UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento per l'agricoltura, le foreste, la natura e l'energia

DAFNE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE VEGETALI -XXVI CICLO.

DEGRADAZIONE DELLA PECTINA NELLA PARETE VEGETALE: IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE E APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE

settore scientifico-disciplinare
BIO/04

Tesi di dottorato di:
Dott. DANIELA PONTIGGIA

Coordinatore del corso

Prof. Stefania MASCI

Tutore

Prof. Giulia DE LORENZO

Data della discussione

30 maggio 2014

Ai mie due più grandi progetti: "EDOARDO E GABRIELE"

e al coautore Andrea

INDICE

1. RIASSUNTO v

2. INTRODUZIONE GENERALE 1

2.1 LA PARETE CELLULARE 2

2.2 LA PARETE CELLULARE: COMPOSIZIONE 3

2.2.1 LE PECTINE 4

2.3 IL RUOLO DELLA PARETE CELLULARE NELLA DIFESA DAI PATOGENI 7

2.3.1 I MECCANISMI DI DIFESA DELLE PIANTE 8

2.3.2 IL SISTEMA DI MONITORAGGIO DELL'INTEGRITÀ DELLA PECTINA (PIMS) 10

2.3.3 GLI OLIGOGALATTURONIDI 11

2.4 PIANTE CON ALTERAZIONE *IN MURO* DELLA PECTINA 15

2.5 SCOPO DEL LAVORO 18

3. L'ESPRESSIONE CONTROLLATA DI UNA PECTATO LIASI BATTERICA IN *ARABIDOPSIS THALIANA* MIGLIORA LA SACCARIFICAZIONE 21

3.1 INTRODUZIONE 22

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE 26

3.2.1 SELEZIONE E ANALISI DI PIANTE PL 26

3.2.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL TRASCRITTO 29

3.2.3 ANALISI DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA 30

3.2.4 ANALISI DELLA DIGERIBILITÀ DELLE PIANTE PL 31

3.3 CONCLUSIONI 33

3.4 MATERIALI E METODI 34
3.4.1 MATERIALE BIOLOGICO UTILIZZATO NEGLI ESPERIMENTI 34
3.4.2 CONDIZIONI DI CRESCITA 34
3.4.3 ANALISI FENOTIPICA DELLE PLANTULE 35
3.4.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA 35
3.4.5 ESTRAZIONE DI PROTEINE E SAGGIO DI ATTIVITÀ DA TESSUTI VEGETALI 36
3.4.6 IDROLISI ENZIMATICA E DETERMINAZIONE DELL'EFFICIENZA DI SACCARIFICAZIONE 37

4. MANIPOLAZIONE DEI LIVELLI DI OG IN VIVO 39

4.1 INTRODUZIONE 40

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE 42
4.2.1 ESTRAZIONE DEI FRAMMENTI PECTICI DA TESSUTI DI PIANTE OGM 42
4.2.2 ANALISI MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA DEI FRAMMENTI PECTICI OTTENUTI DA PIANTE OGM 44

4.3 CONCLUSIONI 46

4.4 MATERIALI E METODI 48
4.4.1 MATERIALE BIOLOGICO UTILIZZATO NEGLI ESPERIMENTI 48
4.4.2 CONDIZIONI DI CRESCITA 48
4.4.3 ESTRAZIONE DELLA PARETE CELLULARE TOTALE (AIS: ALCHOOL INSOLUBLE SOLIDS) 48
4.4.4 FRAZIONE SOLUBILE AD AGENTI CHELANTI (CHASS: "CHELATING AGENT-SOLUBLE SOLIDS") 49
4.4.5 CROMATOGRAFIA IONICA (HPAEC-PAD) 49
4.4.6 MALDI-TOF ("MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION-TIME OF FLIGHT") 50

5. LA PERCEZIONE E LA SEGNALAZIONE DEGLI OG A LIVELLO DELLA MEMBRANA PLASMATICA: EVENTI PRECOCI DI FOSFORILAZIONE IN RISPOSTA AGLI OG, IN ARABIDOPSIS. 53

5.1 INTRODUZIONE 54

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONE 60

5.2.1 CRESCITA DELLE PLANTULE DI ARABIDOPSIS THALIANA E TRATTAMENTO CON OLIGOGALATTURONIDI (OG) 60

5.2.2 PREPARAZIONE DI FRAZIONI MICROSOMIALI ARRICCHITE IN MEMBRANE PLASMATICHE 60

5.2.3 ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DELLE MAPK MEDIANTE WESTERN-BLOT 63

5.2.4 MARCATURA ISOTOPICA DELLE MISCELE PEPTIDICHE 64

5.2.5 ANALISI PROTEOMICA DIFFERENZIALE QUANTITATIVA 67

5.2.5.1 IDENTIFICAZIONE DELLE SEQUENZE PROTEICHE MEDIANTE LC-MS/MS E ANALISI BIOINFORMATICA DELLE PROTEINE IDENTIFICATE PER I CAMPIONI PMIX E WMIX 68

5.2.5.2 ANALISI PROTEOMICA QUANTITATIVA DEI CAMPIONI PMIX E WMIX 71

5.2.6 ANALISI FOSFOPROTEOMICA DIFFERENZIALE QUANTITATIVA 72

5.2.6.1 IDENTIFICAZIONE DELLE SEQUENZE PROTEICHE MEDIANTE LC-MS/MS E ANALISI BIOINFORMATICA DELLE PROTEINE IDENTIFICATE PER I CAMPIONI DOPO ARRICCHIMENO DEI FOSFOPEPTIDI 73

5.2.6.2 ANALISI FOSFOPROTEOMICA QUANTITATIVA DEI CAMPIONI PMIX E WMIX 76

5.3 CONCLUSIONI 78

5.4 MATERIALI E METODI 81

5.4.1 MATERIALE BIOLOGICO E CONDIZIONI DI CRESCITA 81

5.4.2 TRATTAMENTO DELLE PLANTULE CON OLIGOGALATTURONIDI 81

5.4.3 STRATEGIE DI ARRICCHIMENTO IN MEMBRANE TOTALI (MICROSOMI) E MEMBRANE PLASMATICHE 82

5.4.3.1 Preparazione di microsomi 82
5.4.3.2 Trattamento con Brij 58: arricchimento in membrane plasmatiche 83
5.4.4 Analisi delle proteine 84
5.4.4.1 Quantificazione proteica 84
5.4.4.2 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) e analisi western blott 84
5.4.5 Digestione in soluzione delle proteine 85
5.4.6 Quantificazione dei peptidi con saggio fluorimetrico 86

5.5 Preparazione del campione per l'analisi LC-MS/MS 86
5.5.1 Marcatura isotopica delle miscele peptidiche 87
5.5.2 Scambio anionico (SAX) 89
5.5.3 Arricchimento del campione in fosfopeptidi 90
5.5.4 Identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa 93
5.5.4.1 Analisi LC-MS/MS 94
5.5.5 Analisi bioinformatica 96
5.5.5.1 Ricerca in database 96
5.5.5.2 Annotazioni funzionali e metodi di predizioni 97

6. Discussione generale 109

7. Bibliografia 119

8. Appendice 135

RIASSUNTO

La parete cellulare è una complessa struttura delle cellule vegetali che, oltre a determinarne la forma e rigidità, costituisce un importante elemento di regolazione della crescita e del differenziamento delle piante. Rappresenta inoltre l'interfaccia tra la cellula e l'ambiente e funziona come una barriera fisica di protezione dagli stress abiotici e biotici. La parete è un deposito di segnali regolatori che vengono rilasciati durante una infezione o in seguito al danno meccanico. La struttura delle pareti cellulari è sottoposta a un costante rimodellamento in quanto deve adattarsi alle esigenze di volta in volta prevalenti. La pectina in particolare influenza la rigidità della parete e l'adesione cellula-cellula, ed è il primo componente che viene modificato durante l'attacco dei patogeni o durante lo sviluppo. Pertanto, le piante hanno sviluppato un sistema sofisticato, principalmente incentrato sulla pectina, per monitorare la composizione della parete cellulare e regolarne le modifiche. (PIMS:"sistema di monitoraggio dell'integrità della pectina").

Scopo della mia ricerca è stato quello comprendere come le modifiche della pectina possano giocare un ruolo nel mantenere un corretto equilibrio tra difesa e sviluppo, con particolare attenzione all'impatto di queste modifiche sull'utilizzo delle biomasse vegetali per applicazioni industriali come la produzione di biocarburanti.

Nella prima parte del lavoro mi sono occupata di valutare se l'espressione controllata di enzimi pectici *in planta* potesse contribuire a migliorare la resistenza ai patogeni e la saccarificazione della biomassa vegetale senza interferire nel normale sviluppo della pianta.

Nella seconda parte del mio lavoro l'obiettivo è stato di approfondire la comprensione della funzione degli oligogalatturonidi (OG), una classe importante di elicitori rilasciati dalla pectina della parete cellulare vegetale per azione di poligalatturonasi microbiche durante l'infezione.

Abbiamo generato delle piante transgeniche che esprimono, sotto il controllo di un promotore inducibile, una proteina chimerica capace di produrre OG, chiamata per l'appunto OG machine (OGM) , per studiare come i livelli di OG nel tessuto regolano, a seconda della concentrazione, il compromesso tra crescita e difesa. Nella terza parte della tesi, l'analisi proteomica e fosfoproteomica delle membrane di *Arabidopsis thaliana* in seguito al trattamento con OG esogeni ha permesso di studiare le risposte precoci della pianta e dissezionare la via di segnalazione attivata da questi elicitori.

ABSTRACT

DEGRADATION OF PECTIN IN THE PLANT CELL WALL: PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

The cell wall is a complex structure of plant cells which determines their shape and rigidity, and is an important element in the regulation of plant growth and differentiation. It also represents the interface between the cell and its environment and acts as a physical barrier to protect it against abiotic and biotic stresses. The wall is a deposit of regulatory signals that are released during infections or due to mechanical damage. The structure of the cell walls is in a constant process of remodeling as it adapts to the prevailing functional requirements. Pectin in particular influences cell wall rigidity as well as cell–cell adhesion , and is the first component that is modified during the attack of pathogens or during development. Therefore, plants have developed a sophisticated system mainly focused on pectin, to monitor the composition of the cell wall and regulate its modifications. (PIMS " system for monitoring the integrity of the pectin ").

The aim of my research was to understand how pectin modification may play a role in maintaining a proper balance between defense and development, with particular attention to the impact of these modifications on the use of plant biomass for industrial applications such as biofuel production .

In the first part of the work I assessed whether the controlled expression of pectic enzymes in planta could help to improve the resistance to pathogens and the saccharification of plant biomass without interfering with the normal development of the plant .

In the second part of my work , the objective was to deepen our understanding of the function of oligogalacturonides (OG), an important class of elicitors released from the cell wall pectin by the action of polygalacturonases during microbial infection.

We generated transgenic plants that express, under the control of an inducible promoter, a chimeric protein capable of producing OG, called OG machine (OGM), to study how the levels of OGs in the tissue regulate, depending on the concentration, the growth/defense trade off. In the third part of the thesis, proteomic and phosphoproteomic analysis of the membranes of Arabidopsis thaliana in response to treatment with exogenous OG has allowed us to study the early response of the plant and dissect the signaling pathway activated by these elicitors.

1. INTRODUZIONE GENERALE

1.1 La parete cellulare

La parete cellulare è una caratteristica struttura delle cellule vegetali, che oltre a contribuire alla forma delle cellule (e dunque dei tessuti e degli organi della pianta), è sede di eventi biochimici coinvolti nel controllo della crescita e nella comunicazione tra cellule (Keegstra, 2010). Inoltre, svolge un ruolo primario nelle interazioni pianta-patogeno, in quanto è non solo la barriera esterna della cellula, ma anche la sede di eventi sia di segnalazione che di difesa contro potenziali patogeni (Lagaert et al., 2009). La parete cellulare è composta da diversi strati, sintetizzati in momenti differenti. Infatti, a cambiamenti di struttura e composizione della parete cellulare sono associati differenti stadi di sviluppo della pianta. Inoltre è nelle diverse specie vegetali, la struttura e la composizione della parete cellulare vegetale possono essere molto variabili. Considerata la complessità della parete cellulare sono stati proposti diversi modelli (Cosgrove, 2001) di cui uno, molto semplice, è visualizzato in **Figura 1.1**.

La parete viene depositata in tre stadi successivi e diversi tra loro. Il primo, più distale, è rappresentato dalla lamella mediana che si forma durante la divisione cellulare, rappresenta il cemento cellulare, in quanto unisce cellule adiacenti, ed è principalmente costituita da pectine. Quando questa è completata, le cellule figlie appena formatesi procedono a sintetizzare lo strato successivo, definito come parete primaria.

La parete primaria, costituita principalmente da sostanze pectiche, emicellulose e proteine, continua ad accrescersi durante tutto il periodo di sviluppo della pianta, mentre un ulteriore strato, definito parete secondaria, viene deposto da cellule specializzate, e dunque non è sempre presente, all'inizio del differenziamento (Keegstra, 2010).

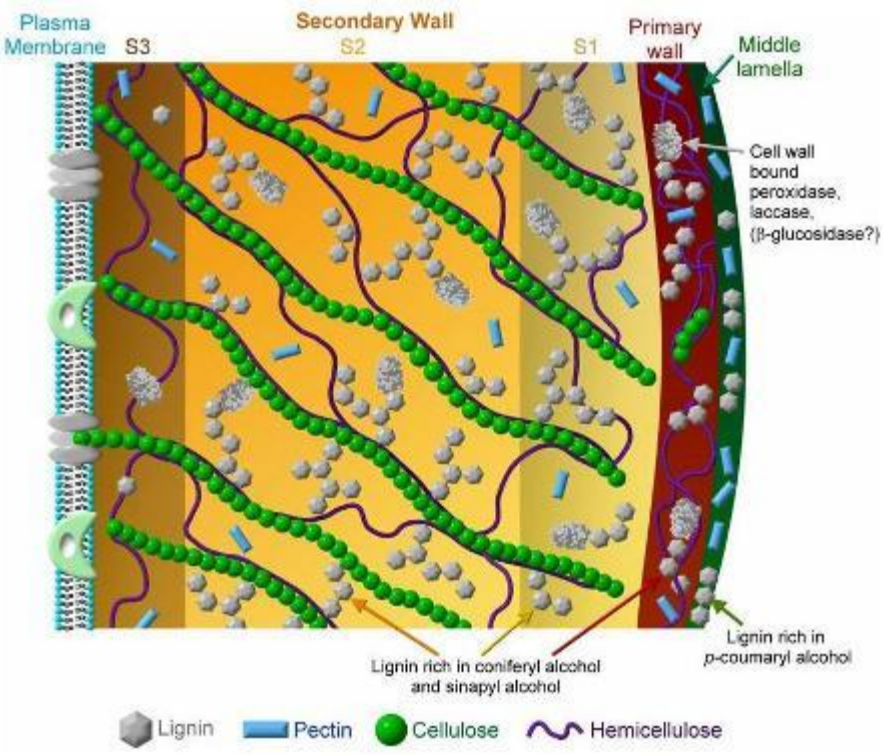


FIGURA 1.1 MODELLO SEMPLIFICATO DELLA PARETE CELLULARE VEGETALE. Sono visibili i tre strati (la lamella mediana, la parete primaria e secondaria) e i principali componenti, come la cellulosa, l'emicellulosa, la pectina, la lignina e le proteine (Achyuthan et al., 2010).

1.2 LA PARETE CELLULARE: COMPOSIZIONE

La parete cellulare è formata da una fase microfibrillare polisaccaridica immersa in una matrice glicidica e proteica (Carpita

eGibeaut, 1993). Le microfibrille sono strutture lunghe e sottili costituite dall'assemblaggio di filamenti di **CELLULOSA**: un polimero di molecole di glucosio unite tra loro da un legame β-1→ 4 glicosidico (Himmel et al., 1999). Questi filamenti sono disposti parallelamente gli uni agli altri e sono legati fra loro per mezzo di legami idrogeno, formando microfibrille di diametro di 5-10 nm. La cellulosa può rappresentare anche oltre il 50% della parete secondaria (Pauly e Keegstra, 2008).

La matrice è composta da un insieme di polisaccaridi, quali le emicellulose e le pectine, oltre che da proteine e glicoproteine strutturali.

Le **EMICELLULOSE** sono una complessa classe di polimeri e possono contenere diversi zuccheri pentosi (xilosio e arabinosio), ed esosi (mannosio, glucosio e galattosio) oltre a acidi uronici come l'acido galatturonico. La composizione e la struttura varia oltre che nei diversi stadi di sviluppo anche nelle differenti famiglie di piante. Per esempio, lo xiloglucano (uno scheletro di residui di β-1,4-glucosio, al quale sono legati spesso residui di xilosio mediante legami β-1→6), è l' emicellulosa principale della parete primaria delle dicotiledoni, mentre il glucomannano (uno scheletro di residui di β-1,4-glucosio e mannosio) è il principale costituente della parete delle gimnosperme (Scheller e Ulvskov, 2010) (**FIGURA 1.2 A**)

1.2.1 LE PECTINE

Le **PECTINE** hanno un ruolo rilevante nella crescita, nello sviluppo, nella morfogenesi e nella difesa della pianta. Sono fondamentali per l'adesione cellula-cellula, nel trasferimento di segnali intracellulari, nell'espansione

cellulare, nei meccanismi di abscissione e nello sviluppo dei frutti; possono inoltre nel legare ioni, fattori di crescita ed enzimi.

Essendo prevalenti nella lamella mediana, sono sintetizzate durante i primi stadi di formazione della parete.

Rappresentano la maggiore componente della parete cellulare primaria delle piante dicotiledoni, dove costituiscono circa un terzo del peso secco della parete, e in alcun monocotiledoni, ad eccezione per esempio delle graminacee, nelle quali sono presenti a livelli molto bassi (Jarvis et al., 1988).

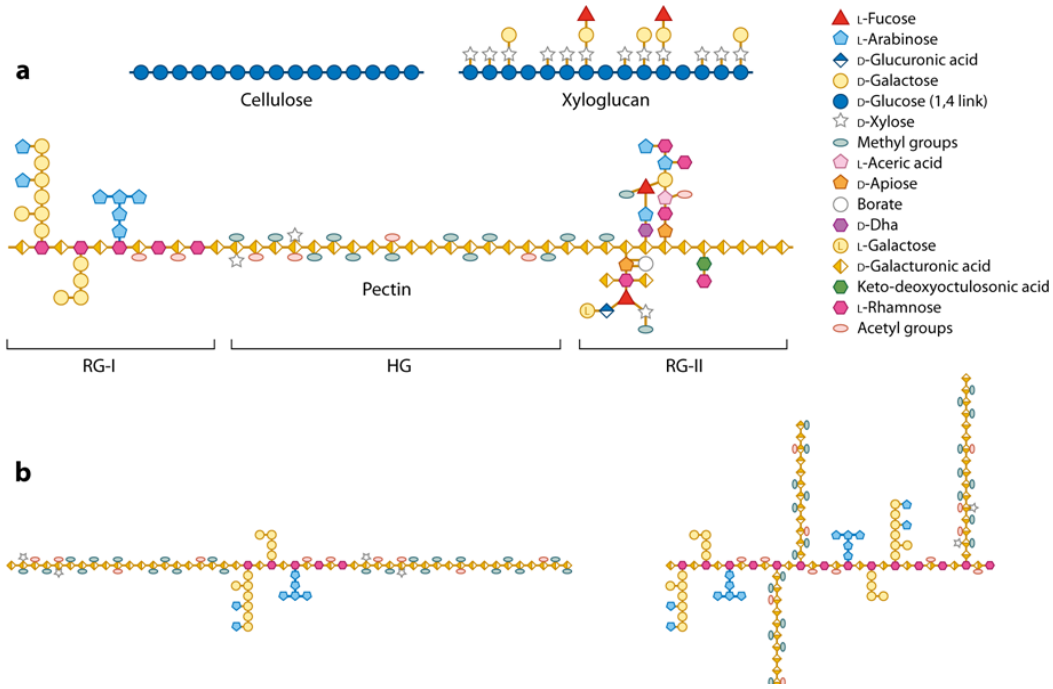


FIGURA 1.2 STRUTTURA DI ALCUNI COMPONENTI DELLA PARETE CELLULARE. (**A**) Rappresentazione schematica della cellulosa, delle emicellulose (xiloglucano), e della pectina (HGA, RG-I e RG-II), (**B**) modelli alternativi di organizzazione della struttura macromolecolare della pectina. A sinistra è schematizzato il modello che mostra una disposizione contigua di HGA intervallati da RG-I mentre sulla destra, è mostrato il modello che prevede uno scheletro di RG-I a cui sono legate catene di HGA. La combinazione dei due modelli può anche essere possibile (Wolf et al., 2012)

Le funzioni delle pectine dipendono dalle loro proprietà e dunque dalla loro composizione. Le pectine costituiscono una famiglia molto complessa di polisaccaridi ricchi in acido galatturonico che comprende l'omogalatturonano (HGA), il ramnogalatturonano I (RG-I) e il ramnogalatturonano II (RG-II (Ridley et al., 2001) (**FIGURA 1.2 A**).

L'HGA è il più abbondante polisaccaride pectico ed è costituito da monomeri di acido galatturonico legati tra loro con legami α-1→4. I residui di acido galatturonico possono essere metil-esterificati al carbossile C6, e talvolta O-acetilati su O-2 oppure O-6. L'RG-I è formato da uno scheletro di residui di acido galatturonico legati con legame glicosidico α-1→2 ad un residuo di ramnosio, che è legato a sua volta con legame α-1→4 ad un altra unità di acido galatturonico; al residuo di ramnosio, in posizione C-4, possono essere legate diverse catene laterali composte da arabinosio e/o galattosio. L'RG-II è un polisaccaride strutturalmente molto complesso e costituisce il 10% delle pectine. È formato da una catena principale di almeno 8 residui di α-D-GalA uniti da legami α-1→4, a cui si legano delle catene laterali costituite da 12 zuccheri diversi, ed è solitamente presente nelle pareti cellulari come dimero, attraverso la formazione di legami diesterici. Infine, lo xilogalatturonano, un omogalatturonano sostituito in posizione O-3 con uno xilosio, è presente soprattutto nei tessuti riproduttivi e nelle foglie (Harholt et al., 2010).

La struttura macromolecolare della pectina è ancora poco nota ed è notevolmente influenzata dai livelli di esterificazione con metanolo o acido acetico dell'HGA. Le pectine con basso grado di metilazione formano gel in presenza di cationi bivalenti, generalmente calcio, grazie a strutture intermolecolari definite "egg-box" (Grant et al., 1973; Willats

et al., 2001b). La capacità delle pectine di formare ““egg-box”, e quindi di gelificare, aumenta al diminuire del grado di metilazione, e determina la porosità della parete. Sono stati proposti diversi modelli sulla struttura della pectina; tra questi il più accreditato è che prevede due regioni alternate e separate fra loro: una, chiamata “hairy region”, concentra blocchi di RG-I e RG-II, l’altra chiamata “smooth region”, comprende quasi esclusivamente HGA (Schols e Voragen, 1994). Un secondo modello (the RG-I backbone model) propone uno scheletro di RG-I adiacente alle microfibre di cellulosa (**FIGURA 1.2 B**) (Vincken et al., 2003). I due modelli non sono necessariamente mutualmente esclusivi e possono costituire una rappresentazione parziale del complesso pectico presente *in muro* (Yapo, 2011), rispecchiando solo in parte la complessità della struttura pectica (Wolf et al., 2012).

1.3 IL RUOLO DELLA PARETE CELLULARE NELLA DIFESA DAI PATOGENI

La parete cellulare è il compartimento che mette in relazione la pianta con l’ambiente circostante, e rappresenta la prima barriera contro un possibile attacco da parte di un potenziale organismo patogeno (Underwood, 2012). Oltre ad avere un ruolo protettivo come barriera passiva che limita l'accesso dei patogeni nelle cellule, la parete cellulare è attivamente rimodellata e rafforzata specificamente nei siti di interazione con i potenziali microrganismi patogeni (Underwood, 2012). In particolare, i polisaccaridi della parete sono in grado di formare una rete continua attraverso tutta la struttura dell’apoplasto e possiedono

domini strutturali che possono andare incontro a diverse modificazioni biochimiche. La natura dinamica della rete polisaccaridica riflette presumibilmente l'ampio spettro delle sue funzioni tra le quali quelle implicate nelle interazioni con gli organismi fitopatogeni(Willats et al., 2001a).

1.3.1 I MECCANISMI DI DIFESA DELLE PIANTE

Una prima linea di difesa è di tipo passivo ed è dovuta alla presenza di fattori costitutivi. In questa categoria rientrano le barriere fisiche, quali la cuticola e, appunto, la parete cellulare che impediscono meccanicamente la penetrazione del patogeno, e le "barriere" chimiche, che consistono nella presenza nei tessuti vegetali e sulla superficie delle piante di sostanze tossiche, per lo più rappresentate da composti fenolici ed alcaloidi. Un ulteriore efficace meccanismo di difesa è costituito dalla presenza, a livello della parete, di glicoproteine in grado di inibire gli enzimi dei patogeni deputati alla degradazione della parete vegetale (Aist, 1983; Bell, 1981; De Lorenzo et al., 2001).

La seconda linea di difesa è di tipo attivo e si innesca solo in seguito al riconoscimento, da parte della pianta, dell'invasione di un potenziale patogeno. Le risposte di difesa attivate in seguito a tale riconoscimento sono complesse. Una risposta importante è la "reazione di ipersensibilità (HR, Hypersensitive Reaction)". Questa consiste in una "morte cellulare programmata" delle cellule della pianta a livello del sito di infezione, che si "sacrificano" per confinare e bloccare la proliferazione di quei patogeni che necessitano di cellule vive per la diffusione dell'infezione (biotrofi) (Greenberg, 1997). Le tappe biochimiche che portano alla

morte cellulare programmata prevedono diverse reazioni tra cui una delle prime è il "burst" ossidativo, cioè la formazione di specie reattive, altamente tossiche dell'ossigeno (come l'H_2O_2 e lo ione superossido) (O'Brien et al., 2012). Contemporaneamente, nelle cellule limitrofe a quelle coinvolte nell'HR, si manifestano altre risposte di difesa, quali la sintesi e l'accumulo di fitoalessine, la sintesi di proteine di difesa ed il rafforzamento della parete vegetale. Le fitoalessine sono dei composti a basso peso molecolare di varia natura (come ad esempio gli isoflavonoidi delle leguminose e i terpenoidi delle solanacee) ad attività antimicrobica, sintetizzati ed accumulati nei tessuti vegetali in seguito ad infezione o a ferita (Ahuja et al., 2012). Le proteine di difesa possono essere divise in due categorie: quelle che catalizzano la produzione di vari metaboliti implicati nei processi di difesa e quelle che agiscono direttamente nei processi di difesa. A quest'ultima categoria appartengono le cosiddette proteine correlate con la patogenesi (PR) (Sels et al., 2008; van Loon et al., 2006), che includono le glucanasi e chitinasi, la cui funzione è quella di degradare i componenti strutturali di superficie dei patogeni (come ad esempio la parete cellulare dei funghi e batteri), ma anche inibitori delle proteasi e delle PG (De Lorenzo e Ferrari, 2002). Il rafforzamento della parete cellulare consiste nella deposizione di callosio, cellulosa e lignina in prossimità del sito d'infezione oltre che alla modificazione e all'accumulo delle HRGP (glicoproteine ricche in idrossiprolina) Tali proteine sono coinvolte nella costruzione dello scheletro della parete, bloccando le microfibrille di cellulosa e contribuiscono al suo rafforzamento, durante l'infezione. Inoltre, associata a queste risposte di difesa, vi è la produzione di l'acido salicilico che è responsabile dell'insorgere della cosiddetta resistenza sistemica acquisita (SAR,

Systemic Acquired Resistance)(Park et al., 2007). Questo fenomeno comporta, nei tessuti lontani dal sito di infezione primario, una maggiore resistenza a successivi attacchi da parte anche di altri patogeni che può durare anche una intera stagione (Muthamilarasan e Prasad, 2013).

1.3.2 Il sistema di monitoraggio dell'integrità della pectina (PIMS)

Come abbiamo visto, diversi sono i meccanismi di difesa che interessano la parete cellulare. Durante l'infezione di una pianta, comunque, i patogeni devono superare la barriera rappresentata dalla parete cellulare vegetale per penetrare all'interno dei tessuti. Per questo, secernono enzimi degradativi dei componenti polimerici di questa struttura. Tra i primi enzimi secreti da funghi e batteri, vi sono gli enzimi pectici, che sono coinvolti nella degradazione della pectina che oltre ad essere il componente principale sia della lamella mediana che della parete cellulare primaria e quello più esterno per cui il primo che deve essere distrutto al fine di invadere la cellula (De Lorenzo et al., 1997).

Tra gli enzimi pectici troviamo le poligalatturonasi (PG), idrolasi in grado di tagliare i legami α-(1-4) tra i residui di acido D-galatturonico dell'omogalatturonano non metilato; le pectato liasi (PL), che tagliano il legame glicosidico tra residui di HGA attraverso una reazione di β-eliminazione che rimuove un protone e genera un prodotto con un doppio legame tra il C4 e il C5 dell'unità saccaridica all'estremità non riducente; le pectina metilesterasi (PME), che catalizzano l'eliminazione di gruppi metilici dell'omogalatturonano trasformando le pectine in acido pectico (**Figura 1.3**).

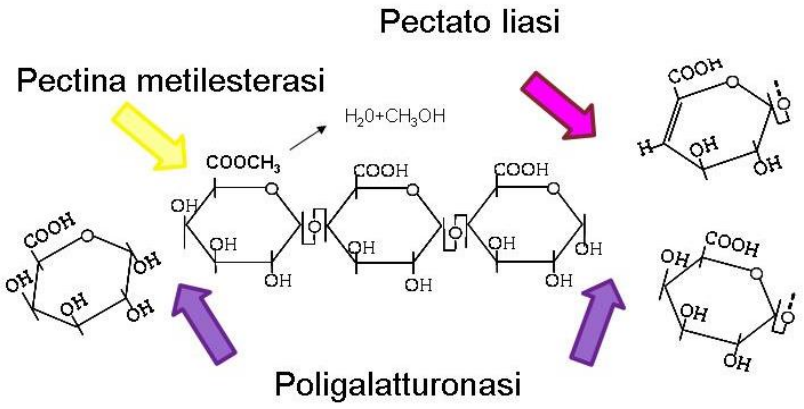


FIGURA 1.3 ALCUNI ENZIMI DEGRADATIVI DELLA PECTINA. Le endo ed esopoligalatturonasi idrolizzano l'omogalatturonano. Le pectato liasi (PL) attraverso una reazione di trans-eliminazione, formano esteri uronici insaturi caratterizzati da un doppio legame tra il C4 ed il C5 del residuo saccaridico all'estremità non riducente. Infine le pectina-metilesterasi (PME) catalizzano l'eliminazione di gruppi metilici formando pectato.

L'azione di questi enzimi (e dunque la degradazione della pectina) è necessaria per rendere la cellulosa e le emicellulose più accessibili alle corrispondenti idrolasi, le cellulasi e le emicellulasi (De Lorenzo et al., 2001). La pectina è, dunque, il primo componente soggetto ad alterazioni o modifiche, spiegando così perché si sono evoluti meccanismi specifici e sofisticati di controllo della sua integrità che complessivamente costituiscono il "sistema di monitoraggio dell'integrità della pectina" (PIMS: pectin integrity monitoring system) (De Lorenzo et al., 2011). Componenti importanti di questo sistema sono gli oligogalatturonidi (OG).

1.3.3 GLI OLIGOGALATTURONIDI

Gli OG, frammenti di omogalatturonano non metilato con un grado di polimerizzazione compreso tra 10 e 15, sono annoverati nella classe

dei cosiddetti DAMP ("Damage-Associated Molecular Patterns"), molecole endogene che funzionano da indicatori del danno tissutale. Gli OG rappresentano infatti uno dei più importanti elementi di segnalazione dello stato della pectina e dunque dell'integrità della cellula (De Lorenzo et al., 2011).

Gli OG sono ben noti elicitori delle risposte di difesa in molte specie vegetali. Tra le risposte indotte dagli OG vi è l'accumulo di fitoalessine (Davis et al., 1986; Hahn, 1981), glucanasi e chitinasi (Davis e Hahlbrock, 1987), la deposizione di callosio, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Galletti et al., 2008)e di ossido nitrico(Rasul et al., 2012). I frammenti di OG che mostrano un'attività elicitoria hanno un grado di polimerizzazione tra 10 e 15. Questa dimensione dei frammenti è ottimale per la formazione dei ponti Ca^{2+} intermolecolari che caratterizzano la struttura "egg box". Altra caratteristica fondamentale che può influenzare l'azione elicitoria degli OG è il loro grado di esterificazione. L'HGA è sintetizzato in una forma esterificata nell'apparato del Golgi e successivamente secreto a livello della parete cellulare dove è in parte de-esterificato dall'azione delle pectina metil-esterasi (PME). Il grado di esterificazione dell'HGA varia inoltre a seconda del tessuto e dello stadio di sviluppo; di conseguenza ci si aspetterebbe che OG con diverso grado di esterificazione siano rilasciati sotto circostanze diverse. Ad oggi non è ancora chiaro come il grado di esterificazione possa influenzare l'attività elicitoria degli OG. E' stato visto che frammenti di OG con un grado di metilazione basso, nei frutti di fragola che sovra-esprimono una PME, è correlato con l'induzione di risposte di difesa e con una parziale resistenza a *Botrytis cinerea* (Osorio et al., 2008).

Durante l'infezione, gli OG sono rilasciati in seguito alla parziale degradazione dell'HGA ad opera di endoPG secrete dai patogeni (Bonivento et al., 2008). Infatti le piante, per limitare l'azione degradativa delle PG, hanno evoluto degli inibitori proteici delle PG, sia di origine fungina che di insetti, chiamati PGIP (D'Ovidio et al., 2004; Mattei et al., 2005).

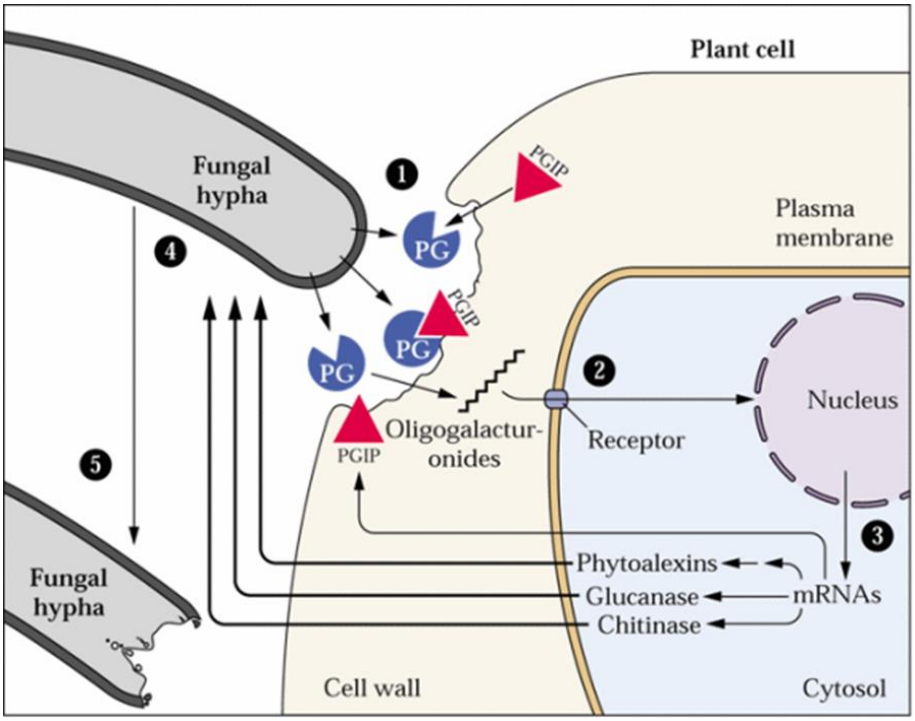


FIGURA 1.4 MODELLO DEL RUOLO DELLA PGIP NEI MECCANISMI DI DIFESA DELLA PIANTA (BUCHANAN ET AL., 2002)

Le PGIP svolgono il duplice ruolo di impedire la degradazione delle pectine e nel contempo favorire l'accumulo degli OG con grado di polimerizzazione compreso tra 10 e 15, attivi nell'indurre risposte di difesa (**FIGURA 1.4**). Dunque anche le PGIP possono essere considerate elementi del PIMS (Ferrari et al., 2013). Inoltre, proprio perché la pectina è tra i primi componenti che vengono modificati quando la parete

subisce il rimodellamento fisiologico, gli OG possono essere importanti non solo nella difesa contro gli agenti patogeni, ma anche nel normale sviluppo fisiologico della pianta (Wolf e Greiner, 2012a). Infatti gli OG funzionano come regolatori della crescita e dello sviluppo, principalmente attraverso un azione antagonista sulle risposte regolate dall'ormone auxina. In particolare è stato dimostrato che gli OG inibiscono la formazione delle radici indotte da auxina in espianti fogliari, sia di tabacco che di Arabidopsis (Bellincampi et al., 1993; Savatin et al., 2011) (**FIGURA 1.5**). Inoltre, in Arabidopsis, l'espressione di numerosi geni, così come quella regolata da un promotore sintetico attivato dall'auxina [DR5, (Ulmasov et al., 1997)], è inibita dagli OG indipendentemente da altri ormoni come l'acido salicilico, l'acido jasmonico o l'etilene. I meccanismi attraverso cui gli OG regolano negativamente l'azione dell'auxina sono ancora poco chiari ma potrebbero esplicarsi a livello dei promotori dei geni indotti da auxina (Savatin et al., 2011).



FIGURA 1.5 ANTAGONISMO OG-AUXINA. Gli OG (pannello in basso) inibiscono la formazione di radici avventizie indotte da auxina (pannello in alto) in espianti fogliari di tabacco. (Bellincampi et al., 1993).

1.4 PIANTE CON ALTERAZIONE *IN MURO* DELLA PECTINA

Per comprendere la funzione delle pectine in un particolare processo, è utile disporre di piante con composizione e struttura dei polisaccaridi di parete alterata. Sono stati già isolati mutanti di Arabidopsis con componente pectica alterata, come il mutante *quartet*, nel quale, durante lo sviluppo del polline, le microspore non si separano a causa della persistenza di polisaccaridi pectici nella parete della cellula madre del polline (Rhee e Somerville, 1998) o il mutante *quasimodo*, che presenta un fenotipo nano e una ridotta adesione tra cellule in concomitanza con una riduzione nei livelli di acido galatturonico (Bouton et al., 2002).

Altri esempi sono il mutante *mur-1*, che presenta una carenza in residui di fucosio che influisce sulla capacità di RG-II di dimerizzare, compromettendo la crescita della pianta (O'Neill et al., 2001), i mutanti *parvus* caratterizzati da bassi livelli di ramificazione del RG-I e da una crescita ed una fertilità influenzata dall'umidità (Lao et al., 2003).

Una strategia alternativa all'isolamento e all'analisi di mutanti con difetti nella composizione biochimica della parete consiste nella manipolazione, *in vivo*, della componente pectica, e nella generazione di piante transgeniche che esprimono, in maniera costitutiva o inducibile, enzimi di origine sia microbica che vegetale per la modificazione della parete. Ad esempio è stato visto che, mentre mutazioni di VGD1, una pectina-metil esterasi altamente espressa in polline in Arabidopsis, si traducono in tubi pollinici instabili (Jiang et al., 2005) la sovraespressione di VGD1 determina una riduzione della crescita che potrebbe essere spiegata con una ridotta estensibilità della parete cellulare (Wolf e Greiner, 2012b). Oppure, l'espressione della endoPG II di *Aspergillus niger* (AnPGII) in piante di tabacco e di Arabidopsis (piante PG) causa una riduzione del contenuto di acido galatturonico e di omogalatturonano deesterificato, rispetto alle piante selvatiche (WT). Le piante PG, sia di Arabidopsis che di tabacco, hanno un fenotipo nano (**FIGURA 1.6**), suggerendo un importante ruolo dell'HGA nei processi di crescita. Sono inoltre più resistenti ai patogeni, confermando l'importanza delle pectine nei processi di difesa. Questi fenotipi sono associati all'attività della AnPGII poiché piante di tabacco che co-esprimono la PGIP2, un forte inibitore di AnPGII, o piante di Arabidopsis che esprimono una AnPGII mutata ed inattiva, sono simili alle piante WT (Capodicasa et al., 2004; Ferrari et al., 2008).

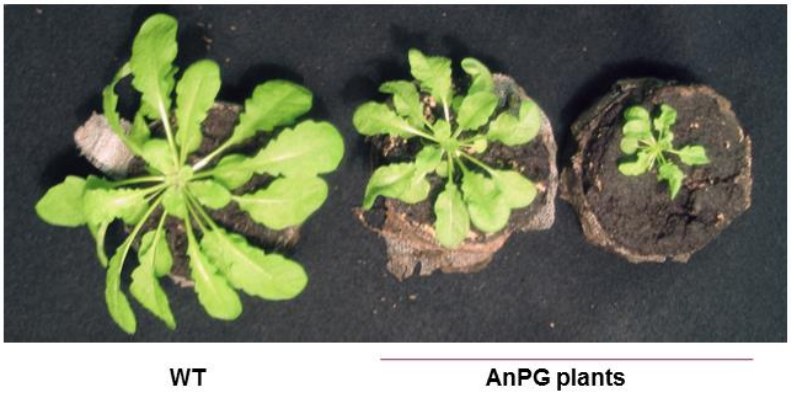


FIGURA 1.6 PIANTE ANPG. Le piante di Arabidopsis che sovraesprimono la AnPGII (a destra) mostrano un fenotipo nano rispetto alle piante WT (a sinistra)(Capodicasa et al., 2004).

