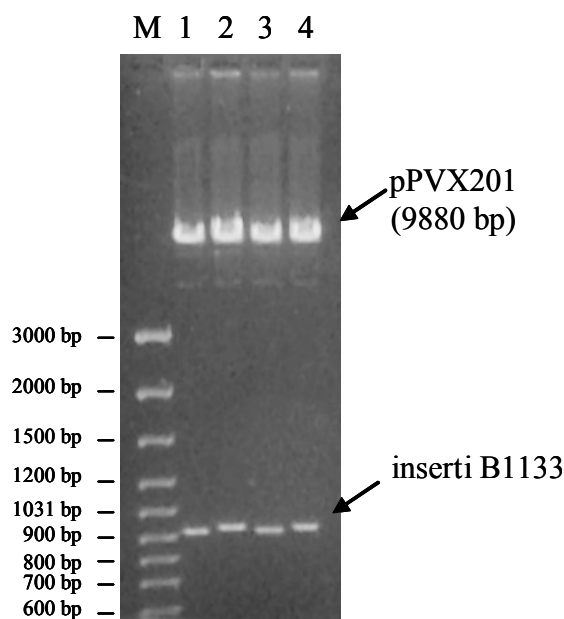


Fig. 41 Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1.2% dei cloni pPVXB1133T23N (corsia 1), pPVXHB1133T23N (corsia 2), pPVXB1133 *wild type* (corsia 3), pPVXHB1133 *wild type* (corsia 4) digeriti con ClaI e SalI. La freccia in alto indica il plasmide pPVX201 digerito con ClaI e SalI, la freccia in basso indica gli inserti B1133T23N, HB1133T23N, B1133 *wild type*, HB1133 *wild type*. E' evidente lo slittamento di banda dovuto alla presenza della coda di istidine fra gli inserti in corsie 1,3 e quelli in corsia 2 e 4. M, Marker 100 bp, Ladder Plus, Fermentas.

4.4.1.3 Infezione ed analisi dell'espressione della LMW-GS B1133 *wild type* e della LMW-GS B1133T23N in *Nicotiana benthamiana*

I costrutti pPVXB1133T23N, pPVXHB1133T23N, pPVXB1133 *wild type*, pPVXHB1133 *wild type* sono stati utilizzati per infettare piante di *N. benthamiana* (tre piante per ciascun costrutto).

Le piante sono state osservate quotidianamente per la comparsa della sintomatologia associata all'infezione con PVX che consiste nella presenza di clorosi, arricciamento e necrosi delle foglie apicali. L'andamento dell'infezione e la comparsa dei sintomi è stata diversa a seconda del costrutto impiegato e delle singole piante utilizzate per l'infezione. A motivo di ciò, non è stato eseguito un campionamento sistematico a diversi giorni dell'infezione, ma le foglie delle piante infette sono state prelevate a mano a mano che manifestavano i sintomi, a partire da 20 giorni fino a 45 giorni dall'infezione. In Figura 42 è mostrata una tipica foglia sintomatica campionata al 20° giorno dall'infezione.

In Fig 43, pannello A, è riportata l'analisi di Western blotting eseguita su estratti totali di foglie di *N. benthamiana* campionate a 20 giorni dall'infezione rispettivamente con i costrutti pPVX201 (corsia 1), pPVXB1133T23N (corsia 2) e pPVXB1133 *wild type* (corsia 3). Come controllo positivo sono stati utilizzati 5 µg di una LMW-GS purificata (LMW-GS 1B, corsia 4) molto reattiva nei confronti dell'anticorpo utilizzato (anticorpo policlonale anti-LMW-GS). Nelle corsie 2 e 3 l'anticorpo anti-LMW-GS riconosce una banda con mobilità elettroforetica intorno ai 45.000 Da ed una banda di circa 30.000 Da. Quest'ultima, essendo presente anche nel controllo negativo costituito dall'estratto di foglie infettate con pPVX201, è probabilmente una proteina dell'ospite o del virus che reagisce in modo aspecifico con l'anticorpo. Poiché il peso molecolare dedotto dalla sequenza amminoacidica della LMW-GS B1133 è pari a 34.195 Da ma il suo peso molecolare apparente è pari a 41.000 Da (Orsi *et al.*, 2001), riteniamo che le bande di dimensioni prossime a 45.000 Da in corsia 2 e 3, corrispondano alla B1133T23N e B1133 *wild type*.

L'analisi della relativa replica SDS-PAGE, tuttavia, non permette di identificare negli estratti derivanti da foglie infettate con i costrutti pPVXB1133T23N e pPVXB1133 *wild type* (Fig. 43, pannello B, corsie 2 e 3) una banda aggiuntiva, corrispondente alla proteina eterologa espressa, rispetto al controllo negativo costituito da un estratto di foglie di tabacco infettate con pPVX201 (corsia 1). Questo fatto probabilmente è in

relazione ai bassi livelli di espressione in *N. benthamiana* della LMW-GS B1133 *wild type* e mutata e/o alla presenza di bande a mobilità elettroforetica simile a quella della LMW-GS B1133 che ne rendono impossibile l'identificazione mediante SDS-PAGE.



Fig. 42 Foglie apicali sintomatiche di piante di *Nicotiana benthamiana* 20 giorni dopo l'infezione con il costrutto pPVXB1133T23N. Particolarmente evidenti sono le clorosi e la morfologia arricciata della pagina fogliare superiore.

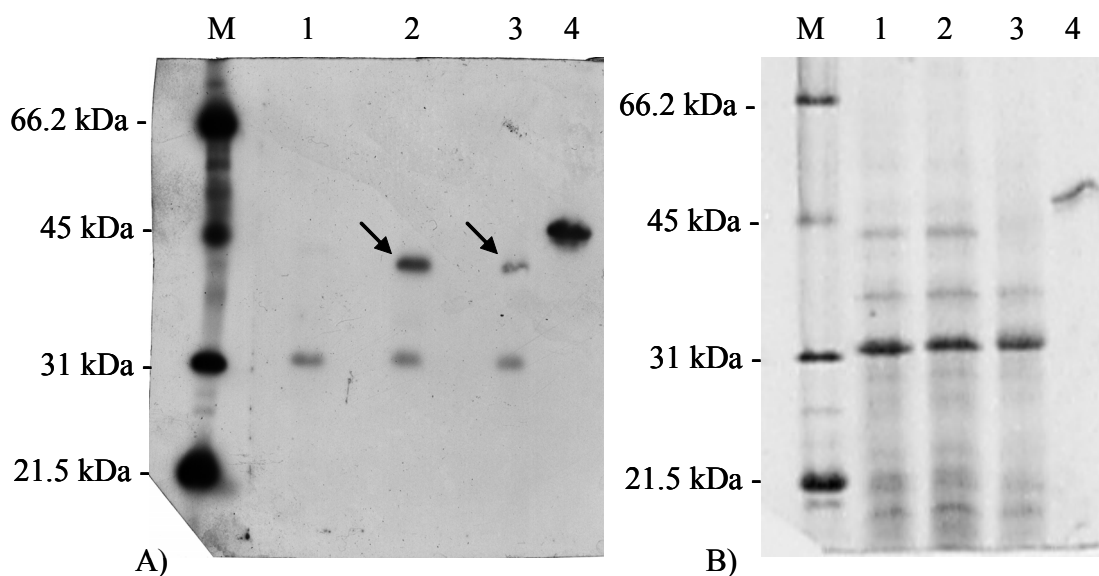


Fig. 43 Analisi dell'espressione della LMW-B1133T23N e LMW-B1133 *wild type* in foglie di tabacco campionate a venti giorni dall'infezione. A) Western blotting B) Relativa replica SDS-PAGE. In entrambi i casi: 1, 2, 3 estratto totale relativo a 80 mg di tessuto di foglie infettate rispettivamente con pPVX201 (controllo negativo), pPVXB1133T23N e pPVXB1133 *wild type*; 4, 5 µg di LMW-GS 1B utilizzata come controllo positivo. Le frecce nel pannello A indicano probabilmente la LMW-GS B1133T23N e la LMW-GS B1133 *wild type*.

