

PROGRAMMA DI MOBILITÀ DI BREVE DURATA – STM (Short-Term-Mobility)

(data di inizio e fine missione 08/05/11 – 29/05/11)

Fruitore – Dott.ssa Tassone Paola

National Research Council - Institute of Agro - Environmental and Forest Biology (IBAF)

Proponente: Dr. Carlo Calfapietra

Struttura Ospitante

Belgian Nuclear Research Centre (SCK•CEN), Boeretang 200, 2400 Mol, Belgium

Supervisor: Dr. Hildegard Vandenhove

STUDIO DELL'EFFETTO COMBINATO DELLA MICROGRAVITÀ E DELLE RADIAZIONI IN PIANTE DI ARABIDOPSIS

Introduzione

Gli ambienti spaziali sono caratterizzati da: assenza di gravità (microgravità), ampio spettro di radiazioni ed altri fattori che influenzano negativamente i processi vitali sia durante i voli spaziali, sia se si permane a lungo nello spazio come ad esempio sostare nella Stazione Spaziale Internazionale orbitante (ISS). Quindi essendo noto che lo spazio extraterrestre é inospitale, in quest'ultimi dieci anni molti scienziati ed ingegneri si sono dedicati a cercare utili contromisure per garantire la sopravvivenza in tali luoghi anche per lunghi periodi.

Tra i componenti principali che rendono estremo l'ambiente spaziale ci sono: le radiazioni e la microgravità. In letteratura gli studi sull'effetto delle radiazioni sulle piante non è molto ampio, tuttavia la maggior parte dei lavori disponibili vertono sull'effetto delle radiazioni ionizzanti (Todd 2001; Tim *et al* 2007), poco invece é noto sugli effetti dei neutroni (Ngo *et al.* 1991), anche se questo tipo di particelle ponga un serio problema per i voli spaziali a lungo termine, finora schermature totali ai neutroni non sono state ritrovate (Benton & Benton 2001; Tanner *et al.* 2007).

Infine è noto che le radiazioni ionizzanti possano indurre modifiche fisiologiche e molecolari con alterazione sia della respirazione che della emissione di etilene, si riscontrano anche variazioni nell'accumulo di saccarosio e valori alterati di fotosintesi (Wada *et al* 1998;. Cho *et al.* 2000; Kim *et al.* 2005; Nagata *et al.* 2005). Inoltre, in Arabidopsis, studi di espressione genica su vasta scala, dopo irradiazione con agenti ionizzanti, ha evidenziato un'alterazione dei messaggeri dei geni

coinvolti nella crescita e divisione cellulare, nello sviluppo, nelle risposte alla trasduzione del segnale e nei geni stress correlati (Kranz *et al.* 1994; Nagata *et al.* 2005; Sahr *et al.* 2005). Infine, alte dosi di radiazioni hanno indotto l'attivazione di geni coinvolti nella biosintesi di enzimi che eliminano gli accumuli tossici delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Miller *et al.* 1985; Nagata *et al.* 1999), che a loro volta causano una maggiore ossidazione lipidica e proteica (Landry *et al.* 1995; Mittler 2002; Kim *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2006). Dai dati attualmente disponibili, sembra che lo studio degli effetti delle radiazioni sulle piante potrebbe portare ad un miglioramento della conoscenza dei meccanismi che inducono stress (Wang *et al.* 2003), e di conseguenza realizzare le corrette contromisure. Recentemente il lavoro di Fortunati *et al.* (2010) ha dimostrato che ca 50 mGy di irraggiamento neutronico induce una variazione significativa dell'espressione di differenti geni correlati al metabolismo auxinico ed un aumento dei livelli di espressione di geni specificamente coinvolti nella senescenza, *SAG12* e *SAG13* (Navabpour *et al.* 2003, Wagstaff *et al.* 2009) in piante wild type mentre un comportamento differente si riscontra in differenti mutanti auxinici.