Inoltre, piante di Arabidopsis che sovra-esprimono un inibitore della PME (AtPMEI-2) oppure mutate per le PME presentano un alto grado di metil-esterificazione della pectina (Lionetti et al., 2007). Queste piante pur non mostrando un'espressione costitutiva di risposte di difesa, sono più resistenti al fungo *Botrytis cinerea* e al batterio *Pectobacterium carotovorum*, entrambi patogeni necrotrofi. Recentemente è stato inoltre documentato che le piante che sovraesprimono la AtPMEI-2 hanno anche una ridotta sensibilità ai virus, presumibilmente perché, bloccando l'attività delle PME, viene inibito l'aumento del limite di esclusione molecolare dei plasmodesmi necessario per la diffusione delle particelle virali (Lionetti et al., 2014).

Le pectine sono i componenti di parete responsabili della forte coesione tra le microfibrille di cellulosa e le emicellulose; modificare la loro struttura significa liberare la cellulosa e le emicellulose da questa fitta rete per rendere la parete più accessibile agli enzimi idrolitici come le cellulasi, importanti, per esempio, nei processi di produzione di

biocarburanti. Ad esempio, l'espressione della AnPGII o della PMEI in piante di Arabidopsis e di tabacco, oltre a portare alla riduzione dell'omogalatturonano demetil-esterificato, porta ad un incremento della saccarificazione, il processo che trasforma i polisaccaridi in zuccheri semplici e fermentabili (Lionetti et al., 2010) (vedere Cap 2.1).

1.5 SCOPO DEL LAVORO

La parete vegetale è un sistema complesso che riveste un ruolo centrale nello sviluppo e nella percezione degli stimoli esterni nella pianta. Di questa complessa struttura riveste un ruolo fondamentale la pectina. Conoscere i processi e i meccanismi in cui questa è coinvolta è alla base di numerosissimi 'interventi' applicati alle piante, sia di tipo tradizionale, come il miglioramento genetico basato sull'incrocio, o biotecnologico, attraverso la generazione di piante transgeniche.

Il mio studio è parte di un progetto più ampio che mira a chiarire, da una parte, come la struttura della pectina regoli il corretto equilibrio tra sviluppo e difesa, e dall'altra parte, come la sua modificazione possa essere utile per applicazioni biotecnologie come la saccarificazione da biomassa vegetale **(FIGURA 1.7)**.

In particolare, una linea di ricerca mirava a valutare, in Arabidopsis, gli effetti dell'espressione inducibile di un enzima pectico diverso dalla PG, la pectato liasi 1 (*Pc*PL1) del batterio fitopatogeno *Pectobacterium carotovorum*, sullo sviluppo e sulla degradabilità della parete cellulare (capitolo 2). In una seconda linea di ricerca, descritta nel capitolo 3, mi sono proposta di studiare se le alterazioni delle risposte di difesa delle piante con pectina alterata possano essere ascrivibili ad aumentati livelli

di OG nei tessuti. In parallelo, visto che ancora poco si conosce sul sistema di riconoscimento, percezione e trasduzione del segnale, obiettivo del mio lavoro è anche quello di determinare con un approccio fosfoproteomico, quali siano le prime proteine regolate a livello post-traduzionale, dagli OG (capitolo 3).

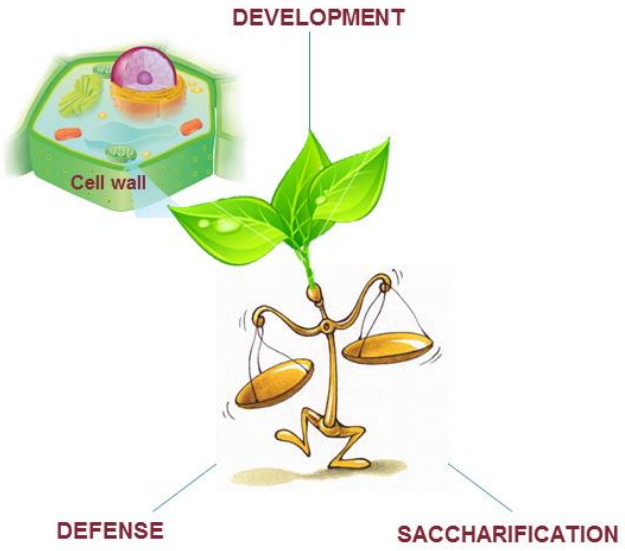


FIGURA 1.7 SCOPO DEL LAVORO. La pectina nella parete cellulare è determinante per qualsiasi applicazione biotecnologica, infatti le sue modifica hanno implicazioni nell'equilibrio tra sviluppo e difesa e nell'utilizzo di biomassa vegetale per la produzione di biofuel.

2. L'ESPRESSIONE CONTROLLATA DI UNA PECTATO LIASI BATTERICA IN *ARABIDOPSIS THALIANA* MIGLIORA LA SACCARIFICAZIONE

2.1 INTRODUZIONE

La diminuzione delle riserve di combustibili fossili e l'aumento della richiesta di energia nei paesi industrializzati chiede alla ricerca un obiettivo: l'identificazione e lo sviluppo di fonti di energia alternative. I combustibili liquidi derivati dalla biomassa vegetale sono una promettente alternativa rinnovabile ai combustibili fossili. In particolare, la produzione di bioetanolo, il combustibile al momento più largamente utilizzabile, rappresenta una valida possibilità, dato il suo limitato impatto sull'ambiente dovuto alla sua bassa tossicità e al minore capacità inquinante rispetto ai carburanti derivanti da petrolio. La sua combustione del bioetanolo, inoltre, non comporta una emissione di anidride carbonica aggiuntiva e non contribuisce all'aumento dell'effetto serra, in quanto il diossido di carbonio liberato è quello precedentemente fissato dalla pianta stessa mediante fotosintesi (Brown et al., 2001).

Attualmente, la maggior parte di bioetanolo è prodotto dalla fermentazione di saccarosio o amido derivanti da colture alimentari come la canna da zucchero, mais e grano (bioetanolo di prima generazione) (Kumar et al., 2008). In Brasile, ad esempio, grandi piantagioni di canna da zucchero sono destinate esclusivamente alla produzione del bioetanolo utilizzato principalmente come carburante per gli autoveicoli, con un una copertura di circa il 40% del fabbisogno interno di carburante (Dashtban et al., 2009). Tuttavia, la concorrenza tra i crescenti bisogni di cibo e carburante, la disponibilità discontinua di materia prima, e gli alti costi di produzione pongono gravi problemi socio-economici e logistici che ostacolano l'adozione su larga scala di questa fonte di energia.

Una valida alternativa all'impiego delle colture alimentari è basata sulla produzione di bioetanolo a partire da materiale lignocellulosico (biomassa) di scarto di colture già esistenti nei singoli paesi (bioetanolo di seconda generazione) (Yuan et al., 2008).

Il processo di produzione del biocarburanti a partire da biomassa prevede tre fasi principali (**FIGURA 2.1**) (Himmel et al., 2007):

1) il materiale lignocellulosico è pretrattato ad alte temperature e/o pressioni con acidi, basi, agenti ossidanti e/o solventi per l'estrazione della lignina, al fine di disorganizzare la struttura base della parete vegetale;

2) la cellulosa e le emicellulose sono idrolizzate a zuccheri semplici con una miscela di enzimi, quali cellulasi ed emicellulasi (saccarificazione);

3) gli zuccheri derivanti, come il glucosio, vengono fermentati da batteri, lieviti o funghi filamentosi, in etanolo.

Attualmente, diversi sono i problemi collegati alla produzione commerciale di etanolo da cellulosa; tra questi, l'alto costo di produzione delle cellulasi da parte di microrganismi cresciuti in bioreattori, ed dei pretrattamenti del materiale ligneocellulosico. Tali trattamenti sono essenziali per l'efficienza del processo (Taherzadeh e Karimi, 2008).

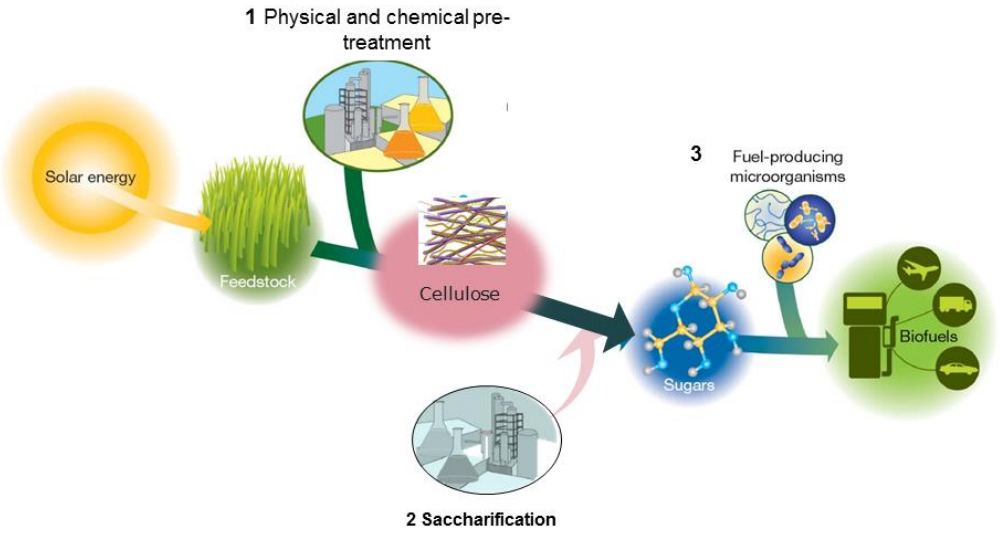


FIGURA 2.1: **BIOCONVERSIONE DEL MATERIALE LIGNOCELLULOSICO IN ETANOLO.** Il materiale lignocellulosico proveniente da scarti di origine vegetale viene sottoposto (**1**) a pretrattamenti con acidi utili a preparare la cellulosa alla successiva saccarificazione (**2**), con la quale si trasformano i polimeri cellulosici in zuccheri semplici e fermentabili. Grazie alla fermentazione da parte di microrganismi (**3**) è possibile ottenere l'etanolo, il quale prima di esser distribuito viene sottoposto a distillazione ed evaporazione. La CO_2 emessa dalla combustione del bioetanolo viene riutilizzata dalle piante per la fotosintesi (modificato da (Rubin, 2008).

L'ingegnerizzazione delle piante, quindi la loro modificazione genetica, potrebbe essere utile per un ridimensionamento delle spese di produzione. Potrebbe infatti consentire l'espressione di enzimi che modificano la quantità e/o la struttura della lignina, per ridurre la necessità di pretrattamenti finalizzati alla sua eliminazione, o che regolano la biosintesi della cellulosa e delle emicellulose, in modo da incrementare la quantità di polisaccaridi fermentabili ad etanolo, oppure che degradano la parete all'interno della stessa pianta, per aumentare l'efficienza di saccarificazione.

Infatti, per esempio, piante con ridotto contenuto di omogalatturonano demetil-esterificato, come quelle che esprimono la

AnPGII (cfr 1.4), risultano più saccarificabili, prospettando la possibilità di una riduzione dei pretrattamenti, e quindi un risparmio sia in termini economici che di inquinamento (Ferrari et al., 2012). Tuttavia, queste piante mostrano una crescita stentata e una ridotta produzione di biomassa, probabilmente come conseguenza della perdita dell'integrità della pectina, durante il ciclo vitale della pianta.

Allo scopo di ottenere delle piante con una normale crescita e sviluppo ma con una maggiore degradabilità della parete, sono state generate piante di Arabidopsis con un espressione controllata (sotto il controllo di un promotore inducibile beta-estradiolo) di un enzima degradativo della pectina diverso dalla PG, la pectato liasi 1 (PL1) del batterio fitopatogeno *Pectobacterium carotovorum* subsp. c*arotovorum*.

Questo enzima è stato scelto perché molto diverso dalle PG, già utilizzate in precedenza allo stesso scopo. Come introdotto nel paragrafo 1.3.2, le pectato liasi (EC 4.2.2.2; PL)) tagliano il legame glicosidico α-1,4 attraverso un meccanismo di β-eliminazione, e non idrolitico come le PG (Marin-Rodriguez et al., 2002), inoltre, per la loro attività degradativa, richiedono ioni calcio (**FIGURA 2.2**), e mostrano un'attività ottimale a valori di pH prossimi a 9 (Herron et al., 2003). Quest'ultima caratteristica consente una attività degradativa molto limitata nell'ambiente acido dell'apoplasto, nel caso di un'espressione basale in assenza d'induttore. Infine, a differenza della AnPGII (cfr 1.4) che è molto sensibili alla metil-esterificazione (Benen et al., 1999), le PL agiscono preferibilmente su pectine parzialmente esterificate (Bartling et al., 1995), offrendo una ulteriore possibilità di miglioramento della saccarificazione del tessuto.

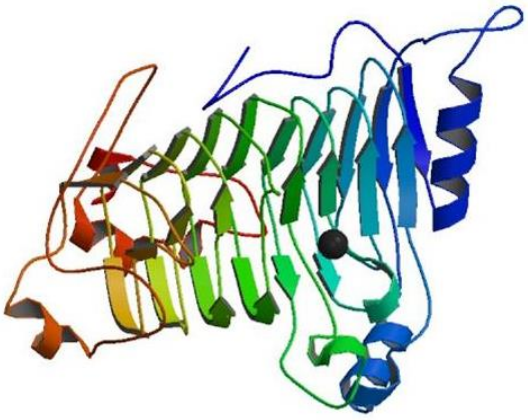


FIGURA 2.2 STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DELLA PECTATO LIASI C DI *ERWINIA CHRYSANTHEMI*. La struttura della PL1 presenta le caratteristiche β-eliche appartenenti a tutti i membri della famiglia di isoenzimi. Evidente è inoltre l'interazione diretta con lo ione calcio (sfera nera). Immagine tratta da (Herron et al., 2003).

2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.2.1 SELEZIONE E ANALISI DI PIANTE PL

Tre linee omozigoti a singola inserzione (PL21.7, PL5.A e PL22.3) sono state selezionate mediante analisi di segregazione condotte su terreno solido contenente antibiotico igromicina (cfr. 2.4.2). Le linee PL5.A e PL22.3 mostravano, in assenza dell'induttore β-estradiolo, un fenotipo normale, mentre la linea PL21 mostrava un fenotipo nano (**FIGURA 2.3**).

Per l'analisi del fenotipo, circa 20 plantule di 7 giorni per ciascun genotipo, cresciute in terreno liquido, sono state poste in presenza di

beta-estradiolo o DMSO da solo come controllo, per 24 e 72 ore. Le piantine transgeniche trattate con DMSO e le plantule WT trattate con beta-estradiolo mostravano foglioline verdi e rigogliose, mentre le plantule transgeniche trattate con l'induttore mostravano foglioline marroni e clorotiche, rivelando una evidente condizione di stress e di blocco della crescita. Il fenotipo di alcune piantine rappresentative è mostrate in **FIGURA 2.4**.

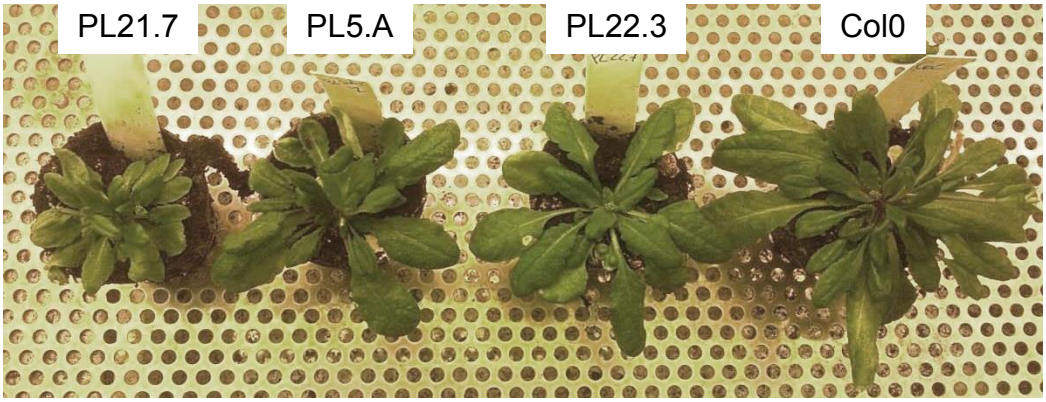


FIGURA 2.4 FENOTIPO DELLE PIANTE PL. Piante di 4 settimane in assenza di induttore. Le linee PL5.A e PL 22.3 mostrano un fenotipo normale mentre la linea PL21.7 ha una ridotta crescita.

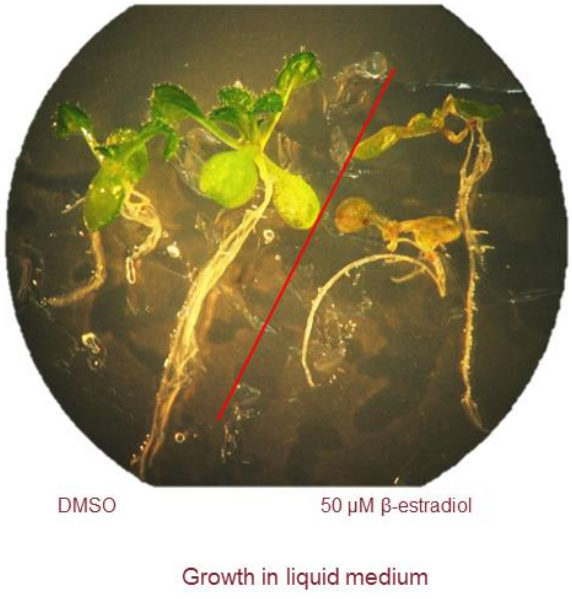


FIGURA 2.3 FENOTIPO DELLE PLANTULE PL1. Sono mostrate alcune piantine (linea PL21.7) di 7 giorni cresciute in terreno liquido e successivamente incubate per 72 ore con beta-estradiolo 50 µM (a destra) o DMSO 0,25% come controllo (a sinistra). Le'osservazioni sono state condotte allo stereomicroscopio. Anche le altre linee transgeniche PL mostravano un fenotipo simile.

.

2.2.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL TRASCRITTO

I livelli dei trascritti di *PL1* sono stati analizzati tramite RT-PCR semi-quantitativa su RNA estratto dalle piante transgeniche (e da quelle WT come controllo) di 3 settimane non trattate o dopo 10 e 24 ore di trattamento con beta-estradiolo. Per tutte e tre le linee, il trascritto non era rilevabile né nelle piante non trattate né in quelle trattate con DMSO come controllo. Solo nella linea PL21.7, un basso livello di trascritto era già evidenziabile dopo 10 ore di trattamento con beta-estradiolo. Il livelli di trascritto aumentavano dopo 24 ore di trattamento con estradiolo, ed era più elevati che quelli delle altre due linee. Le analisi delle linee PL21.7 e PL22.3 sono mostrati in **FIGURA 2.5**.

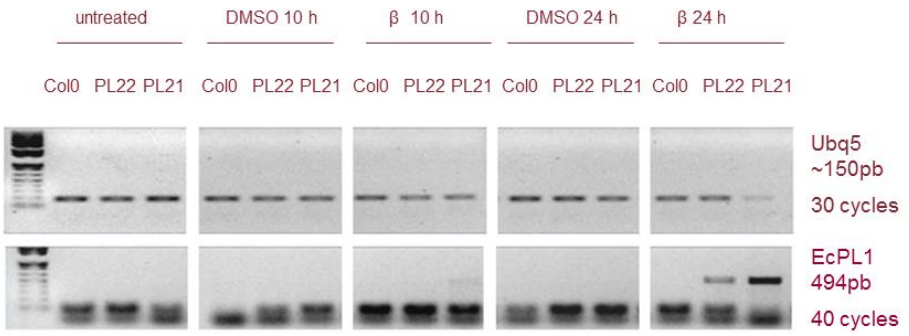


FIGURA 2.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL GENE PL1 NELLE PIANTE TRANSGENICHE. Analisi di RT-PCR semiquantitativa condotte su cDNA ottenuto da piante wild type (Col-0) e piante PL22 e PL21 di 3 settimane (untreated) oppure trattate con beta-estradiolo (β) o DMSO, come controllo, per 10 e 24 ore. Per l'amplificazione dei geni analizzati sono state utilizzate coppie di primer specifiche. Come riferimento è stato utilizzato il gene *UBQ5*, codificante per l'ubiquitina

2.2.3 Analisi dell'attività enzimatica

L'attività enzimatica della PL1 espressa nelle linee transgeniche stata determinata estraendo le proteine totali da piante di 4 settimane 72 ore dopo essere state spruzzate con beta-estradiolo (50 µM) e valutando l'attività PL attraverso un saggio enzimatico di diffusione su piastra. Come mostrato in Figura 2.6, dopo induzione con estradiolo, la PL21.7 e PL5.A presentavano una buona attività enzimatica, mentre la PL22 mostrava una attività più bassa. Non si rilevava invece attività né nelle foglie delle piante di controllo WT né nelle foglie delle piante PL trattate con solo DMSO (**Figura 2.6**).

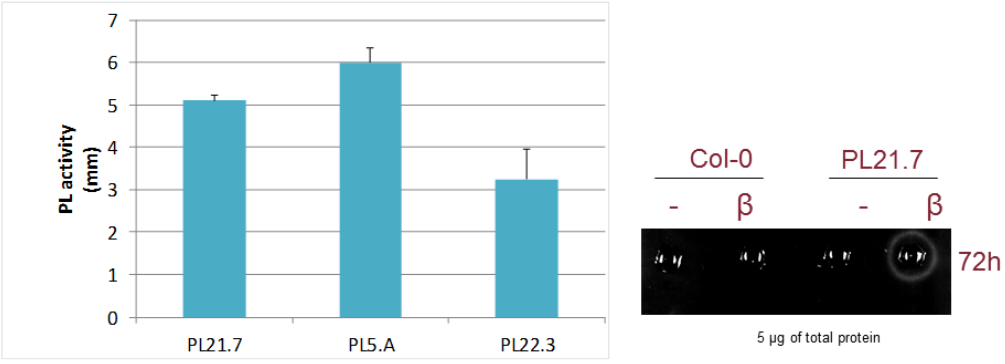


Figura 2.6 Saggi di attività enzimatica sugli estratti proteici di foglie delle piante PL. A destra particolare di un saggio di diffusione su agarosio per rilevare l'attività della pectato liasi. L'attività enzimatica è evidenziata dalla presenza di un alone bianco dovuto alla degradazione del substrato. Sono stati analizzati 5 µg di proteine totali per ogni campione. A sinistra, il grafico mostra l'attivita' enzimatica di estratti di foglie provenienti da piante di 4 settimane dopo un trattamento di 72 ore con beta-estradiolo.Le barre rappresentano la media di 4 replicati ± la deviazione standard.

2.2.4 ANALISI DELLA DIGERIBILITÀ DELLE PIANTE PL

Poiché ci si aspetta che la pectato liasi espressa *in muro* nelle transgeniche sia in grado di alterare la struttura della parete cellulare, le piante PL sono state analizzate per la loro capacità di essere degradate da enzimi idrolitici delle pareti. Per la saccarificazione, è stata utilizzata una miscela di enzimi (Celluclast) composta prevalentemente da cellulasi. Per favorire l'attività enzimatica, prima dell'incubazione con il Cellulast, gli espianti fogliari di piante di 3 settimane trattate con DMSO oppure beta-estradiolo (50 μM) sono stati preincubati per 24 ore in un tampone a pH 8 (cfr 2.4.6) e poi trattati con la miscela enzimatica per 24 ore. L'efficienza di saccarificazione è stata calcolata come la percentuale di glucosio rilasciato dopo incubazione con Cellulast rispetto agli zuccheri totali iniziali (cfr 2.4.6). Come è possibile vedere nel grafico in **FIGURA 2.7** per tutte le linee transgeniche, il trattamento con beta-estradiolo ha portato un aumento dell'efficienza di saccarificazione sia rispetto ai controlli trattati con DMSO sia rispetto alle piante WT trattate con beta-estradiolo.

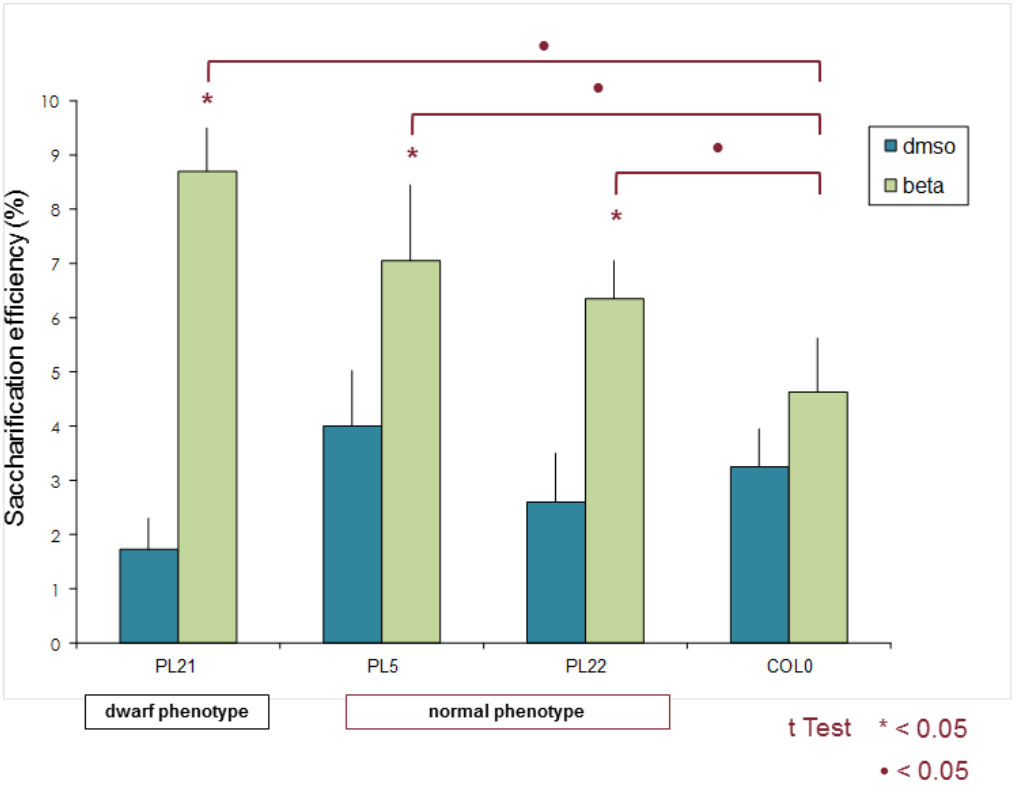


FIGURA 2.7 EFFICIENZA DI SACCARIFICAZIONE DELLE PIANTE PL1. espianti fogliari di piante di 3 settimane WT e piante PL trattate per 72 ore con beta-estradiolo (verde scuro) o DMSO (verde chiaro) come controllo, sono state incubate con Cellulast dopo pre-incubazione di 24 ore con buffer a pH8 per favorire l'attività enzimatica della PL. La saccarificazione è stata misurata dopo 24 ore di incubazione con Cellulast ed è riportata come la % di glucosio rilasciato sugli zuccheri totali. Le barre rappresentano la media di 4 efficienze di saccarificazione ± deviazione strandard; l'asterisco direttamente sopra la barra indica la differenza statistica tra trattamenti nella stessa linea PL mentre il pallino nero sopra la parentesi quadrata indica la differenza statistica tra piante WT e linee PL trattate con beta-estradiolo misurata con il T student test (<0.05). L'esperimento è stato ripetuto due volte con risultati similari.

2.3 CONCLUSIONI

Le piante che esprimono la pectato liasi 1 (PL1) di *Erwinia carotovorum (*dopo induzione dell'espressione del transgene con estradiolo) sono più efficientemente saccarificabili. Come per le piante PG (Francocci et al., 2013; Lionetti et al., 2010), probabilmente l'aumento della saccarificazione in queste piante è collegata ad un più basso contenuto di omogalatturonano deesterificato. Questi risultati indicano che l'efficienza di saccarificazione può essere migliorata, non solo con modifiche 'costitutive' che interessano le pectine nella parte vegetale, ma anche ottenuta attraverso l'espressione controllata dell'attività enzimatica. Questa strategia permetterebbe un maggior utilizzo del materiale di scarto delle produzioni agricole come fonte primaria per il bioetanolo in quanto una attività enzimatica pectinolitica controllata eviterebbe effetti indesiderati sul fenotipo della pianta, una caratteristica importante soprattutto per le piante di interesse agronomico.

2.4 MATERIALI E METODI

2.4.1 MATERIALE BIOLOGICO UTILIZZATO NEGLI ESPERIMENTI

Sono stati utilizzati semi di *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 [Col-0; wild type (WT)] e semi di generazione T2 di linee transgeniche PL, ottenuti dalla trasformazione di piante Col-0 mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. Il plasmide per la trasformazione era stato ottenuto dal vettore pMDC7 per l'espressione inducibile da β-estradiolo (Zuo et al., 2000), clonandovi all'interno la sequenza codificante la porzione matura della pectato liasi 1 (*Pc*PL1) di *Pectobacterium carotovorum* (GenBank: CAA57439.1) fusa al peptide segnale per la traslocazione nel reticolo endoplasmatico di PvPGIP2 (Leckie et al., 1999).

2.4.2 CONDIZIONI DI CRESCITA

Sia le piante cresciute in terra sia le plantule cresciute in terreno liquido o solido sono state poste in camera di crescita in condizioni controllate a 22°C, 70% di umidità, con luce solare di 100 µE m^{-2} s^{-1}, e un fotoperiodo di 16 ore h di luce e 8 di buio.

Per la crescita su terreno sia solido che liquido, i semi sono stati prima sterilizzati sotto cappa sterile a flusso laminare, ponendoli 1 min in alcool isopropilico, poi 10 min nella soluzione per la sterilizzazione (0,01% SDS, 1,6% NaClO) e sottoponendoli poi a 5 lavaggi con H_2O sterile. Dopo l'ultimo lavaggio, i semi, avvolti nella carta alluminio, sono stati messi a stratificare per 3 giorni a 4°C per sincronizzare la

germinazione. I semi sterilizzati sono stati cresciuti in terreno liquido [composto da Murashige Skoog Basal Medium (Sigma), 2,2 g/l, e saccarosio 0,5%), o solido (con aggiunta di Plant Agar 0,8%), in presenza di antibiotico igromicina (20 µg/ml) per la selezione o beta-estradiolo (50 µM in 0,25% DMSO) per l'induzione.

2.4.3 ANALISI FENOTIPICA DELLE PLANTULE

Le plantule cresciute in terreno liquido sono state analizzate tramite stereomicroscopio Stemi2000 della Zeiss (obiettivo 10x), e le fotografie sono state ottenute con una Canon Powershot G3 (Tokyo) collegata allo stereomicroscopio.

2.4.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

I tessuti fogliari, dopo congelamento con azoto liquido sono state omogenizzate tramite l'uso di un mulino a palle Mixer Mill MM301 (RETSCH) per 2 minuti a 30 Hz utilizzando sfere di macinazione in acciaio con diametro di 2 mm e l'RNA è stato estratto con Isol-RNA Lysis Reagent (5'-Prime) seguendo le indicazione del produttore. L'RNA (2 µg) è stato trattato con DNasi (RQ1 DNase Promega) in un volume finale di 10 µl, e 2.5 µl della reazione sono stati usati per sintetizzare il cDNA con la trascrittasi inversa ImProm-II (Promega), secondo le istruzioni del produttore. I livelli di espressione della PL1, valutati rispetto al gene costitutivo di riferimento ubiquitina 5 (*UBQ5*), sono stati valutati mediante PCR semiquantitativa. In particolare, il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione (2 µl), è stato amplificato utilizzando coppie di oligonucleotidi specifiche per ciascun gene in esame:

per *UBQ5*:

-UBQ5fw-5’-GGAAGAAGAAGACTTACACC,

-UBQ5rev-5’-AGTCCACACTTACCACAGTA;

per *PL1*:

-PLfw-5’-TTATTACCTACAACGGTAATGAAGATGC,

-PLrev-5’-TGAGTTAACATCGCTGTAAATATTGTGA).

Per la reazione è stata utilizzata Taq DNA polimerasi (RBC Bioscience). I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati mediane colorazione con etidio bromuro.

2.4.5 Estrazione di proteine e saggio di attività da tessuti vegetali

Le plantule o i tessuti fogliari, dopo congelamento con azoto liquido, sono state omogenizzate tramite l'uso di un mulino a palle Mixer Mill MM301 (RETSCH) per 2 minuti a 30 Hz utilizzando sfere di macinazione in acciaio con diametro di 2 mm. Ai campioni polverizzati è stato aggiunto il tampone per l'estrazione delle proteine (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 200 mM) in rapporto di 2 ml/g e le miscele sono state centrifugate a 13000g per 15 minuti a 4 °C. Il sovranatante ottenuto delle centrifugazione è stato prelevato e trasferito in nuove provette. Il contenuto proteico è stato determinato mediante saggio di Bradford (Bradford, 1976) e l’attività della pectato liasi è stata determinata tramite un saggio di diffusione su piastra di agarosio, con alcune modifiche rispetto a quello descritto in Capodicasa et al.(2004). In particolare, la piastra di agarosio è stata preparata con Tris-HCl pH 8.5 100 mM, $CaCl_2$ 0.3 mM, acido poligalatturonico 0.5% e agarosio 0.8%.

2.4.6 IDROLISI ENZIMATICA E DETERMINAZIONE DELL'EFFICIENZA DI SACCARIFICAZIONE

L'idrolisi enzimatica è stata effettuata su espianti fogliari, prelevati dopo 72 ore da piante di 3 settimane trattate con 50 µM beta-estradiolo in 0,25% DMSO oppure 0,25% DMSO da solo come controllo, con alcune modifiche rispetto a quello descritto in Francocci et al. (2013). In particolare gli espianti fogliari sono stati incubati in Tris-HCl at pH 8 50 mM per 24 ore prima dell'incubazione con Celluclast 1.5 L.

L'efficienza di saccarificazione è stata calcolata come la percentuale di glucosio rilasciato dall'idrolisi enzimatica rispetto al contenuto di zuccheri totali presenti nel tessuto prima dell'idrolisi. Gli zuccheri totali sono stati misurati tramite il saggio spettrofotometrico Dubois (Dubois et al., 1956) mentre il glucosio rilasciato è stato determinato tramite HPAEC-PAD (cromatografia a scambio anionico ad alta prestazione con rilevamento amperometrico pulsato (HPAEC-PAD; Ion Chromatography System ICS-3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) come descritto in Francocci et al. (2013).

3. MANIPOLAZIONE DEI LIVELLI DI OG IN VIVO

3.1 INTRODUZIONE

Gli oligogalatturonidi (OG) (cfr 1.3.3) sono uno dei più importanti elementi del PIMS (cfr 1.3.2) e rappresentano un fondamentale indicatore dello stato della pectina e quindi dell'integrità della cellula, sia in condizioni normali che in quelle sfavorevoli. Il ruolo degli OG, sia nella difesa sia nello sviluppo, è ben documentato da molti studi *in vitro* (Ferrari et al., 2013), mentre le evidenze *in vivo* del loro ruolo sono poche e carenti. Un aspetto molto affascinante, che ancora non è stato chiarito, è come le piante riescano a discriminare tra basse quantità di OG, prodotte da eventi di accrescimento e/o a processi di rimodellamento se non anche da microorganismi benefici, da alte quantità prodotte in seguito ad attacco dei patogeni.

Una seria limitazione di questi studi è posta dalla difficoltà di rilevamento degli OG *in vivo*, se non in presenza di un massiccio degrado tessutale che si verifica in genere solo nelle fasi tardive di una infezione quando ormai la segnalazione è però già avvenuta (An et al., 2005).

Per questo motivo un scopo del mio lavoro è stato quello di caratterizzare piante transgeniche in cui i livelli di OG endogeni potessero essere modulati in modo controllato. Questa caratteristica è stata ottenuta mediante l'espressione, in maniera inducibile da beta-estradiolo, di una proteina chimerica, secreta nell'apoplasto, costituita dalla PG di *Fusarium phyllophilum* (FpPG) e un suo inibitore proteico, la PvPGIP2 di fagiolo (Benedetti et al., 2013) (cfr 1.3.3). Una tale proteina chimerica garantisce un accumulo equimolare e simultaneo delle due proteine in pianta, espressione difficilmente ottenibile sia incrociando piante transgeniche che esprimono separatamente le due proteine

(Capodicasa et al., 2004; Manfredini et al., 2005), sia utilizzando un costrutto per la loro espressione come singole proteine, poiché il loro tasso di trascrizione, traduzione e modificazione post-trasduzionale è presumibilmente molto diverso. Sono stati provati diversi *linkers* per ottenere la fusione delle due proteine; il più adeguato è stato quello composto da tre residui di alanina, che, sulla base di dati strutturali disponibili, permette esclusivamente interazioni intermolecolari tra le due proteine. Le piante ottenute (chiamate piante **OGM**, da *OG machine*) hanno mostrato una ridotta efficienza di saccarificazione dopo induzione della proteina chimerica (dati non pubblicati del Dott. Manuel Benedetti), presumibilmente perché in queste piante una attivazione delle risposte di difesa provoca un rafforzamento della parete. Infatti, dopo induzione con beta-estradiolo, le piante esprimono diverse risposte di difesa (tra cui l'accumulo di specie attive dell'O_2, un aumento di deposizione di callosio,e dell'espressione dei geni di difesa). Per questo queste piante risultano anche più resistenti ai patogeni (per esempio al fungo *B. cinerea*) (dati non pubblicati del Dott. Manuel Benedetti) (**FIGURA 3.1**). Scopo del mio lavoro è stato quello di dimostrare che il fenotipo indotto dall'espressione della proteina chimerica è imputabile ad un reale accumulo di OG *in vivo*. Per questo mi sono avvalsa di procedure da me precedentemente a punto per l'analisi fine della composizione e della struttura della pectina nella parete cellulare e, in particolare, dei frammenti di parete rilasciati *in vivo*.

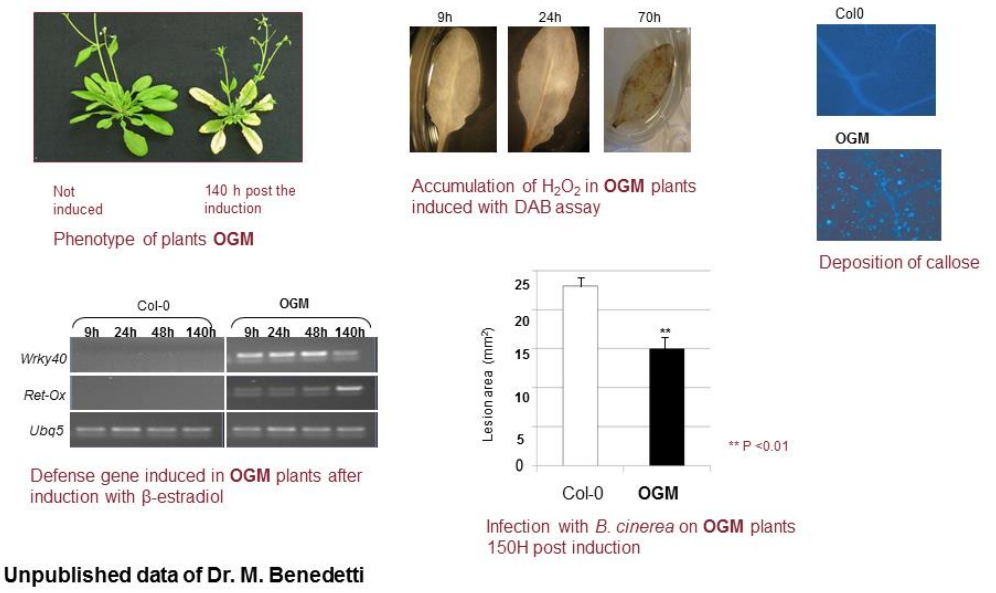


FIGURA 3.1 LE PIANTE OGM HANNO ATTIVE ALCUNE RISPOSTE DI DIFESA E SONO PIÙ RESISTENTI A *BOTRYTIS CINEREA*.

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.2.1 ESTRAZIONE DEI FRAMMENTI PECTICI DA TESSUTI DI PIANTE OGM

Per valutare se le piante **OGM**, in seguito all'espressione della proteina chimerica, accumulassero degli OG, ho estratto la frazione ChASS, costituita principalmente da pectina, da tessuti fogliari a diversi tempi di induzione con beta-estradiolo (zero, 24, 70 e 170 ore). A questo scopo, ho prima ottenuto la frazione indicata come AIS (cfr 3.4.3), che rappresenta le pareti totali, e da questa, utilizzando chelanti del calcio come il CDTA e l'ossalato di ammonio, ho estratto la frazione ChASS

(cfr 3.4.4). Importante per ottenere una frazione ChASS che contenga anche i frammenti di pectina, e non solo la pectina ad alto peso molecolare, è il tempo di incubazione dell'AIS nel tampone di estrazione (2 ore). L'analisi mediante cromatografia ionica HPAEC-PAD delle frazioni ChASS ottenute con questa procedura ha permesso di rilevare, all'aumentare del tempo di trattamento con beta-estradiolo, un aumento di frammenti che non compaioni nelle piante prima dell'induzione della proteina **OGM**. Il profilo dei frammenti ottenuto è compatibile con la presenza di OG (**FIGURA 3.2**).