4.4.1.4 Purificazione della LMW-GS B1133 *wild type* e della LMW-GS B1133T23N dal tessuto infetto di *Nicotiana benthamiana*

Poiché le LMW-GS sono solubili in soluzioni alcoliche, abbiamo messo a punto un protocollo di purificazione della B1133 *wild type* e mutata dal tessuto vegetale infetto, al fine di trasferire le proteine purificate su membrana PVDF per il sequenziamento N-terminale (paragrafo 3.6.1.4 Materiali e Metodi). In Fig. 44 è riportata la foto della membrana PVDF che è stata utilizzata per il sequenziamento N-terminale della B1133 *wild type* e mutata. Nella corsia n°1 è stato caricato un estratto di foglie infettate con pPVX201 (110 mg di tessuto fogliare campionato a 35 giorni dall'infezione), in corsia 2 e 3 l'estratto ottenuto da foglie infettate con pPVXB1133T23N (830 mg di tessuto fogliare campionato a 35 giorni dall'infezione), in corsia 4 e 5 l'estratto ottenuto da foglie infettate con pPVXB1133 *wild type* (1150 mg di tessuto fogliare campionato a 27 giorni dall'infezione) ed infine 5 µg di LMW-GS 1B purificata come ulteriore controllo relativo all'efficienza di trasferimento e peso molecolare. Poiché la LMW-GS B1133 migra in SDS-PAGE come una proteina con peso molecolare intorno ai 45.000 Da (vedi paragrafo precedente), se ne deduce che le bande indicate da una freccia in Fig. 49, corrispondono verosimilmente alla B1133T23N (corsie 2 e 3) e alla B1133 *wild type* (corsie 4 e 5). Queste bande sono state accuratamente ritagliate dalla membrana PVDF ed analizzate mediante analisi di sequenziamento N-terminale i cui risultati sembrano confermare la validità dell'ipotesi di un diverso processamento all' N-terminale della LMW-B1133T23N, caratterizzato dall'eliminazione della sequenza MEN nel polipeptide maturo. Tuttavia, i dati ottenuti non hanno permesso di determinare con certezza le sequenze amminoacidiche di entrambe le proteine, rendendo necessarie ulteriori analisi al fine di confermare i dati preliminari ottenuti. I motivi di ciò potrebbero essere diversi e fra questi vale la pena annoverare il fatto che le proteine eterologhe potrebbero essere bloccate all'N termine, nel qual caso il loro sequenziamento N-terminale si rende impossibile, o semplicemente il loro quantitativo non è sufficiente per la reazione di Edman e/o non sono sufficientemente pure a causa di proteine contaminanti che co-migrano. Inoltre, data l'estrema sensibilità della reazione di Edman, il protocollo di estrazione da noi seguito potrebbe non essere del tutto adatto.

Per escludere alcuni dei problemi sopra elencati, attualmente stiamo purificando dagli estratti di piante di tabacco infettate con i costrutti pPVXHB1133 *wild*

type e pPVXHB1133T23N, le proteine B1133 *wild type* e B1133T23N fornite della coda di istidine tramite cromatografia di affinità (*Ni-NTA Spin Kit*, Qiagen). Sebbene le proteine dotate della coda di istidine si esprimano a bassi livelli a 20, 27 e 35 giorni dall'infezione (dati non mostrati), la loro purificazione da considerevoli quantitativi di tessuto fogliare, potrebbe permettere di ottenerne il quantitativo sufficiente ad un elevato grado di purezza per l'analisi N-terminale.

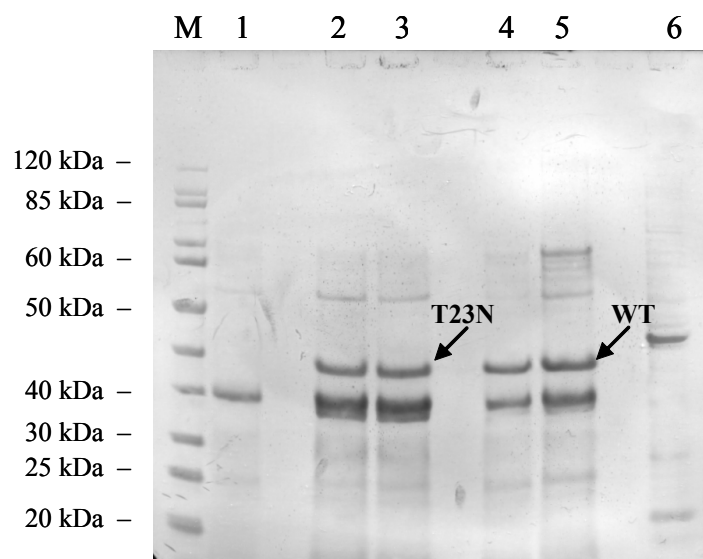


Fig. 44 Membrana PVDF colorata in 50% MeOH e Coomassie R allo 0.1% utilizzata per il sequenziamento N-terminale della B1133T23N e della B1133 *wild type*. M, Marker Protein Ladder 10-200 kDa, Fermentas; 1, estratto alcolico relativo a tessuto fogliare infettato con pPVX201 (controllo negativo); 2, 3, estratto alcolico relativo a tessuto fogliare infettato con pPVXB1133T23N; 4, 5, estratto alcolico relativo a tessuto fogliare infettato con pPVXB1133 *wild type*; 6, 5 µg LMW-GS 1B caricata come controllo. Le frecce indicano la LMW-GS B1133T23N e la LMW-GS B1133 *wild type*.

4.4.2 Clonaggio della LMW-GS 42K *wild type* e mutata nel sito 23 (LMW-GS 42KN23T) nel vettore di espressione pPVX201

4.4.2.1 Clonaggio del gene codificante la LMW-GS 42K nel vettore pCR-Blunt II-TOPO

La sequenza genica codificante la LMW-GS 42K è stata isolata da *Triticum aestivum* cv. Yecora Rojo utilizzando la coppia di oligonucleotidi VT102/VT103. L'amplificazione del DNA genomico con questa coppia di oligonucleotidi produce tre

prodotti (Fig. 45), di cui quello a minore mobilità elettroforetica (1144 bp) corrisponde al gene codificante la LMW-GS 42K mancante dei primi 32 nucleotidi codificanti parte del peptide segnale (Masci *et al.*, 1998). Questo amplificato è stato recuperato da gel di agarosio e successivamente sottoposto ad un' ulteriore reazione di PCR con le coppie di oligonucleotidi LMW42KClalF/LMW42KSalIR e LMW42KClalF/HLMW42KSalIR (dati non mostrati). Tali reazioni di PCR sono finalizzate all'inserimento dei 32 nucleotidi mancanti al 5' del gene, dei siti di restrizione ClaI e SalI, necessari al successivo clonaggio in pPVX201, ed infine di una coda di istidine al C-terminale della LMW-GS42K (prodotto dall'amplificazione con la coppia di oligonucleotidi LMW42KClalF/HLMW42KSalIR), al fine di facilitare la purificazione della proteina eterologa dal tessuto fogliare. I prodotti di PCR così ottenuti sono stati purificati da gel di agarosio, digeriti con ClaI e SalI e ligati nel vettore pBluescript SK(+/-).

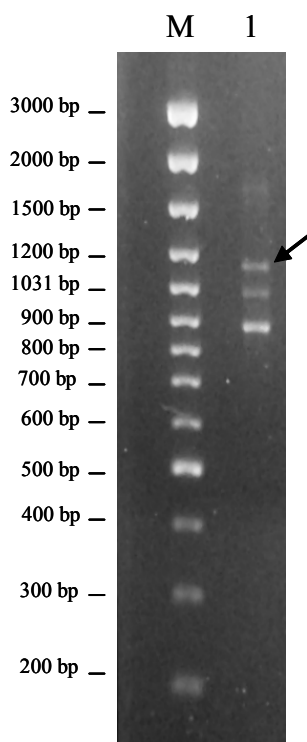


Fig. 45 Analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 1.2% dei prodotti ottenuti dall'amplificazione del DNA genomico di frumento tenero cv. Yecora Rojo con la coppia di oligonucleotidi VT102/VT103. Il prodotto di amplificazione indicato dalla freccia di dimensioni pari a 1144 bp corrisponde al gene LMW-GS 42K (Masci *et al.*, 1998).

Un'aliquota delle reazioni di ligazione è stata utilizzata per trasformare cellule competenti DH5 α , ma l'analisi dei cloni ottenuti non ha rivelato la presenza di alcun clone ricombinante. Abbiamo pensato che ciò potesse essere dovuto alla scarsa

efficienza con cui ClaI e SalI digeriscono le estremità del gene LMW-GS 42K, in quanto l'efficienza di clonaggio ottenuta mediante endonucleasi di restrizione di questi geni è di solito molto scarsa. Anche se non abbiamo ulteriormente approfondito questo aspetto, questo fatto potrebbe essere ascrivibile ad una conformazione non canonica che le sequenze geniche codificanti le LMW-GS assumono a causa della presenza del dominio ripetuto. Tale conformazione da ultimo ostacola l'accesso alle endonucleasi di restrizione e pertanto determina una scarsa efficienza di clonaggio (comunicazione personale Prof. D'Ovidio).

Alla luce dei problemi esposti, ci si è avvalsi della tecnologia *Zero Blunt TOPO PCR Cloning* (Invitrogen) per clonare la LMW-GS 42K nel vettore pCR-Blunt II-TOPO. Questo sistema, che si basa sulla catalisi operata dalla topoisomerasi del virus *Vaccinia* legata covalentemente al plasmide pCR-Blunt II-TOPO, permette il clonaggio di geni con estremità piatte, senza la necessità di ricorrere all'impiego di endonucleasi di restrizione. L'inserto LMW-42K codificante l'intera sequenza genica della LMW-GS 42K, comprensiva del peptide segnale e dei siti ClaI e SalI, è stato quindi impiegato per l'allestimento della reazione di *TOPO Cloning* secondo quanto riportato nei Materiali e Metodi (paragrafo 3.2.2.1.1).