Lo scopo di questa breve visita mi ha permesso di:

- I) Simulare un ambiente spaziale ricreando le condizioni della Stazione Spaziale Internazionale (ISS) all'interno dei laboratori del SCK•CEN.
- II) Valutare gli effetti della microgravità, delle radiazioni neutroniche e l'effetto combinato microgravità-neutroni su piante di *Arabidopsis thaliana* come pianta modello.
- III) Valutare gli effetti di cui al punto II) utilizzando nello studio non solo piante wild type ma anche specifiche piante definite agravitropiche, mutate nel trasporto auxinico: *aux1* ed *eir1/pin2*. Per valutare in tale condizioni la risposta della pianta che presenta un difettoso trasporto auxinico

L'auxina é un importante fitormone che regola molti processi nella pianta, agisce anche a basse concentrazioni sia sui processi di crescita che differenziamento e sviluppo. Il trasporto polare dell'auxina é mediato da proteine specifiche che ne controllano appunto l'ingresso (*AUX1*) e l'uscita (*PIN2/EIR1*)

Materiali & Metodi

Piante utilizzate e condizioni di crescita - Per gli esperimenti sono state utilizzate piante di *Arabidopsis thaliana*. wild-type ecotipo Col (Columbia), piante mutate nel trasporto auxinico *aux1*,

eir1/pin2, e la linea di piante transgeniche *dr5::gfp*, fornite dalla Arabidopsis Nottingham Stock Centre (NASC, Nottingham, UK). I semi sono stati sterilizzati per 10 minuti in una soluzione contenente 50% di candeggina commerciale e 0,01% Triton-X, seguito da quattro lavaggi con acqua distillata sterile. I semi sono stati piastrati in Capsule Petri, su un terreno di crescita composto da 1% agar, 1% saccarosio, 0.5X MS e vitamine Gamborg a pH 5,7. Le piante sono state mantenute in camere di crescita per 7 giorni, con il seguente fotoperiodo: 16/8 luce/buio, con una intensità della luce di $150 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e alla temperatura di 23/19 °C giorno/notte con una umidità relativa di ca. 65%.

Set-up sperimentale - Tutti i trattamenti sono stati eseguiti nel Centro Belga di Ricerca Nucleare (SCK•CEN), sito in Mol, Belgio. Sono state applicate alle piante tre diverse condizioni di simulazione di ambiente spaziale: microgravità simulata (RPM), radiazioni neutroniche (N), e una combinazione della simulazione microgravità-neutroni (CS).

I trattamenti sono stati eseguiti su un triplicato di piastre Petri contenenti all'incirca 20 piantine dell'età di 7 giorni, per ciascun ecotipo utilizzato. La dose di neutroni ISS equivalente è di ca. 180 Gy d⁻¹, creata utilizzando californio-252 come fonte di neutroni ad un tasso di dose equivalente di ca. 850 Gy h⁻¹, come risultato di una esposizione cronica. In questo esperimento, la dose totale assorbita è stata ca. 55 mGy. Per simulare le condizioni di microgravità le piastre contenenti le piantine sono stati collocati sulla Random Positioning Maschine (RPM), un clinostato tridimensionale (3D-Clinostat), che è in grado di creare una microgravità di ca. 10^{-2} , 10^{-3} g, con una rotazione casuale fissata a 60 rad s⁻¹. I trattamenti sono stati eseguiti per 65 ore, e le condizioni ambientali del bunker di irradiazione sono stati: intensità luminosa $260 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con un fotoperiodo di 8h/16h luce/buio, alle temperatura di 22-23 °C e con una umidità relativa di ca. 50%.

Analisi Microscopica - Per rilevare lo stato cellulare delle radici primarie, le piante sono state trattate con ioduro di propidio (PI). Il PI entra solo nelle cellule danneggiate, si intercala e si lega alle basi del doppio filamento di acido nucleico emettendo una fluorescenza rossa. Questa colorazione fluorescente nel rosso é in grado di distinguere le cellule danneggiate da quelle normalmente vitali. Le piante controllo e le piante trattate sono state incubate per 2 minuti in 10 µg/ml di PI (Sigma).

Immunofluorescenza

Al termine dei trattamenti, le differenti linee di piante sono state prelevate e fissate mediante sospensione in soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Al

termine dell'incubazione in paraformaldeide, le piante sono state lavate 3 volte con PBS 1X. Dopo le piante sono state incubate 25 min a 30°C con cellulase 1%/PBS per degradare e permeabilizzare la parete cellulare, successivamente le piante sono state lavate 3 volte con PBS 1X. Si aggiunge 1 ml di metanolo a -20°C per 10 minuti. Si reidratano i campioni con PBS 1X per 10 minuti, infine si esegue una incubazione in PBS-BSA 3%. L'anticorpo primario -anti- γ -H2AX (1:100) overnight a temperatura ambiente. L'anticorpo secondario è lasciato in incubazione per 3 ore a 37°C

La morfologia dei nuclei e delle cellule sono state osservate utilizzando un microscopio a fluorescenza (ZEISS AxioWert). 20 radici primarie sono state analizzate per ogni ecotipo trattato. Le immagini sono state eseguite con una Fotocamera digitale Canon (Canon).