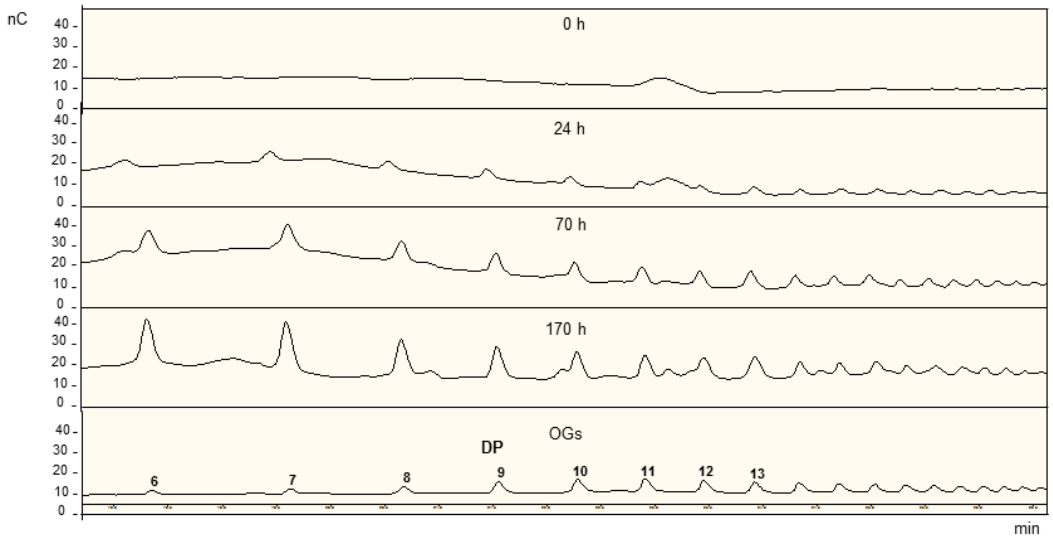


FIGURA 3.2 ANALISI DELLA FRAZIONE CHASS ESTRATTA DA FOGLIE DI PIANTE OGM MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA (HPAEC-PAD). Nei pannello più in basso (OGs) è visualizzata l'analisi dello standard di OG che mostra gli oligomeri con DP da 6 fino a 13, con una distribuzione a campana centrata sull'oligomero con DP=10. Nel pannelli sono mostrate le analisi dei campioni ChASS provenenti da piante **OGM** a 0, 24, 70 e 170 ore di trattamento con beta-estradiolo. Come si può osservare nei campioni sono presenti frammenti simili agli OG con una prevalenza di quelli con grado di polimerizzazione tra 6 e 10 che aumentano all'aumentare del tempo di induzione.

3.2.2 Analisi mediante spettrometria di massa dei frammenti pectici ottenuti da piante OGM

Per confermare che i frammenti recuperati dalle piante OGM fossero OG, ho sottoposto le frazioni ChASS, già analizzate mediante cromatografia ionica, ad analisi di spettrometria di massa MALDI-ToF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight").

In questa analisi, una tappa critica è l'eliminazione dal campione dei sali che interferiscono sia con la cristallizzazione con la matrice, necessaria per la ionizzazione del campione, sia con l'analisi della massa. Infatti gli ioni, in particolare gli ioni sodio e/o potassio, creano con i frammenti di acido poligalatturonico degli addotti che, se un parte mi permettono un rilevamento in modalità positiva, da un'altra parte, in concentrazione troppo elevata, non permettono una buona risoluzione della massa.

Per la rimozione dei sali, le frazioni ChASS sono state prima precipitate e lavate con etanolo, e poi trattate con una resina scambiatrice di ioni positivi (cfr3.4.6). L'analisi della frazione ChASS proveniente da piante OGM trattate a 170 ore con beta-estradiolo ha permesso di evidenziare la presenza di OG con un grado di polimerizzazione tra 6 e 13 (**Figura 3.3**).

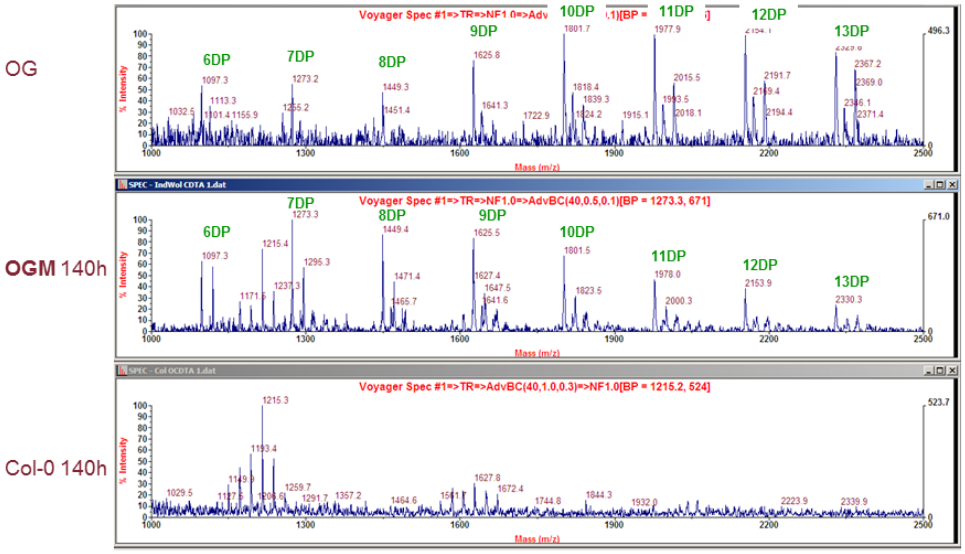


FIGURA 3.3 ANALISI DELLA FRAZIONE CHASS MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI ToF. Spettri delle masse comprese tra 1000 e 2500 Da. In verde è segnato il numero di residui di acido galatturonico corrispondente al picco della massa in questione. In alto (**OG**) è mostrato lo spettro di massa di uno standard di OG Sono visibili gli oligomeri a partire dall'esamero fino ad un DP di 13.Nel pannello centrale è mostrato lo spettro di massa della frazione ChASS proveniente da piante **OGM** trattate per 170 ore con beta-estradiolo. Sono visibili gli oligomeri con un grado di polimerizzazione compreso tra 6 e 13, non rilevabili allo stesso tempo di trattamento nelle piante WT. E' da notare inoltre che le masse osservate corrispondono ad addotti con uno ione Na+: per esempio, il decamero ha un valore m/z atteso di 1779, mentre quello osservato è di 1801, con una differenza di 22 Da corrispondente alla massa dello ione Na+.

3.3 CONCLUSIONI

La prima prova che i frammenti pectina inducono risposte di difesa è stato fornito più di 30 anni fa, analizzando l'accumulo di fitoalessine in cotiledoni di soia (Hahn et al., 1981). Questi frammenti che inducono risposte di difesa, chiamati elicitori endogeni, sono stati successivamente identificati come oligogalatturonidi, ipotizzando che il loro accumulo fosse causato dalla degradazione dell'omogalatturonano (uno dei principali componenti della pectina della parete cellulare), durante le infezioni microbiche. Inoltre è stato ipotizzato, da studi effettuati *in vitro*, un ruolo fondamentale per la produzione ed accumulo di questi elicitori da parte delle poligalatturonasi e dei loro inibitori proteici, PGIP (**FIGURA 1.4)**.(Cervone et al., 1989). Negli anni successivi, si è cercato di chiarire il meccanismo di azione degli OG e studiare la loro capacità di attivare le difese vegetali nonché di incidere, come antagonisti locali dell' auxina, nella crescita e nello sviluppo delle piante. Tuttavia, anche se gli effetti dei OG nella difesa, ed in parte anche nello sviluppo, delle piante sono ben caratterizzati, l'accumulo *in vivo* di queste molecole in condizioni normali o durante una situazione di stress non è stato ancora dimostrato. Per questo motivo è stata progettata nel laboratorio dove ho svolto questa tesi, l'espressione controllata, in pianta, della proteina chimerica (**OGM**) costituita dalla PvPGIP2 e la FpPG, potenzialmente capace di rilasciare OG. L'espressione dell'**OGM** in *A. thaliana* è in grado di attivare una vasta gamma di risposte di difesa che sono generalmente indotte dal trattamento esogeno di OG. Gli studi da me effettuati sulla frazione pectica delle piante transgeniche OGM ha mostrato un accumulo di OG collegato all'attività della proteina

chimerica. In conclusione, l'attività dell'**OGM** ci ha permesso di modulare i livelli di OG direttamente *in vivo* e collegarli alle risposte di difesa, dando la prima dimostrazione sperimentale del rilascio in vivo di questa classe di elicitori. Questo studio, che dimostra l'esistenza di questi elicitori, può essere finalizzato ad un'importante applicazione biotecnologica relativa alla resistenza migliorata conferita dalla proteina **OGM** contro le infezioni microbiche. A questo scopo, abbiamo posto il gene codificante la **OGM** sotto il controllo di un frammento del promotore del gene PR-1 di Arabidopsis (PPR1), la cui induzione avviene principalmente a seguito della percezione microbica. Le piante transgeniche ottenute sono più resistenti ad alcuni patogeni (per esempio *B. cinerea*), e non hanno alterazioni nella crescita e sviluppo, indicando che abbiamo ottenuto un buon compromesso tra sviluppo della pianta e resistenza acquisita. Dunque l'espressione dell'OGM sotto il controllo di un promotore sensibile a diversi patogeni può essere un potente strumento che conferisce alle piante una resistenza di lunga durata e ad ampio spettro contro molti patogeni (dati in pubblicazione). Sarà interessante valutare in futuro se le stesse piante con un livello minimo di OG, per cui con risposte di difesa attivate ma non elevate, abbiano anche la pectina abbastanza modificata per essere più efficientemente saccarificabili e per cui interessanti anche per la produzione di biocarburanti.

3.4 MATERIALI E METODI

3.4.1 MATERIALE BIOLOGICO UTILIZZATO NEGLI ESPERIMENTI

Sono stati utilizzati semi di *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 [Col-0; wild type (WT)] e semi di generazione T3 di linee transgeniche **OGM**, ottenuti dalla trasformazione di piante selvatiche Col-0 mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. Il plasmide per la trasformazione era stato ottenuto dal vettore pMDC7 per l'espressione inducibile da β-estradiolo (Zuo et al., 2000), clonandovi all'interno la sequenza codificante la porzione matura della PvPGIP2 (comprensivo della sequenza di secrezione in apopalasto) (Leckie et al., 1999), fusa al gene FpPG (Benedetti et al., 2011). I due geni sono separati da tre residui Ala.

3.4.2 CONDIZIONI DI CRESCITA

Le piante sono state cresciute in terra in camera di crescita in condizioni controllate a 22°C, 70% di umidità, con luce solare di 100 µE m^{-2} s^{-1}, e un fotoperiodo di 16 ore h di luce e 8 di buio.

Per le analisi, piante di 4 settimane, ottenute da semi stratificati per 3 giorni a 4°C per sincronizzare la germinazione, sono state trattate, a diversi tempi, con 50 µM beta-estradiolo in 0,25% DMSO.

3.4.3 ESTRAZIONE DELLA PARETE CELLULARE TOTALE (AIS: ALCHOOL INSOLUBLE SOLIDS)

Espianti fogliari (100 mg) delle piante **OGM** o WT trattate con beta-estradiolo sono state congelati in azoto liquido ed omogeneizzati tramite

l'uso di un mulino a palle Mixer Mill MM301 (RETSCH) per 2 minuti a 30 Hz, utilizzando sfere di macinazione in acciaio con diametro di 6 mm. I campioni polverizzati sono stati risospesi in 1 ml etanolo 70%, centrifugati a 20000xg per 10 minuti mantenendo il pellet e scartando il sovranatante. Il pellet è stato lavato due volte con 1 ml di una miscela di cloroformio:metanolo 1:1 e due volte con 1 ml di acetone 80%, centrifugando. Tale operazione è stata ripetuta 2 volte fino alla scomparsa della clorofilla. Il pellet è stato quindi asciugato all' aria per 12 ore.

3.4.4 Frazione solubile ad agenti chelanti (ChaSS: "Chelating Agent-Soluble Solids")

La frazione AIS è stata risospesa con 200 µl di una soluzione composta da ammonio acetato a pH 5.0 50 mM, CDTA 50 mM e ossalato di ammonio 50 mM, e mantenuto in agitazione a temperatura ambiente per due ore; dopo centrifugazione a 20000 g per 10 min è stato recuperato il sopranatante (frazione ChASS).

3.4.5 Cromatografia ionica (HPAEC-PAD)

Venticinque µl di campione (campione standard di OG oppure aliquote di frazioni ChASS ottenuta da foglie) sono stati sottoposti a cromatografia ionica (HPAEC-PAD: high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection) utilizzando una colonna (3x250 mm) e precolonna (3x50 mm) a scambio anionico Carbopac PA200 (Dionex), montata su un HPLC ICS3000 della Dionex. Prima dell'iniezione del campione la colonna è stata equilibrata con il

90% KOH 50 mM (tampone A), 10% di KOH 50 mM, acetato di potassio 1 M (tampone B) per 10 minuti. La separazione è avvenuta ad un flusso di 0,4 ml/min applicando alla colonna un gradiente lineare da 90% al 20% del tampone A e da 10% all'80% del tampone B in 30 minuti ed infine lavata con 50 mM KOH 1M acetato di potassio per 2 minuti. I frammenti pectici sono stati rilevati mediante un rivelatore amperometrico pulsato con l'uso di un elettrodo d'oro utilizzando la forma d'onda A, secondo le istruzioni del produttore.

3.4.6 MALDI-TOF ("MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION- TIME OF FLIGHT")

Cento µl di campione frazione ChASS sono stati precipitati con etanolo assoluto per 2 ore a -20° C; dopo centrifugazione a 20000g per 10 minuti e 2 lavaggi con etanolo 80 %, il pellet è stato fatto asciugare all' aria per 10 minuti e risospeso con 10 µl di acqua per massa (Carlo erba). I campioni sono stati pre-trattati con resina Biorex MSZ (Biorad) per 10 minuti a temperatura ambiente. Un µl del campione miscelato a 1 µl di matrice DHB 5 % in TFA 0,2 %, è stato fatto cristallizzare, sotto vuoto, su piastra MALDI (Bioscience), ed analizzati allo spettrometro di massa MALDI-TOF (Voyager DE-STR Applied Biosystems, MA). Ogni spettro è stato ottenuto dalla media di 1000 spari ("shots") indipendenti, e rilevato in modalità positiva con una tensione di accelerazione di 20.000 V e un tempo di ritardo di 350 ns. Uno spettrometro di massa è costituito dalle seguenti unità modulari: una sorgente per la produzione degli ioni, uno o più sistemi di separazione, in funzione del rapporto massa/carica (m/z), degli ioni prodotti e di eventuali frammenti da essi generati (analizzatori); un rivelatore con relativa amplificazione dei

segnali. La spettrometria MALDI-TOF combina la ionizzazione per desorbimento da laser assistito da matrice con un analizzatore a tempo di volo. Nella sorgente MALDI, un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole incorporate in una matrice depositata sul target. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, fino a portarli nella regione priva di campo del tubo di volo. L'energia cinetica di ciascuno ione è $zV = ½ mv^2$, proporzionale alla carica dello ione (z) ed al voltaggio di accelerazione (V). Il tempo di volo $t = L/v$, dove L è la lunghezza del tubo di volo e v è la velocità dello ione. Combinando queste equazioni si vede quindi che $t = L(m/2zV)^{1/2}$, cioè il tempo di volo dipende dalla radice quadrata del rapporto m/z di ciascuno ione, e gli ioni vengono separati in modo tale che quelli di massa inferiore raggiungono il rivelatore per primi. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione. L'analizzatore TOF da noi utilizzato includeva uno specchio ionico "reflectron" posto alla fine del tubo di volo, costituito da una serie di elettrodi a voltaggi crescenti e dello stesso segno rispetto alla carica degli ioni generati in sorgente. Il reflectron migliora la risoluzione dei picchi ottenuti, estendendo il percorso di volo dello ione. Ioni che hanno maggiore energia cinetica penetrano più in profondità nel reflectron rispetto a ioni che hanno energia cinetica minore. Questo si traduce in traiettorie diversificate. Se il potenziale applicato al reflectron è opportunamente scelto, avviene una correzione per gli ioni aventi medesimo m/z, ma con lievi differenze di energia, che saranno focalizzati nel tempo fornendo picchi più stretti nello spettro (risoluzione più elevata)

.

4. La percezione e la segnalazione degli OG a livello della membrana plasmatica: eventi precoci di fosforilazione in risposta agli OG, in Arabidopsis.

4.1 INTRODUZIONE

Molti degli studi recenti sulle risposte di difesa indotte dagli OG sono stati condotti nel sistema modello *Arabidopsis thaliana*. Da questi studi, si è compreso che l'immunità innata innescata dagli OG ha molti punti in comune con quella indotta dai MAMP ("Microbe-Associated Molecular Patterns") (Bittel e Robatzek, 2007). I MAMP sono strutture o componenti molecolari conservati evolutivamente e comuni a diverse classi di patogeni, e il loro riconoscimento nella pianta è mediato da recettori localizzati a livello della membrana plasmatica (PRR: "Patter Recognition Receptors"). Una delle coppie MAMP-PRR più studiate è quella formata da flg22 (un peptide di 22 aminoacidi corrispondente alla porzione N-terminale della flagellina batterica) e FLS2. FLS2 appartiene alla famiglia dei recettori RLK e presenta un dominio extracellulare caratterizzato da domini con ripetizioni ricche in leucina (LRR), un dominio trans-membrana e un dominio chinasico intracellulare ricco in serine e treonine. In seguito al legame di flg22 a FLS2, il dominio chinasico di FLS2 è rapidamente fosforilato, divenendo in grado di interagire con BAK1 [Brassinosteroid-insensitive 1 (BRI1)-associated receptor kinase 1] (Chinchilla et al., 2007). Questa eterodimerizzazione induce la trans-fosforilazione del dominio chinasico di BIK1 (Botrytis-induced kinase 1), che generalmente si trova debolmente associato a FLS2 (Schulze et al., 2010). In seguito alla formazione del dimero FLS2-BAK1, e alla fosforilazione di BIK1, quest'ultima si stacca dal complesso, agendo a livello citoplasmatico e attivando la via di trasduzione a valle. Questa è caratterizzate dalla cascata di fosforilazioni delle "mitogen-activated protein kinase" (MAPK). La cascata delle

MAPK è una sequenza di eventi di fosforilazione che parte dalla fosforilazione delle triple chinasi MAP (MEKK), le quali fosforilano a valle le doppie chinasi MAP (MKK) che a loro volta fosforilano le chinasi MAP (MPK) (Rasmussen et al., 2012). Queste ultime fosforilano substrati a valle, come ad esempio fattori trascrizionali, regolando l'espressione genica (Navarro et al., 2004). Oltre all'attivazione delle MAPK, altri eventi precoci in seguito al riconoscimento di flg22 comprendono l'attivazione di proteine G di membrana con conseguente apertura dei canali per il Ca^{2+}. L'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} è da una parte percepito da proteine che legano il Ca^{2+} (come la calmodulina e le protein-chinasi calcio-dipendenti, CDPK) che attivano una serie di fattori trascrizionali, dall'altra, è correlato alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), da parte di NADPH ossidasi di membrana, e di ossido nitrico (NO), noti per esercitare un'azione antimicrobica (Gomez-Gomez e Boller, 2002; Melotto et al., 2006). Un'altra risposta importante generata da flg22 è la biosintesi di acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) e etilene (ET), che rivestono un ruolo centrale nella risposta sistemica acquisita (Durrant e Dong 2004). Molte dei primi eventi di percezione di flg22 sono legati alla fosforilazione o defosforilazione di proteine coinvolte nella segnalazione (Benschop et al., 2007). Infatti proprio la fosforilazione/defosforilazione delle proteine è uno dei meccanismi più veloci che la cellula attua per rispondere repentinamente.

Anche le risposte di difesa indotte dagli OG sono state studiate soprattutto nel sistema modello *A. thaliana*. Da questi studi si è compreso che molte delle risposte indotte dagli OG (ma non tutte), sono comuni alle risposte di difesa indotte da altri MAMP. Per esempio esiste

una ampia sovrapposizione tra le risposte agi OG e quelle a flg22, almeno nei tempi precoci il trattamento (30-60 minuti) (Denoux et al., 2008). Queste risposte includono l'espressione genica, indipendente dalle vie di segnalazione note (mediate da etilene, acido salicilico, e jasmonate), l'induzione entro pochi minuti di una cascata di trasduzione del segnale che prevede la fosforilazione delle MPK3 e 6 (Galletti et al., 2011), l'attivazione di RbohD, una NADPH ossidasi di membrana coinvolta nella produzione di ROS (Galletti et al., 2008) e, più tardivamente, l'attivazione della callosio sintasi PMR4(Nishimura et al., 2003) Figura 4.1.

Se da una parte le risposte indotte dagli OG sono abbastanza note, poco si conosce sui componenti molecolari responsabili della loro percezione e trasduzione. I probabili candidati recettori sono le chinasi associate alla parete ("wall-associated kinase, WAK). Arabidopsis presenta almeno 5 diversi WAK e una famiglia più grande di 22 geni 'WAK-like'(Verica et al., 2003). I recettori WAK sono una famiglia di chinasi che presentano un dominio extracellulare contenente un "epidermal growth factor motif", un dominio trans-membrana e un dominio intracellulare chinasico ricco in serine e treonine (Anderson et al., 2001). Uno dei membri meglio caratterizzato è WAK1. Da studi biochimici è stato dimostrato che WAK1 è strettamente legato alla pectina (Wagner e Kohorn, 2001) e inoltre che non solo è in grado di legale omogalatturonano parzialmente desterificato ma anche OG (Decreux et al., 2006), L'ipotesi che i le proteine WAK fossero recettori di OG è stato difficile tramite approcci genetici convenzionali a causa proprio della ridondanza funzionale. Ma tramite l'utilizzo di un recettore

chimerico, è stato dimostrato che WAK1 agisce come recettore di OG (Brutus et al., 2010). **FIGURA 4.1**.

Ancora non è noto quali altri componenti intervengono nella percezione e trasduzione e considerati le molteplici risposte al segnale OG (come abbiamo visto nella difesa ma anche nello sviluppo, antagonizzando gli effetti dell'auxina, se non anche nella percezione della ferita (Ferrari et al., 2013)) è importante comprendere a fondo gli elementi che permettono la differenziazione delle risposte. In particolare pur sapendo alcuni effetti che gli OG hanno sullo sviluppo, per esempio riducendo l'allungamento cellulare e lo sviluppo della radice e promuovendo la formazione di radici laterali auxina indotte (Hernandez-Mata et al., 2010), poco si conosce sui meccanismi attraverso cui gli OG regolano negativamente l'azione dell'auxina ma potrebbero esplicarsi a livello dei promotori dei geni indotti da auxina (Ferrari et al., 2013) (**FIGURA 4.2**).

Negli ultimi anni è diventato sempre più evidente che il genoma rappresenta solo il primo livello di complessità di un sistema biologico. I dati sulla struttura di un gene non descrivono le modificazioni post traduzionali di una proteina quali la fosforilazione, la glicosilazione, l'acetilazione, l'ubiquitinazione e la metilazione, che sono essenziali per la funzione e l'attività di una proteina. Proprio per questo motivo ho intrapreso l'analisi, tramite un approccio 'omico', degli eventi precoci della percezione e segnalazione OG a livello della membrana plasmatica, ed in particolare, degli eventi di fosforilazione che si verificano entro i primi minuti dopo la percezione OG.

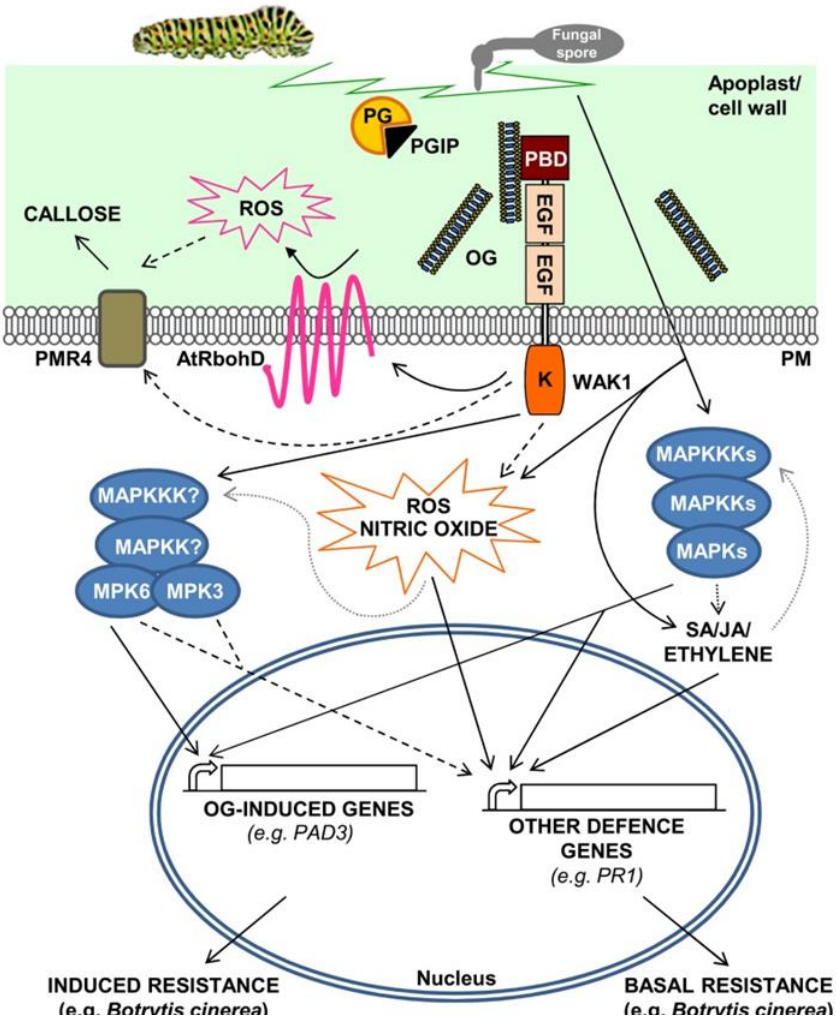


FIGURA 4.1 MODELLO DELL'ATTIVAZIONE DELLE RISPOSTE DI DIFESA INNESCATE DAGLI OG.(Ferrari et al., 2013)}

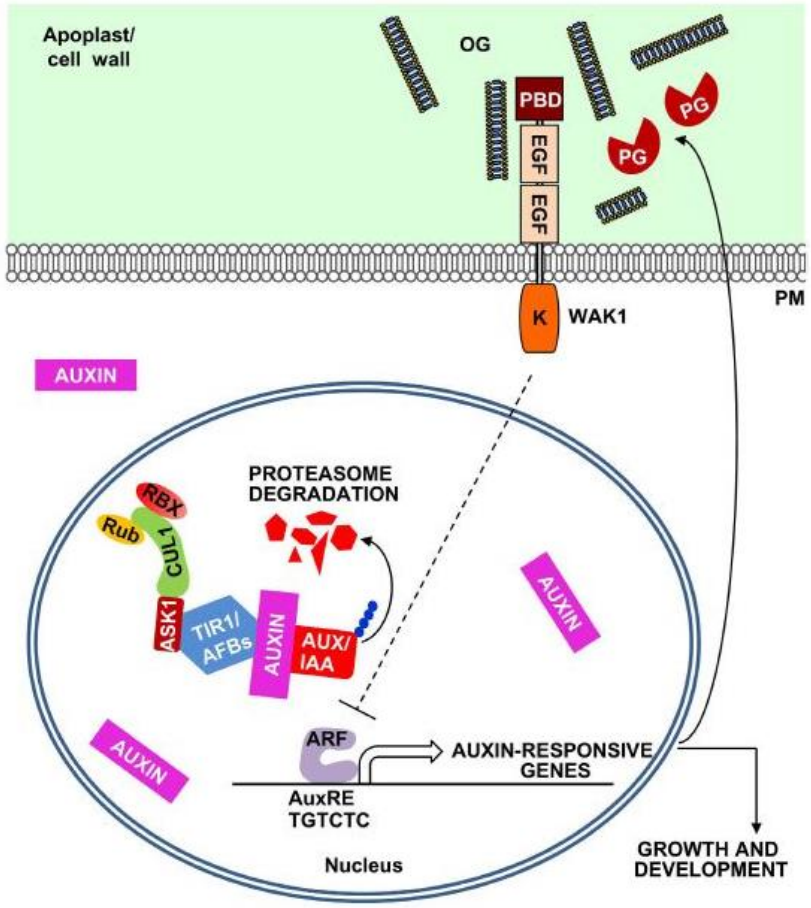


FIGURA 4.2 **MODELLO DELL' EFFETTO ANTAGONISTICO DEGLI OG NELLE RISPOSTE AUXINA.** Le cellule vegetali percepiscono auxina attraverso ad un complesso recettore formato da diverse proteine (tra cui TIR1/AFBs, a SKP (ASK1) e CULLIN1 (CUL1), che formano un complesso ubiquitina ligasi SCF E3. Questo complesso, in presenza di auxina, porta alla ubiquitinazione di repressori Aux/IAA e la loro degradazione proteasoma-mediata, permette l'attivazione dei fattori di risposta all'auxina (ARF) che avviano la trascrizione dei geni auxina-reattiva, caratterizzata dalla presenza di elementi di risposta dell'auxina (AuxREs) nei loro promotori.

4.2 Risultati e discussione

4.2.1 Crescita delle plantule di Arabidopsis thaliana e trattamento con oligogalatturonidi (OG)

Per lo studio dei cambiamenti del proteoma di membrane plasmatiche indotti dagli oligogalatturonidi sono state utilizzate plantule di *Arabidopsis thaliana* di ecotipo Col-0. I semi sono stati fatti germinare in terreno liquido di crescita Murashige-Skoog, supplementato con 1 % di saccarosio e le plantule sono state cresciute per due settimane. Quattro replicati biologici indipendenti sono stati ottenuti effettuando la semina in quattro giorni differenti. Le plantule di due settimane sono state sottoposte a trattamento con OG (100 µg/µL) o con acqua (controllo) e sono state raccolte dopo 10 min.

4.2.2 Preparazione di frazioni microsomiali arricchite in membrane plasmatiche

La membrana plasmatica rappresenta l'interfaccia cellulare che regola lo scambio di molecole e informazioni tra cellule. Essa è coinvolta in molti processi fisiologici delle piante, tra cui la crescita e lo sviluppo, il trasporto di ioni e metaboliti, nella percezione dei cambiamenti ambientali e nella resistenza ai patogeni (Marmagne et al., 2004; Mongrand et al., 2010). I primi eventi di segnalazione coinvolti nei meccanismi di difesa avvengono proprio a livello della membrana plasmatica. Per ottenere frazioni arricchite in membrane plasmatiche ho utilizzato il protocollo descritto da Zhang e Peck, 2011(Zhang e Peck,

2011) (cfr 4.4.3)[1] che prevede, dopo una prima tappa di arricchimento in membrane totali, un trattamento con Brij 58 e successivi lavaggi con Na_2CO_3 (**FIGURA 4.3**) Sono stati preparati per ciascun trattamento 6 replicati biologici ottenuti in tre giorni differenti (**FIGURA 4.4**A). Lo schema sperimentale seguito è rappresentato in Figura 4.2. Dopo il trattamento per 10 min con OG o H2O, come controllo, le plantule sono state prelevate dalle beute, asciugate e omogeneizzate. L'omogenato è stato filtrato su carta miracloth, centrifugato a 10,000xg per 15 min e il supernatante è stato recuperato. Un'aliquota è stata prelevata per l'analisi della fosforilazione di MPK6 e MPK3 (vedi par. successivo) e il rimanente è stato centrifugato a 100,000xg per 1 h per ottenere la frazione corrispondente ai microsomi totali.

Per arricchire le proteine di membrana plasmatica ho trattato i microsomi totali con il detergente Brij 58 che rovesciando le vescicole di membrana plasmatica favorisce l'eliminazione dei contaminanti citoplasmatici. Dopo il lavaggio con carbonato di sodio sono state ottenute, dopo ultracentrifugazione, due frazioni: la frazione pellet (P), arricchita in proteine integrali di membrana e un supernatante (W), arricchito in proteine legate debolmente alla membrana (cfr 4.4.3.2).

1 Inizialmente, le frazioni arricchite in membrane plasmatiche sono state ottenute impiegando la metodologia dell' "aqueous two-phase partitioning". Questa si basa sulla proprietà del polietilene glicol (PEG) e del destrano di formare due fasi distinte quando mescolate in soluzione acquosa. Le vescicole di membrana plasmatica si dispongono principalmente nella fase superiore composta da PEG, mentre le altre membrane cellulari si trovano nella fase sottostante composta da destrano (Larsson et al., 1987). Con questo protocollo però non ho ottenuto un contenuto di proteine abbastanza elevato che mi permettesse l'arricchimento successivo dei fosfopeptidi.

Entrambe le frazioni sono state sottoposte all'analisi proteomica per valutare l'effettivo arricchimento in proteine di membrana plasmatica. Dopo risospensione in 8 M urea, 10 mM Tris-HCl (pH 8) + 0.2% sodio deossicolato, per ciascuna frazione è stato determinato il contenuto proteico mediante saggio BCA (cfr 4.4.4.1).

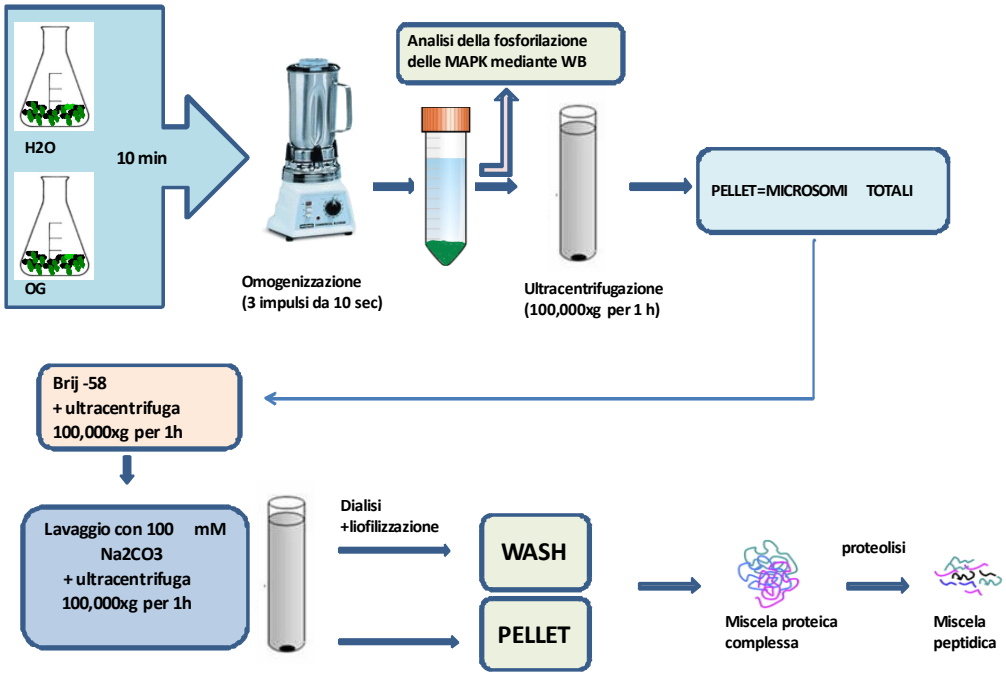


FIGURA 4.3 SCHEMA SPERIMENTALE DELLA PREPARAZIONE DI FRAZIONI MICROSOMIALI ARRICCHITE IN MEMBRANE PLASMATICHE.

4.2.3 Analisi della fosforilazione delle MAPK mediante western-blot

Per valutare l'efficienza del trattamento con OG è stata analizzata la fosforilazione delle MAP chinasi, MPK3 e MPK6 (Galletti et al., 2011). Per l'analisi western-blot, le proteine (30 µg) sono state separate

A

Sample	date
C1	C1 10/12/2012
C2	C2 10/12/2012
C3	C1 25/02/2013
C4	C2 25/02/2013
C5	C3 25/02/2013
C6	C 15/03/2013
T1	T1 10/12/2012
T2	T2 10/12/2012
T3	T1 25/02/2013
T4	T2 25/02/2013
T5	T3 25/02/2013
T6	T 15/03/2013

B

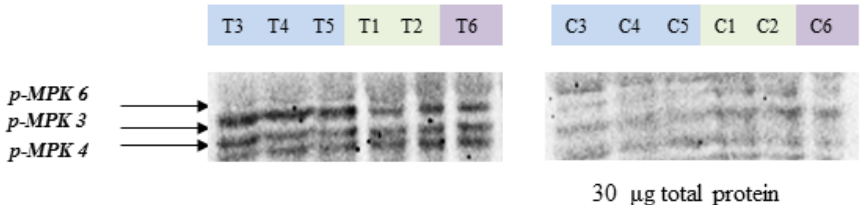


Figura 4.4 Campioni utilizzati per la preparazione di frazioni microsomiali arricchite in membrane plasmatiche e Analisi della fosforilazione delle MPK 3 e 6 mediante western-blot: In A sono indicati, con le relative date relative ai diversi, con C i campioni di controllo trattati per 10 minuti con acqua e con T i campioni trattati 10 minuti con OG. In B l'immunodecorazione che è stata eseguita usando anticorpi specifici per la forma fosforilata della MPK3 e 6. A sinistra i campioni trattati con OG a destra i controlli. La prima banda riscontrabile è relativa alla MPK6 fosforilata, la seconda alla MPK3 fosforilata e la terza alla MPK4 fosforilata.

su gel di policrilammide, trasferite su membrana di nitrocellulosa e incubate con l'anticorpo primario policlonale αp-MPK 3/6, capace di riconoscere entrambe le chinasi. La fosforilazione delle MPK3 e 6 era riscontrabile nei campioni trattati con OG (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) ma non per i campioni di controllo (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). In questo trattamento era evidente anche una terza banda che probabilmente corrisponde alla MPK4 fosforilata, anch'essa riconosciuta dall'anticorpo (**FIGURA 4.4** B). Il trattamento con OG ha quindi condotto alla fosforilazione delle MPK3 e 6 (e MPK4) come previsto.

4.2.4 MARCATURA ISOTOPICA DELLE MISCELE PEPTIDICHE

I campioni P e W sono stati digeriti in soluzione con LysC e tripsina (cfr 4.4.5) e il contenuto in peptidi è stato stimato mediante saggio fluorimetrico (cfr 4.4.6). La quantificazione dei peptidi è una tappa cruciale per effettuare una analisi di tipo quantitativo in LC-MS. Avendo recuperato delle buone quantità di peptidi (cfr **TABELLA 4-1**) ho potuto intraprendere sia l'analisi quantitativa del fosfoproteoma e, per i campioni per i quali era stata ottenuta una quantità di peptidi sufficiente, del proteoma di membrana plasmatica. Questa seconda analisi è fondamentale e prioritaria alla prima per due motivi: uno per valutare se il protocollo utilizzato per l'arricchimento delle proteine di membrana plasmatica fosse stato sufficientemente efficiente e secondo per evidenziare se ci fossero variazioni quantitativi delle proteine prima di qualsiasi considerazione sulle modificazione dei siti di fosforilazione.

Campione (P)*	Contenuto peptidico (µg)	Campione (W)*	Contenuto peptidico (µg)
PC1	220	WC1	268
PC2	448	WC2	207
PC3	315	WC3	144
PC4	395	WC4	160
PC5	317	WC5	160
PC6	326	WC6	223
PT1	242	WT1	199
PT2	334	WT2	133
PT3	285	WT3	147
PT4	221	WT4	138
PT5	418	WT5	163
PT6	370	WT6	111

TABELLA 4-1 CONTENUTO PEPTIDICO PER I CAMPIONI P E W. PC= campione P di controllo trattato per 10 minuti con acqua; PT= campione P trattato 10 minuti con OG. WC= campione W di controllo trattato per 10 minuti con acqua; WT= campione W trattato 10 minuti con OG.

L'analisi comparativa, in entrambe le analisi, dei campioni T e C è stata condotta mediante marcatura isotopica. In questa metodica i campioni C e T, marcati con due diversi isotopi della formaldeide, vengono riuniti e analizzati mediante LC-MS/MS (cfr 4.4.8) La reazione di marcatura è di facile esecuzione, ha una resa stechiometrica, ed ha il vantaggio di utilizzare reattivi a basso costo. Dall'analisi delle intensità relative dei peptidi nella forma leggera e pesante si può direttamente comparare l'abbondanza relativa del peptide tra C e T. Per l'analisi fosfoproteomica, sono stati sottoposti a marcatura isotopica 200 µg di peptidi per i campioni P e 100 µg per i campioni W, considerate le minori quantità di peptidi disponibili per quest'ultimi. I campioni C marcati con l'isotopo leggero (+28 Da) e dei campioni T con l'isotopo pesante (+36 Da) sono stati uniti a coppie secondo lo schema riportato in

TABELLA 4-2 per formare 6 miscele per la serie P (Pmix) e 6 miscele per la serie W (Wmix).

P mix	W mix
Pmix A = C4-T3 (25/02)	Wmix A = C5-T5 (25/02)
Pmix B= C5-T5 (25/02)	Wmix B = C2-T1 (10/12)
Pmix C = C2-T1 (10/12)	Wmix C= C4-T3 (25/02)
Pmix D = C6-T6 (15/03)	Wmix D = C3-T4 (25/02)
Pmix E = C3-T4 (25/02)	Wmix E = C6-T6 (15/03)
Pmix F = C1-T2 (10/12)	Wmix F = C1-T2 (10/12)

TABELLA 4-2 MISCELE DEI CAMPIONI MARCATI PER ANALISI FOSFOPROTEOMICA QUANTITATIVA. Le miscele di campioni sono state fatte unendo C e T da replicati biologici dello stesso giorno (data indicata tra parentesi).

Per l'analisi del proteoma sono stati utilizzati 50 µg di peptidi dei campioni per i quali il materiale rimasto era disponibile. In questo caso le miscele analizzate sono state 4 per i campioni P e 3 per i campioni W (cfr **TABELLA 4-3**).