In Fig. 46, a scopo riassuntivo, è riportato uno schema della strategia seguita per il clonaggio della LMW-GS 42K nel vettore pCR-Blunt II-TOPO. Un'aliquota del prodotto di reazione allestita con il *Zero Blunt TOPO PCR Cloning*, è stata quindi utilizzata per trasformare cellule competenti TOP10 (Invitrogen). I cloni trasformati sono stati quindi controllati per la presenza dell'inserto LMW-42K tramite digestione con EcoRI che, nel caso di un plasmide ricombinante, porta all'escissione di un frammento di dimensioni attese pari a 1203 bp. La Fig. 47 riporta l'analisi di restrizione effettuata sul DNA plasmidico di alcuni cloni analizzati. Le dimensioni degli inserti escissi, compresi fra 1031 bp e 800 bp, lasciano supporre che si possa trattare di forme delete all'interno della zona ripetuta del gene LMW-GS 42K, come già riportato da Masci *et al.* 1998. La crescita dei batteri a 30°C, anziché a 37°C, ha notevolmente ridotto questo fenomeno anche se la maggior parte dei cloni analizzati ha mostrato di contenere inserti deleti (Fig. 48, tutte le corsie ad eccezione della n° 5, 9, 13,14,17).

E' stato inoltre osservato che la presenza delle forme non delete era sempre associata ad una minore quantità di DNA plasmidico estratto. Data la necessità di ottenere un maggior quantitativo di DNA per le reazioni di sequenziamento, il clone n° 5 di Fig. 48 (denominato pTOPO-LMW42K) è stato impiegato per una midi-preparazione di DNA

plamidico. L'analisi di restrizione effettuata sul plasmide ottenuto, ha però rivelato la presenza di forme delete comprese fra 1031 bp e 800 bp oltre all'inserto delle dimensioni attese pari a 1187 bp (dati non mostrati).

La crescita in condizione di maggiore o minore ossigenazione, la riduzione delle ore di crescita da 18 h a 13 h non ha portato all'eliminazione delle forme delete che, sempre presenti, potevano variare di intensità.

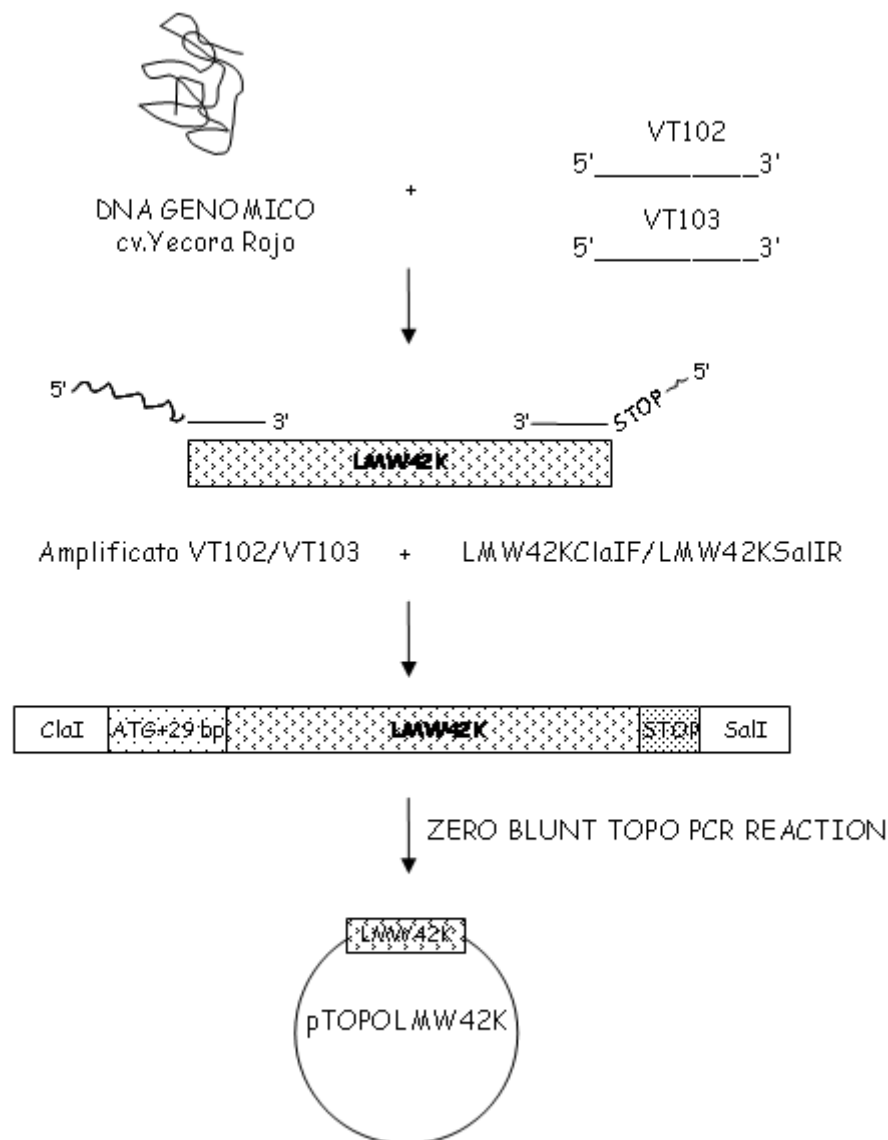


Fig. 46 Rappresentazione schematica della strategia seguita per il clonaggio della LMW-GS 42K nel vettore pCR-Blunt II-TOPO. I dettagli sono forniti nel testo.

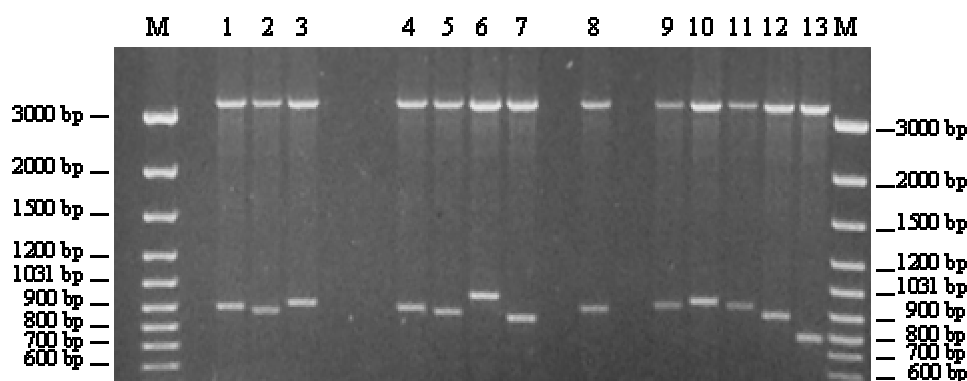


Fig. 47 Analisi elettroforetica del DNA plasmidico estratto da alcuni cloni ottenuti dalla trasformazione di cellule competenti TOP10 cresciute a 37°C con un'aliquota della reazione di clonaggio effettuata con il *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* (Invitrogen). Il DNA plasmidico è stato digerito con EcoRI, che escinde l'inserto di dimensioni attese pari a 1203 bp, ed il prodotto di digestione analizzato su gel di agarosio allo 1.2%. M, 100 bp DNA Ladder Plus; da 1 a 13, cloni analizzati digeriti con EcoRI. Gli inserti ottenuti, di dimensioni comprese fra 1031 bp e 800 bp, corrispondono verosimilmente a prodotti deleti del gene LMW42K.

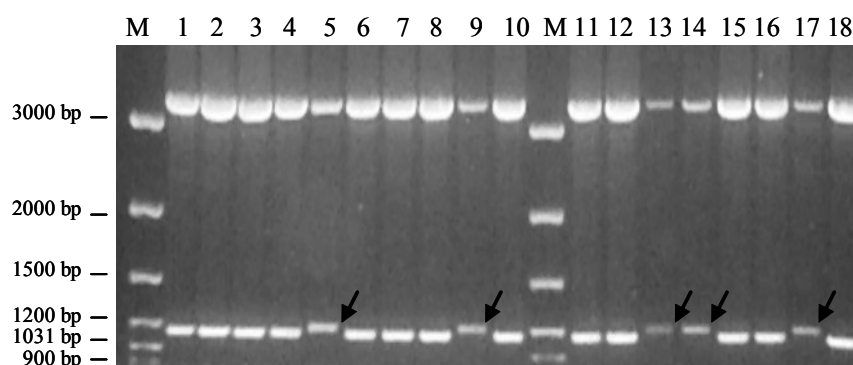


Fig. 48 Analisi elettroforetica dei cloni ottenuti dalla trasformazione di cellule competenti TOP10 cresciute a 30°C con un'aliquota della reazione di clonaggio effettuata con il *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* (Invitrogen). Il DNA plasmidico è stato digerito con EcoRI, che escinde l'inserto LMW42K di dimensioni attese pari a 1203bp, e la digestione analizzata su gel di agarosio allo 1.2%. M, 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas; da 1 a 18, cloni analizzati digeriti con EcoRI. Gli inserti indicati dalle frecce corrispondono al gene LMW42K verosimilmente integro (corsie 5, 9, 13, 14, 17).

Per ovviare all'instabilità del clone pTOPOLMW42K nel ceppo TOP10, l'inserto LMW42K è stato subclonato nel vettore pBluescript SK (+/-) per la successiva trasformazione di cellule competenti del ceppo Sure 2. Il ceppo Sure 2, infatti, manca di alcuni componenti delle vie metaboliche che catalizzano riarrangiamenti e delezioni di strutture secondarie e terziarie non canoniche. L'impossibilità di utilizzare il vettore

pTOPOLMW42K per trasformare cellule competenti Sure 2, nasce dal fatto che esso ha gli stessi marcatori di resistenza del ceppo (Kanamicina e Zeocina). La presenza del gene di resistenza per l'ampicillina nel vettore pBluescript SK (+/-) permette invece di poter operare una selezione fra le colonie trasformate e non trasformate per antibiotico-resistenza. Per subclonare l'inserto LMW-42K in pBluescript SK (+/-), il plasmide pTOPOLMW42K è stato digerito con le endonucleasi ClaI e SalI, il prodotto di digestione corso su gel di agarosio ed infine l'inserto di dimensioni pari a 1187 bp, corrispondente all'intera sequenza genica codificante la LMW-GS 42K, recuperato dal gel. Tale inserto è stato ligato in pBluescript SK (+/-) ed un'aliquota della reazione di trasformazione utilizzata per trasformare cellule competenti Sure 2. L'analisi dei cloni ottenuti tramite digestione del DNA plasmidico con ClaI e SalI ha mostrato come la maggior parte dei plasmidi contenga un inserto deleto con dimensioni pari a 900 bp, anche se è stato possibile identificare un clone con l'inserto delle dimensioni attese pari a 1187 bp (dati non mostrati). Tale clone, denominato pBSLMW42K *wild type*, si è mostrato stabile nel ceppo Sure 2 ed infine è stato sequenziato per verificare la correttezza delle sequenze inserite. In Fig. 49 è riportato un allineamento eseguito fra la sequenza LMW-GS 42K clonata in pBluescript SK (+/-) e quella pubblicata relativa al gene LMW-GS 42K (numero di accensione, Y17845). E' evidente, oltre alla presenza di diverse sostituzioni amminoacidiche rispetto alla sequenza riportata in banca dati, la presenza di una delezione di 27 bp *in frame*, codificante la sequenza QQQPILPQQ.

Poiché abbiamo ritenuto che la presenza di questa delezione fosse trascurabile al fine dell'analisi del processamento N-terminale della proteina, abbiamo subclonato in pPVX201 l'inserto LMW-42K, derivato dalla digestione con ClaI e SalI del clone pBSLMW42K *wild type*. Il costrutto ottenuto, denominato pPVXLMW42K *wild type*, si è mostrato stabile nel ceppo Sure 2 ed è stato sottoposto ad analisi di sequenziamento per rivelare la correttezza delle sequenze nucleotidiche clonate. Infine, è stato impiegato per l'infezione di piante di *Nicotiana bethamiana*.

Uno di questi cloni è stato sottoposto ad analisi di sequenziamento che ha mostrato il corretto inserimento della mutazione N23T oltre alla presenza della delezione QQQPILPQQ, già riscontrata nel costrutto pBSLMW42K *wild type*. Il clone, denominato pBSLMW42KN23T, è stato quindi digerito con le endonucleasi ClaI e SalI e l'inserto ottenuto clonato nel vettore pPVX201 tramite ligazione. Il DNA plasmidico estratto dalle cellule competenti Sure 2, trasformate con un'aliquota del prodotto di ligazione, è stato analizzato mediante PCR con la coppia di oligonucleotidi specifici VT102/VT103. Tale analisi ha portato ad individuare diversi cloni ricombinanti (dati non mostrati) di cui uno, denominato pPVXLMW42KN23T, è stato analizzato tramite analisi di restrizione, di sequenziamento ed infine utilizzato per l'espressione *in planta*.

4.4.2.3 Inserimento di una coda di istidine al C-terminale della LMW-GS 42K *wild type* e della LMW-GS 42KN23T

Al fine di facilitare la purificazione della LMW42K *wild type* e mutata (N23T) dal tessuto fogliare di tabacco, si è ritenuto opportuno inserire una coda di sei istidine al C-terminale delle relative sequenze codificanti. I cloni pPVXLMW42K *wild type* e pPVXLMW42KN23T sono stati amplificati con le coppie di oligonucleotidi LMW42KClaIF e HLMW42KSalIR ed i corrispondenti amplificati ottenuti digeriti con ClaI e SalI e quindi ligati in pPVX201. L'analisi di restrizione effettuata con gli enzimi ClaI e SalI sui cloni ottenuti dopo trasformazione di cellule competenti Sure 2 con un'aliquota del prodotto di ligazione, ha portato all'individuazione di diversi cloni ricombinanti contenenti l'inserto delle dimensioni attese (dati non mostrati). Due di questi cloni, denominati pPVXHLMW42K *wild type* e pPVXHLMW42KN23T, sono stati controllati tramite sequenziamento ed infine utilizzati per l'espressione *in planta*.

In Fig. 50, a scopo riassuntivo, è riportata la struttura schematica dei costrutti della LMW-GS 42K impiegati per l'infezioni di piante di *N. benthamiana*.

4.4.2.4 Analisi dell'espressione della LMW-GS 42K nel tessuto fogliare di tabacco

Analisi preliminari di Western blotting e SDS-PAGE eseguite sugli estratti proteici totali di foglie di piante infettate con i costrutti pPVXLMW42K *wild type*, pPVXHLMW42K *wild type*, pPVXLMW42KN23T e pPVXHLMW42KN23T mostrano

che le proteina eterologhe sono espresse, sebbene a scarsi livelli.

Per determinare la sequenza N-terminale dei polipeptidi, le proteine prive della coda di istidine saranno purificate dal tessuto fogliare seguendo lo stesso protocollo messo a punto per la purificazione della LMW-GS B1133 (paragrafo 3.6.1.4 Materiali e Metodi). Le proteine fornite della coda di istidine saranno invece purificate per cromatografia di affinità utilizzando il *Ni-NTA Spin Kit* (Qiagen) secondo quanto già esposto per la LMW-GS B1133.



Fig. 50 Rappresentazione schematica dei cloni pPVXLMW42K *wild type*, pPVXHLMW42K *wild type*, pPVXLMW42KN23T e pPVXHLMW42KN23T con particolare riferimento alla sequenza codificante la LMW-42K. Le spiegazioni sono fornite nel testo, il disegno non è in scala.

5 CONCLUSIONI

Le proprietà uniche degli impasti ottenuti dalle farine di frumento sono ascrivibili in massima parte ad una classe di proteine di riserva che costituisce l'80% delle proteine totali della cariosside di frumento e che, per l'elevato contenuto in prolina e glutammina, sono state denominate prolammine. Sebbene le prolammine da un punto di vista fisiologico costituiscano una fonte di azoto, zolfo e carbonio per l'embrione in fase di germinazione (Shewry *et al.*, 1995), per un caso del tutto accidentale ed a noi fortunato, esse conferiscono uniche proprietà reologiche agli impasti, quali l'estensibilità, l'elasticità e la forza, che permettono il processamento degli impasti di frumento in una vasta gamma di prodotti come la pasta, il pane, il cous-cous, i biscotti e molti altri.

Le basi molecolari del comportamento e delle proprietà degli impasti di frumento risiedono nella struttura dei maggiori componenti del glutine, costituiti da due classi proteiche denominate gliadine e glutenine sulla base della loro natura monomerica (gliadine) e polimerica (glutenine). Le gliadine conferiscono agli impasti le tipiche caratteristiche di estensibilità e prendono parte alla formazione del glutine interagendo con le altre subunità mediante legami di natura secondaria, come legami ad idrogeno e di natura idrofobica. Le gliadine sono state classificate in tre sottogruppi distinti, α/β , γ ed ω -gliadine, in base alla loro mobilità in elettroforesi acida (A-PAGE), che riflette una diversa struttura ed organizzazione, e, attualmente, sono considerate il fattore eziologico principale della malattia celiaca, la più comune intolleranza umana al glutine (Ellis *et al.*, 2003; Dewar *et al.*, 2004; Londei *et al.*, 2005). Inoltre, dei tre gruppi costituenti le gliadine, i polipeptidi appartenenti alla sottoclasse α/β , sembrano essere quelli maggiormente coinvolti nella risposta immunitaria glutine-mediata della mucosa intestinale degli individui celiaci (Picarelli *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2002; Mowat, 2003).

Sebbene le gliadine siano proteine monomeriche, sequenze corrispondenti ad α/β , γ -gliadine sono state individuate in aggregati polimerici a basso peso molecolare del glutine della cv. di frumento tenero Chinese Spring (Tao and Kasarda, 1989; Masci *et al.*, 1995; Muccilli *et al.*, 2005). Inoltre, è stato dimostrato che polipeptidi corrispondenti ad ω -gliadine possono prendere parte alla formazione dei polimeri gluteninici a seguito di eventi di mutazione che determinano l'acquisizione di residui cisteinici, normalmente assenti in questo tipo di subunità (Masci *et al.*, 1993, 1999). Poiché le subunità

gliadiniche di tipo ω presenti nei polimeri gluteninici ad oggi identificate, sembrano possedere un unico residuo cisteinico lungo la sequenza, è atteso che da un punto di vista funzionale esse si comportino da terminatori dei polimeri gluteninici, causando la formazione di polimeri di dimensioni ridotte ed esercitando in tal modo effetti negativi sulle caratteristiche di elasticità e forza degli impasti.

Per quanto riguarda invece le α/β , γ -gliadine, precedentemente al presente lavoro di tesi, non erano note correlazioni specifiche fra determinate caratteristiche strutturali dei polipeptidi e la loro appartenenza alla frazione polimerica del glutine.