P mix*	Wmix
Pmix A = C4-T3 (25/02)	Wmix E = C5-T5 (25/02)
Pmix B = C5-T5 (25/02)	Wmix F = C2-T1 (10/12)
Pmix C = C2-T2 (10/12)	Wmix G = C4-T3 (25/02)
Pmix D = C6-T6 (15/03)	

TABELLA 4-3 MISCELE DEI CAMPIONI MARCATI PER ANALISI PROTEOMICA QUANTITATIVA. Le miscele di campioni sono state fatte unendo C e T da replicati biologici dello stesso giorno (data indicata tra parentesi).

A titolo di esempio in **FIGURA 4.5** è mostrato uno spettro di massa ottenuto dall'analisi LC-MS/MS di una miscela di campioni marcati. I due picchi relativi ad uno ione peptidico di carica z=2 hanno una differenza di m/z di circa 4 dovuta alla differenza di massa tra l'isotopo leggero e pesante della formaldeide.

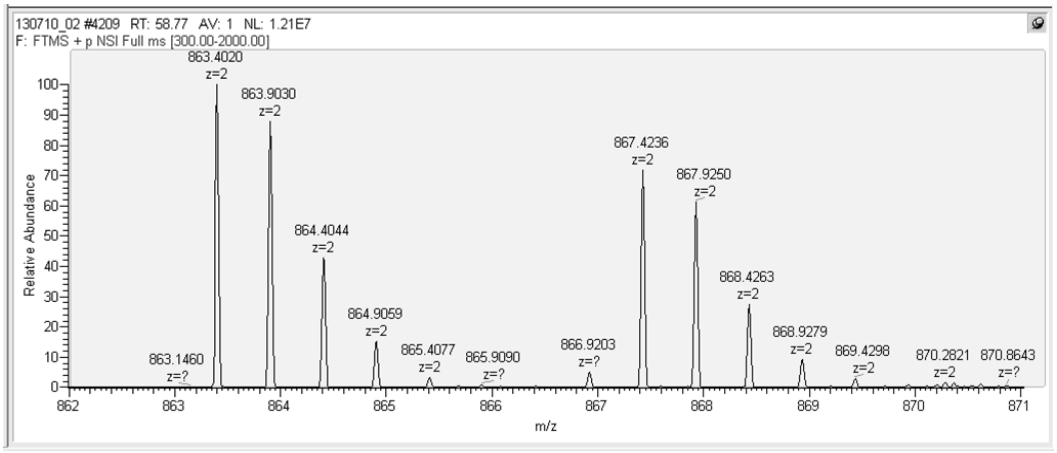


FIGURA 4.5 SPETTRO DI MASSA DI UNA MISCELA DI PEPTIDI MARCATI. Il peptide marcato con isotopo leggero ha un valore m/z= 863.4020, mentre il peptide marcato con isotopo pesante ha un valore m/z= 867.4236. La differenza di 4 corrisponde alla differenza attesa di 8 Da per uno ione con z=2.

4.2.5 ANALISI PROTEOMICA DIFFERENZIALE QUANTITATIVA

L'analisi proteomica è stata condotta sui campioni Pmix e Wmix elencati in **TABELLA 4-3** Per ovviare alla complessità delle miscele peptidiche, queste sono state frazionate mediante cromatografia bidimensionale accoppiata con spettrometria di massa tandem. La prima separazione cromatografica a scambio anionico (SAX) (cfr 4.4.9) è stata condotta in microcolonne e le frazioni ottenute sono state ulteriormente separate mediante HPLC su colonna a fase inversa (RP). L'analisi

complessiva viene in seguito abbreviata come SAX-RP LC-MS/MS (cfr 4.4.11.1).

4.2.5.1 IDENTIFICAZIONE DELLE SEQUENZE PROTEICHE MEDIANTE LC-MS/MS E ANALISI BIOINFORMATICA DELLE PROTEINE IDENTIFICATE PER I CAMPIONI PMIX E WMIX

Gli spettri di massa ottenuti dall'analisi LC-MS/MS sono stati analizzati utilizzando la piattaforma MaxQuant (v.1.3.0.5), supportato da Andromeda come motore di ricerca nelle banche dati, per l'identificazione delle sequenze proteiche. La ricerca è stata condotta utilizzando la banca dati ARATH13 (rilasciata a luglio 2013 con 33339 sequenze) di *Arabidopsis thaliana*. Le proteine prese in considerazione sono quelle identificate con almeno due peptidi. Con l'analisi SAX-RP LC-MS/MS sono state identificate 1075 gruppi di proteine [2] per i campioni Pmix e 545 per i campioni Wmix. Le proteine identificate in comune tra i campioni Pmix e Wmix sono 356.

Per ottenere una predizione della localizzazione subcellulare e una classificazione funzionale delle proteine identificate, tutte le sequenze proteiche identificate sono state analizzate mediante la banca dati di AgriGO (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php). L'analisi di "GO Term enrichment" per il compartimento subcellulare delle proteine identificate nei campioni Pmix (901 delle 1075 sequenze proteiche totali

2 In proteomica spesso si parla di 'protein group' in quanto i peptidi identificati non possono essere assegnati ad una unica proteina ma a diverse proteine che spesso sono isoforme. Nelle analisi successive per evitare una sovrastima ho considerato una unica proteina per gruppi di proteine identificate: Da notare che aver scelto una unica proteina per gruppo di proteine identificate non significa che non siano presenti altre proteine dello stesso gruppo.

identificate sono annotate in AgriGO) mostra che la membrana plasmatica è tra i compartimenti più arricchiti, con un *p-value* di 1.4e-201, rappresentando il 36% delle proteine del campione (cfr **FIGURA 4.6**).

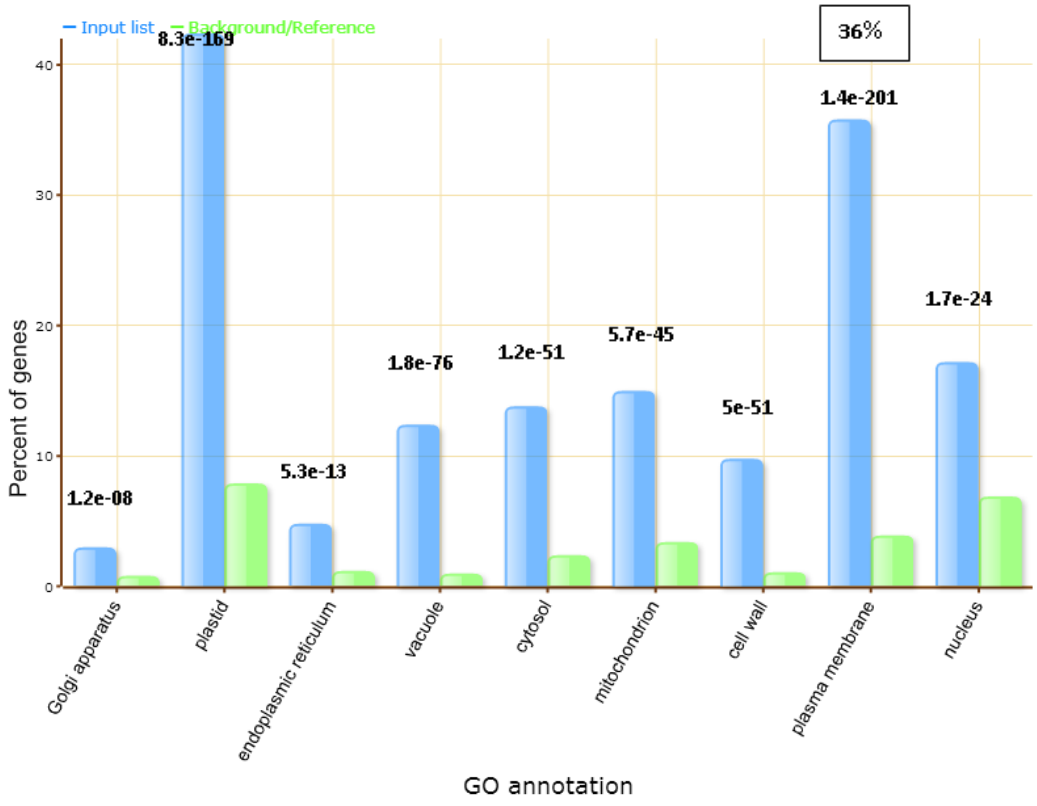


FIGURA 4.6 ANALISI DI "GO-TERM ENRICHMENT" PER IL COMPARTIMENTO SUBCELLULARE DELLE PROTEINE IDENTIFICATE NEI CAMPIONI PMIX. Sulle barre sono riportati i valori di p-value calcolati per l'arricchimento. Sull'asse delle x è riportata la definizione dei termini GO. Sull'asse delle Y è riportata la percentuale di geni corrispondenti, in. blu per la lista di proteine identificate (input list) e in verde per la lista di riferimento (Tair9).

Allo stesso modo l'analisi è stata condotta per i campioni Wmix. L'analisi di "GO Term enrichment" per il compartimento subcellulare delle proteine identificate nei campioni Wmix (472 delle 545 sequenze

proteiche totali identificate sono annotate in AgriGO) mostra anche in questo caso che la membrana plasmatica è tra i compartimenti più arricchiti, con un *p-value* di 2.1e-147, rappresentando il 43% delle proteine del campione (cfr **FIGURA 4.7**).

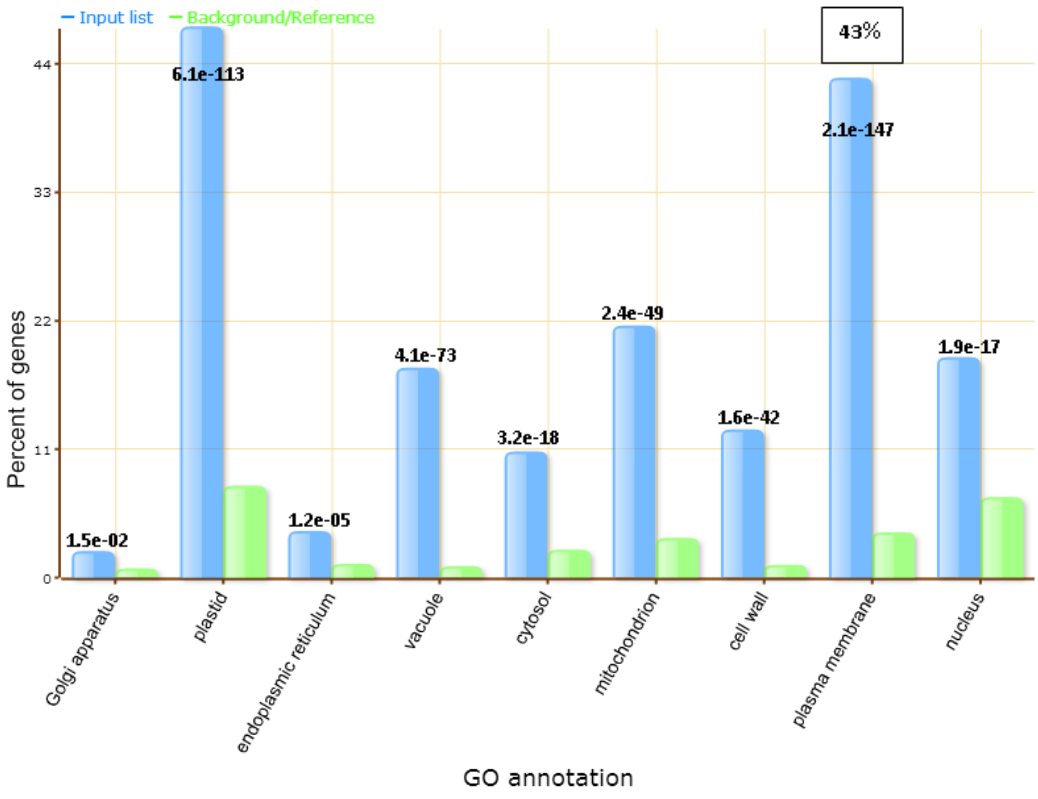


FIGURA 4.7 ANALISI DI "GO-TERM ENRICHMENT" PER IL COMPARTIMENTO SUBCELLULARE DELLE PROTEINE IDENTIFICATE NEI CAMPIONI WMIX. Sulle barre sono riportati i valori di p-value calcolati per l'arricchimento. Sull'asse delle x è riportata la definizione dei "Go Term". Sull'asse delle Y è riportata la percentuale di geni corrispondenti, in blu per la lista di "input" e in verde per la lista di riferimento (Tair9).

Per avere ulteriori informazioni sulla localizzazione subcellulare, le proteine identificate nei campioni Wmix e Pmix sono state analizzate con il programma di predizione CELLO (cfr 4.4.12.2) ed il programma

THMHMM la predizione dei domini transmembrana (cfr Appendice **TABELLA 5-1**).

4.2.5.2 ANALISI PROTEOMICA QUANTITATIVA DEI CAMPIONI PMIX E WMIX

L'analisi quantitativa è stata condotta con il software Perseus che effettua una normalizzazione delle intensità dei peptidi osservati e fornisce per ciascuna proteina il rapporto di abbondanza relativa tra T e C. Per l'analisi sono state prese in considerazione quelle proteine che era stato possibile quantificare in 4 replicati biologici su 4 sia nel controllo che nel trattato per la frazione P (408 proteine) e 3 su 3 per la frazione W (245 proteine). L'abbondanza relativa delle proteine identificate tra C e T non è significativamente differente tramite un test T, con correzione di Benjamini-Hochberg (False Discovery Rate <1%, che è la proporzione dei falsi positivi rispetto a tutti i positivi; fold-change>2 cioè il valore soglia di cambiamento quantitativo considerato significativo).

Il grafico in **FIGURA 4.8** mostra i rapporti quantitativi delle proteine tra C e T trasformati nel logaritmo in base 2. La media dei rapporti è intorno allo zero e in generale i valori sono compresi in un intervallo che va da 1 a -1 sia per la frazione W che per quella P. Proteine che non sono differenzialmente espresse avranno un valore del log2 della ratio uguale a 0 mentre un valore di 1 rappresenta un aumento di espressione di due volte, ed il valore -1 rappresenta una diminuzione di espressione di 2 volte. Questo dimostra come ci aspettavamo che un trattamento così breve, di 10 minuti, non modifica quantitativamente il proteoma di membrana.

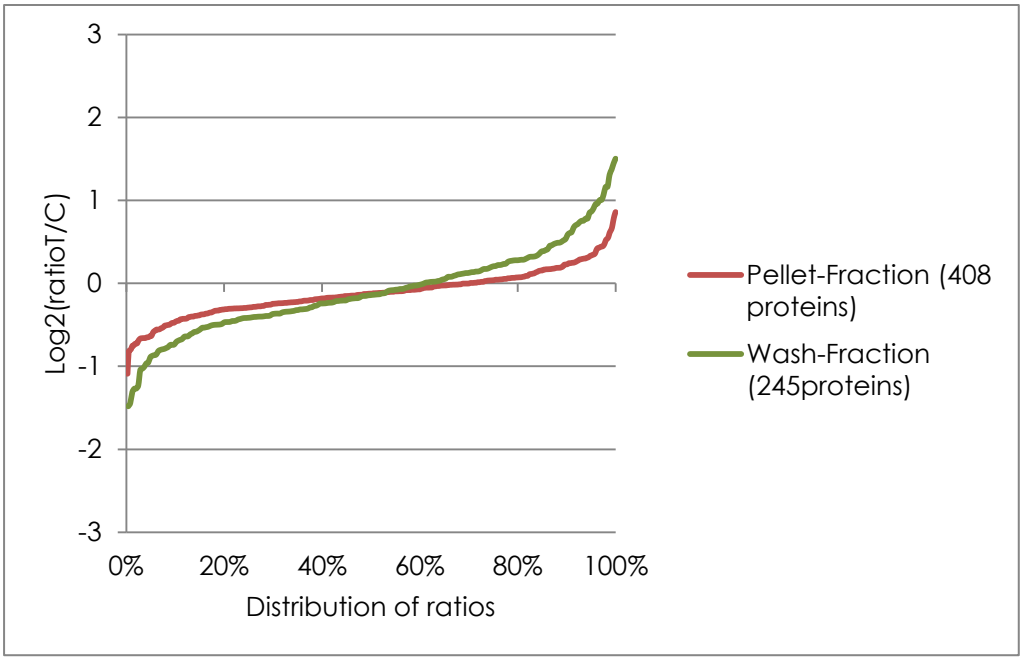


FIGURA 4.8 DISTRIBUZIONE DEI RAPPORTI QUANTITATIVI DELLE PROTEINE. NELL'ASSE DELLE ORDINATE È MOSTRATO IL LOG$_2$ DELLA MEDIA DEI RAPPORTI QUANTITATIVI DELLE PROTEINE TRA T E C. Sull'asse delle ascisse sono mostrati, in maniera equidistante, dal più piccolo al più grande la distribuzione delle proteine quantificate. In rosso la distribuzione delle proteine quantificate nella frazione P, in verde quella delle proteine quantificate nella frazione W. Essendo Log$_2$ un valore prossimo allo zero significa che non c'è nessuna variazione quantitativa.

4.2.6 ANALISI FOSFOPROTEOMICA DIFFERENZIALE QUANTITATIVA

Per individuare eventi di fosforilazione/defosforilazione nella vie di segnalazione attivata dagli OG, frazioni arricchite in fosfopeptidi sono state preparate per i campioni Pmix e Wmix (cfr **TABELLA 4-2**). I fosfopeptidi sono generalmente poco abbondanti in una miscela peptidica complessa; per questo le strategie di arricchimento sono fondamentali in uno studio fosfoproteomico. La procedura di arricchimento in fosfopeptidi impiegata nel mio studio è definita SIMAC (Thingholm et

al., 2009) (cfr. 4.4.10) e si basa sulla proprietà dei peptidi fosforilati di essere più carichi negativamente rispetto ai peptidi non fosforilati a causa del gruppo fosfato legato. La procedura prevede una prima eluizione di tre frazioni (il flow-through, una frazione acida e una frazione basica) da una cromatografia effettuata su una microcolonna contenente una resina con metallo immobilizzato, ed una seconda affinità su sferette di TiO_2. Alla fine del processo di arricchimento sono state ottenute 3 frazioni: 2 arricchite in peptidi mono-fosforilati e 1 in peptidi multi-fosforilati (cfr **FIGURA 4.14**)

4.2.6.1 IDENTIFICAZIONE DELLE SEQUENZE PROTEICHE MEDIANTE LC-MS/MS E ANALISI BIOINFORMATICA DELLE PROTEINE IDENTIFICATE PER I CAMPIONI DOPO ARRICCHIMENO DEI FOSFOPEPTIDI

Le tre frazioni ottenute per ciascuna frazione di ogni campione sono state analizzate mediante LC-MS/MS. Gli spettri di massa ottenuti sono stati analizzati come descritto nei paragrafi precedenti utilizzando la banca dati ARATH13. L'analisi fosfoproteomica dei peptidi fosforilati, basata su un numero molto ridotto di peptidi unici per proteina (1 o 2 peptidi nella maggior parte dei casi). La predizione della localizzazione subcellulare e la classificazione funzionale delle proteine identificate sono state condotte anche in questo caso utilizzando la banca dati AgriGO.

Per i campioni Wmix sono stati identificati 130 fosfopeptidi con una probabilità del sito di fosforilazione maggiore della soglia arbitrariamente fissata a 95%.

Di questi, 82 sono peptidi unici. L'analisi di "GO Term enrichment" per il compartimento subcellulare delle proteine identificate con i peptidi fosforilati nei campioni Wmix (67 delle 82 sequenze proteiche identificate sono annotate in AgriGO) mostra che la membrana plasmatica è tra i compartimenti più arricchiti, con un *p-value* di 1.2e-24 (**FIGURA 4.9**)

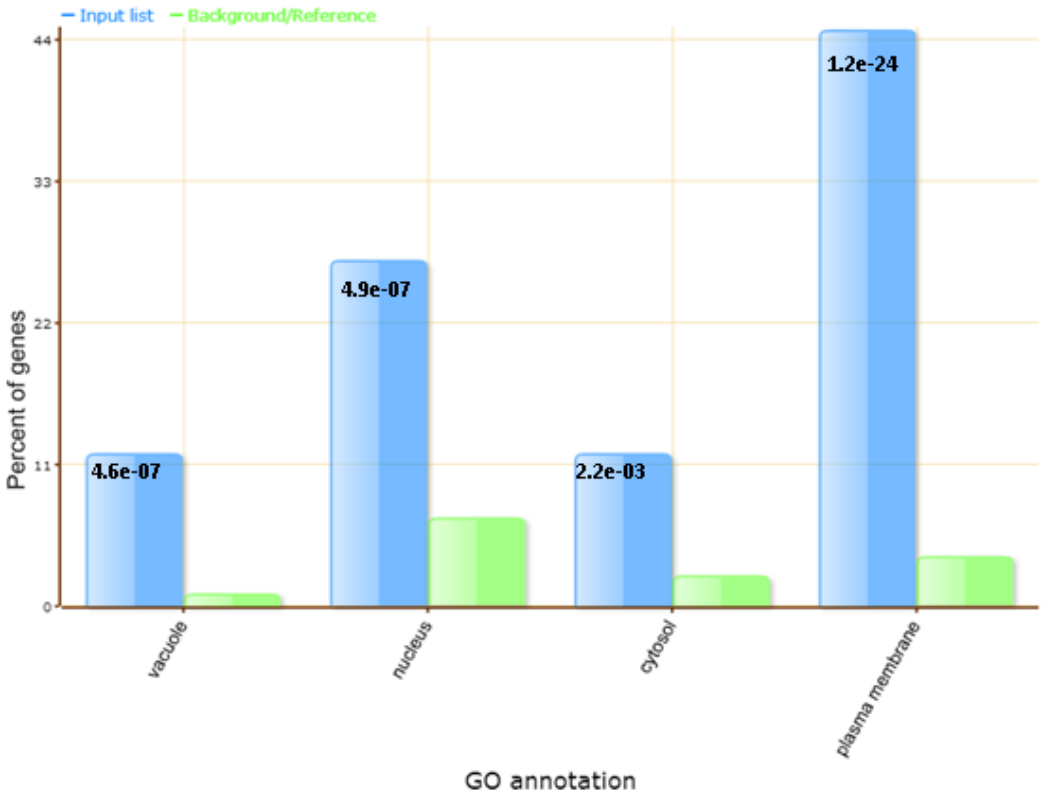


FIGURA 4.9 ANALISI DI "GO-TERM ENRICHMENT" PER IL COMPARTIMENTO SUBCELLULARE DELLE PROTEINE FOSFORILATE PER I CAMPIONI WMIX. Sulle barre sono riportati i valori di p-value calcolati per l'arricchimento. Sull'asse delle x è riportata la definizione dei "Go Term". Sull'asse delle Y è riportata la percentuale di geni corrispondenti, in blu per la lista di "input" e in verde per la lista di riferimento (TAIR9).

Per i campioni Pmix sono stati identificati 311 fosfopeptidi con una probabilità del sito di fosforilazione maggiore di 95%, di questi 225 sono peptidi unici. L'analisi di "GO Term enrichment" per il compartimento subcellulare delle proteine identificate con i peptidi fosforilati nei campioni Pmix (157 delle 225 sequenze proteiche totali sono annotate in AgriGO) mostra anche in questo caso la membrana plasmatica risulta tra i compartimenti più arricchiti, con un *p-value* di 1.9e-57 (**FIGURA 4.10**)

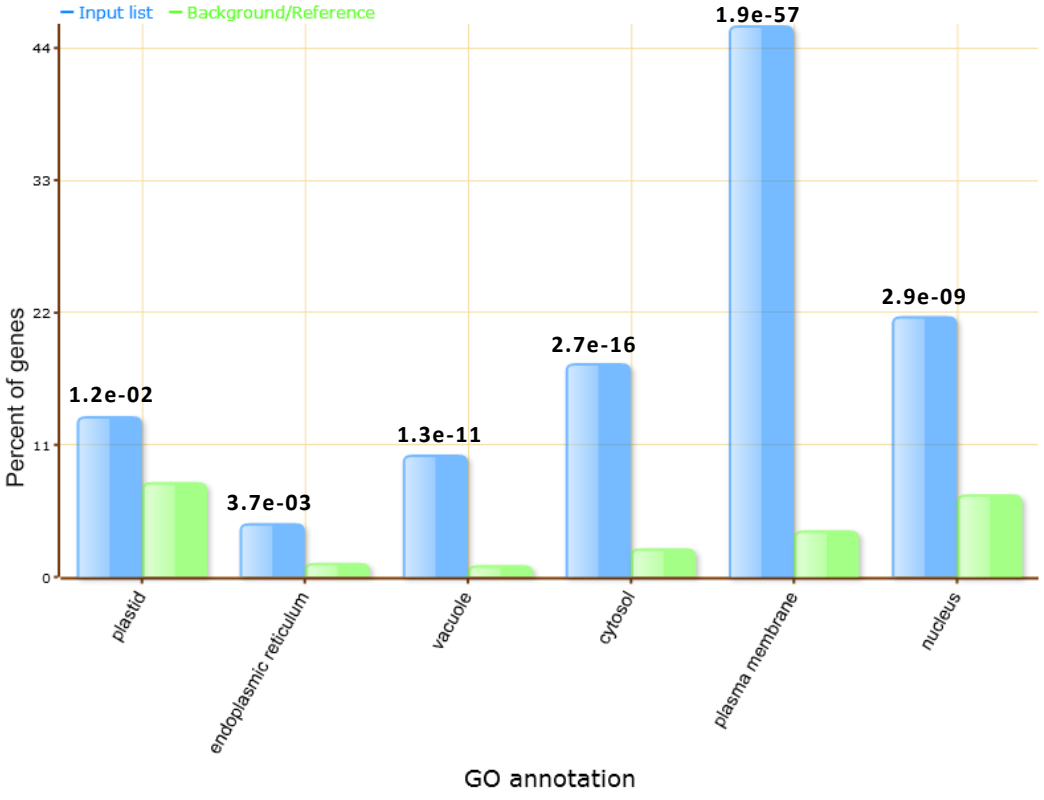


FIGURA 4.10 ANALISI DI "GO-TERM ENRICHMENT" PER IL COMPARTIMENTO SUBCELLULARE DELLE PROTEINE FOSFORILATE PER I CAMPIONI PMIX. Sulle barre sono riportati i valori di p-value calcolati per l'arricchimento. Sull'asse delle x è riportata la definizione dei "Go Term". Sull'asse delle Y è riportata la percentuale di geni corrispondenti, in blu per la lista di "input" e in verde per la lista di riferimento (TAIR9).

4.2.6.2 ANALISI FOSFOPROTEOMICA QUANTITATIVA DEI CAMPIONI PMIX E WMIX

Dall'analisi dei profili di LC-MS/MS effettuata con MaxQuant è stato possibile ottenere informazioni riguardo alla posizione di specifici siti di fosforilazione. L'analisi statistica di questi dati è stata condotta con il software Perseus. Questo programma effettua una normalizzazione delle intensità dei fosfopeptidi osservati e fornisce per ciascuno di essi il rapporto di abbondanza relativa tra C e T. Dai valori del rapporto delle intensità relative tra fosfopeptidi nel T e C è stato possibile risalire alle fosforilazioni differenziali delle proteine.

E' riportato in diversi lavori che il metodo di filtraggio dei dati entro valori di FDR tradizionalmente accettati per la proteomica non è adeguato per l'analisi fosfoproteomica (Goldstrohm et al., 2011). Un'analisi statistica con soglie iniziali meno stringenti (FDR<10%), seguita da una rigorosa validazione manuale degli spettri, porta ad identificare un numero maggiore di fosfopeptidi con un'elevata significatività (Kadota et al., 2014). Dal momento che le analisi validate manualmente richiedono tempi molto più lunghi, ho potuto per adesso effettuare una analisi preliminare dove ho preso in considerazione quei fosfopeptidi per cui la localizzazione del sito di fosforilazione è maggiore del 95% e per i quali la quantificazione delle variazioni dello stato di fosforilazione era risultata valida, sia nel controllo che nel trattato, in almeno 3 replicati biologici. Per 25 fosfoproteine della frazione wash e 165 della frazione pellet è stato possibile quantificare le variazione dello stato di fosforilazione (cfr Appendice **TABELLA 5-2**). Ho, dunque valutato tramite un T-Test, considerando un *p value* minore di 0,1, quelle proteine che avessero una variazione significativa a seguito

del trattamento con OG. Sono risultati significativamente differenti 7 fosfoproteine per la frazione wash (**Tabella 4-4**) e 32 per la frazione pellet (**Tabella 4-5**).

4.3 CONCLUSIONI

Anche se l'analisi dei dati è ancora preliminare, emergono numerose informazioni di particolare interesse. Tra le proteine identificate come differentemente fosforilate in seguito al trattamento di 10 minuti con gli OG, è presente MPK6, nota essere fosforilata in seguito ad induzione con gli OG. La sua presenza è in accordo con l'analisi di controllo dell'efficienza del trattamento con OG mediante western blot, e dà una indicazione della bontà della procedura. In due recenti studi (Hoehenwarter et al., 2013; Sorensson et al., 2012), è stato individuato il motivo caratterizzante dei substrati delle MPK3/6, che risulta essere PXpSP (prolina-qualsiasi amminoacido-serina fosforilata-prolina). Tra le proteine fosforilate identificate nel mio studio, tre hanno questo dominio: VAP27-1, AMT1-1 ed infine una proteina non ben caratterizzata At1g80180. In particolare per quest'ultima, nel lavoro di Sorensson e collaboratori (2012), è stata proprio dimostrata l'interazione e l'attività della MPK6 nella fosforilazione della serina 105, la stessa che però è da me identificata come defosforilata in seguito al trattamento con OG. La defosforilazione di questo sito dunque non appare direttamente collegata all'attività della MPK6, e il suo significato funzionale rimane da chiarire. At1g80180 sembra implicata nella regolazione e nello sviluppo degli stomi, strutture indispensabili per lo scambio di gas e per la traspirazione della pianta. Durante l'attacco dei patogeni gli stomi possono essere determinanti come 'porta d'ingresso' per l'invasione microbica. Una stretta regolazione dell'apertura e della chiusura degli stomi, quindi, è fondamentale non solo per resistere a condizioni ambientali sfavorevoli, come siccità e calore, ma anche per limitare

l'invasione del patogeno (Pitzschke et al., 2009).

Dal nostro studio è risultato diminuire anche lo stato di fosforilazione dell'ATPase 2 e dell'ATPase 1, nonché di una suo noto interattore la PPI1, (Proton Pump-Interactor 1). La defosforilazione di queste ATPasi è stata riportata anche dopo trattamento con flagellina o chitina (Benschop et al., 2007). La defosforilazione indotta da tutti questi elicitori riguarda la Thr 947 della ATPase2 e del corrispondente residuo della ATPasi 1, localizzate al C-terminale delle proteine, nel dominio autoinibitorio. La fosforilazione di questo residuo è fondamentale per l'interazione con una proteina 14-3-3 che interviene nell'attivazione della pompa (Rudashevskaya et al., 2012). Una defosforilazione di questa treonina impedirebbe il legame con la 14-3-3, portando la pompa nella conformazione autoinibita. La H^+-ATPasi è importante per il mantenimento del pH sia intra- che extracellulare e fornisce la forza motrice per i processi di trasporto accoppiati al trasporto di protoni (per es. il trasporto di saccarosio). La regolazione delle due ATPasi da parte degli OG indica che la risposta a questi elicitori comporta una modulazione dei meccanismi di mantenimento del pH. E' noto che sia i MAMP che i DAMP inducono un'alcalinizzazione del mezzo incubazione (Boller e Felix, 2009) ed è stato proposto che questa fenomeno possa essere collegato ad una inibizione delle H + -ATPasi di membrana (Elmore e Coaker, 2011). Le mie osservazioni confermano questa ipotesi.

Sono state trovate inoltre differenzialmente fosforilate diverse proteine coinvolte nel trasporto di ioni (come il potassio, l'ammonio, il cloro, il fosfato inorganico), aquaporine e un trasportatore ABC 14 che mostra affinità per i coniugati del glutatione (Gaedeke et al., 2001)

evidenziando che molti cambiamenti avvengono a livello dei trasportatori di membrana, suggerendo un loro importante ruolo nella trasduzione del segnale mediata dagli OG.

Interessante è il cambiamento di fosforilazione di AtCSLC6, un enzima, ancora non ben caratterizzato, che fa parte della superfamiglia delle CELLULOSE SYNTHASE-LIKE (CSL) strettamente collegate alle cellulosa sintasi (CESA) (Liepman e Cavalier, 2012) e probabilmente implicata nella sintesi delle emicellulose. Una modulazione tramite fosforilazione di alcune proteine CESA è stata riscontrata anche in risposta ad altri elicitori (Benschop et al., 2007) e potrebbe essere connessa ad una regolazione fine della sintesi della cellulosa e ad un rimodellamento della parete cellulare.

Le variazioni del calcio intracellulare sono spesso decodificate da proteine sensibili al calcio come le calmoduline che a loro volta possono attivare altre proteine importanti per il traffico vescicolare come la Miosina 17 (di cui ho identificato due peptidi, uno defosforilato ed uno fosforilato) e la IQD31 (Abel et al., 2005). Inoltre anche coinvolta nel traffico vescicolare è la VAP27-1 (Vesicle-associated protein 1-1), defosforilata in seguito a trattamento con gli OG. Questa svolge un ruolo importante nel trasporto sia da che verso il reticolo endoplasmatico (Carette et al., 2002). In una cellula eucariotica, il flusso tra compartimenti avviene sia con un trasporto di membrana mediato da proteine che attraverso il traffico vescicolare (Rothman e Wieland, 1996). La secrezione mirata verso i siti d'ingresso del patogeno è importante la risposta di difesa contro il patogeno, per esempio, per rafforzare le barriere fisiche o secernere dei composti antimicrobici (Frey e Robatzek, 2009).

In un lavoro precedente condotto nel laboratorio in cui ho svolto la tesi, utilizzando la metodologia 2-D DIGE accoppiata con la colorazione fosfo-sensibile ProQ Diamond, sono state individuate 68 proteine fosforilate, e per due di queste è stato dimostrato un ruolo funzionale nella risposta delle piante agli OG (dati non pubblicati). In particolare una delle proteine fosforilate la cui fosforilazione è regolata dagli OG, è DE-ETIOLATED3 (DET3) che codifica per la subunità C della H^+-ATPasi vacuolare (V-ATPasi). DET3 ha un ruolo importante nel controllo dell'allungamento cellulare e nella regolazione dell'attività meristematica (Dettmer et al., 2006). Nel mio lavoro ho trovato un'altra subunità della V-ATPasi, la subunità D, la cui fosforilazione aumenta in risposta agli OG. Le V-ATPasi non solo promuovono il trasporto attivo secondario, ma sono anche importanti regolatori del traffico di membrana. L'inibizione della V-ATPasi da parte della concavalina A interferisce con l'attività di secrezione e col traffico endocitico di varie molecole cargo e porta ad una perdita dell'integrità del Trans Golgi Network a livello ultrastrutturale. Tuttavia la base molecolare di questi effetti non è stata ancora chiarita (Schumacher e Krebs, 2010). La V-ATPasi sembra funzionare come un sensore di pH e l'acidificazione mediata da V-ATPasi è stata dimostrata essere essenziale per il traffico cellulare vescicolare e la segnalazione cellulare.

Interessanti proteine la cui fosforilazione è regolata dagli OG sono anche un fattore di risposta all'auxina, la AUX/IAA indicata come IAA11, e TPL (Topless), che viene reclutato dalle proteine Aux/IAA, inclusa IAA11, per sopprimere l'espressione dei geni regolati dall'auxina in assenza di auxina (Causier et al., 2012; Szemenyei et al., 2008). Entrambe le proteine risultano defosforilate. IAA11 appartiene alla

famiglia delle Aux/IAA che comprende 29 membri (Liscum e Reed, 2002) e codificano proteine nucleari che mediano l'espressione genica auxina-dipendente (Overvoorde et al., 2005; Ulmasov et al., 1997). In breve, a concentrazioni di auxina basse, le risposte all'auxina vengono soppresse dalle proteine AUX/IAA attraverso la loro azione come repressori degli ARF (fattori di risposta all'auxina), fattori di trascrizione che regolano l'espressione genica indotta dall'auxina. La percezione dell'auxina da TIR1 conduce alla degradazione da parte del proteosoma 26S degli AUX/IAA e quindi al successivo rilascio di ARFs che legandosi ai promotori genici ARE regolano (attivando o reprimendo) l'espressione genica auxina-sensibile (Kazan, 2013).

La famiglia Aux/IAA è prevalentemente una famiglia di proteine ben caratterizzate e sinora identificate nel nucleo. IAA11 è l'unica un presunto dominio transmembrana ed è stato precedentemente identificata in una analisi bioinformatica su larga scala insieme a fattori di trascrizione legati alla membrana (MTF) (Kim et al., 2010) ed inoltre è stato identificata in un lavoro di proteomica dei plasmodesmi (Fernandez-Calvino et al., 2011). L'attivazione proteolitica controllata di fattori regolatori della trascrizione è emersa recentemente come un meccanismo versatile per l'induzione rapida di risposte trascrizionali in risposta a stress ambientali. Secondo lo schema in **FIGURA 4.11**, i fattori di trascrizione sono resi dormienti dalla loro associazione fisica con le membrane intracellulari e rilasciati dall'azione controllata di un taglio proteolitico (Seo et al., 2008).

La regolazione da parte degli OG di proteine legate alla trasduzione del segnale auxinico appare di particolare interesse data la capacità degli OG di antagonizzare l'azione dell'auxina su fenomeni di crescita e

sviluppo della pianta. Ad esempio, inibiscono la formazione di radici avventizie in espianti fogliari trattati con auxina, l'allungamento di

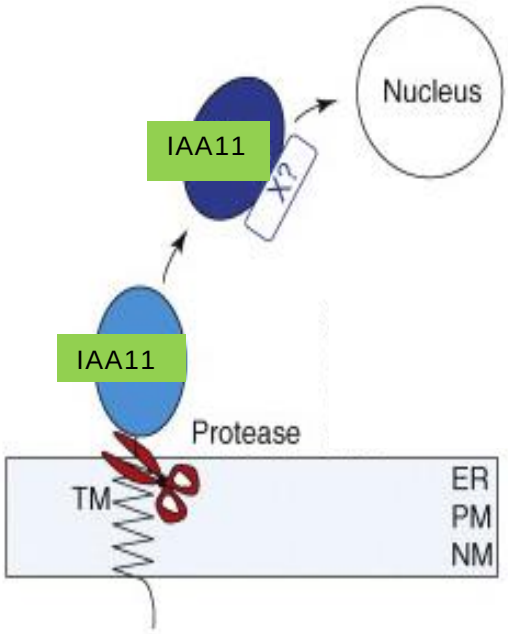


FIGURA 4.11 RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL POSSIBILE MECCANISMO BIOCHIMICO CHE ATTIVA I FATTORI DI TRASCRIZIONE LEGATI ALLA MEMBRANA (MTF). Forme dormienti di mtf (es. IAA11) sono associate con le membrane intracellulari, come reticolo endoplasmatico (er), membrana plasmatica (pm), o membrana nucleare (nm). IAA11 potrebbe essere attivato da una proteolisi regolata intramembrana, ad opera delle proteasi associate alla membrana. il fattore attivato si trasferisce al nucleo, dove induce l'espressione di geni coinvolti nella risposta agli stress ambientali (adattata da (Seo et al., 2008)).

segmenti di stelo e l'espressione di geni indotti dall'auxina (vedi capitoli 1.3.3 e 4.1). Il ruolo di IAA11 sia nella difesa ma soprattutto nell'antagonismo OG –auxina sarà oggetto di ulteriori studi.

E' stato riscontrata anche una defosforilazione OG-dipendente della nitrato reduttasi (NR) NIA2, a livello della Serina 534. Questo sito, quando fosforilato, è importante per il legame con una proteina 14-3-3; l'interazione delle due proteine forma un complesso in cui l'attività della NR è inibita (Moorhead et al., 1996). Una defosforilazione di questa

serina porterebbe alla dissociazione con la 14-3-3 e quindi permetterebbe l'attivazione dell'enzima. Le NR sono i principali (se non gli unici), catalizzatori della produzione di ossido nitrico (NO) nelle risposte di difesa. Infatti sebbene la loro funzione primaria nelle piante sia quella di convertire il nitrato in nitrito, esse possono convertire nitrito in NO sia in *vitro* che in *vivo* (Wang et al., 2010). Il NO riveste un ruolo importante in numerosi processi di sviluppo di piante e nella segnalazione nelle risposte di difesa. In particolare, NIA2 è coinvolta nella produzione di NO in risposta a H_2O_2. E' stata dimostrato che la fosforilazione della Serina627 di NIA2, mediata da MPK6 attivata dall' H_2O_2, provoca un aumento della produzione di NO (Wang et al., 2010).

TABELLA 4-4 PROTEINE FOSFORILATE DIFFERENZIALMENTE TRA C E T NELLA FRAZIONE WASH. a) Average (Log2ratio) media dei logartimi in base 2 dei rapporti delle quantità tra C e T b) Phos numero delle fosforilazioni nel peptide identificato c) Sequence: sequenza amminoacidica del fosfopeptide, in minuscolo e tra parentesi è indicata la modifica dell'amminoacido antecedente: (ph)= fosforilazione, (ox) ossidazione, (ac) acetilazione. d) ID protein: codice identificativo della proteina per la banca dati ARATH13; e) ID TAIR10: codice identificativo della proteina per la banca dati TAIR10; f) Fasta headers: descrittivo sintetico della proteina, GN: nome del gene. In rosa le proteine fosforilate in seguito al trattamento con OG. In azzurro quelle defosforilate in seguito a trattamento con gli OG.