Relativamente alla frazione aggregata del glutine, essa è costituita in larga parte da proteine polimeriche denominate glutenine, che formano aggregati molecolari di dimensioni pari a milioni di Da (Wrigley, 1996), mediante legami disolfuro fra specifiche cisteine localizzate lungo la sequenza polipeptidica. Le glutenine sono responsabili delle caratteristiche di elasticità e forza degli impasti e sono state ulteriormente classificate in subunità gluteniniche ad alto (HMW-GS) ed a basso peso molecolare (LMW-GS) a seconda della loro mobilità elettroforetica in SDS-PAGE.

Mentre le HMW-GS sono state oggetto di approfondite indagini e studi, la caratterizzazione strutturale e funzionale delle LMW-GS è ancora ad uno stadio incompleto, a causa fondamentalmente dell'ampio numero di subunità espresse *in vivo* (circa una trentina in frumento tenero, Cassidy *et al.*, 1998) e della loro marcata somiglianza nelle caratteristiche fisico-chimiche, che ne rende difficoltosa la purificazione per le successive analisi.

Le LMW-GS sono state classificate in tre distinti gruppi sulla base della loro mobilità in elettroforesi bidimensionale, B, C, D. Le subunità dei gruppi C e D sono costituite rispettivamente da α/β , γ ed ω -gliadine modificate nel numero e nella disposizione dei residui cisteinici presenti, le subunità di tipo B sono quelle a tipica struttura, classificate a loro volta nei gruppi m, s ed i, a seconda della natura del primo amminoacido costituente la catena polipeptidica matura. Mentre sequenze ammino-terminali corrispondenti a LMW-s e LMW-m sono state ampiamente riscontrate sia in frumento duro sia in quello tenero (Tao *and* Kasarda, 1989; Lew *et al.*, 1992; Masci *et al.*, 1995), sequenze di tipo i non erano state identificate precedentemente al presente lavoro di tesi, mancando quindi una chiara indicazione della loro reale espressione *in vivo*.

Inoltre, un altro aspetto da chiarire riguardante le LMW-m e LMW-s è relativo al loro processamento N-terminale, in quanto il confronto delle loro sequenze ammino-terminali rivela che esse differiscono principalmente per l'assenza dei primi tre amminoacidi MET

nella catena polipeptidica matura delle LMW-s. L'isolamento e la caratterizzazione strutturale del gene e del corrispondente prodotto polipeptidico, denominato LMW-42K, ad opera di Masci *et al.* (1998), ha rivelato che la sequenza amminoacidica dedotta comprende i primi tre amminoacidi MET che, tuttavia, sono assenti nella sequenza N-terminale determinata sperimentalmente. Su tali basi, gli autori hanno ipotizzato che l'assenza degli amminoacidi MET nel polipeptide maturo, potrebbe essere causata da un taglio proteolitico effettuato da un'asparaginil endoproteasi in posizione N23 della sequenza polipeptidica. Di converso, la presenza di una treonina in posizione 23 nelle LMW-m, determinerebbe il loro processamento canonico, caratterizzato semplicemente dal taglio del peptide segnale.

Sulla base delle seguenti premesse, il lavoro di ricerca eseguito nel corso del Dottorato in Biotecnologie, è stato mirato alla comprensione di alcuni aspetti strutturali, funzionali e tossicologici, riguardanti le proteine di riserva di frumento, con particolare riferimento ad una LMW-i (LMW1A1), ad una γ -gliadina fornita di un addizionale residuo cisteinico (clone pTD9, verosimilmente corrispondente ad una LMW-GS di tipo C), ad una LMW-m (B1133), ad una LMW-s (LMW42K) ed infine ad una gliadina di tipo α .

Per quanto concerne gli aspetti tossicologici, è stata espressa in *E. coli* una subunità gliadinica di tipo α , isolata da *Triticum aestivum* sottospecie *spelta* da Kasarda and D'Ovidio (1999). L'espressione in *E. coli* di tale subunità è stata finalizzata ad un suo successivo impiego in test tossicologici *in vitro*, che verranno eseguiti in collaborazione con il gruppo del Prof. Picarelli del Policlinico Umberto I di Roma, al fine di una migliore comprensione delle caratteristiche della risposta immune glutine-mediata, montata dagli individui celiaci verso il glutine.

Per quanto concerne invece la LMW-1A1 e la γ -gliadina modificata nel numero di cisteine, è stata dimostrata la loro espressione *in vivo* e la loro appartenenza alla frazione aggregata del glutine, avvalendosi dell'uso di tecniche quali espressione eterologa, elettroforesi bidimensionale, sequenziamento N-terminale, RP-HPLC e spettrometria di massa. La dimostrazione dell'espressione *in vivo* della LMW1A1 costituisce un dato molto interessante in quanto al momento dello svolgimento dei lavori, vi erano solo delle indicazioni indirette a favore della presenza delle LMW-i nell'endosperma di frumento (Cloutier *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2004). Per quanto riguarda invece la γ -gliadina modificata, la localizzazione nella frazione polimerica del glutine è stata correlata ad una specifica caratteristica strutturale del polipeptide, costituita dalla presenza di un

addizionale residuo cisteinico in posizione 26 del polipeptide maturo.

La funzionalità della LMW-1A1 e della γ -gliadina modificata è stata studiata mediante test funzionali di incorporazione. Questi test sono stati condotti mediante un micro-mixografo prototipo presso il laboratorio di “*Dough Rheology*” della divisione di *Plant Industry* dello CSIRO di Canberra (Australia) e consistono in test funzionali *in vitro* in cui la singola subunità polipeptidica oggetto di studio viene ad essere incorporata in un impasto base mediante un processo di riduzione-ossidazione parziale ed i suoi effetti monitorati mediante confronto con un impasto base, semplicemente ridotto ed ossidato. I test di incorporazione condotti utilizzando la farina di frumento tenero hanno dimostrato che la γ -gliadina esercita un effetto di indebolimento sulle caratteristiche di forza dell’impasto, in quanto la sua incorporazione causa una riduzione significativa del *mixing time* (MT) e del parametro *peak resistance* (PR). La LMW1A1 non ha effetti sostanziali sulle caratteristiche di *mixing* dell’impasto in cui è incorporata, non apportando modifiche sostanziali nel MT, nel PR e nella *resistance to breakdown* (RBD). Tali effetti sono stati correlati con un ruolo di terminatore di catena per la γ -gliadina che, andando a ridurre le dimensioni medie dei polimeri gluteninici, causa un sostanziale indebolimento dell’impasto. La LMW1A1 agisce invece probabilmente da elemento di allungamento dei polimeri gluteninici, tuttavia non apportando miglioramenti alle caratteristiche di *mixing* dell’impasto, verosimilmente in relazione alla natura estremamente forte della farina della cv. utilizzata (cv. Kukri) che, pertanto, è di difficile miglioramento. Normalmente, infatti, un effetto di rafforzamento è ben evidente incorporando la proteina oggetto di studio in una farina dalle scarse caratteristiche tecnologiche, mentre un effetto di indebolimento è di facile identificazione in esperimenti di incorporazione condotti utilizzando farine di ottima o buona qualità. Sebbene la scelta della cv. Kukri, classificata nella lista delle migliori farine Australiane (*Australian Prime Hard*), ha permesso di definire chiari ruoli funzionali per la γ -gliadina, riteniamo che siano necessari esperimenti di incorporazione utilizzando una farina di scarse qualità tecnologiche al fine di confermare il possibile ruolo positivo, tipico di un elemento di allungamento dei polimeri gluteninici, attribuito alla LMW1A1 sulla base dei test eseguiti.

Gli esperimenti di incorporazione sono stati anche condotti incorporando la γ -gliadina modificata e la LMW1A1 negli impasti ottenuti dalla semola dei biotipi 42 e 45 della cv. Italiana di frumento duro Lira, tuttavia i risultati ottenuti ci inducono a ritenere che le condizioni di incorporazione utilizzate non siano state del tutto adeguate. Infatti,

come ampiamente discusso nel paragrafo 4.3.5 dei Risultati e Discussione, mentre gli esperimenti di incorporazione sono stati messi a punto in frumento tenero da Bèkès *et al.* (1994) ed attualmente sono ampiamente documentati, riproducibili ed affidabili, i test da noi effettuati utilizzando la semola di frumento duro rappresentano la prima prova ad oggi documentata. In particolare, la semola di frumento duro e la farina di frumento tenero potrebbero presentare alcune sostanziali differenze, come una diversa organizzazione dei polimeri gluteninici, una differente granulometria ed un diverso grado di rottura dei granuli d'amido, tutti fattori che potrebbero determinare che l'incorporazione di proteine in sistemi parzialmente ridotti e ossidati, richieda condizioni in parte diverse da quelle tipicamente utilizzate per gli sfarinati a base di frumento tenero. Sulla base di quanto esposto, riteniamo che ulteriori esperimenti debbano essere condotti al fine di rendere i test di incorporazione in frumento duro riproducibili ed affidabili, alla stregua di quelli effettuati in frumento tenero.