Average (Log2ratio)[a]	Phos[b]	Sequence[c]	ID Protein[d]	ID Tair[e]	Fasta headers[f]
-1.0288	_2	_SDS(ph)T(ph)KM(ox)RNSM(ox)FVK_	A8MR39	AT4G28640	Auxin-responsive protein GN=IAA11
2.75934	_2	_SSSSS(ph)S(ph)RR_	Q8H1D3	AT4G23680	BTB/POZ domain-containing protein NPY1 GN=NPY1
0.69794	_2	_(ac)M(ox)FRLRS(ph)LLS(ph)LK_	Q8L763	AT2G18465	Chaperone DnaJ-domain containing protein GN=AT2G18465
1.02984	_1	_GIS(ph)INAAR_	Q9XGM1	AT3G58730	V-type proton ATPase subunit D GN=VHA-D PE=1 SV=2
1.05788	_3	_S(ph)EFLIQFDGVT(ph)S(ph)NPDDLVIIIGATNK_	A8MRR2	AT2G45500	AAA-type ATPase-like protein GN=AT2G45500
0.52535	_2	_ITLIWEKRNDDSPEPS(ph)GY(ph)M(ox)K_	Q9SUQ9	AT4G23680	AT4g23680/F9D16_150 GN=F9D16.150
0.54927	_1	_KKDEPAEES(ph)DGDLGFGLFD_	Q8LEQ0	AT5G47700	60S acidic ribosomal protein P1-3 GN=RPP1C

TABELLA 4-5 PROTEINE FOSFORILATE DIFFERENZIALMENTE TRA C E T NELLA FRAZIONE PELLET. a) Average (Log2ratio) media dei logartimi in base 2 dei rapporti delle quantità tra C e T b) Phos numero delle fosforilazioni nel peptide identificato c) Sequence: sequenza aminoacidica del fosfopeptide, in minuscolo e tra parentesi è indicata la modifica dell'amminoacido antcedente: (ph)= fosforilazione, (ox) ossidazione, (ac) acetilazione. d) ID protein: codice identificativo della proteina per la banca dati ARATH13; e) ID TAIR10: codice identificativo della proteina per la banca dati TAIR10; f) Fasta headers: descrittivo sintetico della proteina, GN: nome del gene. In rosa le proteine fosforilate in seguito al trattamento con OG. In azzurro quelle defosforilate in seguito a trattamento con gli OG.

Average (Log2ratio)[a]	Phos[b]	Sequence[c]	ID Protein[d]	ID Tair[e]	Fasta headers[f]
-1.9124	_3	_VTYVAPPRPPS(ph)PVHEGSEEGS(ph)S(ph)PR_	Q8VZ95	AT3G60600	Vesicle-associated protein 27-1 GN= VAP27-1
-1.8913	_1	_SIS(ph)IESPR_	Q9LZJ5	AT3G62700	ABC transporter C family member 14 GN=ABCC14
-1.7572	_1	_TGGNTETETEEVPEAS(ph)EEEIEAPVQEEKPQKEK_	O23144	AT4G27500	Proton pump-interactor 1 GN=PPI1
-1.7472	_2	_TKDELTEEES(ph)LS(ph)GKDYLDPPPVK_	Q9ZV07	AT2G39010	Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-1.4216	_1	_KVVEGDS(ph)AEEDENKLPVEDIVSSR_	O81283	AT4G02510	Translocase of chloroplast 159, chloroplastic GN=TOC159
-1.0367	_1	_KIS(ph)GILDDGSVGFR_	Q96282	AT5G49890	Chloride channel protein CLC-c GN=CLC-C
-0.9694	_2	_RVEPRS(ph)PS(ph)PSGANTTPTPV_	P54144	AT4G13510	Ammonium transporter 1 member 1 GN=AMT1-1
-0.8974	_1	_VDS(ph)SGDVCGATFK_	Q9FG81	AT5G43830	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs GN=AT5G43830
-0.8622	_1	_NT(ph)GRVSPAVDPPS(ph)PR_	Q9SSC1	AT1G80180	At1g80180/F18B13_26 GN=F18B13.26
-0.787	_1	_SIS(ph)EANIAGSSR_	Q9FE38	AT4G23640	Potassium transporter 3 GN=POT3
-0.7813	_1	_GLDIDTAGHHYT(ph)V_	P20649	AT2G18960	ATPase 1, plasma membrane-type GN=AHA1
-0.7446	_1	_SVS(ph)TPFMNTTAK_	P11035	AT1G37130	Nitrate reductase [NADH] 2 GN=NIA2

-0.7036	_1	_SLEELSGEAEVS(ph)HDEK_	Q8VYM2	AT5G43350	Inorganic phosphate transporter 1-1 GN=PHT1-1
-0.6987	_1	_GSPQSAGLS(ph)FLNR_	F4K5J1	AT5G20490	Myosin-17 GN=XI-K
-0.6666	_1	_GLDIETPSHYT(ph)V_	F4JPJ7	AT4G30190	H(+)-ATPase 2 GN=HA2
-0.6153	_1	_SLGS(ph)FRS(ph)AANV_	P43286	AT3G53420	Aquaporin PIP2-1 GN=PIP2-1
-0.6055	_1	_GFVPFVPGSPT(ph)ERNPPDLSKA_	Q68KI4	AT5G27150	Sodium/hydrogen exchanger 1 GN=NHX1
-0.5432	_1	_VEEKKEES(ph)DEEDYEGGFGLFDEE_	P57691	AT3G11250	60S acidic ribosomal protein P0-3 GN=RPP0C
-0.5368	_1	_SSS(ph)DSGLTELSK_	Q9SRT3	AT3G07330	Probable xyloglucan glycosyltransferase 6 GN=CSLC6
-0.5134	_1	_APS(ph)PVNNPLLGGIPK_	Q94AI7	AT1G15750	Protein TOPLESS GN=TPL
-0.5045	_3	_QLS(ph)S(ph)GLLLVT(ph)GPFK_	Q9FZ76	AT1G18540	60S ribosomal protein L6-1 GN=RPL6A
-0.4985	_1	_GFVPFVPGS(ph)PTERNPPDLSKA_	Q68KI4	AT5G27150	Sodium/hydrogen exchanger 1 GN=NHX1
-0.4085	_1	_SGES(ph)VDDESENYLSDLGK_	Q9C8E6	AT1G42550	Plastid movement impaired1 GN=T8D8.2
-0.3957	_1	_SGGM(ox)LETQNVGPEEIS(ph)DDEIELPEGK_	Q8L4D8	AT1G74690	Protein IQ-DOMAIN 31 GN=IQD31
-0.3957	_2	_IFS(ph)QRS(ph)FR_	Q8GUM4	AT3G27390	Uncharacterized membrane protein At3g27390 GN=At3g27390
0.77872	_1	_YSLVLDPNLDAGT(ph)PR_	F4J153	AT3G03570	Uncharacterized protein GN=AT3G03570
0.97225	_2	_WPPPT(ph)PPPT(ph)PGR_	Q8GXE9	AT2G36020	HVA22-like protein j GN=HVA22J
1.0247	_2	_VQDLIHGGGGAS(ph)PVQS(ph)PTR_	F4HYR4	AT1G62330	O-fucosyltransferase family protein GN=AT1G62330
1.18031	_1	_QQALAIS(ph)PTSR_	F4K5J1	AT5G20490	Myosin-17 GN=XI-K
1.30965	_1	_SVETLS(ph)PFQQK_	Q9MB58	AT1G07110	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase GN=FKFBP
1.49182	_1	_INLVDVGGGGLFS(ph)PR_	F4JXM9	AT5G65950	Uncharacterized protein GN=AT5G65950
2.81925	_2	_VTSESDFM(ox)T(ph)EY(ph)VVTR_	Q39026	AT2G43790	Mitogen-activated protein kinase 6 GN=MPK6

4.4 MATERIALI E METODI

4.4.1 MATERIALE BIOLOGICO E CONDIZIONI DI CRESCITA

Per gli esperimenti sono stati utilizzati semi di *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0, genotipo wild type (WT). Dieci mg di semi (circa 500) sono stati lavati con 1 mL di isopropanolo per 1 min; una volta rimosso l'isopropanolo sono stati effettuati 2 lavaggi con H_2O ultrapura sterile per 1 min. I semi sono stati trattati con 1 mL di soluzione di sterilizzazione (1.6 % NaClO, 0.01% SDS) per 10 min in agitazione. In condizioni di sterilità (sotto cappa a flusso laminare) sono stati effettuati 7 lavaggi con acqua ultrapura sterile per rimuovere la soluzione sterilizzante. I semi così sterilizzati sono stati avvolti in carta alluminio e posti a 4°C per 3 giorni per sincronizzare la germinazione. Un litro di terreno liquido è stato preparato sciogliendo in acqua distillata 2.2 gr di terreno Murashige e Skoog con vitamine (MS/2) e 1% di saccarosio, pH 5.5. Il terreno è stato sterilizzato in apparato di filtrazione sotto cappa a flusso laminare. I semi sono stati posti in 100 mL di terreno in beute da 500 mL precedentemente autoclavate a 120 °C per 20 min, e fatti crescere per 2 settimane a 22 °C, 41% di umidità, con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

4.4.2 TRATTAMENTO DELLE PLANTULE CON OLIGOGALATTURONIDI

Le plantule di *Arabidopsis thaliana* di 2 settimane sono state trattate con oligogalatturonidi (OG). Sono stati utilizzati oligogalatturonidi con grado di polimerizzazione compreso tra 9 e 16, preparati come descritto

in Bellincampi et al. (Bellincampi et al., 2000). Per il trattamento in ciascuna beuta sono stati somministrati 10 mg di OG in 5 mL di H_2O ultrapura sterile (2 mg/mL) (concentrazione finale di OG per beuta, 100 µg/mL). Come controllo sono stati somministrati 5 mL di H_2O ultrapura sterile. Il trattamento è stato effettuato per 10 min sotto leggera agitazione.

4.4.3 Strategie di arricchimento in membrane totali (microsomi) e membrane plasmatiche

4.4.3.1 Preparazione di microsomi

Al termine del trattamento con OG è stata effettuata l'estrazione dei microsomi totali. Il tampone di estrazione utilizzato è composto da 50 mM HEPES pH 7.5, 330 mM saccarosio, 5 mM EDTA, 5 mM acido ascorbico, inibitori di fosfatasi (50 mM $Na_4P_2O_4$, 25 mM NaF, 1 mM Na_2MoO_4), 1mM PMSF, cocktail inibitori di proteasi 1:10,000 (P9599, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 mM DTT, PVPP 0.6%. Le plantule sono state prelevate dalla beuta, asciugate con carta assorbente e pesate. Sono state successivamente omogeneizzate mediante 3 impulsi da 10 sec (in un Waring blender 7011G) aggiungendo un volume di tampone di estrazione di 2 mL/gr di tessuto fresco. Il tessuto omogeneizzato è stato filtrato su carta Miracloth, trasferito in tubi falcon e centrifugato a 10,000xg per 15 min. Il supernatante (da cui è stata prelevata un' aliquota per l'analisi western-blot) è stato sottoposto ad ultracentrifugazione a 100,000xg (28,500 rpm) a 4 °C per 1 h. Il pellet recuperato (frazione arricchita in microsomi) è stato incubato in 300 µL

di tampone di risospensione 1 composto da 330 mM saccarosio, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 50 mM $Na_4P_2O_4$, 25 mM NaF, 10 mM EDTA (pH 7.5), 1 mM Na_2MoO_4, 1 mM PMSF, cocktail di inibitori di proteasi (50 µL per 6 mL di tampone).

4.4.3.2 TRATTAMENTO CON BRIJ 58: ARRICCHIMENTO IN MEMBRANE PLASMATICHE

La preparazione di microsomi è stata realizzata apportando alcune modifiche ai protocolli pubblicati da Zhang e Peck (2011). I campioni sono stati risospesi in tampone di risospensione 1 con l'aggiunta di 2% Brij 58 (w/v), aggiustando i volumi in modo che il rapporto detergente:proteine fosse di 10:1 (w/w). Ai campioni risospesi è stata aggiunta una soluzione 2M KCl fino ad una concentrazione finale di 0.2 M, il trattamento è stato condotto a 4°C per 30 min sotto leggera agitazione. Le membrane totali sono state sottoposte ad ultracentrifuga a 100,000xg a 4°C per 1 h e il pellet è stato incubati per 10 min con 2 mL di 100 mM Na_2CO_3 (pH 11-12), risospesi, sonicati in ghiaccio per 5 min e infine precipitati in ultracentrifuga a 100,000xg a 4°C per 1 h. Dopo l'ultracentifugazione, i pellet (frazione che successivamente verrà chiamata P) sono stati risospesi in 100 µL di 8 M urea, 10 mM tris-HCl (pH 8) + 10µL di 5% sodio deossicolato e sonicati in ghiaccio per 10 min. I supernatanti (frazione che verrà chiamata successivamente W) ottenuti dopo centrifugazione sono stati invece dializzati in 5 L di H_2O distillata + 25 mL di 1 M NH_4HCO_3 a 4 °C, liofilizzati e risospesi in 200 µL di 8 M urea, 10 mM tris-HCl (pH 8) + 10 µL di 5% sodio deossicolato.

4.4.4 Analisi delle proteine

4.4.4.1 Quantificazione proteica

Per determinare la concentrazione proteica dei campioni, sono stati utilizzati due differenti saggi spettrofotometrici: il saggio Bradford (Bradford, 1976) e il saggio BCA (Bicinchoninic acid protein assay) (Smith et al., 1985).

4.4.4.2 Elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) e analisi western blott

Le proteine di ogni campione sono state separate su gel di acrilamide come descritto in Desiderio et al (1997). In seguito sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa (Hybond ECL C-EXTRA Amersham) in tampone di trasferimento composto da 100 mL di tampone stock 10X (96.8 tris gr/L, 9.74 glicina gr/L, pH 9.2), 200 mL di metanolo e 700 ml di H_2O ultrapura, utilizzando un apparecchio trans-blot (BIORAD) ad un voltaggio costante di 100 V per 1 h a 4°C. Dopo il trasferimento il filtro di nitrocellulosa è stato immerso per 2 h in agitazione a T ambiente in 100 mL di tampone di bloccaggio, composto da 10 mL di TBS 10 X (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM), 0.1% Tween 20, 5 gr di BSA. Il filtro è stato lavato con tampone di lavaggio composto da 50 mL di tampone stock TBS 10 X , 0.2 % Tween 20, (un lavaggio di 10 min e due lavaggi di 5 min). In seguito il filtro è stato incubato per 12 h a temperatura ambiente ed in agitazione in una soluzione di anticorpo primario (policlonale) αp-MPK 3-6 diluito 1:2000 nel tampone di lavaggio con 5

% BSA. Il filtro è stato lavato in tampone di lavaggio come sopra e incubato per 1.5 h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (anti-IgG di coniglio coniugato ad una perossidasi – Amersham RPN 2108) diluito 1:6000 in tampone di lavaggio con 5% BSA. Dopo essere stato lavato in tampone di lavaggio (come sopra) il filtro è stato immerso in 3 mL di soluzione 2 ECL + 3 mL di soluzione 1 ECL (kit Amersham ECL western-blotting analysis system) per 1 min e infine asciugato tra due fogli di carta 3 MM. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata mediante un sistema di acquisizione di immagine Chemidoc (Biorad) con tempi di esposizione compresi tra 120 e 1800 sec.

4.4.5 DIGESTIONE IN SOLUZIONE DELLE PROTEINE

I campioni sono stati risospesi in 100 µL di 8 M urea, 10 mM tris-HCl (pH 8) + 10µL di 5% sodio deossicolato (cfr 4.4.3.2). La riduzione dei residui di cisteina è stata effettuata aggiungendo 1 µL di 10 mM ditiotreitolo per 50 µg di campione e incubando a temperatura ambiente per 30 min. Le cisteine sono state alchilate aggiungendo 1 µL di 50 mM iodoacetamide, 50 mM NH_4HCO_3 per 50 µg di campione e incubando per 20 min a temperatura ambiente. La digestione delle proteine è stata condotta utilizzando l'enzima LysC (Promega) che determina la proteolisi a livello del carbossi-terminale dei residui di lisina (1 µg di LysC per 50 µg di campione). I campioni sono stati incubati overnight a 37° C sotto leggera agitazione. Una seconda digestione è stata eseguita con la tripsina (Promega) che determina la proteolisi a livello del carbossi-terminale dei residui di lisina e di arginina. Prima di aggiungere la tripsina il volume dei campioni è stato diluito 4 volte con NH_4HCO_3

50 mM; anche in questo caso è stato aggiunto 1 µg di tripsina per 50 µg di campione e i campioni sono stati incubati per 4 h a 37° C sotto leggera agitazione. I campioni sono stati acidificati con 5 µL di acido formico (100%) e centrifugati a 13,000xg per 10 min.

4.4.6 Quantificazione dei peptidi con saggio fluorimetrico

La quantificazione della miscela peptidica ottenuta dopo digestione in soluzione è stata realizzata mediante il saggio fluorimetrico Lavapep (Peptide quantification kit). Tale saggio si basa sull'utilizzo di composti fluorescenti naturali che in ambiente idrofobico si legano reversibilmente ai residui di lisina, arginina e istidina dei frammenti peptidici. La quantità di fluorescenza emessa è proporzionale alla concentrazione peptidica. E' stata realizzata una curva di riferimento utilizzando 0.5, 1, e 2 µL di una soluzione stock di BSA digerita con tripsina (3.35 µg/µL) diluiti in 50 µL di H_2O ultrapura sterile. Per i campioni sono stati saggiati volumi di 0.5 e 1 µL diluiti in 50 µL di H_2O ultrapura sterile. Ad ogni campione sono stati aggiunti 50 µL di soluzione di lavoro che è stata preparata miscelando H_2O, soluzione A (soluzione contenente il fluoroforo in DMSO e CH_3CN) e soluzione B ($NaHCO_3$, SDS e CH_3CN) in rapporto 8:1:1. I campioni (posti in piastra nera da 96 pozzetti) sono stati incubati per 1 al buio. La misura della fluorescenza è stata determinata al fluorimetro (Promega) utilizzando un filtro di eccitazione a 540 ±10 nm e un filtro di emissione a 630 ±10 nm. Dai valori di fluorescenza ottenuti è stato possibile risalire alla concentrazione peptidica dei campioni.

4.5 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI LC-MS/MS

Per pulire i campioni dai sali e detergenti e per concentrare i peptidi ottenuti, sono state utilizzate delle micro-colonne in cui una resina cromatografica viene impaccata all'estremità di puntali per pipette gilson (Gobom et al., 1999). In particolare in puntali da 200 µL è stato inserito un disco di resina cromatografica C18 (3M empore C18) e al di sopra è stata depositata una sospensione diluita di resina R3 (Applied Biosystems, POROS, Reversed-Phase Media) in 70 % CH_3CN. La resina è stata impaccata esercitando una moderata pressione con una siringa da insulina. Per i campioni meno abbondanti la resina R3 è stata impaccata direttamente in tip da 10 µl con punta lunga (normalmente utilizzati per caricare i campioni nei pozzetti dei gel) in cui la parte terminale del puntale è stata ristretta con una pinzetta per evitare la perdita di resina. Dopo un lavaggio con 20 µL di 70% CH_3CN, la colonna è stata equilibrata con 20 µL di 0.1 % TFA, e il campione è stato caricato molto lentamente per favorire il legame tra i peptidi e la resina cromatografica. La colonna è stata lavata con 20 µL di 0.1% TFA ed i peptidi eluiti con 60 µL di 80% CH_3CN, 0.1% TFA.

4.5.1 MARCATURA ISOTOPICA DELLE MISCELE PEPTIDICHE

Nella reazione di marcatura le ammine primarie dei peptidi reagiscono con la formaldeide (CH_2O), ad un pH compreso tra 5 e 8.5, per generare una base di Schiff che è rapidamente ridotta dall'addizione del cianoboroidruro ($NaBH_3CN$) alla miscela di reazione (Boersema et al., 2009). La reazione genera sull'ammina primaria del peptide un incremento di massa di 28 Da. Usando una miscela di formaldeide

deuterata (CD_2O) e cianoboroidruro ($NaBH_3CN$) è possibile ottenere un incremento di massa sull'ammina primaria del peptide pari a 32 Da, mentre la combinazione di formaldeide deuterata contenente ^{13}C ($^{13}CD_2O$) e di cianoboroidruro deuterato ($NaBD_3CN$) permette di

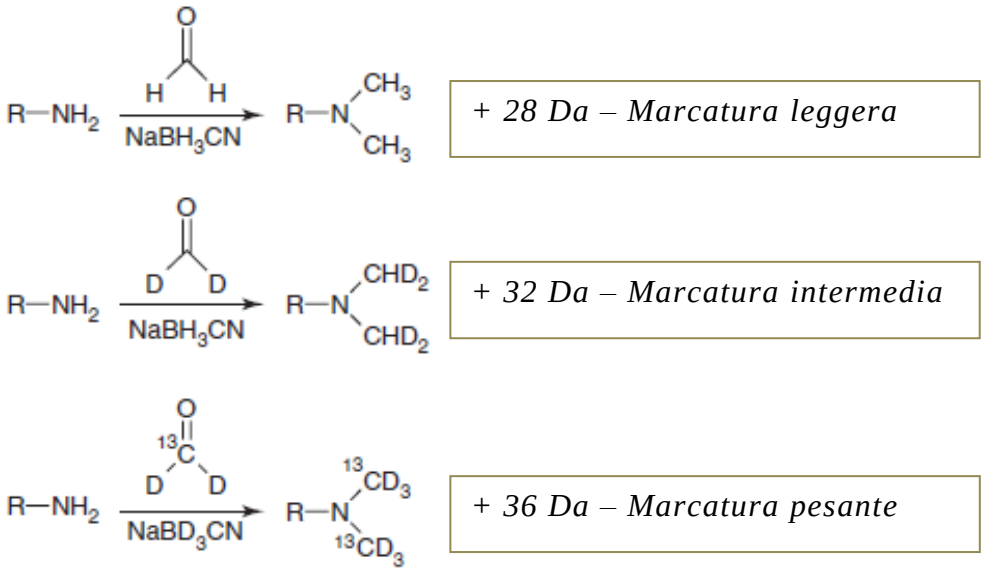


FIGURA 4.12 SCHEMA DELLE REAZIONI DI MARCATURA ISOTOPICA

ottenere un incremento di massa di 36 Da (vedi **FIGURA 4.12**).

In questo lavoro è stata usata la marcatura isotopica "pesante" per i campioni trattati con OG (+36 Da) e la marcatura "leggera" per i campioni di controllo (+28 Da). I campioni sono stati seccati in Savant e risospesi in 100 µL di 100 mM TEAB. Per 50 µg di miscela peptidica sono stati aggiunti 8 µL di CH_2O o di $^{13}CD_2O$ al 4% (v/v) e 8 µL di $NaBH_3CN$ o di $NaBD_3CN$ 0.6 M, rispettivamente per il controllo e per il trattato. I campioni sono stati incubati per 1 h a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata aggiungendo 32 µL di 1% ammoniaca (v/v) e

16 µL di acido formico (100%). Per maggiori quantità di materiale peptidico sono state utilizzate soluzioni maggiormente concentrate per evitare di aumentare eccessivamente il volume della miscela di reazione. Per 100 µg di materiale peptidico sono stati utilizzati 8 µL di CH_2O o di $^{13}CD_2O$ 8 % (v/v), 8 µL di $NaBH_3CN$ o di $NaBD_3CN$ 1.2 M e 16 µL di 4% ammoniaca. Per 200 µg sono stati utilizzati 16 µL di CH_2O o di $^{13}CD_2O$ 8%, 16 µL di $NaBH_3CN$ o di $NaBD_3CN$ 1.2 M e 16 µL di 8% ammoniaca.

4.5.2 SCAMBIO ANIONICO (SAX)

I campioni peptici sono stati frazionati mediante cromatografia a scambio anionico su micro-colonne preparate impaccando in un puntale da 200 µL 6 dischi di resina a scambio anionico (Empore/disk Anion Exchange). Le micro-colonne sono state preventivamente lavate con 0.1 mL di metanolo e con 0.1 mL di NaOH 1 M in seguito equilibrate con 0.1 mL di tampone a pH 11 (CH_3COOH 0.02 M, H_3PO_4 0.02 M e H_3BO_3 0.02 M, pH 11). Prima del caricamento i campioni sono stati seccati in Savant, risospesi in 0.1 mL di tampone a pH 11 e sonicati in ghiaccio per 5 min. Sono state fatte delle eluzioni sequenziali utilizzando tamponi (CH_3COOH 0.02 M, H_3PO_4 0.02 M e H_3BO_3 0.02 M) con i seguenti pH: 11, 9.5, 8, 6, 5, 4 e 3.(**FIGURA 4.13**). Le frazioni raccolte (centrifugando a 7000xg per 3 min ad ogni passaggio) sono state purificate su micro-colonne R3, come precedentemente descritto.

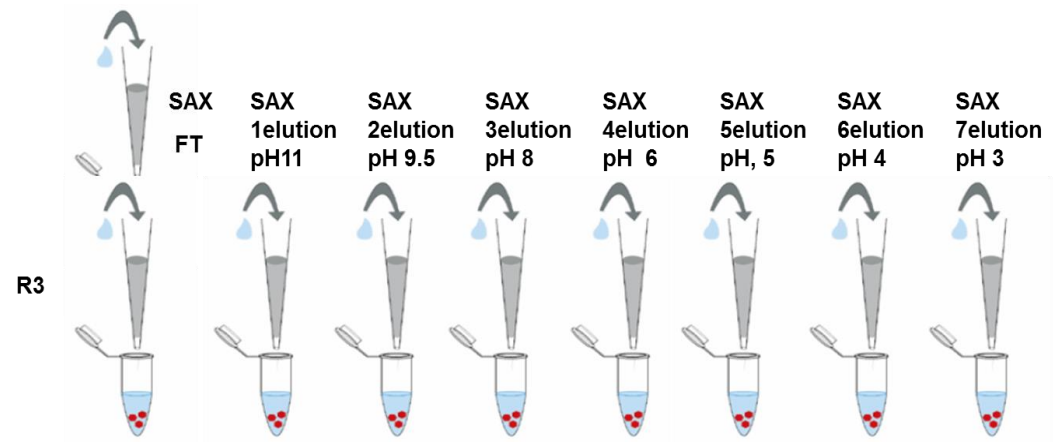


FIGURA 4.13 SCHEMA SPERIMENTALE DEL FRAZIONAMENTO PER CROMATOGRAFIA A SCAMBIO ANIONICO.

4.5.3 ARRICCHIMENTO DEL CAMPIONE IN FOSFOPEPTIDI

Per l'arricchimento del campione in fosfopeptidi è stata seguita la procedura, definita SIMAC (sequential elution from immobilized metal affinity chromatography (IMAC), (Thingholm et al., 2009).

La SIMAC è caratterizzata da una prima cromatografia di affinità con metalli immobilizzati (IMAC) e da una successiva fase di arricchimento con una cromatografia con resina di TiO_2 (**FIGURA 4.14**). Questa strategia di arricchimento in fosfopeptidi porta a ottenere da ogni campione tre frazioni differenti: la frazione FT e la frazione acida, provenienti dall'affinità con metalli immobilizzati (nel nostro caso il Fe^{3+}). e successiva cromatografia con resina TiO_2 in cui sono presenti principalmente peptidi mono-fosforilati e la terza frazione (frazione alcalina) proveniente esclusivamente dall'eluizione basica della IMAC, costituita da peptidi multi-fosforilati(Thingholm et al., 2009).

Per i campioni W sono stati usati 60 µL di resina IMAC (PhosSelect, Sigma), per i campioni P sono stati utilizzati 80 µL di resina IMAC. La resina trasferita in tubi eppendorf è stata centrifugata a 5,000xg per 1 min e lavata (due volte) con 200 µL di tampone di caricamento 1 (50 % CH_3CN, 0.1 % TFA).

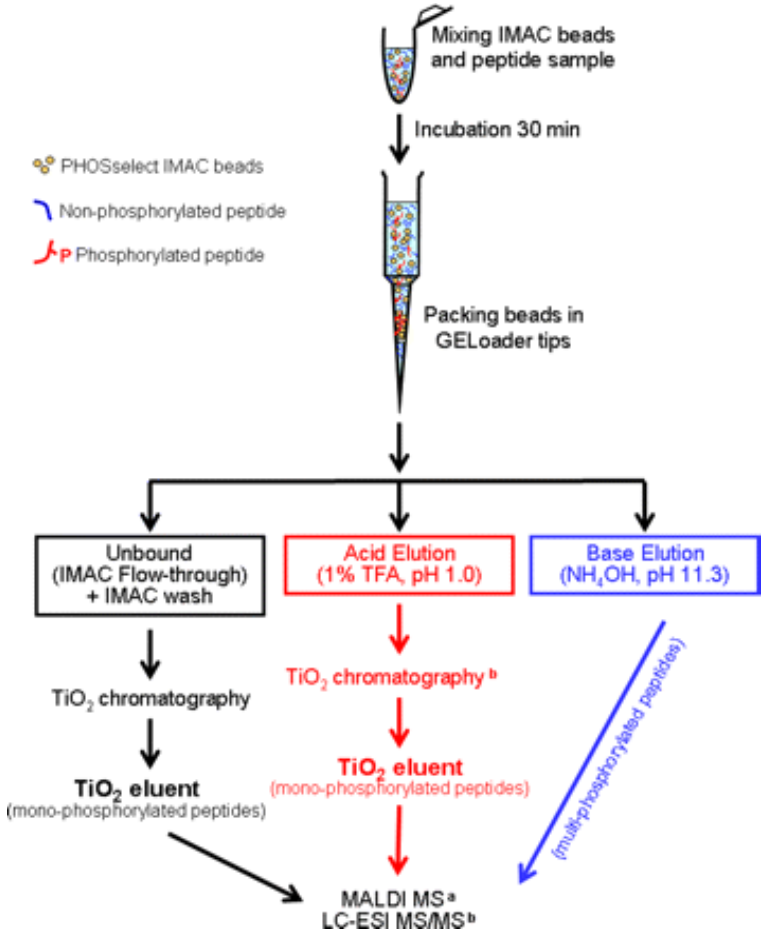


FIGURA 4.14 SCHEMA SPERIMENTALE DELLA STRATEGIA SIMAC (THINGHOLM ET AL., 2009)

La resina è stata risospesa in 150 µL di tampone di caricamento 1 e incubata con il campione per 30 min a temperatura ambiente, in agitazione. La resina è stata impaccata in un puntale "Gel-loader" da 20 µL a cui è stata ristretta la punta con una pinzetta per evitarne la fuoriuscita e lavata con 80 µL di tampone di caricamento 1 (frazione flow-through). Una prima eluizione è stata effettuata con 80 µL di tampone di eluizione acida (20% acetonitrile,1% TFA) (frazione acida arricchita in peptidi mono-fosforilati). La seconda eluizione è stata effettuata con 80 µL di tampone di eluizione alcalino (40 µL di ammoniaca in 980 µL di H_2O ultrapura sterile, pH 11.3) (frazione alcalina arricchita in peptidi multifosforilati). La frazione flow-through e la frazione acida sono state seccate in Savant e risospese con 2 µL di 10% SDS. Sono state risospese in 1 mL di tampone di caricamento 2 (80% acetonitrile, 5% TFA e 1 M acido glicolico) + 0.6 mg di resina TiO_2 (per 100 µg di peptidi). Dopo 10 minuti di incubazione sono state centrifugate a 5,000xg per 1 min per rimuovere il supernatante. La resina è stata lavata prima con 80 µL di tampone di caricamento 2, poi con 80 µL di tampone di lavaggio 1 (80% acetonitrile, 5% TFA) ed infine con 50 µL di tampone di lavaggio 2 (20% acetonitrile, 0.1% TFA). L'eluizione è stata effettuata incubando per 10 min la resina di TiO_2 con 50 µL di tampone di eluizione alcalino (40 µL di ammoniaca in 980 µL di H_2O ultrapura sterile, pH 11.3). Il supernatante raccolto dopo centrifugazione a 5,000xg per 1 min è stato acidificato con 7 µL di acido formico (100%) e 2 µL di TFA 10%, e purificato su micro-colonne R3 come descritto sopra. La frazione alcalina è stata acidificata con 7 µL di acido formico (100%) e 2 µL di 10% TFA, e infine purificata su micro-colonne R3 come precedentemente descritto.

4.5.4 IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

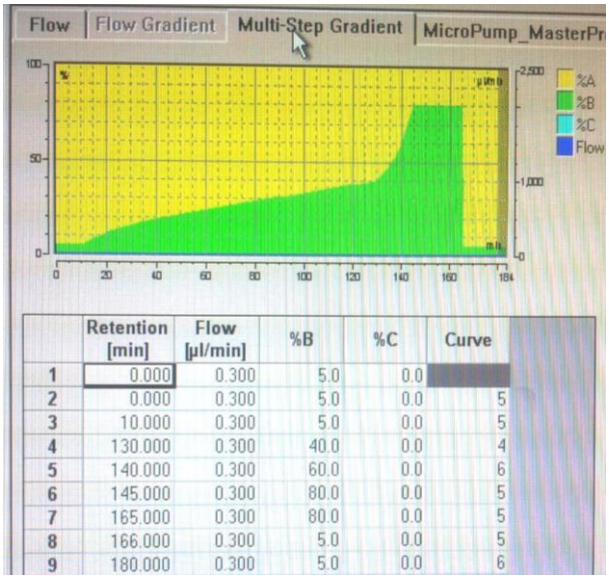
La spettrometria di massa è uno dei metodi attualmente più utilizzati per l'identificazione delle proteine. Uno spettrometro di massa è costituito da tre componenti principali: una sorgente ionica in cui l'analita è volatilizzato e ionizzato; un analizzatore di massa che separa gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z); un detector che rileva gli ioni e produce uno spettro di massa con il rapporto m/z in ascissa e l'intensità del segnale in ordinata. Esistono due tipi di sorgenti di ionizzazione "soft" utilizzate nell'analisi di peptidi: la sorgente MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) e quella ESI (Electro Spray Ionization). Nel caso della ionizzazione ESI il campione viene introdotto in fase liquida all'interno di un capillare a cui è applicato un voltaggio piuttosto alto che fa si che, una volta fuoriuscito dal capillare, nebulizzi sotto forma di goccioline contenenti sia il campione ionizzato che il solvente. Dopo l'evaporazione del solvente gli ioni (di carica uguale) del campione tendono a respingersi provocando l'esplosione della goccia e la liberazione degli ioni in fase gassosa i quali vengono poi accelerati verso l'analizzatore. La ESI-MS può essere accoppiata ad un sistema di separazione in fase liquida come l'elettroforesi capillare o la cromatografia liquida (LC), con il vantaggio di poter separare i peptidi e quindi ridurre la complessità del campione. Nella spettrometria di massa tandem, gli ioni formati nella sorgente vengono selezionati in base al loro rapporto m/z in un primo analizzatore che funge da filtro di massa, e quindi diretti in una cella di collisione, al cui interno è presente un flusso di gas inerte (azoto o argon): la collisione degli ioni peptidici con il gas ne provoca la frammentazione, un fenomeno noto come

dissociazione indotta dalla collisione (CID). Infine, un secondo analizzatore effettua la scansione degli ioni frammento che vengono indirizzati verso il detector, producendo uno spettro di massa-massa (MS/MS). Quando un peptide viene frammentato su un legame peptidico, solo uno dei due frammenti acquisisce la carica: i frammenti che vengono ionizzati all'estremità carbossi-terminale sono detti ioni "y", mentre quelli che vengono ionizzati all'estremità ammino-terminale sono detti ioni "b". Nello spettro di massa-massa ogni picco corrisponde a un frammento "b" o "y", dalla differenza di massa tra frammenti adiacenti della stessa serie ("y" o "b") si ottiene la massa corrisponde ad uno uno specifico residuo amminoacidico. Quindi dall'analisi dello spettro di frammentazione è possibile ricavare una parziale sequenza amminoacidica del peptide.

4.5.4.1 Analisi LC-MS/MS

Le analisi di spettrometria di massa tandem accoppiata con cromatografia liquida (LC-MS/MS) sono state eseguite utilizzando un HPLC in configurazione nano (Dionex Ultimate 3000 nano LC) accoppiato ad uno spettrometro di massa con analizzatore ibrido trappola ionica lineare – Orbitrap, equipaggiato con una sorgente nanoESI (LTQ Orbitrap XL Discovery, ThermoFinnigan San Jose, Ca). Attraverso l'autocampionatore sono stati caricati 5 µL di ciascun campione su una colonna nano di 75 µm (ID) x 17 cm, impaccata manualmente con resina a fase inversa C18 (Magic C18AQ; grandezza delle particelle: 5 µm; misura del poro: 200 Å; Michrom Bioresources, Auburn, CA). La separazione è avvenuta ad un flusso di 300 nL/min utilizzando un

gradiente “multi-step” di 180 min dal 5% al 80% di solvente B (0.1 % acido formico, 90% acetonitrile) come mostrato in **FIGURA 4.15**. Lo strumento operava in modalità data-dependent alternando un evento MS full-scan a cinque eventi MS/MS sui 5 ioni più abbondanti. Gli spettri MS full-scan (da m/z 300-2000) sono stati acquisiti nell’ Orbitrap con risoluzione R=30,000 a m/z 400. I cinque ioni peptidici più intensi con stato di carica ≥2 sono stati sequenzialmente isolati con una finestra di 2 Th e frammentati mediante dissociazione indotta da collisione (CID) nella trappola ionica lineare LTQ utilizzando una energia di collisione del 35% e un tempo di attivazione di 30 ms.Per valutare le fosforilazioni è stato utilizzato per la MS/MS il ‘MultiStageActivaction MSA’ che fondamentalmente permette una MS^3 nel momento che viene identificato un frammento con un aumento di massa derivante da un gruppo fosfato Lo spettrometro operava in modalità ioni positivi ad un voltaggio del capillare di 37 V e voltaggio dello spray di 1.9 kV.



	Retention [min]	Flow [µl/min]	%B	%C	Curve
1	0.000	0.300	5.0	0.0	
2	0.000	0.300	5.0	0.0	5
3	10.000	0.300	5.0	0.0	5
4	130.000	0.300	40.0	0.0	4
5	140.000	0.300	60.0	0.0	6
6	145.000	0.300	80.0	0.0	5
7	165.000	0.300	80.0	0.0	5
8	166.000	0.300	5.0	0.0	5
9	180.000	0.300	5.0	0.0	6

FIGURA 4.15 GRADIENTE “MULTI STEP”

4.5.5 ANALISI BIOINFORMATICA

4.5.5.1 RICERCA IN DATABASE

Gli spettri di massa acquisiti sono stati analizzati utilizzando la piattaforma MaxQuant (www.maxquant.org), versione 1.3.0.5 supportata da Andromeda come motore di ricerca.

L'algoritmo Andromeda è stato utilizzato per l'identificazione delle proteine nella banca dati genomica ARATH13 di *Arabidopsis thaliana* (UNIPROT, (ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/proteomes/). MaxQuant è caratterizzato da uno schema di lavoro che può essere suddiviso in 4 parti o schermate:

"Raw files"

"Group-specific parametres"

"MS/MS and sequences"

"Identification and quantification"

La schermata 1 consente di inserire i "raw file" ottenuti dall'analisi LC-MS/MS, e di inserire lo schema sperimentale (Experimental design).

La schermata 2, "Group-specific parametres", consente di definire le possibili modificazioni chimiche, sia fisse sia variabili, a carico delle sequenze peptidiche. Le ricerche sono state effettuate impostando come modificazioni variabili l'ossidazione della metionina, l'acetilazione all' N-terminale e la fosforilazione della serina, treonina e tirosina mentre tra quelle fisse (che si impostano nella terza schermata) è stata impostatata la carbamidometilazione della cisteina, generata dalla riduzione e alchilazione del campione con iodoacetamide. E' necessario inoltre

impostare l'incremento di massa della marcatura effettuata, dal momento che sono state utilizzate due marcature isotopiche (sono stati utilizzati isotopi leggeri e pesanti della formaldeide), la molteplicità è stata impostata a 2. Inoltre è necessario definire l'enzima con cui sono state generati i peptidi (tripsina) e visto che l'efficienza dell'enzima non è mai del 100%, ho tollerato 2 tagli mancati dell'enzima (missed cleavage). Le ricerche sono state effettuate impostando l'accuratezza di massa dello ione precursore monoisotopico a 6 ppm (accuratezza dello strumento) e quella dei frammenti peptidici a 20 ppm. Nella terza schermata, "MS/MS and sequences" sono definite le modificazioni fisse a carico del peptide ed inoltre viene definita la banca dati in cui sarà effettuata la ricerca. Nella ricerca vengono considerati anche possibili contaminanti, come cheratine e frammenti peptidici degli enzimi utilizzati per la digestione delle proteine. L'ultima schermata, "Identification and quantification" consente di definire i parametri riguardo alla stringenza con cui verrà effettuata la ricerca. Vengono considerati peptidi formati da un minimo di sette amminoacidi. I parametri statistici FDR ("false discovery rate") e PEP ("posterior error probability") sono impostati rispettivamente a 0.01 e 1 .

L'analisi statistica dei dati è stata realizzata utilizzando il programma Perseus versione 1.3.04.

4.5.5.2 ANNOTAZIONI FUNZIONALI E METODI DI PREDIZIONI

La localizzazione subcellulare, la funzione molecolare e i processi biologici delle proteine sono state determinate utilizzando AgriGO [Gene Ontology (GO) analysis toolkit and database for agricultural community,

http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/]. Il progetto Gene Ontology (http://www.geneontology.org/) fornisce una banca dati in cui i prodotti genici sono descritti secondo tre domini di interesse (ontologie): 1) componente cellulare, cioè le strutture di una cellula o del suo ambiente extracellulare in cui possono essere localizzate le proteine; 2) funzione molecolare, cioè le attività fondamentali a livello molecolare; 3) processi biologici, cioè la serie di eventi cellulari ai quali una proteina può prendere parte. La banca dati GO non è specie-specifica, infatti contiene dati relativi a organismi sia procarioti che eucarioti, sia monocellulari che multicellulari. La predizione della localizzazione subcellulare delle proteine identificate è stata realizzata usando il subCELlular LOcalization predictor (CELLO v.2.5, http://cello.life.nctu.edu.tw/). La predizione dei domini transmembrana è stata realizzata usando il programma THMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). Per le analisi di predizione delle fosforilazioni è stato utilizzato il database PhosPhAt 4.0 (http://phosphat.uni-hohenheim.de/index.html).

5. DISCUSSIONE GENERALE

Le piante, con l'enorme varietà di specie esistenti, da sempre hanno rappresentato per l'uomo la principale fonte di cibo, energia e di molti prodotti di importanza economica. Dall'avvento dell'agricoltura, l'uomo ha selezionato le piante al fine di migliorare le caratteristiche utili nelle specie coltivate, fino agli ultimi anni, dove il miglioramento genetico é diventato una scienza molto complessa che utilizza conoscenze derivanti da discipline scientifiche diverse ed arriva anche fino alle moderne biotecnologie che consentono di modificare le piante in modo molto mirato ed efficiente (Di Pietro e Sgreccia, 2003). Lo sviluppo di nuove varietà sempre più produttive derivanti dall'attività di miglioramento genetico, insieme all'uso di prodotti chimici quali i fertilizzanti e i pesticidi e all'incremento di tecniche agronomiche più efficienti, ha consentito di aumentare notevolmente le produzioni agricole. Per rispondere alle nuove sfide che si vanno profilando all'orizzonte tra cui quella alimentare e quella ambientale *in primis*, il settore agroalimentare richiede innovazione, tenendo conto di tutta l'ampia base di conoscenze e strumenti resi disponibili dalla moderna ricerca scientifica e tecnologica. E' in questa ottica che può essere di aiuto studiare come è possibile limitare l'uso di sostanze chimiche tossiche (in particolare per esempio l'uso dei pesticidi in agricoltura) o partecipare allo sviluppo di fonti energetiche rinnovabili, a basso impatto ambientale. Dunque la comprensione, da un lato, dei meccanismi naturali di difesa delle piante e, dall'altro, la caratterizzazione della composizione strutturale delle pareti vegetali, possono contribuire da una parte a sviluppare nuovi metodi di lotta integrata in agricoltura e dall'altra a sviluppare metodi di produzione sempre più efficienti di biocarburanti.

La parete cellulare è una complessa struttura delle cellule vegetali che, oltre ad essere responsabile della forma e della rigidità delle piante, costituisce un importante elemento di regolazione della crescita e del differenziamento. Rappresenta l'interfaccia tra la cellula e l'ambiente, e funziona non solo come una barriera di protezione contro l'attacco dei fitopatogeni ma anche come deposito di segnali regolatori, come gli oligogalatturonidi, che vengono rilasciati durante una infezione o in seguito al danno meccanico ma anche nello sviluppo delle piante. Inoltre le pareti cellulari vegetali di piante di interesse agrario rappresentano un'abbondante risorsa rinnovabile di biomassa che, senza togliere terreno all'agricoltura per uso alimentare, può essere utilizzata come substrato per la bioconversione a etanolo e dunque alla produzione di biocarburanti (capitolo 1).

Per questo motivo ho intrapreso uno studio articolato per determinare gli effetti delle alterazioni *in muro* della pectina, e in particolare come la pectina partecipi al corretto equilibrio tra sviluppo e difesa. Piante con alterazioni della pectina causate dall'espressione costitutiva di enzimi pectici come le PG hanno alterazioni nello sviluppo della pianta, sono più resistenti ai patogeni e sono inoltre più saccarificabili per il loro ridotto contenuto di omogalatturonano deesterificato (Ferrari et al., 2008; Ferrari et al., 2012). Inoltre, recentemente è stato dimostrato, che, in varietà naturali di Arabidopsis, vi è una correlazione tra basso contenuto di omogalatturonano e alta digeribilita enzimatica della cellulosa (Francocci et al., 2013). Questo a dimostrazione che le conoscenze che possono derivare da piante transgeniche possono poi essere anche utilizzate anche per il miglioramento genetico classico di piante di interesse agrario.

Nel mio lavoro mi sono occupata di valutare se l'espressione controllata di enzimi pectici possa contribuire a migliorare quelle caratteristiche desiderate quali l'aumentata resistenza ai patogeni e l'aumentata saccarificazione della biomassa vegetale, senza interferire nel normale sviluppo della pianta. Per questo motivo (capitolo 2) ho caratterizzato piante di Arabidopsis che esprimono la pectato liasi di *Erwinia carotovora* sotto il controllo di un promotore inducibile da estradiolo che, sebbene abbiano ha una scarsa applicazione, sono utili per studi di laboratorio. Le piante ottenute che esprimono, dopo induzione, l'enzima attivo sono più efficientemente degradabili ad opera di miscele enzimatiche contenenti prevalentemente cellulasi, e quindi sono più saccarificabili. Questo studio ha dunque una valenza nel miglioramento della produzione di biocarburante a partire da biomassa vegetale, in quanto può contribuire sia all'abbattimento dei costi dovuti al pre-trattamento delle biomasse su scala industriale sia all'abbassamento dell'impatto ambientale di tale processo. L'idea di base di questo studio è, infatti, materia del brevetto internazionale presentato dalla Sapienza dal titolo "Use of plants with reduced levels of de-esterified homogalacturonan in the cell wall or portion there of for improving the saccharification of plant biomasses" (Cervone et al., 2014).

Inoltre il controllo dell'espressione dell'attività enzimatica pectinolitica evita effetti indesiderati nello sviluppo della pianta, caratteristica importante nel caso di trasferimento tecnologico a varietà di interesse agronomico. A tal riguardo abbiamo studiato la possibilità di esprimere gli enzimi pectinolitici solo nella fase finale della vita della pianta, in modo tale di poter modificare le pectine solo nel momento in

cui le piante siano usate nella produzione di biofucarburante al termine del ciclo vitale. Infatti lo studio dell'espressione della AnPGII sotto il controllo di un promotore indotto nella senescenza della pianta, SAG12, ha mostrato che queste piante nella fase finale del ciclo vitale esprimono l'enzima pectico e risultano anch'esse più saccarificabili (dati in pubblicazione).

Sempre nell'intento di controllare le modifiche *in muro* della pectina, e quindi anche l'impatto sullo sviluppo della pianta, sono state generate delle piante transgeniche che esprimessero, sotto il controllo di un promotore inducibile, una proteina capace di produrre OG, chiamata appunto OG machine (**OGM**). Visto che l'importanza degli OG nelle risposte di difesa è stata sino ad ora esclusivamente determinata da prove *in vitro*, e l'assenza di evidenze sperimentali *in vivo* che l'interazione tra PG e PGIP porti ad un reale accumulo di OG *in vivo*, abbiamo provato ad esprimere le due proteine in un'unica proteina di fusione che ci permettesse di ottenere un accumulo equimolae e simultaneo delle due proteine. Queste piante effettivamente producono gli OG (capitolo 3), e le risposte di difesa attivate in queste piante sono collegate proprio ad aumentati livelli di OG, a loro volta causati dall'espressione controllata della proteina di fusione. Questa sistema sperimentale ha aperto la possibilità di effettuare diversi studi, soprattutto sugli effetti che gli OG, *in vivo*, hanno sulla difesa e sullo sviluppo della pianta.

Le piante che presentano un espressione elevata della proteina chimerica presentano una elevata induzione delle risposte di difesa che causaun rafforzamento tale della parte che non permette un aumento e anzi determina una riduzione dell'eefficienza della saccarificazione. In futuro, potendo controllare l'espressione della proteina chimerica (per

cui controllare la produzione di OG e le risposte di difesa ad esse collegate), valuteremo qual è il livello di OG che consenta di mantenere un buon equilibrio tra sviluppo, difesa e saccarificazione della biomassa vegetale.

A seguito della dimostrazione che piante che esprimono la proteina di fusione **OGM** hanno livelli maggiori di OG e una aumentato livello di espressione delle risposte di difesa, sono state generate piante che esprimessero la chimera sotto il controllo di un promotore indotto da stress biotico, quello del gene *PR-1* di Arabidopsis. Infatti pensando ad una possibile applicazione biotecnologica, avere una produzione di oligogalatturonidi nella pianta indotta da un promotore sensibile a diversi patogeni, può essere un potente strumento che conferisce una resistenza generica verso batteri e funghi fitopatogeni. Questi risultati sono, infatti, in procinto di essere inclusi in una domanda di brevetto dal titolo provvisorio "Ingegnerizzazione di resistenza a microrganismi patogeni mediante produzione *in vivo* di DAMPs (Profili Molecolari Associati al Danno) tramite una chimera proteica costituita da una poligalatturonasi fungina ed un inibitore proteico vegetale delle poligalatturonasi.".

Una delle sfide più importanti nella ricerca attuale consiste nell'individuazione e nella caratterizzazione dei prodotti proteici di ogni gene. Oggi infatti appare chiaro che il dogma centrale della biologia (un gene, un trascritto, una proteina) appare quantomeno insufficiente. Esistono infatti numerosi geni che, trascritti, vanno incontro a *splicing* alternativo, e che i prodotti di traduzione, le proteine, vanno in contro a diverse modifiche post traduzionali (PTM). Le PTM modulano l'attività

della maggior parte delle proteine eucariotiche e consistono in diversi eventi che permettono di modulare l'attività, la localizzazione se non l'interazione con altre proteine (Mann e Jensen, 2003). Tra questi un meccanismo di regolazione fine e veloce è l'aggiunta e/o la rimozione di gruppi fosfato in maniera reversibili da parte delle chinasi.

La parete cellulare rappresenta il 'primo sensore' per la cellula vegetale dell'ambiente circostante. La pianta, per attuare velocemente delle risposte ai cambiamenti ambientali, deve recepire e tradurre rapidamente i segnali che provengono dalla parete. Come la pianta riesca a percepire gli OG come un 'segnale' dell'attacco da patogeno oppure di una ferita, oppure del normale sviluppo, e differenziare le risposte è ancora poco chiaro. Per valutare gli eventi precoci della percezione e della segnalazione degli OG, ho pensato di studiare gli eventi di fosforilazione che si verificano entro i primi minuti dopo la percezione (capitolo 4). Con questo lavoro è stato fatto un primo passo verso lo studio delle dinamiche del fosfoproteoma di membrana in risposta agli oligogalatturonidi. Nonostante attualmente la frazione di siti di fosforilazione per i quali è possibile ottenere informazioni quantitative non sia molto elevata, credo che un'analisi più approfondita, che verrà condotta nei mesi futuri, mi consentirà di aumentarne il numero.

Comunque, questa indagine fosfoproteomica ha fornito una base indispensabile per nuove analisi mirate in un settore che è oggetto di intense ricerche. Infatti il primo dato, largamente atteso, è che non vi sono variazioni significative della quantità delle proteine di membrana in risposta agli OG. La regolazione dell'attività proteica, specialmente in relazione alle variazioni di brevissimo termine in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli, viene attuata dunque a livello post-traduzionale.

Per esempio, per la subunità D della V-ATPasi e per la H+-ATPasi 2 di membrana plasmatica, i dati di proteomica quantitativa mostrano che l'abbondanza proteica complessiva non varia in risposta agli OG, mentre l'analisi fosfoproteomica ha evidenziato la variazione di abbondanza di un sito di fosforilazione. Per queste proteine quindi la regolazione avviene mediante modificazioni post-traduzionale di fosforilazione/defosforilazione senza bisogno di sintesi/degradazione *de novo* per spiegarne il ruolo fisiologico.

I risultati presentati in questo studio di fosfoproteomica delle membrane hanno indicato nuove proteine candidate, probabilmente coinvolte nella via di segnalazione dei DAMP, il cui ruolo biologico potrà essere approfondito in esperimenti futuri.

Una sfida ulteriore sarà quella di definire gli elementi che contraddistinguono il "sistema di monitoraggio dell'integrità della pectina" (PIMS: pectin integrity monitoring system), per fornire conoscenze utili per l'applicazione biotecnologica nelle piante.

.

6. BIBLIOGRAFIA

Abel S, Savchenko T, Levy M (2005) Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. BMC Evol Biol **5**: 72

Achyuthan KE, Achyuthan AM, Adams PD, Dirk SM, Harper JC, Simmons BA, Singh AK (2010) Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. Molecules **15**: 8641-8688

Ahuja I, Kissen R, Bones AM (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. Trends Plant Sci **17**: 73-90

Aist JR (1983) Structural responses as resistance mechanisms. In JA Bailey, BJ Deverall, eds, The Dynamics of Host Defence. Academic Press, Sidney, pp 33-70

An HJ, Lurie S, Greve LC, Rosenquist D, Kirmiz C, Labavitch JM, Lebrilla CB (2005) Determination of pathogen-related enzyme action by mass spectrometry analysis of pectin breakdown products of plant cell walls. Anal Biochem **338**: 71-82

Anderson CM, Wagner TA, Perret M, He ZH, He D, Kohorn BD (2001) WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. Plant Mol Biol **47**: 197-206

Bartling S, Wegener C, Olsen O (1995) Synergism between *Erwinia* pectate lyase isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin. Microbiology **141**: 873-881

Bell AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. Annu Rev Plant Physiol **32**: 21-81

Bellincampi D, Dipierro N, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G (2000) Extracellular H_2O_2 induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. Plant Physiol **122**: 1379-1385

Bellincampi D, Salvi G, De Lorenzo G, Cervone F, Marfà V, Eberhard S, Darvill A, Albersheim P (1993) Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. Plant J **4**: 207-213

Benedetti M, Andreani F, Leggio C, Galantini L, Di Matteo A, Pavel NV, De Lorenzo G, Cervone F, Federici L, Sicilia F (2013) A single amino-acid substitution allows endo-polygalacturonase of Fusarium

verticillioides to acquire recognition by PGIP2 from Phaseolus vulgaris. PLoS One **8**: e80610

Benedetti M, Leggio C, Federici L, De Lorenzo G, Pavel NV, Cervone F (2011) Structural Resolution of the Complex between a Fungal Polygalacturonase and a Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein by Small-Angle X-Ray Scattering. Plant Physiol **157**: 599-607

Benen JAE, Kester HC, Visser J (1999) Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. Eur J Biochem **259**: 577-585

Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke FL (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. Mol Cell Proteomics **6**: 1198-1214

Bittel P, Robatzek S (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. Curr Opin Plant Biol **10**: 335-341

Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJ (2009) Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. Nat Protoc **4**: 484-494

Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu Rev Plant Biol **60**: 379-406

Bonivento D, Pontiggia D, Di Matteo A, Fernandez-Recio J, Salvi G, Tsernoglou D, Cervone F, De Lorenzo G, Federici L (2008) Crystal structure of the endopolygalacturonase from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lupini* and its interaction with polygalacturonase-inhibiting proteins. Proteins **70**: 294-299

Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker MT, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Hofte H, Truong HN (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis. Plant Cell **14**: 2577-2590

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254

Brown S, Sampson RN, Schlamadinger B, Kinsman J (2001) Policy considerations for using forests to mitigate carbon dioxide emissions. ScientificWorldJournal **1**: 241-242

Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proc Natl Acad Sci USA **107**: 9452-9457

Buchanan B, Gruissem W, Jones RL (2002) Carbohydrate metabolism. Biochemistry & Molecular Biology of Plants

Capodicasa C, Vairo D, Zabotina O, McCartney L, Caprari C, Mattei B, Manfredini C, Aracri B, Benen J, Knox JP, De Lorenzo G, Cervone F (2004) Targeted modification of homogalacturonan by transgenic expression of a fungal polygalacturonase alters plant growth. Plant Physiol **135**: 1294-1304

Carette JE, Verver J, Martens J, van Kampen T, Wellink J, van Kammen A (2002) Characterization of plant proteins that interact with cowpea mosaic virus '60K' protein in the yeast two-hybrid system. J Gen Virol **83**: 885-893

Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J **3**: 1-30

Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B (2012) The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in Arabidopsis. Plant Physiol **158**: 423-438

Cervone F, Hahn MG, De Lorenzo G, Darvill A, Albersheim P (1989) Host-pathogen interactions. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. Plant Physiol **90**: 542-548

Cervone F, De Lorenzo G, Bellincampi D, Ferrari S, Lionetti V, Salvi G, Francocci F, Pontiggia D. Use of plants with reduced levels of de-esterified homogalacturonan in the cell wall or portions thereof for improving the saccharification of plant biomasses. 2014.Patents.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature **448**: 497-500

Cosgrove DJ (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. Plant Physiol **125**: 131-134

D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G (2004) Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. Plant Physiol **135**: 2424-2435

Dashtban M, Schraft H, Qin W (2009) Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. Int J Biol Sci **5**: 578-595

Davis KR, Darvill AG, Albersheim P, Dell A (1986) Host-pathogen interactions. XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. Plant Physiol **80**: 568-577

Davis KR, Hahlbrock K (1987) Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. Plant Physiol **85**: 1286-1290

De Lorenzo G, Brutus A, Savatin DV, Sicilia F, Cervone F (2011) Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). FEBS Lett **585**: 1521-1528

De Lorenzo G, Castoria R, Bellincampi D, Cervone F (1997) Fungal invasion enzymes and their inhibition. In GC Carroll, P Tudzynski, eds, The Mycota. V. Plant Relationships, Part B. Springer-Verlag, Berlin, pp 61-83

De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F (2001) The role of polygacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. Annu Rev Phytopathol **39**: 313-335

De Lorenzo G, Ferrari S (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. Curr Opin Plant Biol **5**: 295-299

Decreux A, Thomas A, Spies B, Brasseur R, Van Cutsem P, Messiaen J (2006) In vitro characterization of the homogalacturonan-binding

domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. Phytochemistry **67**: 1068-1079

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. Mol Plant **1**: 423-445

Desiderio A, Aracri B, Leckie F, Mattei B, Salvi G, Tigelaar H, Van Roekel JS, Baulcombe DC, Melchers LS, De Lorenzo G, Cervone F (1997) Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. Mol Plant-Microbe Interact **10**: 852-60

Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006) Vacuolar H+-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. Plant Cell **18**: 715-730

Di Pietro ML, Sgreccia E (2003) Biotecnologie e futuro dell'uomo. Vita e pensiero,

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. Anal Chem **28**: 350-358

Elmore JM, Coaker G (2011) The role of the plasma membrane H+-ATPase in plant-microbe interactions. Mol Plant **4**: 416-427

Fernandez-Calvino L, Faulkner C, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, Maule A (2011) Arabidopsis plasmodesmal proteome. PLoS ONE **6**: e18880

Ferrari S, Galletti R, Pontiggia D, Manfredini C, Lionetti V, Bellincampi D, Cervone F, De Lorenzo G (2008) Transgenic expression of a fungal endo-polygalacturonase increases plant resistance to pathogens and reduces auxin sensitivity. Plant Physiol **146**: 669-681

Ferrari S, Lionetti V, Francocci F, Benedetti M, Pontiggia D, Tomassetti S, Bellincampi D, De Lorenzo G, Cervone F (2012) Pectin Modification Improves Utilization of Plant Biomasses to Biofuel Conversion. Pharmaceutical Biology **50**: 669-670

Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular

patterns and regulators of growth and development. Front Plant Sci **doi: 10.3389/fpls.2013.00049**:

Francocci F, Bastianelli E, Lionetti V, Ferrari S, De Lorenzo G, Bellincampi D, Cervone F (2013) Analysis of pectin mutants and natural accessions of Arabidopsis highlights the impact of de-methyl-esterified homogalacturonan on tissue saccharification. Biotechnology for Biofuels **6**: 163

Frey NFD, Robatzek S (2009) Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? Curr Opin Plant Biol **12**: 437-443

Gaedeke N, Klein M, Kolukisaoglu U, Forestier C, Muller A, Ansorge M, Becker D, Mamnun Y, Kuchler K, Schulz B, Mueller-Roeber B, Martinoia E (2001) The Arabidopsis thaliana ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. EMBO J **20**: 1875-1887

Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, De Lorenzo G, Ferrari S (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. Plant Physiol **148**: 1695-1706

Galletti R, Ferrari S, De Lorenzo G (2011) Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. Plant Physiol **157**: 804-814

Gobom J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff P (1999) Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom **34**: 105-116

Goldstrohm DA, Broeckling CD, Prenni JE, Curthoys NP (2011) Importance of manual validation for the identification of phosphopeptides using a linear ion trap mass spectrometer. J Biomol Tech **22**: 10-20

Gomez-Gomez L, Boller T (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends Plant Sci **7**: 251-256

Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the "egg box" model. FEBS Lett **32**: 195-198

Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 525-545

Hahn MG (1981) Fragments of plant and fungal cell wall polysaccharides elicit the accumulation of phytoalexins in plants. Ph.D. Thesis, University of Colorado, Boulder, CO

Hahn MG, Darvill AG, Albersheim P (1981) Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol **68**: 1161-1169

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV (2010) Biosynthesis of Pectin. Plant Physiol **153**: 384-395

Hernandez-Mata G, Mellado-Rojas ME, Richards-Lewis A, Lopez-Bucio J, Beltran-Pena E, Soriano-Bello EL (2010) Plant Immunity Induced by Oligogalacturonides Alters Root Growth in a Process Involving Flavonoid Accumulation in Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Growth Regulation **29**: 441-454

Herron SR, Scavetta RD, Garrett M, Legner M, Jurnak F (2003) Characterization and implications of Ca2+ binding to pectate lyase C. J Biol Chem **278**: 12271-12277

Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science **315**: 804-807

Himmel ME, Ruth MF, Wyman CE (1999) Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. Curr Opin Biotechnol **10**: 358-364

Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E, Egelhofer V, Rohrig H, Weckwerth W, Conrath U, Beckers GJ (2013) Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in Arabidopsis thaliana through use of tandem metal oxide affinity chromatography. Mol Cell Proteomics **12**: 369-380

Jarvis MC, Forsyth W, Duncan HJ (1988) A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. Plant Physiol **88**: 309-314

Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puah CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D (2005) VANGUARD1 Encodes a Pectin Methylesterase That Enhances Pollen Tube Growth in the Arabidopsis Style and Transmitting Tract. Plant Cell **17**: 584-596

Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, Zipfel C (2014) Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. Mol Cell **54**: 43-55

Kazan K (2013) Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. Ann Bot **112**: 1655-1665

Keegstra K (2010) Plant cell walls. Plant Physiol **154**: 483-486

Kim SG, Lee S, Seo PJ, Kim SK, Kim JK, Park CM (2010) Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in Arabidopsis and rice. Genomics **95**: 56-65

Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol **35**: 377-391

Lagaert S, Belien T, Volckaert G (2009) Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. Semin Cell Dev Biol **20**: 1064-1073

Lao NT, Long D, Kiang S, Coupland G, Shoue DA, Carpita NC, Kavanagh TA (2003) Mutation of a family 8 glycosyltransferase gene alters cell wall carbohydrate composition and causes a humidity-sensitive semi-sterile dwarf phenotype in Arabidopsis. Plant Mol Biol **53**: 647-661

Larsson C, Widell S, Kjellbom P (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. Meth Enzymol **148**: 558-568

Leckie F, Mattei B, Capodicasa C, Hemmings A, Nuss L, Aracri B, De Lorenzo G, Cervone F (1999) The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed β- strand/β-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. EMBO J **18**: 2352-2363

Liepman AH, Cavalier DM (2012) The CELLULOSE SYNTHASE-LIKE A and CELLULOSE SYNTHASE-LIKE C families: recent advances and future perspectives. Front Plant Sci **3**: 109

Lionetti V, Francocci F, Ferrari S, Volpi C, Bellincampi D, Galletti R, D'Ovidio R, De Lorenzo G, Cervone F (2010) Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. Proc Natl Acad Sci USA **107**: 616-621

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D (2007) Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol **143**: 1871-1880

Lionetti V, Raiola A, Cervone F, Bellincampi D (2014) Transgenic expression of pectin methylesterase inhibitors limits tobamovirus spread in tobacco and Arabidopsis. Mol Plant Pathol **15**: 265-274

Liscum E, Reed JW (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Mol Biol **49**: 387-400

Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, Salvi G, Caprari C, Lorito M, De Lorenzo G (2005) Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. Physiol Mol Plant Pathol **67**: 108-115

Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat Biotechnol **21**: 255-261

Marin-Rodriguez MC, Orchard J, Seymour GB (2002) Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. J Exp Bot **53**: 2115-2119

Marmagne A, Rouet MA, Ferro M, Rolland N, Alcon C, Joyard J, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G (2004) Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. Mol Cell Proteomics **3**: 675-691

Mattei B, Galletti R, Manfredini C, Pontiggia D, Salvi G, Spadoni S, Caprari C, Ferrari S, Bellincampi D, Cervone F, De Lorenzo G (2005) Recognition and signalling in the cell wall: The case of endopolygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides. Plant Biosystems **139**: 24-27

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell **126**: 969-980

Mongrand S, Stanislas T, Bayer EM, Lherminier J, Simon-Plas F (2010) Membrane rafts in plant cells. Trends Plant Sci **15**: 656-663

Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is

inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. Curr Biol **6**: 1104-1113

Muthamilarasan M, Prasad M (2013) Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. J Biosci **38**: 433-449

Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. Plant Physiol **135**: 1113-1128

Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. Science **301**: 969-972

O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. Planta **236**: 765-779

O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. Science **294**: 846-849

Osorio S, Castillejo C, Quesada MA, Medina-Escobar N, Brownsey GJ, Suau R, Heredia A, Botella MA, Valpuesta V (2008) Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). Plant J **54**: 43-55

Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **17**: 3282-3300

Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science **318**: 113-116

Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. Plant J **54**: 559-568

Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. Curr Opin Plant Biol **12**: 421-426

Rasmussen MW, Roux M, Petersen M, Mundy J (2012) MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. Front Plant Sci **3**: 169

Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S (2012) Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ **35**: 1483-1499

Rhee SY, Somerville CR (1998) Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. Plant J **15**: 79-88

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry **57**: 929-967

Rothman JE, Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. Science **272**: 227-234

Rubin EM (2008) Genomics of cellulosic biofuels. Nature **454**: 841-845

Rudashevskaya EL, Ye J, Jensen ON, Fuglsang AT, Palmgren MG (2012) Phosphosite mapping of P-type plasma membrane H+-ATPase in homologous and heterologous environments. J Biol Chem **287**: 4904-4913

Savatin DV, Ferrari S, Sicilia F, De Lorenzo G (2011) Oligogalacturonide-auxin antagonism does not require posttranscriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in Arabidopsis. Plant Physiol **157**: 1163-1174

Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology, Vol 61 **61**: 263-289

Schols HA, Voragen AGJ (1994) Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. Carbohydr Res **256**: 83-95

Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. J Biol Chem **285**: 9444-9451

Schumacher K, Krebs M (2010) The V-ATPase: small cargo, large effects. Curr Opin Plant Biol **13**: 724-730

Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiol Biochem **46**: 941-950

Seo PJ, Kim SG, Park CM (2008) Membrane-bound transcription factors in plants. Trends Plant Sci **13**: 550-556

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem **150**: 76-85

Sorensson C, Lenman M, Veide-Vilg J, Schopper S, Ljungdahl T, Grotli M, Tamas MJ, Peck SC, Andreasson E (2012) Determination of primary sequence specificity of Arabidopsis MAPKs MPK3 and MPK6 leads to identification of new substrates. Biochem J **446**: 271-278

Szemenyei H, Hannon M, Long JA (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. Science **319**: 1384-1386

Taherzadeh MJ, Karimi K (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. Int J Mol Sci **9**: 1621-1651

Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR (2009) Enrichment and separation of mono- and multiply phosphorylated peptides using sequential elution from IMAC prior to mass spectrometric analysis. Methods Mol Biol **527**: 67-78, xi

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell **9**: 1963-1971

Underwood W (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. Front Plant Sci **3**:

van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol

Verica JA, Chae L, Tong HY, Ingmire P, He ZH (2003) Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in Arabidopsis. Plant Physiol **133**: 1732-1746

Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AG, Visser RG (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. Plant Physiol **132**: 1781-1789

Wagner TA, Kohorn BD (2001) Wall-Associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. Plant Cell **13**: 303-318

Wang P, Du Y, Li Y, Ren D, Song CP (2010) Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis. Plant Cell **22**: 2981-2998

Willats WG, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant Mol Biol **47**: 9-27

Willats WG, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJ, Voragen AG, Marcus SE, Christensen TM, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP (2001b) Modulation of the degree and pattern of methyl esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties and cell adhesion. J Biol Chem 19404-19413

Wolf S, Greiner S (2012a) Growth control by cell wall pectins. Protoplasma **249 Suppl 2**: S169-S175

Wolf S, Greiner S (2012b) Growth control by cell wall pectins. Protoplasma **249 Suppl 2**: S169-S175

Wolf S, Hematy K, Hofte H (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. Annu Rev Plant Biol **63**: 381-407

Yapo BM (2011) Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins-A new hypothetical model. Carbohydr Polym **86**: 373-385

Yuan JS, Tiller KH, Al Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN, Jr. (2008) Plants to power: bioenergy to fuel the future. Trends Plant Sci **13**: 421-429

Zhang ZJ, Peck SC (2011) Simplified enrichment of plasma membrane proteins for proteomic analyses in Arabidopsis thaliana. Proteomics **11**: 1780-1788

Zuo J, Niu QW, Chua NH (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J **24**: 265-273

7. APPENDICE

TABELLA 5-1 PROTEINE DI MEMBRANA PLASMATICA IDENTIFICATE PER I CAMPIONI PMIX E WMIX DIVISE PER FUNZIONI MOLECOLARI E PROCESSI BIOLOGICI. A) *ID ARATH13: codice identificativo della proteina per la banca dati ARATH13;* B) *ID TAIR10: codice identificativo della proteina per la banca dati TAIR10;* C) *Descrizione: nome della proteina;* D) *Peptidi: numero di peptidi identificati mediante MS/MS;* E) *PEP (posterior error probability): è definita come la probabilità di ottenere un falso positivo, data dallo "score" di identificazione del peptide e dalla lunghezza del peptide;* F) *Fosfo: + indica la presenza di un peptide fosforilato;* G) *Fraz: W=proteina identificata solo nei campioni Wmix; P= proteina identificata solo nei campioni Pmix; W-P: proteina identificata sia nei campioni Pmix che Wmix;* H) *Loc.: localizzazione subcellulare predetta con CELLO (v.2.5 subCELlular LOcalization predictor, http://cello.life.nctu.edu.tw/) (GA: Apparato del Golgi, PM: Membrana plasmatica, PX: perossisomi, ER: Reticolo endoplasmatico, CYT: citoso,. PLA: plastidi, MIT: mitocondri, EX:extracellulare);* K)*TM: numero di domini transmembrana predetti con il programma THMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).*

A	B	C	D	E	F	G	H	K
Recettori								
Q9LP77	AT1G48480	Probable inactive receptor kinase At1g48480	1	2.81E-27		W-P	PM	2
Q9M8T0	AT3G02880	Probable inactive receptor kinase At3g02880	5	3.87E-65	+	W-P	PM	2
Q9FMD7	AT5G16590	Probable inactive receptor kinase At5g16590	3	2.31E-14		P	PM	2
Q9LVI6	AT3G17840	Probable inactive receptor kinase RLK902	2	3.84E-07		P	PM	1
Q8VZG8	AT4G08850	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850	1	0.0023677		P	NU	2
Q9LV48	AT3G24550	Proline-rich receptor-like protein kinase PERK1	1	1.56E-27		P	NU	1
Q9SCZ4	AT3G51550	Receptor-like protein kinase FERONIA	1	0.0077866		P	PM	2
Q944A7	AT4G35230	Probable serine/threonine-protein kinase At4g35230	2	7.43E-06		P	CYT	0
Trasporto								
Q84M24	AT2G41700	ABC transporter A family member 1	1	0.0088321		P	PM	15
Q9LJX0	AT3G28860	ABC transporter B family member 19	2	1.40E-40		P	PM	10
Q9M1Q9	AT3G62150	ABC transporter B family member 21	3	4.55E-77		W-P	PM	9
Q9C8G9	AT1G30400	ABC transporter C family member 1	3	4.66E-22		P	PM	14
Q9LZJ5	AT3G62700	ABC transporter C family	7	2.56E-35		W-P	PM	16

		member 14						
Q7DM58	AT2G47800	ABC transporter C family member 4	3	2.28E-29		P	PM	15
Q93YS4	AT5G06530	ABC transporter G family member 22	1	0.0048123		W	PM	5
Q7PC87	AT2G36380	ABC transporter G family member 34	6	9.35E-22		W-P	PM	12
Q9XIE2	AT1G59870	ABC transporter G family member 36	38	4.07E-264		W-P	PM	13
Q9M9E1	AT1G15520	ABC transporter G family member 40	2	2.31E-07		W	PM	13
P43286	AT3G53420	Aquaporin PIP2-1	7	1.28E-46	+	W-P	PM	6
P43287	AT2G37170	Aquaporin PIP2-2	7	5.62E-47	+	W-P	PM	6
P30302	AT2G37180	Aquaporin PIP2-3	3	3.50E-20	+	P	PM	6
P93004	AT4G35100	Aquaporin PIP2-7	2	2.45E-10	+	P	PM	6
Q41963	AT3G26520	Aquaporin TIP1-2	1	3.05E-06		W-P	PM	7
Q41951	AT3G16240	Aquaporin TIP2-1	1	4.40E-18		P	PM	6
P31167	AT3G08580	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial	23	5.98E-254		W-P	PLA	3
P40941	AT5G13490	ADP,ATP carrier protein 2, mitochondrial	13	2.43E-66		W-P	MIT	3
Q9FJX3	AT5G67500	Mitochondrial outer membrane protein porin 2	12	3.05E-71		W-P	MIT	0
Q9SMX3	AT5G15090	Mitochondrial outer membrane protein porin 3	9	1.15E-119		W-P	MIT	0
Q9FKM2	AT5G57490	Mitochondrial outer membrane protein porin 4	1	2.91E-18		P	MIT	0
Q9FMU6	AT5G14040	Mitochondrial phosphate carrier protein 3, mitochondrial	14	9.50E-79		P	MIT	0
Q9C5M0	AT5G19760	Mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter DTC	8	7.35E-32		W-P	MIT	0
Q944S8	AT4G21105	Acytochrome-c oxidase/ electron carrier	1	0.0021975		W	MIT	1
Q9C5M0	AT5G19760	Mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter DTC	8	7.35E-32		W-P	MIT	0
Q9FJX3	AT5G67500	Mitochondrial outer membrane protein porin 2	12	3.05E-71		W-P	MIT	0
Q9SMX3	AT5G15090	Mitochondrial outer membrane protein porin 3	9	1.15E-119		W-P	MIT	0
Q9FKM2	AT5G57490	Mitochondrial outer membrane protein porin 4	1	2.91E-18		P	MIT	0

Q9FMU6	AT5G14040	Mitochondrial phosphate carrier protein 3, mitochondrial	14	9.50E-79		P	MIT	0
Q9C7F5	AT1G27970	Nuclear transport factor 2	4	8.50E-83		P	EX	0
Q8LAA6	AT4G23400	Probable aquaporin PIP1-5	3	1.24E-11		P	PM	6
Q9ZV07	AT2G39010	Probable aquaporin PIP2-6	2	1.23E-06		P	PM	6
Q9LT02	AT5G23630	Probable cation-transporting ATPase	2	2.28E-05		P	PM	10
O23144	AT4G27500	Proton pump-interactor 1	3	7.80E-11		W-P	NU	1
Q39232	AT1G71880	Sucrose transport protein SUC1	1	1.24E-05		P	PM	12
P23586	AT1G11260	Sugar transport protein 1	1	2.69E-08		P	PM	12
Q94AZ2	AT5G26340	Sugar transport protein 13	1	2.68E-15		W-P	PM	12
Q93YP9	AT1G19450	Sugar transporter ERD6-like 4	2	9.52E-11		P	PM	12
Q9FRL3	AT1G75220	Sugar transporter ERD6-like 6	2	2.14E-21		P	PM	12
Q9FJH6	AT5G60790	ABC transporter F family member 1	4	7.54E-20		P	CYT	0
Q93VM8	AT5G20650	Copper transporter 5	1	5.21E-06		P	PM	3
O23016	AT1G04690	Probable voltage-gated potassium channel subunit beta	4	2.24E-18		W-P	CYT	0
Q39221	AT2G01470	SEC12-like protein 2	1	3.36E-11		W-P	PLA	1
Q8VYM2	AT5G43350	Inorganic phosphate transporter 1-1	2	6.09E-39		W-P	PM	11
Q9SRH5	AT3G01280	Mitochondrial outer membrane protein porin 1	11	9.40E-85		W-P	MIT	0
Q9STE8	AT3G46740	Protein TOC75-3, chloroplastic	3	6.38E-27		P	PLA	0
P45434	AT2G21160	Translocon-associated protein subunit alpha	3	6.75E-11		P	PM	1
Q9LHE5	AT3G20000	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog 1	1	0.00041228		W-P	MIT	0
P31414	AT1G15690	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1	6	3.61E-203		W-P	PM	14
O04200	AT2G39970	Peroxisomal nicotinamide adenine dinucleotide carrier	1	5.68E-29		P	MIT	3
Q944S8	AT4G21105	Acytochrome-c oxidase/ electron carrier	1	0.0021975		W	MIT	1
Q42342	AT5G53560	Cytochrome b5 isoform A	1	0.0013754		P	NU	1
P56779	ATCG00580	Cytochrome b559 subunit alpha	3	5.72E-24		W-P	PM	1
Q9ZR03	AT4G03280	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic	3	1.11E-26		W-P	PLA	1
Q9SUU5	AT4G32470	Cytochrome b-c1 complex subunit 7-1	3	3.70E-24		W	MIT	0
O49652	AT4G22710	Cytochrome P450 - like protein	4	5.05E-12		P	CYT	1
O65782	AT4G31500	Cytochrome P450 83B1	4	9.29E-14		P	CYT	0

Q07488	AT5G20230	Blue copper protein	1	3.10E-06		P	PM	0
P57758	AT5G40670	Cystinosin homolog	1	6.14E-30		P	PM	7
O80517	AT2G44790	Uclacyanin-2	1	0.0025356		W-P	EX	2
ATPasi								
P20649	AT2G18960	ATPase 1, plasma membrane-type	29	4.12E-242	+	W-P	PM	10
Q9LV11	AT5G62670	ATPase 11, plasma membrane-type	9	2.54E-126		W-P	PM	9
F4JPJ7	AT4G30190	ATPase 2, plasma membrane-type	28	5.58E-195	+	W-P	PM	8
Q37145	AT1G27770	Calcium-transporting ATPase 1, chloroplastic	2	7.35E-30		P	PM	8
Q9SZR1	AT4G29900	Calcium-transporting ATPase 10, plasma membrane-type	2	1.58E-07		P	PM	8
O22218	AT2G41560	Calcium-transporting ATPase 4, plasma membrane-type	3	2.06E-42		P	PM	8
Q9LF79	AT5G57110	Calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type	1	4.47E-06		W-P	PM	6
Q9M2L4	AT3G57330	Putative calcium-transporting ATPase 11, plasma membrane-type	1	9.16E-77		P	PM	10
O23654	AT1G78900	V-type proton ATPase catalytic subunit A	15	1.62E-139		W-P	CYT	0
P11574	AT1G76030	V-type proton ATPase subunit B1	30	0		W	CYT	0
Q9SDS7	AT1G12840	V-type proton ATPase subunit C	4	3.27E-46		W-P	NU	0
Q9XGM1	AT3G58730	V-type proton ATPase subunit D	4	2.15E-14		W-P	MIT	0
Q9LJI5	AT3G28710	V-type proton ATPase subunit d1	15	3.25E-259		W	CYT	0
Q39258	AT4G11150	V-type proton ATPase subunit E1	2	0.00013633		W-P	CYT	0
Q9ZQX4	AT4G02620	V-type proton ATPase subunit F	7	3.14E-38		W	PM	0
O82628	AT3G01390	V-type proton ATPase subunit G1	13	3.44E-170		W	NU	0
O82629	AT4G23710	V-type proton ATPase subunit G2	5	4.04E-67		W	NU	0
Q9SSS9	AT4G09650	F-type H+-transporting ATPase subunit delta	1	1.68E-06		W-P	PLA	0
Q9SJT7	AT2G21410	Vacuolar proton ATPase a2	13	2.26E-224		P	PM	6
Q8W4S4	AT4G39080	Vacuolar proton ATPase a3	23	0		W-P	PM	6
Q9LHA4	AT3G28715	V-type proton ATPase subunit d2	1	0.0039217		W-P	CYT	0
Q9LX65	AT3G42050	V-type proton ATPase subunit H	3	2.07E-42		W-P	CYT	0
Folding								
P29402	AT5G61790	Calnexin homolog 1	3	5.71E-21		W-P	ER	1