Un ultimo aspetto del lavoro svolto è stato quello di chiarire il processamento N-terminale a cui le subunità gluteniniche a basso peso molecolare di tipo s ed m vengono verosimilmente sottoposte. Infatti come discusso precedentemente (vedi anche il paragrafo 1.1.4.2.2 dell'Introduzione), è stato proposto che la presenza di un'asparagina in posizione 23 nelle LMW-s, determinerebbe il taglio da parte di un'asparaginil-endoproteasi della sequenza MEN che porterebbe quindi alla produzione di sequenze di tipo s (Masci *et al.*, 1998; DuPont *et al.*, 2004). La presenza di una treonina in posizione 23, invece di un'asparagina, nelle sequenze di tipo m, porterebbe di converso, al loro processamento canonico, caratterizzato esclusivamente dal taglio del peptide segnale.

Al fine di dimostrare questa ipotesi ed alla luce della conservazione dei processi di modificazione post-traduzionali nel regno vegetale, è stata effettuata la mutagenesi-sito specifica sul sito T23 di una LMW-m (LMW-GS B1133) e sul sito N23 di una LMW-s (LMW-GS 42K). Le sequenze mutagenizzate (B1133T23N e LMW42KN23T) e le sequenze *wild type* (LMW-B1133 e LMW-42K) sono state quindi clonate nel vettore di espressione transiente pPVX201 ed i cloni ottenuti utilizzati per infettare piante di *Nicotiana benthamiana*. Dati preliminari ottenuti dall'analisi di sequenziamento della LMW-B1133 *wild type* e mutata (LMW-B1133T23N) indicano che l'ipotesi di un diverso processamento all'N-terminale della LMW-B1133T23N, caratterizzato dal taglio del peptide MEN, è verosimilmente corretta; tuttavia, i dati di sequenza ottenuti sono in parte incompleti e non ci permettono di confermare con certezza la validità di questa

ipotesi. L'incompletezza dei dati di sequenziamento ottenuti potrebbe essere in relazione alla scarsità dei polipeptidi sequenziati, al loro possibile blocco all'N-terminale e/o alla presenza di proteine contaminanti che copurificano con la proteina di interesse. Inoltre, data l'estrema sensibilità della reazione di Edman, il protocollo di estrazione da noi seguito per la purificazione selettiva delle LMW-GS eterologhe da tessuto di tabacco, potrebbe non essere del tutto adeguato.

Per escludere alcuni dei problemi sopra elencati, è stata inserita una coda di sei istidine al C-terminale delle sequenze mutagenizzate e *wild type* corrispondenti alla LMW-B1133 e alla LMW-42K, al fine di facilitarne la purificazione ad un elevato grado di purezza ed omogeneità a partire da cospicui quantitativi di tessuto fogliare. Questo lavoro è ancora *in fieri* ed attualmente si sta operando la purificazione dei polipeptidi forniti della coda di istidine tramite cromatografia di affinità e, appena possibile, sarà determinata la loro sequenza N-terminale.

In conclusione, il presente lavoro di tesi rappresenta un contributo alla conoscenza della complessa famiglia genica delle subunità gluteniniche a basso peso molecolare, sia dal punto di vista della loro struttura che della loro funzionalità.

6 BIBLIOGRAFIA

Accomando, S., Cataldo, F., 2004. The global village of celiac disease. Digestive and Liver Disease, 36, 492-498.

Ahlquist, P., Pacha, R.F., 1990. Gene amplification and expression by RNA viruses and potential for further application to plant gene transfer. Plant Physiology, 79, 163-167.

Anderson, O.D., Litts, J.C., Gautier, M. F., Greene, F.C., 1984. Nucleic acid sequence and chromosome assignment of a wheat storage protein gene. Nucl. Acids Res., 12, 8129-8144.

Anderson, R.P., Degano, P., Godkin, A.J., Jewell, D.P., Hill, A.V.S., 2000. *In vivo* antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant α -gliadin T-cell epitope. Nature medicine, 6, 3, 337-342.

Autran, J.C., Laignelet B., Morel, M.H., 1987. Characterization and quantification of low molecular weight glutenins in durum wheats. Biochimie, 69, 699-711.

Ball, S.G., Van de Wal, M.H.B.J., Visser, R.G.F., 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. Trends in Plant Science, 3, 462-467.

Baneyx, F., 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 10, 411-421.

Bartels, D., Altosaar, I., Harberd, N.P., Barker, R.F., Thompson, R.D., 1986. Molecular analysis of γ -gliadin gene families at the complex *Gli-1* locus of bread wheat (*T. aestivum* L.). Theor. Appl. Genet., 72, 845-853.

Beasley, H.L., Uthayakumaran, S., Stoddard, F.L., Partridge, S.J., Daqiq, L., Chong, P., Bèkès, F., 2002. Synergistic and additive effects of three high molecular weight glutenin subunit loci. II. Effects on wheat dough functionality and end-use quality. Cereal Chemistry, 79(2), 301-307.

Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Andersen, M.T., Forster, R.L.S., 1991. Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. Virology, 183, 695-702.

Bèkès, F., Gras, P.W., Gupta, R.B., 1994. Mixing properties as a measure of reversible reduction/oxidation of doughs. Cereal Chemistry, 71, 44-50.

Bèkès, F., Gras, P.W., Gupta, R.B., 1995. The effects of purified cereal polypeptides on the mixing properties of dough. Proc. 45th Australian Cereal Chemistry.

Pages 92-98 Conf. Y.A. Williams and C. W. Wrigley, eds. RACI: North Melbourne, Australia.

Bèkès, F., Tamas, L., Gras, P.W., Shewry, P.R., Anderson, O., Appels, R., 1998. Functional domains within glutenin subunits of wheat. Proceedings of the 9th International Wheat Genetic Symposium, 4, 136-139. Ed. A.E. Slinkard. University Extension Press: Saskatchewan.

Belton, P.S., 1999. On the elasticity of wheat gluten. Journal of Cereal Science, 29, 103-107.

Betton, J.M., 2004. High throughput cloning and expression strategies for protein production. Biochimie, 86, 601-605.

Bhattacharya, M., Erazo-Castrejon, S.V., Doehlert, D.C., McMullen, M.S., 2002. Staling of bread as affected by waxy wheats flour blends. Cereal Chemistry, 79, 178-182.

Bloksma, A.H., Bushuk, W., 1998. Rheology and chemistry of dough. Pomeranz Y. (ed). Wheat: chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, 131-218.

Boggini, G., Pogna, N.E., 1989. The bread-making quality and storage protein composition of Italian durum wheat. J. Cereal Sci., 9, 131-138.

Burnouf, T., Bietz, J.A., 1984. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of reduced glutenin, a disulfide-bonded protein of wheat endosperm. J. Chromat., 299, 185-199.

Cassidy, B.G., Dvorak, J., Anderson, O.D., 1998. The wheat low-molecular weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. Theor. Appl. Genet., 96, 743-750.

Chapman, S., Kavanagh, T., Baulcombe, D.C., 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. The Plant Journal, 2 (4), 549-557.

Chung, O.K., 1985. Lipid-protein interaction in wheat flour, dough, gluten and protein fractions. Cereal Foods World, 31, 242-256.

Cloutier, S., Rampitsch, C., Penner, G.A., Lukow, O.M., 2001. Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene. Journal of Cereal Science, 33, 143-154.

D'Ovidio, R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., 1992. Isolation of an α -type gliadin gene from *Triticum durum* Desf. and genetic polymorphism at the *Gli-2* loci. J. Genet. Breed., 46, 41-48.

D'Ovidio, R., Simeone, M., Masci, S., Porceddu, E., Kasarda, D.D., 1995. Nucleotide sequence of a γ -type glutenin gene from a durum wheat: Correlation with a γ -type glutenin subunit from the same biotype. *Cereal Chemistry*, 72(5), 443-449.

D'Ovidio, R., Simeone, M., Porceddu, E., 1997. Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for the *Glu-B3* complex locus in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 1119-1126.

D'Ovidio, R., Marchitelli, C., Ercoli Cardelli, L., Porceddu, E., 1999. Sequence similarity between allelic *Glu-B3* genes related to quality properties of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 455-461.

D'Ovidio, R., Masci, S., 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J. Cereal Sci.*, 39, 321-339.

Dewar, D., Pereira, P. S., Ciclitira, P. J., 2004. The pathogenesis of coeliac disease. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 17-24.

Dexter, J.E., Preston, K.R., Martin, D.G., Gander, E.J., 1994. The effects of protein content and starch damage on the physical dough properties and bread-making quality of Canadian durum wheat. *Journal of Cereal Science*, 20, 139-151.

Dick, J.W., Matsuo, R.R., 1988. Durum wheat and pasta products. In: Pomeranz, Y., (ed.): *Wheat: Chemistry and Technology*, vol. II. Am. Ass. Cereal Chem., St. Paul, pp. 507-547.

Dolja, V.V., Grama, D.P., Morozov, S.Y., Atabekov, J.G., 1987. Potato virus X-related single and double-stranded RNAs: Characterization and identification of terminal structures. *FEBS Letters*, 214, 308-312.

Dowd, C., Bèkès, F., 2002. Large scale expression and purification of high molecular weight glutenin subunits. *Protein expression and purification*, 25, 97-104.

Du Cros, D.L., Joppa, L.R., Wrigley, C.W., 1983. Two-dimensional analysis of gliadin proteins associated with quality durum wheat: chromosomal location of genes for their synthesis. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 297-302.