P42825	AT5G22060	Chaperone protein dnaJ 2	2	5.59E-28		W-P	NU	0
Q94AW8	AT3G44110	Chaperone protein dnaJ 3	3	6.32E-31		W-P	NU	0
P21240	AT1G55490	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic	11	6.40E-166		W-P	PLA	0
P29197	AT3G23990	Chaperonin CPN60, mitochondrial	3	3.86E-15		W-P	MIT	0
Q940P8	AT5G20890	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	1	0.00058073		W	CYT	0
Q93ZM7	AT3G13860	Chaperonin CPN60-like 2, mitochondrial	1	0.00243		W	MIT	0
O04450	AT1G24510	T-complex protein 1 subunit epsilon	2	1.15E-35		P	CYT	0
Q0WT48	AT1G79940	J domain protein	2	1.58E-19		P	PM	3
Traffico vescicolare								
Q9SEL6	AT5G39510	Vesicle transport v-SNARE 11	1	1.26E-17		P	NU	1
O49377	AT4G32150	Vesicle-associated membrane protein 711	1	1.79E-05		P	PM	1
Q9ZTW3	AT1G04750	Vesicle-associated membrane protein 721	4	1.62E-08		P	CYT	1
Q0WLB5	AT3G08530	Clathrin heavy chain 2	40	0		W-P	CYT	0
Q8H1F4	AT4G08520	Coatomer subunit zeta-3	1	2.89E-08		P	GA	0
Q9ZSD4	AT3G11820	Syntaxin-121	1	1.46E-37		W-P	NU	1
Q9SVC2	AT3G52400	Syntaxin-122	1	0.00026809		P	NU	1
Q9SF29	AT3G09740	Syntaxin-71	3	6.11E-42		P	NU	1
O49513	AT4G18430	Ras-related protein RABA1e	1	0.0077335		W-P	CYT	0
Q96283	AT3G46830	Ras-related protein RABA2c	2	1.00E-10		W-P	CYT	0
Q9FIF9	AT5G59150	Ras-related protein RABA2d	2	1.10E-10		W-P	CYT	0
Q9ZRE2	AT3G11730	Ras-related protein RABD1	1	1.50E-06		P	EX	0
Q9FPJ4	AT5G47200	Ras-related protein RABD2b	3	5.87E-58		W-P	GA	0
P28186	AT3G46060	Ras-related protein RABE1c	4	3.48E-27		P	PLA	0
Q9C820	AT1G52280	Ras-related protein RABG3d	1	0.0010692		W-P	CYT	0
Q8LPK4	AT5G22780	AP-2 complex subunit alpha-2	2	1.82E-06		P	GA	0
Q9SKU1	AT2G20760	Clathrin light chain 1	1	0.0017663		W	NU	0
O04209	AT2G40060	Clathrin light chain 2	7	1.44E-20		W	NU	0
Q8RWY6	AT2G20190	CLIP-associated protein	2	2.81E-10		P	NU	0
Q94A40	AT1G62020	Coatomer subunit alpha-1	12	2.88E-123		P	CYT	0
Q9SA78	AT1G30630	Coatomer subunit epsilon-1	1	0.00061522		W-P	GA	0
Q9SE83	AT1G10290	Dynamin-2A	3	3.23E-15		W	NU	0

Q9LQ55	AT1G59610	Dynamin-2B	3	2.30E-43		W-P	NU	0
P42697	AT5G42080	Dynamin-related protein 1A	6	2.72E-23		W-P	CYT	0
Q8LF21	AT1G14830	Dynamin-related protein 1C	4	5.94E-26		P	CYT	0
Q9FNX5	AT3G60190	Dynamin-related protein 1E	3	3.75E-15		P	CYT	0
Q8LF20	AT2G25430	Putative clathrin assembly protein At2g25430	1	0.0004004 6		W	NU	0
O80501	AT2G44610	Ras-related protein RABH1b	3	3.41E-09		P	PLA	0
P11139	AT1G64740	Tubulin alpha-1 chain	4	8.92E-68		P	CYT	0
P29513	AT1G20010	Tubulin beta-5 chain	13	7.63E-192		W-P	CYT	0
P29514	AT5G12250	Tubulin beta-6 chain	10	5.94E-109		P	CYT	0
P29515	AT2G29550	Tubulin beta-7 chain	11	1.77E-116		W-P	CYT	0
Q9ASY2	AT5G53310	Myosin heavy chain-related protein	1	2.65E-05		W	NU	0
P53492	AT5G09810	Actin-7	18	8.44E-263		W-P	CYT	0
Q39251	AT3G46000	Actin-depolymerizing factor 2	1	0.0010978		W	CYT	0
Q9ZSK4	AT5G59880	Actin-depolymerizing factor 3	2	5.35E-08		W-P	CYT	0
Q9SPE6	AT3G56190	Alpha-soluble NSF attachment protein 2	3	1.09E-07		W	CYT	0
Chinasi/ fosfatasi								
Q9FK35	AT5G50370	Adenylate kinase 2	1	0.0083636		W	CYT	0
Q9ZSA2	AT4G04720	Calcium-dependent protein kinase 21	2	2.60E-06		P	CYT	0
Q42479	AT4G23650	Calcium-dependent protein kinase 3	7	2.81E-19	+	P	CYT	0
P24100	AT3G48750	Cyclin-dependent kinase A-1	1	0.0011907		P	CYT	0
Q9SAJ4	AT1G79550	Phosphoglycerate kinase	3	1.27E-20		W-P	CYT	0
Q9C5G5	AT3G51460	Phosphoinositide phosphatase SAC7	1	1.75E-05		P	CYT	2
O81716	AT2G25070	Probable protein phosphatase 2C 21	2	0.0065163		P	NU	0
Q9FFP6	AT5G63680	Pyruvate kinase	2	5.45E-08		P	CYT	0
Q38950	AT3G25800	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	2	5.81E-08		P	CYT	0
Q38951	AT1G13320	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A gamma isoform	1	2.21E-08		P	CYT	0
Q9SJF0	AT1G08420	Serine/threonine-protein phosphatase BSL2	1	9.17E-10		P	PM	0
Q8H1G6	AT1G06700	PTI1-like tyrosine-protein kinase 1	3	4.09E-07		P	CYT	0

Risposta a stress								
Q42403	AT5G42980	Thioredoxin H3	11	1.03E-147		W-P	CYT	0
Q39241	AT1G45145	Thioredoxin H5	2	9.70E-05		P	CYT	0
Q9FM19	AT5G62740	Hypersensitive-induced response protein 1	6	4.36E-45		W-P	CYT	0
Q9CAR7	AT1G69840	Hypersensitive-induced response protein 2	4	4.10E-15		W-P	CYT	0
Q9SRH6	AT3G01290	Hypersensitive-induced response protein 3	10	4.50E-126		W-P	CYT	0
Q9FRL8	AT1G75270	Glutathione S-transferase DHAR2	1	8.74E-06		P	CYT	0
Q9FNH6	At5g06320	Harpin-induced protein-like	1	0.0072845		W-P	EX	1
Q9S7C0	AT1G79930	Heat shock 70 kDa protein 14	7	1.50E-66		P	CYT	0
O65719	AT3G09440	Heat shock 70 kDa protein 3	10	1.91E-59		P	CYT	0
P27323	AT5G52640	Heat shock protein 90-1	10	5.58E-87		P	CYT	0
P51818	AT5G56010	Heat shock protein 90-3	33	0		W-P	CYT	0
P21276	AT4G25100	Superoxide dismutase [Fe] 1, chloroplastic	1	0.0037013		P	PLA	0
Q9C8G5	AT1G30360	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)	7	1.82E-36		W-P	PM	10
P42761	AT2G30870	Glutathione S-transferase F10	7	4.64E-30		W-P	CYT	0
P46422	AT4G02520	Glutathione S-transferase F2	8	7.55E-58		W-P	CYT	0
Q96266	AT2G47730	Glutathione S-transferase F8, chloroplastic	2	3.81E-10		W-P	PLA	0
O80852	AT2G30860	Glutathione S-transferase F9	4	3.53E-16		W-P	CYT	0
Q9ZRW8	AT1G78380	Glutathione S-transferase U19	2	3.26E-06		P	CYT	0
Q9SYT0	AT1G35720	Annexin D1	1	0.0022376		W-P	CYT	0
Q9LVA0	AT5G62390	BAG family molecular chaperone regulator 7	9	1.19E-37		W	NU	0
Q945Q1	AT5G12140	Cysteine proteinase inhibitor 1	1	0.0004915 1		W	CYT	0
Q9SMN1	AT3G48680	Gamma carbonic anhydrase-like 2	4	1.89E-47		W	PLA	0
Q05431	AT1G07890	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	3	1.67E-41		P	CYT	0
Q42564	AT4G35000	L-ascorbate peroxidase 3, peroxisomal	1	0.0064715		W	CYT	1
O64517	AT1G79340	Metacaspase-4	3	2.86E-25		W-P	NU	0
P52577	AT1G75280	Isoflavone reductase homolog P3	2	8.81E-07		P	CYT	0
Q9FGT8	AT5G58070	Outer membrane lipoprotein-like	1	0.0009436 3		W	CYT	0
O48646	AT4G11600	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione	2	0.0002630 8		W-P	MI T	0

		peroxidase 6, mitochondrial						
Q9LUV2	AT3G17210	Probable protein Pop3	1	0.0021443		W	CYT	0
O81845	AT3G54110	Mitochondrial uncoupling protein 1	5	5.60E-31		P	MIT	0
Processi metabolici e biosintetici								
Q9LSQ5	AT5G54500	1,4-benzoquinone reductase-like protein	3	6.77E-22		W	CYT	0
Q41931	AT1G62380	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2	3	1.12E-66		W-P	CYT	0
O04499	AT1G09780	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 1	1	2.18E-22		P	CYT	0
Q9LQ04	AT1G63000	3,5-epimerase/4-reductase	1	6.09E-11		P	CYT	0
O50008	AT5G17920	5-methyl tetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	18	3.69E-151		W-P	CYT	0
P46645	AT5G19550	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic isozyme 1	3	4.43E-12		P	CYT	0
Q9LIK9	AT3G22890	ATP sulfurylase 1, chloroplastic	3	2.68E-07		W-P	CYT	0
Q96251	AT5G13450	ATP synthase subunit O	4	3.58E-15		W-P	MIT	0
Q9FT52	AT3G52300	ATP synthase subunit d	17	6.92E-157		W	CYT	0
Q9SJM0	AT2G36850	Callose synthase 10	1	0.00083117		W-P	PM	15
Q9SFU6	AT3G07160	Callose synthase 9	1	0.0092946		P	PM	16
Q9LF98	AT3G52930	Fructose-bisphosphate aldolase	2	5.77E-46		W-P	CYT	0
P25858	AT3G04120	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC1, cytosolic	14	2.06E-108		W-P	CYT	0
Q9LYG3	AT5G11670	NADP-dependent malic enzyme 2	2	0.00095323		W-P	CYT	0
P11035	AT1G37130	Nitrate reductase [NAD]	2	0.0010325		P	CYT	0
P32961	AT3G44310	Nitrilase 1	2	4.07E-11		W-P	CYT	0
P46010	AT3G44320	Nitrilase 3	1	7.28E-14		W-P	CYT	0
Q9SID0	AT2G31390	Probable fructokinase-1	1	3.95E-06		W	CYT	0
P25696	AT2G36530	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator	2	1.31E-06		P	CYT	0
Q9SRV5	AT3G03780	Cobalamin-independent methionine synthase	11	1.02E-82		P	CYT	0
Q39085	AT3G19820	Delta(24)-sterol reductase	3	4.12E-27		P	CYT	1
Q944K2	AT5G66680	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48	5	2.45E-23		W-P	PM	1

		kDa subunit						
Q93Z16	AT4G21150	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	9	4.49E-56		P	PM	4
Q93ZY3	AT5G19690	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A	1	5.83E-09		P	PM	12
Q9FX21	AT1G34130	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3B	2	0.0012187		P	PM	11
Q8LCP6	AT1G75680	Endoglucanase 10	1	0.0012905		P	EX	1
Q9FF55	AT5G60640	Protein disulfide isomerase-like 1-4	6	3.10E-61		W-P	ER	0
O48773	AT2G32920	Protein disulfide-isomerase 2-3	3	4.72E-22		W-P	ER	0
O48661	AT1G70310	Spermidine synthase 2	2	3.61E-08		W-P	CYT	0
P94111	AT1G74020	Strictosidine synthase 1	1	8.26E-05		W	VO	0
P57751	AT5G17310	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	3	8.65E-19		P	CYT	0
Q94BT0	AT5G20280	Sucrose-phosphate synthase 1	3	1.39E-10		P	NU	0
P93042	AT3G13870	Protein ROOT HAIR DEFECTIVE 3	6	2.82E-34		P	CYT	0
Q9SJL8	AT2G36880	S-adenosylmethionine synthase 3	3	2.64E-16		W-P	CYT	0
Q9LUT2	AT3G17390	S-adenosylmethionine synth 4	5	2.52E-21		W-P	CYT	0
Q9SZJ5	AT4G37930	Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial	2	6.45E-06		P	MIT	0
O23254	AT4G13930	Serine hydroxymethyltransferase 4	2	2.69E-11		P	CYT	0
Q39033	AT3G08510	Phosphoinositide phospholipase C 2	3	3.92E-10		W-P	CYT	0
Q38882	AT3G15730	Phospholipase D alpha 1	1	0.0034701		P	CYT	0
Q9SN86	AT3G47520	Malate dehydrogenase, chloroplastic	8	3.16E-73		W	PLA	0
P93819	AT1G04410	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1	3	1.93E-15		W-P	CYT	0
Q42525	AT4G29130	Hexokinase-1	2	3.77E-05		P	PLA	1
O49299	AT1G23190	Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 1	3	8.55E-14		P	CYT	0
Q56WD9	AT2G33150	3-ketoacyl-CoA thiolase 2	2	2.68E-06		P	PLA	0
O23255	AT4G13940	Adenosylhomocysteinase 1	6	6.32E-32		P	CYT	0
Q38946	AT5G07440	Glutamate dehydrogenase 2	1	4.45E-16		P	CYT	0
Q1H583	AT1G54000	GDSL esterase/lipase At1g54000	4	9.12E-15		W	EX	1

Q8W4H8	AT1G54010	GDSL esterase/lipase At1g54010	10	4.49E-158		W	EX	1
Q9FK25	AT5G54160	Flavone 3-O-methyltransferase 1	2	9.62E-09		P	CYT	0
Q9SPK5	AT1G50480	Formate-tetrahydrofolate ligase	4	3.30E-69		P	CYT	0
Q9T0A0	AT4G23850	Long chain acyl-CoA synthetase 4	4	6.81E-60		P	CYT	0
Binding								
P48347	AT1G22300	14-3-3-like protein GF14 epsilon	6	4.48E-61		W-P	CYT	0
Q96300	AT3G02520	14-3-3-like protein GF14 nu	8	2.75E-55		W-P	CYT	0
Q01525	AT1G78300	14-3-3-like protein GF14 omega	9	4.63E-48		W-P	CYT	0
P42644	AT5G38480	14-3-3-like protein GF14 psi	9	2.08E-76		W-P	CYT	0
P42645	AT5G16050	14-3-3-like protein GF14 upsilon	8	2.44E-36		W-P	CYT	0
Q8L636	AT1G53210	Calcium-binding EF-hand domain-containing protein	3	6.60E-49		W-P	PM	11
Q9LZQ4	AT3G62360	Carbohydrate-binding-like fold-containing protein	1	1.41E-05		W-P	CYT	2
Q03251	AT4G39260	Glycine-rich RNA-binding protein 8	2	2.54E-07		W-P	NU	0
P41916	AT5G20010	GTP-binding nuclear protein Ran-1	6	1.40E-25		W-P	CYT	0
Q01474	AT1G56330	GTP-binding protein SAR1B	4	1.09E-41		P	CYT	0
Q9FJF1	AT5G59840	Putative GTP-binding protein ara-3	4	5.31E-51		W-P	PLA	0
Q94AZ4	AT1G12310	Probable calcium-binding protein CML13	4	1.49E-27		W	CYT	0
Q93Y31	AT5G67560	ADP-ribosylation factor-like A1D	4	6.14E-16		P	EX	0
Q8VZI2	AT4G33700	DUF21 domain-containing protein At4g33700	1	0.0050774		P	PM	3
Q9T076	AT4G27520	Early nodulin-like protein 2	1	1.11E-19		W	NU	1
Q9ZVA2	AT1G78830	Curculin-like (Mannose-binding) lectin-like protein	2	1.28E-05		W	EX	1
Q8LA13	AT3G58510	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 11;DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 52	5	2.76E-25		P	NU	0
Q93ZG7	AT3G53110	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	3	2.19E-09		P	CYT	0
Sintesi e degradazione proteica								
Q08112	AT1G04270	40S ribosomal protein S15-1	6	9.33E-71		P	CYT	0
Q9FY64	AT5G09510	40S ribosomal protein S15-4	5	2.29E-67		P	CYT	0
P42798	AT1G07770	40S ribosomal protein S15a-1	6	1.38E-81		W-P	CYT	0
P49205	AT2G04390	40S ribosomal protein S17-1	1	0.0016948		P	NU	0

P34788	AT1G22780	40S ribosomal protein S18	6	5.49E-93		W-P	CYT	0
Q8L8Y0	AT1G58380	40S ribosomal protein S2-1	10	7.50E-88		W-P	CYT	0
Q9SS17	AT3G04920	40S ribosomal protein S24-1	5	1.20E-73		P	MIT	0
Q9SIW5	AT2G16360	40S ribosomal protein S25-1	1	6.35E-05		P	NU	0
Q8L953	AT5G47930	40S ribosomal protein S27-3	2	9.43E-07		P	NU	0
Q9SR73	AT3G10090	40S ribosomal protein S28-1	1	2.70E-09		W	NU	0
Q9SIP7	AT2G31610	40S ribosomal protein S3-1	20	1.20E-144	+	W-P	CYT	0
Q9CAV0	AT3G04840	40S ribosomal protein S3a-1	8	1.70E-145		P	CYT	0
Q42262	AT4G34670	40S ribosomal protein S3a-2	8	6.87E-62		P	CYT	0
P49204	AT5G07090	40S ribosomal protein S4-2	16	1.32E-125		W-P	CYT	0
Q9ZUT9	AT2G37270	40S ribosomal protein S5-1	5	1.33E-75		W-P	MIT	0
P51430	AT5G10360	40S ribosomal protein S6-2	8	1.07E-118		W-P	NU	0
Q9C514	AT1G48830	40S ribosomal protein S7-1	4	5.32E-31		W-P	CYT	0
Q8LD03	AT5G16130	40S ribosomal protein S7-3	4	2.17E-29		P	CYT	0
Q93VG5	AT5G20290	40S ribosomal protein S8-1	14	8.80E-264		W-P	NU	0
Q9LXG1	AT5G15200	40S ribosomal protein S9-1	14	5.79E-63		W-P	NU	0
Q08682	AT1G72370	40S ribosomal protein Sa-1	6	2.76E-48		W-P	CYT	0
Q42112	AT3G09200	60S acidic ribosomal protein P0-2	9	5.12E-148		W-P	PLA	0
Q9SLF7	AT2G27710	60S acidic ribosomal protein P2-2	5	8.47E-55		W	PLA	0
Q93VT9	AT1G14320	60S ribosomal protein L10-1	6	6.16E-21		P	CYT	0
P41127	AT3G49010	60S ribosomal protein L13-1	10	1.26E-65		W-P	CYT	0
Q9T043	AT4G27090	60S ribosomal protein L14-2	6	1.99E-45		W-P	CYT	0
O23515	AT4G16720	60S ribosomal protein L15-1	7	2.01E-61		P	MIT	0
Q93VI3	AT1G27400	60S ribosomal protein L17-1	5	4.13E-47		W-P	NU	0
P42791	AT3G05590	60S ribosomal protein L18-2	7	2.74E-55		P	CYT	0
P51418	AT2G34480	60S ribosomal protein L18a-2	4	2.54E-12		W-P	MIT	0
Q9SRX2	AT1G02780	60S ribosomal protein L19-1	5	1.51E-18		P	NU	0
Q9M9W1	AT3G05560	60S ribosomal protein L22-2	3	3.50E-31	+	W-P	NU	0
Q9FE58	AT5G27770	60S ribosomal protein L22-3	3	3.54E-09	+	W-P	NU	0
Q42347	AT2G36620	60S ribosomal protein L24-1	3	1.94E-78		P	CYT	0
P51414	AT3G49910	60S ribosomal protein L26-1	3	2.13E-13		P	NU	0
Q9SF40	AT3G09630	60S ribosomal protein L4-1	14	1.61E-251		W-P	MI	0

							T	
P49691	AT5G02870	60S ribosomal protein L4-2	10	1.47E-103		P	MIT	0
Q8LBI1	AT3G25520	60S ribosomal protein L5-1	14	1.13E-160		W-P	NU	0
P49227	AT5G39740	60S ribosomal protein L5-2	12	1.71E-149		P	NU	0
Q9FZ76	AT1G18540	60S ribosomal protein L6-1	6	7.30E-37	+	P	CYT	0
P60040	AT2G01250	60S ribosomal protein L7-2	14	2.50E-138		W-P	NU	0
P49692	AT2G47610	60S ribosomal protein L7a-1	7	4.20E-55		P	MIT	0
P46286	AT2G18020	60S ribosomal protein L8-1	7	5.42E-79		W-P	CYT	0
Q42064	AT4G36130	60S ribosomal protein L8-3	7	6.66E-78		P	CYT	0
P49209	AT1G33120	60S ribosomal protein L9-1	11	2.87E-207		W-P	CYT	0
Q9SIH0	AT2G36160	40S ribosomal protein S14-1	5	1.35E-29		P	CYT	0
Q9SSB5	AT1G53750	26S protease regulatory subunit 7 homolog A	1	0.0016385		W-P	CYT	0
Q9MAK9	AT1G45000	26S protease regulatory subunit S10B homolog B	6	1.21E-51		W-P	CYT	0
Q9SIV2	AT2G20580	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 1A	5	8.03E-24		W-P	CYT	0
Q9SL67	AT2G20140	26S proteasome regulatory subunit 4 homolog B	5	4.32E-86		W-P	CYT	0
Q9LZH9	AT3G62870	60S ribosomal protein L7a-2	7	7.23E-55		P	MIT	0
Q84WM9	AT5G12110	Elongation factor 1-beta 1	4	5.18E-123		W	CYT	0
Q9SCX3	AT5G19510	Elongation factor 1-beta 2	8	1.24E-68		W-P	CYT	0
Q9LNC5	AT1G06220	Elongation factor like protein	1	2.07E-08		W	CYT	0
P41377	AT1G54270	Eukaryotic initiation factor 4A-2	19	4.82E-243		P	CYT	0
Q9LD55	AT4G11420	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	6	2.07E-26		P	CYT	0
Q9C5Z3	AT3G57290	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	5	1.93E-48		P	CYT	0
Q9LNU4	AT1G20200	Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3a	2	6.53E-21		P	NU	0
Q93Y35	AT4G24820	Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	1	0.00022862		W-P	CYT	0
O04487	AT1G09640	Probable elongation factor 1-gamma 1	11	1.05E-149		W-P	CYT	0
Q9FVT2	AT1G57720	Probable elongation factor 1-gamma 2	11	6.25E-113		W-P	CYT	0
O81149	AT1G53850	Proteasome subunit alpha type-5-A	1	1.74E-05		W	CYT	0
Miscellanea								
Q8L8Z1	AT4G15630	CASP-like protein At4g15630	2	2.05E-16		P	PM	4

O80503	AT2G44640	Expressed protein	3	7.10E-24		P	PLA	0
Q9ZQ87	AT2G03510	Expressed protein	4	7.42E-18		W-P	CYT	1
Q9SIV6	AT2G16460	Expressed protein	1	1.18E-09		P	MIT	0
Q9M2Y6	AT3G49720	Uncharacterized protein At3g49720	1	4.51E-36		P	PLA	1
Q9M2D8	AT3G61260	Uncharacterized protein At3g61260	1	3.55E-07		W	NU	0
Q94AL6	AT4G20150	Putative uncharacterized protein At4g20150	1	0.0033792		W-P	MIT	0
Q9C5B1	AT5G08660	Putative uncharacterized protein At5g08660	1	3.64E-20		P	NU	0
Q949R9	AT5G20090	Putative uncharacterized protein At5g20090	1	1.53E-07		P	EX	0
Q8VZH2	AT4G33090	AT4g33090/F4I10_20	2	1.02E-33		P	CYT	0
Q941A6	AT1G08480	At1g08480/T27G7_10	2	6.58E-07		W	CYT	0
Q9ASR1	AT1G56070	At1g56070/T6	14	1.48E-184		P	CYT	0
O80798	AT1G65270	AT1G65270 protein	1	6.38E-05		W-P	PLA	0
Q9S791	AT1G70770	AT1G70770 protein	8	1.34E-53	+	P	CYT	0
Q9SIF2	AT2G04030	At2g04030/F3C11.14	17	0		W-P	CYT	0
Q8S8R9	AT2G34585	At2g34585	1	2.39E-51		P	EX	1
O80576	AT2G44060	At2g44060	11	7.22E-83		W-P	CYT	0
Q8LFK2	AT3G03270	AT3G03270 protein	2	1.08E-51		P	CYT	0
Q9LSP5	AT3G17020	AT3g17020/K14A17_14	2	1.38E-24		W-P	CYT	0
Q9LUG8	AT3G23600	AT3g23600/MDB19_9	6	1.90E-63		W-P	CYT	0
Q9ZSJ7	AT3G24160	AT3g24160/MUJ8_16	1	3.27E-05		P	PM	1
Q9LEX1	AT3G61050	At3g61050	2	3.71E-42		P	MIT	1
Q8L7U4	AT4G02450	AT4g02450/T14P8_5	3	3.00E-15		W-P	CYT	0
O81629	AT4G10840	AT4g10840/F25I24_50	1	8.68E-38		P	CYT	0
Q93V62	AT4G27450	AT4g27450/F27G19_50	3	2.62E-17		P	PLA	0
Q8GUN1	AT4G31340	AT4G31340 protein	2	5.64E-09		P	NU	1
Q94BY3	AT5G14030	AT5g14030/MUA22_2	1	1.06E-06		W-P	PLA	2
Q9FLT9	AT5G24650	AT5g24650/K18P6_19	1	7.35E-19		P	MIT	0
Q8W4E6	AT5G25265	At5g25265	1	0.0041233		P	PLA	1
Q94BR2	AT5G19140	Aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs	1	0.00104		P	PLA	0
Q42547	AT1G20620	Catalase-3	13	1.23E-170		W-P	PX	0
P54609	AT3G09840	Cell division control protein 48 homolog A	10	3.29E-63		P	CYT	0

Q9SCN8	AT3G53230	Cell division control protein 48 homolog D	2	1.44E-07		W	CYT	0
Q8L5Y6	AT2G02560	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	4	3.62E-46		P	NU	0
Q9ZWA8	AT1G03870	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	2	3.28E-10		W	EX	0
Q501E6	AT5G25250	Flotillin-like protein 1	2	2.76E-07		W-P	CYT	0
Q9ZNT7	AT1G03860	Prohibitin-2, mitochondrial	4	1.11E-28		W-P	PLA	0
O04331	AT5G40770	Prohibitin-3, mitochondrial	6	6.75E-121		W-P	MIT	0
Q9SIL6	AT2G20530	Prohibitin-6, mitochondrial	3	4.34E-29		W-P	MIT	1
Q9SUR3	AT4G23630	Reticulon-like protein B1	1	0.0012506		P	PM	3
Q8L798	AT1G19110	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain-like protein	1	0.0012965		W	NU	0
Q9LKR3	AT5G28540	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a	4	4.90E-37		W-P	ER	1
Q9ZUP3	AT2G19480	Nucleosome assembly protein 12	3	7.98E-65		W-P	NU	0
Q9SZI2	AT4G26110	Nucleosome assembly protein 1-like 1	2	3.12E-12		W-P	NU	0
Q56WK6	AT1G72150	Patellin-1	2	7.29E-11		P	CYT	0
Q9XEX2	AT1G65980	Peroxiredoxin-2B	2	1.85E-06		W-P	CYT	0
O22711	AT1G60740	Peroxiredoxin-2D	2	2.05E-06		W	CYT	0
Q93YU5	AT3G10380	Probable exocyst complex component 4	1	4.04E-13		P	NU	0
O24520	AT2G16060	Non-symbiotic hemoglobin 1	5	6.36E-51		W-P	CYT	0
O48963	AT3G45780	Phototropin-1	1	9.85E-09		P	NU	0
P59259	AT5G59970	Histone H4	2	5.40E-08		W-P	NU	0
P22953	AT5G02500	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e	9	1.85E-52		W-P	CYT	0
Q94EJ6	AT4G18030	Probable methyltransferase PMT14	1	9.47E-16		P	CYT	1
Q9ZU25	AT1G51980	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1	4	4.59E-09		W-P	MIT	0
O04308	AT3G16480	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-2	11	3.52E-124		W	MIT	0
Q9LW57	AT3G23400	Probable plastid-lipid-associated protein 6, chloroplastic	1	0.010482		P	PLA	0
P92994	AT2G30490	Trans-cinnamate 4-monooxygenase	13	9.70E-81		P	CYT	0
P31265	AT3G16640	Translationally-controlled tumor protein homolog	4	6.55E-22		W-P	CYT	0

Q9LK29	AT3G27240	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit	1	0.010578		P	MIT	0
P93028	AT2G30110	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	9	2.35E-50		P	CYT	0
Q9SFX2	AT1G76390	U-box domain-containing protein 43	1	4.65E-13		P	PM	0
Q9LM76	AT1G20780	U-box domain-containing protein 44	1	5.02E-10		P	CYT	0
Q9MBH2	AT3G28940	AIG2 protein-like	1	0.0010118		W-P	CYT	0
Q9FFH6	AT5G44130	Fasciclin-like arabinogalactan protein 13	2	2.94E-32		W	EX	0

TABELLA 5-2 PROTEINE FOSFORILATE E QUANTIFICATE TRA C E T NELLA FRAZIONE PELLET. a) Average (Log2ratio) media dei logartimi in base 2 dei rapporti delle quantità tra C e T b) Phos numero delle fosforilazioni nel peptide identificato c) Sequence: sequenza aminoacidica del fosfopeptide, in minuscolo e tra parentesi è indicata la modifica dell'amminoacido antcedente: (ph)= fosforilazione, (ox) ossidazione, (ac) acetilazione. d) Prob: probabilità con cui è identificato il peptide fosforilato; e) T: significatività con t-test; f) t-test p: valore del t test; g) ID protein: codice identificativo della proteina per la banca dati ARATH13; h) ID TAIR10: codice identificativo della proteina per la banca dati TAIR10; l) Fasta headers: descrittivo sintetico della proteina, GN: nome del gene

Wash fraction								
Average (Log2ratio)[a]	Phos[b]	Sequence[c]	Prob[d]	T[e]	t-test p[f]	ID Protein[g]	ID Tair[h]	Fasta headers[l]
-1.02879	_2	_SDS(ph)T(ph)KM(ox)RNSM(ox)FVK_	0.965905	+	0.005659	A8MR39	AT4G28640	Auxin-responsive protein GN=IAA11
2.759343	_2	_SSSSS(ph)S(ph)RR_	0.999124	+	0.044198	Q8H1D3	AT4G23680	NPY1_ARATH BTB/POZ domain-containing protein NPY1 GN=NPY1
0.697939	_2	_(ac)M(ox)FRLRS(ph)LLS(ph)LK_	1	+	0.052836	Q8L763	AT2G18465	Chaperone DnaJ-domain containing protein GN=AT2G18465
1.029842	_1	_GIS(ph)INAAR_	1	+	0.065012	Q9XGM1	AT3G58730	V-type proton ATPase subunit D GN=VHA-D
1.05788	_3	_S(ph)EFLIQFDGVT(ph)S(ph)NPDDLVIIIGATNK_	0.999871	+	0.06771	A8MRR2	AT2G45500	AAA-type ATPase-like protein GN=AT2G45500
0.525353	_2	_ITLIWEKRNDDSPEPS(ph)GY(ph)M(ox)K_	0.998401	+	0.073588	Q9SUQ9	AT4G23680	AT4g23680/F9D16_150 GN=F9D16.150
0.549268	_1	_KKDEPAEES(ph)DGDLGFGLFD_	1	+	0.080627	Q8LEQ0	AT5G47700	60S acidic ribosomal protein P1-3 GN=RPP1C
1.967798	_1	_LGTVSS(ph)PEPISVVR_	0.999387		0.109796	Q9SMM5	AT3G48740	Bidirectional sugar transporter SWEET11 GN=SWEET11

2.011973	_1	_FGFGT(ph)KK_	1		0.208248	Q9XF88	AT3G08940	Chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplastic GN=LHCB4.2
0.283914	_1	_EY(ph)NEALK_	1		0.213212	Q94KK7	AT1G79590	Syntaxin-52 GN=SYP52
1.217302	_1	_VSPAVDPPS(ph)PR_	1		0.225921	Q9XI29	AT1G15400	Uncharacterized protein At1g15400 GN=At1g15400
1.186892	_1	_SLEELSGEAEVS(ph)HDEK_	1		0.245016	Q8VYM2	AT5G43350	Inorganic phosphate transporter 1-1 GN=PHT1-1
0.450177	_1	_GFVPFVPGS(ph)PTERNPPDLSKA_	0.997809		0.261367	Q68KI4	AT5G27150	NHX1_ARATH Sodium/hydrogen exchanger 1 GN=NHX1
1.833709	_1	_EVPS(ph)FIQR_	1		0.299675	Q39033	AT3G08510	Phosphoinositide phospholipase C 2 GN=PLC2
0.822811	_1	_T(ph)ATHEEM(ox)R_	0.999991		0.31174	F4JR96	AT4G37080	Uncharacterized protein GN=AT4G37080
-0.50495	_3	_Y(ph)LLT(ph)IVNQHS(ph)DKISKR_	0.999776		0.359389	Q9M2J5	AT3G58211	Putative uncharacterized protein F9D24.120
0.508457	_2	_GY(ph)S(ph)M(ox)GELGAAKNILELGAEIRIPVK_	1		0.419008	Q5IZC8	AT4G09080	Protein TOC75-4, chloroplastic GN=TOC75-4
1.760914	_1	_SVS(ph)TPFM(ox)NTTAK_	0.997923		0.448146	P11035	AT1G37130	Nitrate reductase [NADH] 2 GN=NIA2
1.05995	_1	_GLDIETPSHYT(ph)V_	1		0.461901	F4JPJ7	AT4G30190	H(+)-ATPase 2 GN=HA2
0.886127	_2	_SLGS(ph)FRS(ph)AANV_	1		0.532263	P43286	AT3G53420	Aquaporin PIP2-1 GN=PIP2-1
0.249836	_1	_VEEKEES(ph)DEEDYGGDFGLFDEE_	1		0.628153	Q42112	AT3G09200	60S acidic ribosomal protein P0-2 GN=RPP0B
0.233312	_1	_EIAEGVTQIVQM(ox)LET(ph)EEE_	1		0.644664	Q9LVA0	AT5G62390	BAG family molecular chaperone regulator 7 GN=BAG7
0.033604	_3	_RT(ph)SQS(ph)KVQICIIIS(ph)QAVW_	0.999986		0.903371	B3H5H1	AT5G18362	Cytokine-induced anti-apoptosis inhibitor 1, Fe-S biogenesis protein GN=AT5G18362
1.52767	_1	_AAAAAPGLS(ph)PK_	1		1	Q38868	AT3G20410	Calcium-dependent protein kinase 9 GN=CPK9

-0.71828	_1	_SIS(ph)EANIAGSSR_	1		1	Q9FE38	AT4G23640	Potassium transporter 3 GN=POT3
Pellet fraction								
-1.91241	_3	_VTYVAPPRPPS(ph)PVHEGSEEGS(ph)S(ph)PR_	0.986229	+	0.004321	Q8VZ95	AT3G60600	VAP11_ARATH Vesicle-associated protein 1-1 GN=PVA11
-1.42156	_1	_KVVEGDS(ph)AEEDENKLPVEDIVSSR_	1	+	0.005253	O81283	AT4G02510	TC159_ARATH Translocase of chloroplast 159, chloroplastic GN=TOC159
-1.0367	_1	_KIS(ph)GILDDGSVGFR_	1	+	0.009709	Q96282	AT5G49890	CLCC_ARATH Chloride channel protein CLC-c GN=CLC-C
-0.66658	_1	_GLDIETPSHYT(ph)V_	0.999998	+	0.011356	F4JPJ7	AT4G30190	F4JPJ7_ARATH H(+)-ATPase 2 GN=HA2
-0.51336	_1	_APS(ph)PVNNPLLGGIPK_	1	+	0.013371	Q94AI7	AT1G15750	TPL_ARATH Protein TOPLESS GN=TPL
-1.89127	_1	_SIS(ph)IESPR_	0.999973	+	0.014797	Q9LZJ5	AT3G62700	AB14C_ARATH ABC transporter C family member 14 GN=ABCC14
0.778721	_1	_YSLVLDPNLDAGT(ph)PR_	1	+	0.017666	F4J153	AT3G03570	F4J153_ARATH Uncharacterized protein GN=AT3G03570
-0.54322	_1	_VEEKKEES(ph)DEEDYEGGFGLFDEE_	1	+	0.023564	P57691	AT3G11250	RLA03_ARATH 60S acidic ribosomal protein P0-3 GN=RPP0C
-0.78704	_1	_SIS(ph)EANIAGSSR_	1	+	0.027069	Q9FE38	AT4G23640	POT3_ARATH Potassium transporter 3 GN=POT3
-0.61527	_1	_SLGS(ph)FRS(ph)AANV_	1	+	0.038895	P43286	AT3G53420	PIP21_ARATH Aquaporin PIP2-1 GN=PIP2-1
-0.49852	_1	_GFVPFVPGS(ph)PTERNPPDLSKA_	0.992024	+	0.039104	Q68KI4	AT5G27150	NHX1_ARATH Sodium/hydrogen exchanger 1 GN=NHX1
-0.78126	_1	_GLDIDTAGHHYT(ph)V_	1	+	0.050567	P20649	AT2G18960	PMA1_ARATH ATPase 1, plasma membrane-type GN=AHA1
-0.74461	_1	_SVS(ph)TPFMNTTAK_	0.99972	+	0.054171	P11035	AT1G37130	NIA2_ARATH Nitrate reductase [NADH] 2 GN=NIA2

-0.50448	_3	_QLS(ph)S(ph)GLLLVT(ph)GPFK_	1	+	0.056519	Q9FZ76	AT1G18540	RL61_ARATH 60S ribosomal protein L6-1 GN=RPL6A
1.30965	_1	_SVETLS(ph)PFQQK_	0.999994	+	0.06033	Q9MB58	AT1G07110	F26_ARATH 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase GN=FKFBP
-0.60554	_1	_GFVPFVPGSPT(ph)ERNPPDLSKA_	0.962764	+	0.06076	Q68KI4	AT5G27150	NHX1_ARATH Sodium/hydrogen exchanger 1 GN=NHX1
2.81925	_2	_VTSESDFM(ox)T(ph)EY(ph)VVTR_	0.99997	+	0.061513	Q39026	AT2G43790	MPK6_ARATH Mitogen-activated protein kinase 6 GN=MPK6
1.491815	_1	_INLVDVGGGGLFS(ph)PR_	1	+	0.063724	F4JXM9	AT5G65950	F4JXM9_ARATH Uncharacterized protein GN=AT5G65950
1.18031	_1	_QQALAIS(ph)PTSR_	0.992573	+	0.064339	F4K5J1	AT5G20490	MYO17_ARATH Myosin-17 GN=XI-K
-0.8622	_1	_NT(ph)GRVSPAVDPPS(ph)PR_	1	+	0.067825	Q9SSC1	AT1G80180	Q9SSC1_ARATH At1g80180/F18B13_26 GN=F18B13.26
-0.89739	_1	_VDS(ph)SGDVCGATFK_	0.979043	+	0.06918	Q9FG81	AT5G43830	Q9FG81_ARATH Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs GN=AT5G43830
-1.75717	_1	_TGGNTETETEEVPEAS(ph)EEEIEAPVQEEKPQKEK_	0.999999	+	0.076605	O23144	AT4G27500	PPI1_ARATH Proton pump-interactor 1 GN=PPI1
-0.69865	_1	_GSPQSAGLS(ph)FLNR_	1	+	0.079318	F4K5J1	AT5G20490	MYO17_ARATH Myosin-17 GN=XI-K
0.97225	_2	_WPPPT(ph)PPPT(ph)PGR_	1	+	0.082677	Q8GXE9	AT2G36020	HA22J_ARATH HVA22-like protein j GN=HVA22J
-1.74716	_2	_TKDELTEEES(ph)LS(ph)GKDYLDPPPVK_	0.981852	+	0.085304	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-0.40851	_1	_SGES(ph)VDDESENYLSDLGK_	0.999966	+	0.086988	Q9C8E6	AT1G42550	Q9C8E6_ARATH Plastid movement impaired1 GN=T8D8.2
1.024696	_2	_VQDLIHGGGGAS(ph)PVQS(ph)PTR_	0.997904	+	0.090674	F4HYR4	AT1G62330	F4HYR4_ARATH O-fucosyltransferase family protein GN=AT1G62330

-0.39566	_2	_IFS(ph)QRS(ph)FR_	1	+	0.091929	Q8GUM4	AT3G27390	Y3739_ARATH Uncharacterized membrane protein At3g27390 GN=At3g27390
-0.53677	_1	_SSS(ph)DSGLTELSK_	0.991565	+	0.092653	Q9SRT3	AT3G07330	CSLC6_ARATH Probable xyloglucan glycosyltransferase 6 GN=CSLC6
-0.70364	_1	_SLEELSGEAEVS(ph)HDEK_	1	+	0.09437	Q8VYM2	AT5G43350	PHT11_ARATH Inorganic phosphate transporter 1-1 GN=PHT1-1
-0.39574	_1	_SGGM(ox)LETQNVGPEEIS(ph)DDEIELPEGK_	0.999999	+	0.095625	Q8L4D8	AT1G74690	IQD31_ARATH Protein IQ-DOMAIN 31 GN=IQD31
-0.96942	_2	_RVEPRS(ph)PS(ph)PSGANTTPTPV_	0.998474	+	0.099368	P54144	AT4G13510	AMT11_ARATH Ammonium transporter 1 member 1 GN=AMT1-1
-0.57807	_2	_ALAS(ph)FRS(ph)NPTN_	0.999998		0.100174	Q9ZVX8	AT2G16850	PIP28_ARATH Probable aquaporin PIP2-8 GN=PIP2-8
-1.90204	_1	_TKDELTEEES(ph)LS(ph)GKDYLDPPPVK_	0.981852		0.100348	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-0.75076	_1	_LGTVSS(ph)PEPISVVR_	0.994562		0.100824	Q9SMM5	AT3G48740	SWT11_ARATH Bidirectional sugar transporter SWEET11 GN=SWEET11
-0.42659	_1	_TTFGS(ph)QILR_	0.999998		0.107069	Q96282	AT5G49890	CLCC_ARATH Chloride channel protein CLC-c GN=CLC-C
-0.63826	_1	_M(ox)TAIDS(ph)DDDGVVR_	1		0.109126	Q9S791	At1g70770	Q9S791_ARATH AT1G70770 protein GN=F5A18.5
-0.68814	_1	_(ac)MAVSSAFVVT(ph)PK_	0.951089		0.110801	P49294	AT1G09940	HEM12_ARATH Glutamyl-tRNA reductase 2, chloroplastic GN=HEMA2
-0.29651	_1	_KKDEPAEES(ph)DGDLGFGLFD_	1		0.113915	Q8LEQ0	AT5G47700	RLA13_ARATH 60S acidic ribosomal protein P1-3 GN=RPP1C
-0.29165	_1	_AANTPAEYDS(ph)DDEYLAPR_	1		0.116224	Q9C5W7	AT1G32400	TOM2A_ARATH Tobamovirus multiplication protein 2A GN=TOM2A
-0.36912	_1	_ALGS(ph)FRS(ph)NATN_	1		0.116403	P93004	AT4G35100	PIP27_ARATH Aquaporin PIP2-7 GN=PIP2-7

-0.76694	_1	_QTTAEGSANPEPDQILS(ph)PR_	1		0.117898	Q9C508	AT1G57990	PUP18_ARATH Probable purine permease 18 GN=PUP18
-0.57787	_1	_ALLEGGS(ph)DDEGASTEAQGR_	1		0.118002	F4I893	AT1G64790	F4I893_ARATH Protein ILITYHIA GN=ILA
-0.8495	_2	_VTYVAPPRPPS(ph)PVHEGSEEGS(ph)SPR_	0.99496		0.126396	Q8VZ95	AT3G60600	VAP11_ARATH Vesicle-associated protein 1-1 GN=PVA11
-0.2554	_1	_SVS(ph)PSPQM(ox)AVPDVFK_	0.998965		0.130612	Q9FIL6	At5G58950	Q9FIL6_ARATH At5g58950 GN=AT5G58950
-0.38532	_1	_SLS(ph)ASSFLIDTK_	0.999972		0.13106	Q9MB58	AT1G07110	F26_ARATH 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase GN=FKFBP
-0.76404	_1	_RVEPRS(ph)PS(ph)PSGANTTPTPV_	0.998474		0.132868	P54144	AT4G13510	AMT11_ARATH Ammonium transporter 1 member 1 GN=AMT1-1
-0.84941	_2	_RVEPRSPS(ph)PS(ph)GANTTPTPV_	0.950464		0.133493	P54144	AT4G13510	AMT11_ARATH Ammonium transporter 1 member 1 GN=AMT1-1
-0.4052	_1	_SIS(ph)ITPEIGDDIVR_	0.999938		0.134445	Q94AB2	AT3G58640	Q94AB2_ARATH AT3g58640/F14P22_230 GN=AT3G58640
-0.50741	_1	_GLAYDT(ph)SDDQQDITR_	0.997283		0.141739	P10896	AT2G39730	RCA_ARATH Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic GN=RCA
-0.79643	_1	_ALS(ph)TSKPDPVVEDQA_	0.966247		0.150514	P49688	AT2G41840	RS23_ARATH 40S ribosomal protein S2-3 GN=RPS2C
-1.5919	_2	_TKDELTEEES(ph)LS(ph)GKDYLDPPPVK_	0.958151		0.151113	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-0.47852	_1	_AAPTSNFTVGSDGPPS(ph)FR_	0.999657		0.15452	Q9S814	AT5G03280	EIN2_ARATH Ethylene-insensitive protein 2 GN=EIN2
-0.69473	_1	_NLAGDVIGT(ph)RTEAADAK_	0.966554		0.157619	Q07473	AT5G01530	CB4A_ARATH Chlorophyll a-b binding protein CP29.1, chloroplastic GN=LHCB4.1
-0.3467	_2	_SLGS(ph)FRS(ph)AANV_	1		0.15992	P43286	AT3G53420	PIP21_ARATH Aquaporin PIP2-1 GN=PIP2-

								1
-0.75475	_2	_ALGS(ph)FRS(ph)NATN_	1		0.167176	P93004	AT4G35100	PIP27_ARATH Aquaporin PIP2-7 GN=PIP2-7
-0.29645	_1	_QGS(ph)GIIGTFGQSEELR_	1		0.170616	F4K8B7	AT5G15070	F4K8B7_ARATH Phosphoglycerate mutase-like protein GN=AT5G15070
-0.90043	_1	_APS(ph)PVNNPLLGSLPK_	1		0.180406	Q0WV90	AT1G80490	TPR1_ARATH Topless-related protein 1 GN=TPR1
-0.49957	_2	_MACVIY(ph)Y(ph)GPDGELKTWPK_	0.999999		0.182938	Q7XJA0	AT5G37415	Q7XJA0_ARATH MADS-box protein AGL105 GN=AGL105
-0.68618	_1	_VIS(ph)TLVEEM(ox)R_	0.999233		0.183254	Q0WUY1	AT1G04280	Q0WUY1_ARATH P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein GN=AT1G04280
-1.06452	_1	_IEEES(ph)ENEEEEEGEEEDDDEEVKEKK_	1		0.194862	F4J8D3	AT3G01780	TPLAT_ARATH Protein TPLATE GN=TPLATE
-0.85781	_2	_TT(ph)GRVSPAVDPPS(ph)PR_	1		0.198682	Q9XI29	AT1G15400	Y1540_ARATH Uncharacterized protein At1g15400 GN=At1g15400
-0.32713	_1	_LKGLDIETIQQAYT(ph)V_	0.999584		0.200394	Q9LV11	AT5G62670	PMA11_ARATH ATPase 11, plasma membrane-type GN=AHA11
-0.3423	_1	_AVS(ph)ATKVITEGEDQA_	0.997587		0.21715	Q8L8Y0	AT1G58380	RS21_ARATH 40S ribosomal protein S2-1 GN=RPS2A
0.847063	_1	_AIAPPELS(ph)PR_	1		0.217291	Q9SIV5	AT2G16470	C3H19_ARATH Zinc finger CCCH domain-containing protein 19 GN=NERD
-1.01823	_2	_SFGT(ph)RS(ph)GTKFLPSSD_	0.954118		0.219918	Q9FN48	AT5G23060	CAS_ARATH Calcium sensing receptor, chloroplastic GN=CAS
-0.91957	_2	_NT(ph)GRVSPAVDPPS(ph)PR_	1		0.226468	Q9SSC1	AT1G80180	Q9SSC1_ARATH At1g80180/F18B13_26 GN=F18B13.26
-1.0605	_2	_TDSEVTSLAAS(ph)SPARS(ph)PR_	0.998192		0.236319	Q9C636	AT1G45688	Q9C636_ARATH Putative uncharacterized protein At1g45688 GN=F2G19.25

-0.4974	_2	_VTYVAPPRPPS(ph)PVHEGSEEGS(ph)S(ph)PR_	0.986229		0.245054	Q8VZ95	AT3G60600	VAP11_ARATH Vesicle-associated protein 1-1 GN=PVA11
-0.56025	_1	_LVGS(ph)LPIMR_	1		0.257119	Q9FMN2	AT5G42870	PAH2_ARATH Phosphatidate phosphatase PAH2 GN=PAH2
-0.61738	_1	_AVSAT(ph)KVITEGEDQA_	0.990537		0.264993	Q8L8Y0	AT1G58380	RS21_ARATH 40S ribosomal protein S2-1 GN=RPS2A
-0.36624	_1	_TLS(ph)STPLALVGAK_	0.99674		0.283778	P92942	AT3G27170	CLCB_ARATH Chloride channel protein CLC-b GN=CLC-B
-1.00813	_2	_TKDELT(ph)EEES(ph)LSGK_	0.999999		0.2841	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-0.8615	_1	_SLS(ph)FSTSGPR_	0.995712		0.288306	F4HSE1	AT1G07650	F4HSE1_ARATH Putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GN=AT1G07650
-0.72241	_2	_ALGS(ph)FRS(ph)NATN_	0.999994		0.299013	P93004	AT4G35100	PIP27_ARATH Aquaporin PIP2-7 GN=PIP2-7
-0.53408	_1	_SLS(ph)GISLNEPK_	0.999799		0.302105	Q9SUT4	AT4G11270	Q9SUT4_ARATH Putative uncharacterized protein AT4g11270 GN=AT4g11270
-0.61791	_1	_LHVKDGELGELS(ph)PDIR_	1		0.305659	Q0WQK2	AT3G26935	ZDHC9_ARATH Probable protein S-acyltransferase 7 GN=PAT07
-0.41203	_1	_VTSIIDSVPES(ph)PQRP_	1		0.317936	Q9C9Y6	AT3G08710	TRXH9_ARATH Thioredoxin H9 GN=TRX9
0.473012	_3	_AVEPT(ph)PPS(ph)T(ph)PS(ph)PSPFEDEVFVR_	0.967794		0.320222	Q42606	AT5G40850	Q42606_ARATH AT5g40850/MHK7_8 GN=UPM1
0.473012	_3	_AVEPT(ph)PPS(ph)T(ph)PS(ph)PSPFEDEVFVR_	0.965094		0.320222	Q42606	AT5G40850	Q42606_ARATH AT5g40850/MHK7_8 GN=UPM1
-0.67658	_1	_APSPSTTNFAGSS(ph)PR_	0.986208		0.323123	Q9FMF5	AT5G64330	RPT3_ARATH Root phototropism protein 3 GN=RPT3
-0.22649	_1	_GFLS(ph)GPIER_	1		0.325949	Q9LQN6	AT1G07630	P2C04_ARATH Probable protein phosphatase 2C 4 GN=PLL5

-0.89543	_1	_GFRQDVESTEDS(ph)EDEDILK_	0.999981		0.339148	Q9FYG2	AT1G67310	CMTA4_ARATH Calmodulin-binding transcription activator 4 GN=CMTA4
-0.91632	_2	_KY(ph)GPIFT(ph)M(ox)QMGQR_	1		0.341689	Q9SAB7	AT1G11600	Q9SAB7_ARATH Cytochrome P450 like protein GN=F25C20.25
-0.21205	_1	_VEEKEES(ph)DEEDYGGDFGLFDEE_	1		0.350576	Q42112	AT3G09200	RLA02_ARATH 60S acidic ribosomal protein P0-2 GN=RPP0B
-0.15651	_1	_ILSQMLS(ph)QK_	0.988866		0.355374	Q9FIJ0	AT5G47910	RBOHD_ARATH Respiratory burst oxidase homolog protein D GN=RBOHD
-0.42871	_2	_SFGT(ph)RS(ph)GTKFLPSSD_	0.962828		0.35716	Q9FN48	AT5G23060	CAS_ARATH Calcium sensing receptor, chloroplastic GN=CAS
-0.51683	_1	_S(ph)FGDVNEIGAR_	1		0.357182	Q8S9J8	AT4G32285	CAP1_ARATH Probable clathrin assembly protein At4g32285 GN=At4g32285
-0.36584	_1	_VDS(ph)SQNWAGHI_	0.991183		0.361105	Q9FG81	AT5G43830	Q9FG81_ARATH Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs GN=AT5G43830
-0.64378	_1	_LIEEVSHS(ph)SGSPNPVS(ph)D_	1		0.3614	Q9M8T0	AT3G02880	Y3288_ARATH Probable inactive receptor kinase At3g02880 GN=At3g02880
-0.47169	_1	_AVDAGM(ox)LDYDS(ph)DDNPIVVDKR_	0.999997		0.373042	O22907	AT2G47330	RH24_ARATH DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 24 GN=RH24
-0.29585	_1	_LIEEVSHSSGS(ph)PNPVSD_	0.999726		0.376433	Q9M8T0	AT3G02880	Y3288_ARATH Probable inactive receptor kinase At3g02880 GN=At3g02880
-0.52227	_2	_RVEPRS(ph)PS(ph)PSGANTTPTPV_	0.978475		0.381607	P54144	AT4G13510	AMT11_ARATH Ammonium transporter 1 member 1 GN=AMT1-1
-0.40578	_1	_SGT(ph)KFLPSSD_	0.988794		0.382832	Q9FN48	AT5G23060	CAS_ARATH Calcium sensing receptor, chloroplastic GN=CAS
0.927836	_1	_TVANSPEALQS(ph)PHSSESAFALK_	0.989716		0.392853	Q9FG81	AT5G43830	Q9FG81_ARATH Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs GN=AT5G43830
0.07086	_1	_SNS(ph)LSFLGK_	0.996692		0.419028	Q9C585	AT5G22030	UBP8_ARATH Ubiquitin carboxyl-terminal

								hydrolase 8 GN=UBP8
0.156216	_1	_AQTGVMT(ph)AETGTYR_	0.999737		0.431627	F4JTP5	AT4G38470	F4JTP5_ARATH ACT-like protein tyrosine kinase family protein GN=AT4G38470
-0.28416	_1	_FLTQSGT(ph)FKDGDLR_	0.994877		0.46458	Q9S7U9	AT4G29810	M2K2_ARATH Mitogen-activated protein kinase kinase 2 GN=MKK2
-0.31442	_2	_LIEEVSHS(ph)SGSPNPVS(ph)D_	1		0.478549	Q9M8T0	AT3G02880	Y3288_ARATH Probable inactive receptor kinase At3g02880 GN=At3g02880
-0.3759	_1	_ETESQQAGEDLLES(ph)PLLQEEK_	1		0.483137	Q8W4S4	AT4G39080	VHAA3_ARATH Vacuolar proton ATPase a3 GN=VHA-a3
-0.25151	_1	_SVAVQQPIDGS(ph)PR_	1		0.486245	Q9LJQ7	AT3G18230	Q9LJQ7_ARATH At3g18230 GN=AT3G18230
0.360767	_1	_SSS(ph)GVSAPLIPK_	0.996673		0.486383	Q93VM8	AT5G20650	COPT5_ARATH Copper transporter 5 GN=COPT5
-0.26887	_1	_VDS(ph)EGVLCGANFK_	1		0.508837	Q93V62	AT4G27450	Q93V62_ARATH AT4g27450/F27G19_50 GN=AT4G27450
-0.52827	_1	_AY(ph)GSVRSQLHELHA_	0.962497		0.509728	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-0.31296	_1	_TSFSVPS(ph)PK_	0.992995		0.511318	Q9C8E6	AT1G42550	Q9C8E6_ARATH Plastid movement impaired1 GN=T8D8.2
-0.37645	_2	_NSS(ph)PPS(ph)PFHPAAYK_	0.998654		0.520593	Q9C5F6	AT4G38550	Q9C5F6_ARATH Phospholipase like protein (PEARLI 4) family GN=AT4G38550
-0.34632	_1	_TNS(ph)LLVLPR_	0.999537		0.533901	Q8RXX9	AT3G05200	ATL6_ARATH E3 ubiquitin-protein ligase ATL6 GN=ATL6
-0.26815	_1	_IISQLEPEVLS(ph)PIKPADDQLSLSDLDM(ox)VK_	0.999982		0.551577	Q9S7U9	AT4G29810	M2K2_ARATH Mitogen-activated protein kinase kinase 2 GN=MKK2
-0.28787	_1	_QLS(ph)IDQFENEGRR_	1		0.55227	Q9SJF0	AT1G08420	BSL2_ARATH Serine/threonine-protein phosphatase BSL2 GN=BSL2
-0.47568	_1	_YAPANS(ph)PPLPR_	1		0.558997	F4JM55	AT4G28990	F4JM55_ARATH RNA-binding-related protein GN=AT4G28990

-0.19076	_1	_VDVYNRVNS(ph)IPR_	0.99999		0.564271	Q93V62	AT4G27450	Q93V62_ARATH AT4g27450/F27G19_50 GN=AT4G27450
-0.47932	_2	_KVPS(ph)LSSLS(ph)SR_	0.985286		0.57195	Q9C8K2	AT1G51500	AB12G_ARATH ABC transporter G family member 12 GN=ABCG12
-0.10937	_3	_M(ox)ATST(ph)T(ph)LQS(ph)LLM(ox)K_	0.99481		0.578381	Q9M0U7	AT4G05475	FB221_ARATH Putative F-box protein At4g05475 GN=At4g05475
-0.17397	_1	_EIAEGVTQIVQM(ox)LET(ph)EEE_	1		0.587506	Q9LVA0	AT5G62390	BAG7_ARATH BAG family molecular chaperone regulator 7 GN=BAG7
-0.10375	_2	_AIS(ph)LPS(ph)SPQNYR_	1		0.621004	Q94AB2	AT3G58640	Q94AB2_ARATH AT3g58640/F14P22_230 GN=AT3G58640
-0.12085	_2	_(ac)T(ph)LTIPNAPGS(ph)SGYLDM(ox)FPER_	0.972316		0.640178	Q8VZR6	AT2G43330	INT1_ARATH Inositol transporter 1 GN=INT1 PE=1 SV=1
-0.20103	_1	_VVT(ph)IQGYQK_	0.997124		0.647543	Q9LNC1	AT1G06260	Q9LNC1_ARATH Cysteine proteinases superfamily protein GN=F9P14.12
-0.06807	_3	_TFQGAET(ph)T(ph)M(ox)QNLT(ph)VHPNIGR_	0.998592		0.686748	F4J0L7	AT3G50370	F4J0L7_ARATH Uncharacterized protein GN=AT3G50370
-0.28118	_1	_VDS(ph)SGEVCGVTFK_	0.997831		0.68744	Q9LIL3	AT3G22850	Q9LIL3_ARATH Aluminum induced protein with YGL and LRDR motif GN=AT3G22850
-0.46865	_1	_VTTPSEEDSNNGLPVQQPGT(ph)PNQR_	1		0.688901	Q9M815	AT1G52200	PCR8_ARATH Protein PLANT CADMIUM RESISTANCE 8 GN=PCR8
0.125587	_2	_(ac)M(ox)DFGYT(ph)MKALRS(ph)K_	0.993588		0.689686	F4ING4	AT2G08986	F4ING4_ARATH Uncharacterized protein GN=AT2G08986
-0.11312	_1	_GGS(ph)FLAGNLS(ph)FNR_	1		0.713436	Q93ZS6	AT3G05090	Q93ZS6_ARATH AT3g05090/T12H1_5 GN=LRS1
0.188869	_2	_AYGS(ph)VRS(ph)QLHELHA_	0.999996		0.723695	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
-0.40678	_2	_LIEEVSRSPAS(ph)PGPLS(ph)D_	1		0.729763	Q9FMD7	AT5G16590	Y5659_ARATH Probable inactive receptor kinase At5g16590 GN=At5g16590
-	_2	_ALGSFGS(ph)FGS(ph)FR_	0.999981		0.731314	Q9FF53	AT5G60660	PIP24_ARATH Probable aquaporin PIP2-4

0.33186								GN=PIP2-4
-0.07765	_1	_VALTSLQS(ph)LPR_	0.999006		0.757478	Q8S3U9	AT1G76850	SEC5A_ARATH Exocyst complex component SEC5A GN=SEC5A
-0.14657	_1	_AAS(ph)FNIIPSSTGAAK_	0.999994		0.76288	P25858	AT3G04120	G3PC1_ARATH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC1, cytosolic GN=GAPC1
-0.13569	_1	_VGSDEGGVY(ph)QVHPLK_	0.989916		0.770133	F4HRC1	AT1G45233	THO5A_ARATH THO complex subunit 5A GN=THO5A
0.071328	_1	_SLYDLQELLDTTIIAS(ph)SGNLKGFEK_	0.953196		0.786482	Q8GZ99	AT5G49760	Q8GZ99_ARATH At5g49760 GN=At5g49760/K2I5_13
0.068522	_1	_LIDTDGDYHIDPNDPNYDS(ph)GEEPFELVGATLSDPLDDYKK_	0.957934		0.796269	Q8W4Q4	AT4G24800	Q8W4Q4_ARATH AT4g24800/F6I7_10 GN=AT4G24800
0.111991	_1	_VFEQQGIEAPS(ph)DDDDFIEVR_	1		0.814358	F4J0L7	AT3G50370	F4J0L7_ARATH Uncharacterized protein GN=AT3G50370
8.99E-02	_1	_NLS(ph)GKAETMSTNVER_	0.999974		0.872889	Q9FHY8	AT5G41950	Q9FHY8_ARATH At5g41950 GN=AT5G41950
-0.04494	_1	_ASS(ph)FIRGGTDQLQTAR_	0.958512		0.886489	Q9ZSD4	AT3G11820	SY121_ARATH Syntaxin-121 GN=SYP121
-0.11252	_1	_YYEQKS(ph)FVSGD_	0.997256		0.886763	Q9ZVI9	AT2G38670	PECT1_ARATH Ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase GN=PECT1
0.051113	_3	_SFDS(ph)VT(ph)NM(ox)IPPSPPVY(ph)K_	0.970636		0.915822	F4IPV3	AT2G30990	F4IPV3_ARATH Uncharacterized protein GN=AT2G30990
-0.04606	_1	_SFVVEES(ph)DDDM(ox)DETEEVKPK_	0.999975		0.919015	Q93YR3	AT4G22670	F10AL_ARATH FAM10 family protein At4g22670 GN=At4g22670
-0.01185	_1	_LAS(ph)IDSFDSR_	0.997247		0.923892	Q9XF67	AT5G04510	PDPK1_ARATH 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 GN=PDPK1
0.042846	_2	_SGT(ph)KFLPSSD_	0.988794		0.93883	Q9FN48	AT5G23060	CAS_ARATH Calcium sensing receptor, chloroplastic GN=CAS

-0.01875	_2	_GGS(ph)FLAGNLS(ph)FNR_	1		0.943945	Q93ZS6	AT3G05090	Q93ZS6_ARATH AT3g05090/T12H1_5 GN=LRS1
1.97E-02	_2	_LIEEVSHSSGS(ph)PNPVSD_	0.999726		0.95092	Q9M8T0	AT3G02880	Y3288_ARATH Probable inactive receptor kinase At3g02880 GN=At3g02880
0.022982	_1	_VSS(ph)FEALQPATR_	0.991894		0.952439	Q9C9P3	AT1G74910	Q9C9P3_ARATH ADP-glucose pyrophosphorylase family protein GN=F9E10.24
-0.0195	_1	_ALGSFGS(ph)FGS(ph)FR_	0.999981		0.953386	Q9FF53	AT5G60660	PIP24_ARATH Probable aquaporin PIP2-4 GN=PIP2-4
0.026657	_1	_EVPS(ph)FIQR_	1		0.959341	Q39033	AT3G08510	PLCD2_ARATH Phosphoinositide phospholipase C 2 GN=PLC2
-0.02893	_1	_IGIWQYGDIES(ph)DDEDTGPAR_	1		0.960114	F4K6N0	AT5G07350	F4K6N0_ARATH TUDOR-SN protein 1 GN=Tudor1
0.009167	_2	_(ac)T(ph)LT(ph)IPNAPGSSGYLDM(ox)FPER_	0.953724		0.981408	Q8VZR6	AT2G43330	INT1_ARATH Inositol transporter 1 GN=INT1
-1.17241	_1	_GRS(ph)PAFNALAATFESQNAR_	1		1	F4JPJ2	AT4G30160	F4JPJ2_ARATH Villin 4 GN=VLN4
-0.97398	_1	_SLGS(ph)FRS(ph)AANV_	1		1	P43286	AT3G53420	PIP21_ARATH Aquaporin PIP2-1 GN=PIP2-1
0.513289	_1	_S(ph)FGPGTPFEFFQSQSR_	0.974928		1	F4K8T6	AT5G44240	F4K8T6_ARATH Aminophospholipid ATPase 2 GN=ALA2
-0.68293	_1	_RFS(ph)PVHELDVGQILSEAR_	1		1	Q8GSA7	AT2G22300	CMTA3_ARATH Calmodulin-binding transcription activator 3 GN=CMTA3
-0.19542	_1	_QLS(ph)LDQFQNESR_	1		1	Q8L7U5	AT4G03080	BSL1_ARATH Serine/threonine-protein phosphatase BSL1 GN=BSL1
-0.54772	_1	_PTATGDIPS(ph)LEPVLR_	0.992026		1	Q9FF10	AT5G07830	HPSE1_ARATH Heparanase-like protein 1 GN=At5g07830
-0.16707	_1	_KVS(ph)GPLDSSGLM(ox)K_	0.999961		1	Q9FZ45	AT1G16860	Y1686_ARATH Uncharacterized membrane protein At1g16860

								GN=At1g16860
-1.7698	_1	_ELAAEES(ph)DGSVKEDDDDDEDSSESGK_	0.964264		1	Q9LD43	AT2G38040	ACCA_ARATH Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha, chloroplastic GN=CAC3
0.440314	_1	_SVS(ph)FGGIYNNK_	0.999999		1	Q9LKW9	AT2G01980	NHX7_ARATH Sodium/hydrogen exchanger 7 GN=NHX7
0.201383	_1	_DIES(ph)EVEVSQEGR_	0.999999		1	Q9MA55-2	At3G05420	ACBP4_ARATH Isoform 2 of Acyl-CoA-binding domain-containing protein 4 GN=ACBP4
-0.58346	_1	_LGAGLVQS(ph)PLDR_	1		1	Q8L602	AT5G53420	Q8L602_ARATH CCT motif family protein GN=AT5G53420
-0.22796	_1	_LGAGLVQS(ph)PLDR_	1		1	Q8L602	AT5G53420	Q8L602_ARATH CCT motif family protein GN=AT5G53420
0.462785	_1	_QQFESIARPTLEIEIPS(ph)PR_	1		1	Q8GY46	AT5G13560	Q8GY46_ARATH At5g13560 GN=At5g13560/MSH12_2
-0.46913	_1	_VQS(ph)LAESNLSSLPDR_	0.999416		1	Q9FFF6	AT5G05600	Q9FFF6_ARATH AT5g05600/MOP10_14 GN=AT5G05600
-1.07543	_1	_LASIS(ph)GGLDGQAPR_	0.992328		1	Q9LJD8	AT3G13530	Q9LJD8_ARATH MAP3K epsilon protein kinase GN=MAPKKK7
-1.15853	_1	_NATEVPS(ph)PDYSQGK_	0.997776		1	Q9LM78	AT1G20760	Q9LM78_ARATH Calcium-binding EF hand-containing protein GN=AT1G20760
-1.24175	_2	_VVYVAPPRPPS(ph)PVREGS(ph)EEGSSPR_	0.994507		1	Q9SHC8	AT2G45140	VAP12_ARATH Vesicle-associated protein 1-2 GN=PVA12
0.155231	_2	_T(ph)KDELT(ph)EEESLSGKDYLDPPPVK_	0.974609		1	Q9ZV07	AT2G39010	PIP26_ARATH Probable aquaporin PIP2-6 GN=PIP2-6
0.570074	_3	_INSLTTT(ph)IY(ph)NY(ph)K_	0.98351		1	Q9FIS4	AT5G62140	Q9FIS4_ARATH At5g62140 GN=AT5G62140

UN PO' DI ME

Nasco nel 1974 ed entro a far parte della mia famiglia composta da mamma Tecla, papà Vittorio e mia sorella Valentina. La mia infanzia è stata bella con loro e con tutti i miei parenti (e Milena) della Val Camonica dove ci sono le montagne a me così care!

Crescendo ho incontrato diversi 'insegnanti', canonici e no, che mi hanno preparato alle sfide della vita. Quando ho dovuto scegliere la scuola superiore mio papà ha insistito per una formazione che non mi escludesse nessuna possibilità… aveva ragione ho usato la mia formazione scientifica per trovare la mia strada lavorativa. Un mio grande dispiacere il fatto che non abbia avuto il tempo di vederne i frutti! Ed ecco che ben nel lontano 1993 esco dal liceo scientifico pronta a iscrivermi a Biologia. Quegli anni sono stati duri perché, oltre alla malattia del mio papà, non riuscivo a trovare la mia strada fino a quando per puro caso, andando a trovare a Latina una delle persone più preziose della mia vita (Rossella) mi imbatto nel diploma di laurea in Biotecnologie Vegelati ed Industriali!

Spinta anche dalla mia famiglia, decido di provarci… mi piace: nel mio essere pragmatica studiare le applicazioni della biologia era diventato un piacere. Mi ritrovo dunque nel 2000 a dover trovare un laboratorio dove fare la tesi. Il coordinatore del corso il Prof. Felice Cervone, avendo io 'la faccia di una che non studia' mi istrada verso l'ENEA di Casaccia, ma la Prof. Daniela Bellincampi mi acchiappa e mi fa rimanere nel laboratorio di Fisiologia Vegetale della Sapienza. Li inizio a lavorare al mio primo lavoro di tesi! Non sapevo allora che vedere la Minerva (citando mio figlio Edoardo: 'La signora che fa gol!!') tutti i giorni sarebbe stato il mio futuro! Finisco la mia prima tesi (dal titolo "Caratterizzazione di piante di pomodoro esprimenti PGIP1 e PGIP2 di Phaseolus vulgaris") discutendola con successo il 14 marzo 2001. Durante l'esperienza di questa prima tesi, Gianni Salvi tecnico, di Elevata Esperienza, mi ha notata e ha insistito per farmi continuare a collaborare in laboratorio come 'supporto tecnico alla ricerca'… non fermandosi sul fatto che la prima settimana in laboratorio ero riuscita a rompere una quindicina di cilindri di vetro in un sol colpo!!! Mi ha scelto come sua erede lavorativa… ma poi chissà quante volte se ne è pentito!! … Di quegli anni amo ricordare l'amicizia nata con Adele Di Matteo, Vera D'Agabito, Roberta Galletti, Lucia Tufano e Cinzia Manfredini… ancora adesso le cerco con uno sguardo malinconico nei loro ex-posti di lavoro.

Avevo tanta voglia di stare in laboratorio, ma non solo per fare 'il tecnico', volevo anche partecipare alle ricerche… dunque sono stata affidata alle cure scientifiche della Prof. Giulia De Lorenzo! Credo che insieme, Gianni e la Prof., siano un giusto compromesso tra follia e sapienza, tra protocollo ed inventiva.

Quegli anni sono stati per me importanti e formativi… e così con Federica Taddei abbiamo deciso di continuare a studiare all'Università: ricordo benissimo le giornate a studiare, gli pettegolezzi e i viaggi insieme… si, perché nel nostro percorso di studi ci siamo ritrovate a Viterbo a iscriverci al corso di laurea di I livello in Biotecnologie agrarie ed industriali! A Viterbo non ho mai fatto la vita da studentessa e probabilmente mi sarò persa tante cose, ma l'ho trovata sempre un posto accogliente e le persone che ho conosciuto sono sempre state disponibili e gentili. Tra questi ho avuto il piacere così di rincontrare una delle migliori coppie di Prof. universitari che ho avuto la fortuna di conoscere: Stefania Masci e Renato D'Ovidio! In particolare con quest'ultimo ho svolto il lavoro della mia seconda tesi!! Con i modi gentili che lo contraddistinguono riesce spesso a farti dire dei 'Si' che non avresti voluto!!! Per fortuna che, spesso, il sorriso aperto e solare di Stefania, il suo affetto e la sua disponibilità ti fanno continuare a voler bene anche a Renato!! Non ho mai lavorato con Lei ma ricordo ancora in una delle sue prime lezioni (che ho avuto il piacere di seguire quando ancora si usavano i lucidi), una pianta stressata disegnata da lei come un fumetto! Continuando a lavorare e studiare ho discusso la mia seconda tesi nel dicembre 2005 proprio sul lavoro fatto in collaborazione con Renato D'Ovidio 'Caratterizzazione di inibitori proteici delle poligalatturonasi (PGIP) in Triticum aestivum' e mi sono ritrovata a iscrivermi alla laurea specialistica in Biotecnologie Ambientali ed Industriali alla Sapienza. In quegli anni trova compimento con le relative pubblicazioni, la mia ricerca… in particolare la purificazione e il clonaggio di una PG di Colletotricum e la caratterizzazione delle risposte della piante di tabacco esprimenti la PG di Niger. Di quest'ultimo lavoro, amo ricordare in particolare la vita di laboratorio passata con Cinzia e Roberta… basti pensare la giornata assurda a fare il nostro primo Northen Blot con il radioattivo!! Sotto la guida della Prof. De Lorenzo e spronata da Felice Cervone, ho incominciato ad occuparmi di 'cercare' gli oligogalatturonidi in vivo… o meglio a cecarli e basta!!! Ma che anno il 2006, a livello lavorativo, ho fatto il concorso per tecnico B3 alla Sapienza e a settembre ho preso servizio… Certo il 2007 è all'insegna

della mia prima gravidanza, un po' inaspettata.. il 14 novembre nasce il mio splendido (cuore di mamma) Edoardo che ha cambiato gli orizzonti sia a me che al mio compagno Andrea… Poteva esser il momento giusto per abbandonare gli studi…. Ed invece no… con il supporto di chi mi sta sempre a canto, sono riuscita a prendere la laurea specialista! Come ho fatto non so, considerato che ho discusso la tesi a dicembre del 2010 e il mio secondo genito Gabriele, spettacolare ma vivace dalla nascita, era nato il 24 luglio di quello stesso anno.. Non riesco neanche a ricordare perché ho provato a fare il concorso per il dottorato in biotecnologie vegetali all'Università di Viterbo… onestamente come la prof Stefania e il prof Felice mi abbiano convinto a provarci è un ricordo che probabilmente ho voluto rimuovere!!! Forse fra qualche anno quando tutto questo sarà lontano m tornerà in mente…. Al Professore Felice vorrei dire, solamente: "e per fortuna che ho la faccia di una che non studia" Credo che nella sua carriera non può aver conosciuto nessun altro che ci ha speso tanto tempo!!

In questi ultimi tre anni ho condiviso le mie ricerche scientifiche con diverse persone: alcuni studenti che ho seguito nella realizzazione delle loro tesi come MariaAntonietta Vigorito (e direi che angoscia!!), oppure altri dottorandi come Giovanna Gramegna e Ilaria Verrascina, alcuni post doc come Francesco Spinelli, Lucia Marti e Manuel Bendetti (di quest'ultimo voglio precisare una cosa.. a volte mi verrebbe voglia di spaccargli la faccia, quando è contorto e convinto delle sue idee.. ma poi è capace di mettersi in discussione, non so quando ma succede e mi piace lavorare con lui), la professoressa Benedetta Mattei con cui condivido l'amore per le proteine, lo sconforto per la statistica e le giornate all'Orbitrap. Di lei rimango colpita della capacità di collegare, di trovare l'idea semplice (e a volte giusta) per risolvere il problema scientifico…Certo l'Orbitrap, che ha un suo fascino maledetto e vuole miliardi di attenzioni, ci ha messo a dura prova!!! Per fortuna, oltre a Claudia Fabbri, condividiamo gioie e dolori di questa macchina capricciosa con il gruppo della prof. Eugenia Schininà (la cui grande esperienza in LC-MS è sempre di conforto… al di là che ci vuole far mettere la copertina all' Orbitrap!) e le ragazze Laura Di Francesco (che bella scoperta!) e Virginia Correani con cui ho condiviso, in particolare, l'esperienza entusiasmante della Pratical School EMBO a Odense (Danimarca) in Fosfoproteomica. Ed infine la prof Giulia che deve sopportare il mio modo di parlare come il prof Cervone (e non gliene bastava uno nella vita!) e il prof

Felice a cui ogni mattina accendo la luce dello studio e che so che oramai è convinto delle mie capacità (certo gli ho trovato alla fine gli OG in vivo!!!!!).

E che dire di tutto questo viaggio…. ci stanno mio marito Andrea (nel frattempo mi sono anche sposata!! Che grande emozione dopo 10 anni di storia e di vita insieme e due figli, sposarlo) Lui è il primo che si deve subire come risolvere un problema scientifico, oppure il ritardo nella fine dell'esperimento, la rottura dell'Orbitrap, la perdita del campione, i malumori per una giornata dove 'non è venuto niente' e gli entusiasmi del buon risultato… I miei figli che forse vorrebbe una mamma casalinga ma che poi quando sono venuti, quelle rare volte, in laboratorio gli sono brillati gli occhi per un microscopio o anche solo per l'azoto liquido…Mia sorella e mio cognato e le loro tre figlie: Chiara, Benedetta e Gemma che amo come i miei figli e con cui passare del tempo è sempre tempo prezioso… La mia famiglia 'scelta': zia Rossella e Zio Marcello e i loro tre figli: speciale ogni momento che riusciamo a rubare alla quotidianità e alla distanza per stare insieme.. La mia mamma che trova il modo di essere sempre utile e a cui devo la voce alta ma anche tutta la mia capacità di essere pratica... I miei 'suoceri': nonni giganti con un 'cuore' grande, (come loro), verso la mia famiglia, sempre disponibili, I miei amici, in particolare le ''Gioie' e i Console… Questa è la mia vita… potrei anche mettere le pubblicazioni ma per quello c'è Intenet… I rapporti con le persone con cui si lavora, le persone preziose che fanno parte della nostra vita e con cui condividiamo il nostro viaggio non si mettono mai nel curriculum.. e pure sono tanta parte della nostra vita (e direi anche per fortuna!!) E' bello, così nero su bianco, ricordare come ci si è arrivati ad un traguardo e come queste persone abbiano contribuito a ciò e per cui ringraziare tutti!

Dedico questo mio elaborato ad Edoardo e Gabriele. A volte cerco di immaginare il mondo che stiamo lasciando a loro e alle generazioni future ma è troppo difficile.. A volte spero di poter contribuire a lasciare, con il mio lavoro, una traccia (anche piccola) per un progresso positivo del mondo… Non so, ma mi accontenterei del fatto che i miei figli capissero l'importanza dell'amore e dell'impegno per quello che si fa… senza mai perde di vista le persone!. Non importa la meta, ma il viaggio!!!" Le persone non fanno i viaggi, sono i viaggi che fanno le persone.(John Steinbeck) *e fatemi anche aggiungere:* sono i viaggi e le persone con cui si fanno questi viaggi che fanno le persone! ***Grazie!***

IN QUESTI TRE ANNI:

Pubblicazioni:

- Ferrari, S, Lionetti, V, Francocci, F, Benedetti, M, *Pontiggia, D*, Tomassetti, S, Bellincampi, D, De Lorenzo, G; Cervone, F. (2012). *Pectin modification improves utilization of plant biomasses to biofuel conversion*. Pharmaceutical Biology vol 50, issue 5; p. 669-670 ISSN: 1388-0209
- Lionetti V; Francocci F; Bastianelli E; Ferrari S; *Pontiggia* D; Benedetti M; De Lorenzo G, Bellincampi D & Cervone F (2011). *Improving exploitation and saccharification of biomass for bioconversion.* (Article in conference proceedings) Proceedings of the Joint Meeting AGI-SIBV-SIGA Assisi, Italy – 19/22 September, 2011. ISBN 978-88-904570-2-9 Oral Communication Abstract – 5C.03
- Tomassetti S*, *Pontiggia* D*; Reca IB, Verrascina I, Francocci F,Salvi G, Cervone F., Ferrari S. (*Equal contribution to the paper). *Controlled expression of pectic enzymes in Arabidopsis thaliana enhances biomass conversion without adverse effects on growth*. Submitted to Phytochemistry.
- Benedetti M, *Pontiggia* D, Raggi S, Cheng Z, Scaloni F, Ferrari S,. Ausubel FA, Cervone F, De Lorenzo G. *Plant immunity triggered by engineered release of oligogalacturonides, damage-associated molecular patterns* Submitted to Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

Brevetti:

- 2014 Estensione americana del Brevetto con n. di deposito US 8,637,734 B2 "*Use of plants with reduced levels of de-esterified homogalacturonan in the cell wall or portion thereof for improving the saccharification of plant biomasses*" Inventori: Felice Cervone, Giulia De Lorenzo, Daniela Bellincampi, Simone Ferrari, Vincenzo Lionetti, Giovanni Salvi, Fedra Francocci, *Daniela Pontiggia.*

Poster presentati ai congressi:

- *D. Pontiggia, C. Fabbri, G.De Lorenzo, B. Mattei. Degradation of pectin in the plant cell wall: implications in plant defense. 3th practical EMBO course in "Phosphoproteomics"in Odense, 14-19April 2013.*
- *D. Pontiggia, M. Benedetti; S. Ferrari, F. Cervone, G. De Lorenzo. Protein engineering and improvement of plant resistance to pathogens: exploitation of a polygalacturonase inhibitor. 12th FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita) Congress University of Rome 'Sapienza', 24-27 September 2012.*

- *C. Fabbri; F. Spinelli, D. Pontiggia, D. Bellincampi, V. Lionetti, G. De Lorenzo. B. Mattei. Large scale analysis of the tomato membrane proteome during fruit ripening. 12th FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita) Congress University of Rome 'Sapienza', 24-27 September 2012.*
- *Simone Ferrari, Vincenzo Lionetti, Francocci Fedra, Manuel Benedetti, Daniela Pontiggia, Susanna Tommassetti, Daniela Bellincampi, Giulia De Lorenzo, Felice Cervone. Pectin modification improves utilization of plant biomasses to biofuel conversion. Phytochemical Society of North America 50th Anniversary Meeting, Fairmont Orchid, Hawai'i, 10-15 december 2011.*
- *Vincenzo Lionetti, Fedra Francocci, Elisa Bastianelli, Simone Ferrari, Daniela Pontiggia, Manuel Benedetti, Giulia De Lorenzo, Daniela Bellincampi and Felice Cervone. Improving exploitation and saccharification of biomass for bioconversion. Joint Meeting AGI- SIBV- SIGA Cittadella di Assisi, 19-22 september 2011.*

Partecipazioni a congressi e scuole:

- EMBO Pratical Course "Phosphoproteomics" University of Southern Denmark, Odense, April 14-19,2013
- XII FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita), Rome 24-27 september 2012


'Mamma che lavora al computer e con le piante'
Edoardo 6 anni


'Mamma e le piante'
Gabriele 3 anni