DuPont, F.M., Vensel, W., Encarnacao, T., Chan, R., Kasarda, D.D., 2004. Similarities of omega gliadins from *Triticum urartu* to those encoded on chromosome 1A of hexaploid wheat and evidence for their post-translational processing. *Theor Appl Genet*, 108, 1299-1308.

Dvorak, J., Di Terlizzi, P., Zhang, H.B., Resta, P., 1993. The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, 36, 21-31.

Ellis, H.J., Pollock, E.L., Engel, W., Fraser, J.S., Rosen-Bronson, S., Wieser, H., Ciclitira, P.J., 2003. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in celiac disease. *Gut*, 52, 212-217.

Evers, T. , Millart, S., 2002. Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, 36, 261-284.

Ewart, J. A. D., 1979. Glutenin structure *J. Sci. Food Agric.* 30, 482-492.

Field, J.M., Shewry, P.R., Mifflin, B.J., 1983. Solubilisation and characterisation of wheat gluten proteins, correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 370-377.

Gras, P.W., Anderssen, R.S., Keentok, M., Bèkès, F., Appels, R., 2001. Gluten protein functionality in wheat flour processing: a review. *Aust. J. Agric. Res.*, 52, 1311-1323.

Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W. J., Marseille, J. P., Moonen, J. H. E., Scheepstra, A., 1985. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 3, 1-16.

Gupta, R.B., Shepherd, K.W., 1988. Low molecular weight subunits in wheat: their variation, inheritance and association with physical dough properties. Miller TE, Koebner RMD (eds), *Proc 7th Int Wheat Genet Symp*, Cambridge, UK, 943-949.

Gupta, R.B., Singh, N.K., Shepherd, K.W., 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 57-64.

Gupta, R.B., MacRitchie, F., Shepherd, K.W., Ellison, F.W., 1991. Relative contribution of LMW and HMW subunits of glutenin to dough strength and dough stickiness of bread wheat. Bushuk. W., Tkachuk, R., (eds), *Gluten Proteins 1990*. America Association of Cereal Chemistry, 71-80.

Gupta, R.B., MacRitchie, F., 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1* of common wheats. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. *J. Cereal Sci.*, 19, 19-29.

Gupta, R.B., Popineau, Y., Lefebvre, J., Cornec, M., Lawrence, G.J., MacRitchie, F., 1995. Biochemical basis of flour proteins in bread wheats. II. Changes in polymeric protein formation and dough/gluten properties associated with the loss of low Mr or high Mr glutenin subunits. *Journal of Cereal Science*, 21, 103-116.

Gupta, R.M., Masci, S., Lafiandra, D., Bariana, H.S., MacRitchie, F., 1996. Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of

hexaploid wheats. J. Exp. Bot., 47, 1377-1385.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal Molecular Biology, 166, 557-580.

Hoseney, R.C., 1985. The mixing phenomenon. Cereal food world, 30 (7), 453-457.

Hsia, C.C.; Anderson, O.D., 2001. Isolation and characterization of wheat ω -gliadin genes. Theor. Appl. Genet., 103(1), 37-44.

Huebner, F.R., Wall, J.S., 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. Cereal Chem., 53, 258-269.

Hull R., 1990. The use and misuse of viruses in cloning and expression in plants. In: Recognition and Response in Plant Virus Interactions, NATO Advanced Science Institutes Series, H21 (Fraser, R.S.S., ed.) Berlin: Springer-Verlag, 443-457.

Ikeda, T. M., Nagamine, T., Yano, H. 2004. Characterization of LMW-GS and the corresponding proteins in common wheats. In "The Gluten Proteins", edited by Lafiandra D., Masci S., D'Ovidio R., Eds., Royal Society of Chemistry, 101-104.

Jackson, E.A., Holt, L.M., Payne, P.I., 1983. Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. Theor. Appl. Genet., 66, 29-37.

Josephides, C.M., Joppa, L.R., Youngs, V.L., 1987. Effect of chromosome 1B on gluten strength and other characteristics of durum wheat. Crop Sci., 27, 212-216.

Joshi, R.L., Joshi, V., Ow, D.W., 1990. BSMV genome mediated expression of a foreign in dicot and monocot plant cells. EMBO J, 9, 2663-2669.

Kasarda, D.D., Adalsteins, A.E., Laird, N.F., 1987. Gamma-gliadins with alpha-type structure coded on chromosome 6 B of the wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar "Chinese Spring". In: Lasztity, R. and Bekes, F., (eds.): Proc. 3rd Int. Workshop on Gluten Proteins. Budapest, Hungary, pp. 20-29.

Kasarda, D.D., Tao, H.P., Evans, P.K., Adalsteins, A.E., Yuen, S.W., 1988. Sequencing of protein from a single spot of a 2-D gel pattern: N-terminal sequence of a major wheat LMW-glutenin subunit. J. Exp. Bot., 39, 899-966.

Kasarda, D.D., 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In: Pomeranz, Y., (ed.): Wheat is Unique. Am. Ass. Cereal Chem., St. Paul, pp. 277-302.

Kasarda, D.D., 1999. Glutenin polymers: the *in vitro* to *in vivo* transition. Cereal Foods World, 44, 566-571.

Kasarda, D.D., D' Ovidio, R., 1999. Deduced amino acid sequence of an α -gliadin gene from spelt wheat (spelta) includes sequences active in celiac disease. *Cereal Chemistry*, 76, (4), 548-551.

Keck, B., Köhler, P., Wieser, H., 1995. Disulfide bonds in wheat gluten: cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolitic digestion. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200, 432-439.

Khatkar, B.S., Fido, R.J., Tatham, A. S., Schofield, J.D., 2002. Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 35, 299-306.

Kihara, H., 1924. Cytologische und genetische studien bei wichtigen getreidearten mit besonderer rucksicht auf das verhalten der chromosomen und die sterilitat in den bastarden. *Men. Coll. Sci. Ser. B, Kyoto Imp. Univ., Kyoto*.

Köhler, P., Belitz, H.D., Wieser, H., 1993. Disulphide bonds in wheat gluten: further cysteine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196, 239-247.

Konarev, V.G., 1983. The nature and the origin of the wheat genome on the data of grain protein immunochemistry and electrophoresis. *Proc. 6th Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan*, 65-75.

Koning, F., 2005. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 19, 3, 373-387.

Lacomme, C., Smolenska, L., Wilson, T.M.A., 1998. Genetic engineering and the expression of foreign peptides or proteins with plant virus-based vector. *Genetic Engineering*, 20, ed J.K. Setlow, Plenum Press New York.

Lafiandra, D., Kasarda, D.D., Morris, R., 1984. Chromosomal assignment of genes coding for the wheat gliadin protein components of the cultivars Cheyenne and Chinese Spring by two dimensional electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.*, 68, 531-539.

Lafiandra, D., Ciaffi, M., Benedettelli, S., 1993. Seed storage proteins of wild wheat progenitors. *Biodiversity and wheat improvement*. Edited by A.B. Damania, ICARDA, J. Wilsey and sons, New York, 329-340.

Lee, M.R., Swanson, B.G., Baik, B.K., 2001. Influence of amylose content on properties of wheat starch and bread-making quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, 78, 701-706.

Lee, Y.K. , Bèkès, F., Gras, P., Ciaffi, M., Morell, M., K., Appels, R.,

1999. The low molecular weight glutenin subunit proteins of primitive wheats. IV. Functional properties of products from individual genes. *Theor. Appl. Genet.* 98, 149-155.

Lew, E.J.L., Kuzmicky, D.D., Kasarda, D.D., 1992. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem.* 69(5), 508-515.

Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R., 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 497-501.

Londei, M., Ciacchi, C., Ricciarelli, I., Vacca, L., Quarantino, S., Maiuri, L., 2005. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Molecular Immunology*, 42, 913-918.

MacRitchie, F., 1984. Baking quality of wheat flours. *Adv. Food Res.* 29, 201-277.

Mäki, M., Collin, P., 1997. Coeliac disease. *Lancet*, 349, 1755-59.

Margiotta, B., Urbano, M., Colaprico, G., Johansson, E., Buonocore, F., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., 1996. Detection of γ -type subunit at the *Glu-A1* locus in some Swedish bread wheat lines. *J. Cereal Sci.* 23, 203-211.

Masci, S., Lafiandra, D., Porceddu, E., Lew, E.J.L., Tao, H.P., Kasarda, D.D., 1993. D glutenin subunits: N-Terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chem.*, 70, 581-585.

Masci, S., Lew, E.J.L., Lafiandra, D., Porceddu, E., Kasarda, D.D., 1995. Characterization of low-molecular-weight glutenins type 1 and type 2 by RP-HPLC and N-Terminal sequencing. *Cereal Chem.*, 72(1), 100-104.

Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Kasarda, D.D., 1998. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiology*, 118, 1147-1158.

Masci, S., Egorov, T.A., Ronchi, C., Kuzmicky, D.D., Kasarda, D.D., Lafiandra, D., 1999. Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type low-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal. Sci.*, 29, 17-25.

Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Kasarda, D.D., 2000. A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. *Theor. Appl. Genet.*,

100, 396-400.

Morell, M.K., Rahman, S., Abrahams, S.L., Appels, R., 1995. The biochemistry and molecular biology of starch synthesis in cereals. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 647-660.

Morita, N., Maeda, T., Miyazaki, M., Yamamori, M., Miura, H., Ohtsuka, I., 2002. Dough and baking properties of high-amylose and waxy flours. *Cereal Chemistry*, 79, 491-495.

Morrison, W.R., 1995. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Foods World*, 40, 43-46.

Mowat, A. Mcl, 2003. Coeliac disease, a meeting point for genetics, immunology and protein chemistry. *Lancet*, 361, 1290-92.

Muccilli, V., Cunsolo, V., Saletti, R., Foti, S., Masci, S., Lafiandra, D., 2005. Characterization of B and C-type low-molecular-weight glutenin subunits by electrospray ionization mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics*, 5, 719-728.

Orsi, A., Sparvoli, F., Ceriotti, A., 2001. Role of individual disulfide bonds in the structural maturation of a low molecular weigh glutenin subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 34, 32322-32329.

Orth, R.A., Shellenberger, J.A., 1988. Origin, production and utilization of wheat. *Wheat Chemistry and Technology*. Ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 1-14.

Osborne, T.B., 1924. *The vegetable proteins*, 2th ed., Longmans, Green and Co., London.

Panozzo, J., Eagles, H.A., Wootton, M., 2001. Changes in protein composition during grain development in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 52, 485-493.

Payne, P.I., Corfield, K.G., 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta*, 145, 83-88.

Payne, P.I., Holt, L.M., Law, C.N., 1981a. Structural and genetic studies of the high molecular weight subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 60, 229-241.

Payne, P.I., Corfield, K.G., Holt, L.M., Blackman, J.A., 1981b. Correlations between the inheritance of certain HMW subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 51-60.

Payne, P.I., Jackson, E.A., Holt, L.M., 1984. The association between γ -

gliadin 45 and gluten strength in durum wheat varieties. A direct causal effect on the result of genetic linkage. *J. Cereal Sci.*, 2, 73-81.

Payne, P.I., Holt, L.M., Jarvis, M.G., Jackson, E.A., 1985. Two-dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*): biochemical and genetic studies. *Cereal Chem.*, 62, 319-326.

Payne, P.I., 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38, 141-153.

Payne, P.I., Nightingale, M. A., Krattinger, A.F., Holt, L.M., 1987a. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 40, 51-65.

Payne, P.I., Seekings, J.A., Worland, A.J., Jarvis, M.G., Holt, L.M., 1987b. Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effect on bread-making quality in wheat: analysis of F₅ progeny from Chinese Spring x Chinese Spring (Hope 1A). *J. Cereal Sci.*, 6, 103-118.

Peña, R.J., Zarco-Hernandez, J., Amaya-Celis, A., Mujeeb-Kazi, A., 1994. Relationships between chromosome 1B-encoded glutenin subunit compositions and bread-making quality characteristics of some durum wheat (*Triticum turgidum*) cultivars. *J. Cereal Sci.*, 19, 243-249.

Picarelli, A., Di Tola, M., Sabbatella, L., Anania, M.C., Di Cello, T., Greco, R., Silano, M., De Vincenzi, M., 1999. 31-34 amino acid sequence of the α -gliadin induce anti-endomysial antibody production during *in vitro* challenge. *Scand J Gastroenterol*, 11, 1099-1102.

Pogna, N., Lafiandra D., Feillet, P., Autran, J.C., 1988. Evidence for a direct causal effect of low molecular weight glutenin subunits on gluten visco-elasticity in durum wheats. *J. Cereal Sci.*, 7, 211-214.

Pomeranz, Y., 1988. Composition and functionality of wheat flour components. Pomeranz Y. (ed). *Wheat: chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, 219-370.

Purcell, J.M., Kasarda, D.D., Wu, C.S.C., 1988. Secondary structures of wheat α and ω -gliadin proteins: Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Cereal Sci.*, 7, 21-32.

Rafalski, J.A., Sheets, K., Metzler, M., Peterson, D.M., Hedgcoth, C., Soll, D.G., 1984. Developmentally regulated plant genes: the nucleotide sequence of a wheat gliadin genomic clone. *EMBO J.*, 3, 1409-1415.

Rahman, S., Li, Z., Batey, I., Cochrane, M.P., Appels, R., Morell, M.K., 2000. Genetic alteration of starch functionality in wheat. *Journal of Cereal Science*, 31, 91-110.

Riley, R., Chapman, V., 1967. Effect of 5Bs in suppressing the expression of altered dosage of 5Blon meiotic chromosome pairing in *Triticum aestivum*. *Nature*, 7, (216) 110,60-62.

Rubin, R., Levanony, H., Galili, G., 1992. Evidence for the presence of two different types of protein bodies in wheat endosperm. *Plant Physiol.*, 99, 718-724.

Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., 2005. Advances genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, 113-128.

Sambrook, J., Fritsch, R.F., Maniatis, R., 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbour laboratory.

Schropp, P., Wieser, H., 1996. Effects of high molecular weight subunits of glutenin on the rheological properties of wheat gluten. *Cereal Chemistry*, 73 (3), 410-413.

Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., Khosla, C., 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, 2275-2279.

Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Mifflin, B.J., 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *J. Cereal Sci.*, 4, 97-106.

Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.*, 15, 105-120.

Shewry, P.R., 1995. Plant storage proteins. *Biol. Rev.*, 70, 375-426.

Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1997. Biotechnology of wheat quality. *J. Sci. Food Agric.*, 73, 397-406.

Shewry, P.R., 1999. The synthesis, processing, and deposition of gluten proteins in the developing wheat grain. *Cereal Foods World*, 44, 587-589.

Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafandra, D., Belton, P., 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 433-441.

Shimoni, Y., Blechl, A.E., Anderson, O.D., Galili, G., 1997. A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in

Transgenic Wheat. J. Biol. Chem., 272, 15488-15495.

Sissons, M.J., Bèkès, F., Skerritt, J.H., 1997. Isolation and functionality of low molecular weight glutenin subunits. Cereal Chemistry (in press).

Stevens, R.C., 2000. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. Structure, 8, R177-R185.

Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol., 189, 113-130.

Swartz, J.R., 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Current Opinion in Biotechnology, 12, 195-201.

Tai, T., Tanksley S., 1991. Plant Molecular Biology, 8, 297-303.

Tamàs, L., Bèkès, F., Greenfield, J., Tatham, A.S., Gras, P.W., Shewry, P.R., Appels, R., 1998. Heterologous expression and dough mixing studies of wild type and mutant C hordeins. Journal of Cereal Science, 27, 15-22.

Tao, H.P., Kasarda, D.D., 1989. Two-Dimensional Gel Mapping and N-Terminal Sequencing of LMW-glutenin subunits. J. Exp. Bot., 40(218), 1015-1020.

Tao, H.P., Adaltein, A.E., Kasarda, D.D., 1992. Intermolecular disulfide bonds link specific high-molecular-weight glutenin subunits in wheat endosperm. Biochim. Biophys. Acta, 1159, 13-21.

Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1985. The conformation of wheat gluten proteins, the secondary structures and thermal stabilities of α , β , γ and ω -gliadins. J. Cereal Sci., 3, 103-113.

Tatham, A.S., Field, J.M., Smith S.J., Shewry P.R., 1987. The conformations of wheat gluten proteins. II. Aggregated gliadins and low molecular weight subunits of glutenin. J. Cereal Sci., 51, 203-214.

Tatham, A.S., Masson, P., Popineau, Y., 1990. Conformational studies derived by the enzymic hydrolysis of a γ -type gliadin. J. Cereal Sci., 11, 1-13.

Thompson, S., Bishop, D.H.L., Madgwick, P., Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1994. High-level expression of a wheat LMW glutenin subunit using a baculovirus system. J. Agricultural and Food Chemistry, 42, 426-31.

Uthayakumaran, S., Stoddard, F.L., Gras, P.W., Bèkès, F., 2000a. Optimized methods for incorporating glutenin subunits into wheat dough for extension and baking studies. Cereal Chemistry, 77 (6), 731-736.

Uthayakumaran, S., Stoddard, F.L., Gras, P.W., Bèkès, F., 2000b. Effects

of incorporated glutenins on functional properties of wheat dough. *Cereal Chemistry*, 77 (6), 737-743.

Walker C.E., Hazelton, J.L., 1996. Dough rheological tests. *Cereal Food world*, 41 (1) 23-28.

Walker, C.E., Hazelton, J.L., Shogren, M.D., 1997. The mixograph handbook. Ed. by Walker, C.E., Hazelton, J.L., Shogren, M.D; Kansas State University, Manhattan, KS.

Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, 1996. Functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 23, 1-18.

Weickert, M.J., Doherty, D.H., Best, E.A., Olins, P.O., 1996. Optimization of heterologous production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 494-499.

Werner, W.E., Elva Adalsteins, A., Kasarda, D.D., 1992. Composition of high-molecular-weight glutenin subunit dimers formed by partial reduction of residue glutenin. *Cereal Chem.*, 69(5), 535-541.

Woychik, J.H., Boundy, J.A., Dimler, R.J., 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 477-482.

Wrigley, C.W., 1996. Giant proteins with flour power. *Nature*, 381, 738-739.