Risultati e discussione

A causa delle numerose difficoltà per realizzare esperimenti a bordo delle navette spaziali o sulla ISS, e considerando l'elevato costo delle missioni spaziali, gli esperimenti di simulazione a terra degli ambienti spaziali possono effettivamente essere di aiuto per portare avanti le conoscenze in questo campo. In letteratura, non ci sono dati sugli effetti combinati delle condizioni spaziali simulate dove contemporaneamente il campione viene trattato con radiazioni neutroniche e microgravità. Questo lavoro vuole essere il primo a studiare gli effetti combinati dei neutroni e della microgravità sulla crescita delle radici, ed in parallelo sono state anche valutati gli effetti dei neutroni ed il singolo effetto della microgravità simulata. I risultati sono stati confrontati utilizzando sia piante di *Arabidopsis thaliana*, wild-type ecotipo Colombia (WT-Col), di età di 7 giorni e piante con un difettoso sistema di trasporto dell'auxina, rispettivamente mutanti nelle proteine responsabili dell'afflusso dell'auxina (*aux1*) ed efflusso (*eir1/pin2*).

Dalla figura 1 si può osservare come dopo i trattamenti le piante wild-type non abbiano mostrato alcuna significativa differenza nel normale modello di crescita delle radici dopo bombardamento con neutroni (ca. 55 mGy di dose assorbita), mentre il trattamento con RPM, produce dei coil di tipo destrorso. È interessante notare che un comportamento diverso è stato osservato dopo il trattamento combinato (RPM+Neutrons). Le piante wild-type (WT-Col) mostrano chiaramente che durante il trattamento combinato le radici tentano di curvarsi in modo destrorso ma paragonando le curvature, queste appaiono chiaramente alterate e/o inibite dalla radiazione di neutroni, dove il tentativo di avvolgimento viene chiaramente impedito.

Mentre i neutroni non sembrano influenzare il modello di crescita della radice in entrambi i mutanti auxinici *aux1* e *eir1/pin2*, che mostravano, dopo il trattamento, corte radici agravitropiche (figura 1).

La microgravità simulata ha prodotto una estensione del normale sviluppo della radice primaria, mantenendo una direzione di crescita casuale. Inoltre, il trattamento di RPM su piantine *eir1/pin2* ha mostrato un aumento della formazione delle radici laterali. Le radici sia per i mutanti *aux1* che per i mutanti *eir1/pin2* risultano significativamente alterati dalle condizioni spaziali simulate. I nostri risultati mostrano che la dose di neutroni assorbita da parte delle piante (ca.55 mGy) non è in grado di alterare o modificare il modello di crescita delle radici, anche nelle piante, che presentano un difettoso sistema di trasporto dell'auxina, ma in combinazione con il trattamento RPM, si osserva una maggiore alterazione del modello di crescita delle radici.

Per indagare se le radici primarie fossero danneggiate a livello cellulare, le piante, dopo i differenti trattamenti sono state trattate con Ioduro di Propidio (PI) ed analizzate al microscopio a fluorescenza. La fluorescenza rossa, segnale d'ingresso del PI e del legame con gli acidi nucleici, evidenzia rotture della parete cellulare, questo risulta un chiaro indice di stress ossidativo. Questa analisi mi ha permesso di evidenziare che, dopo irradiazione con i neutroni, l'apice della radice primaria di tutte le piante trattate presentano un elevato numero di cellule danneggiate rispetto ai controlli (NT= non trattate) (Figura 2). I segnali di fluorescenza rossa si presentano bassi e diffusi nelle piante controllo, mentre un aumento della fluorescenza si è osservata nelle piante dopo le radiazioni con i neutroni (N). Tuttavia, questo aumento è maggiore negli apici radicali delle piante mutate *aux1* ed *eir1/pin2*, rispetto le radici delle piante wilde-type (WT-Col). Infine l'estensione del danno cellulare, suggerita dalla localizzazione delle fluorescenza rossa del colorante PI, è piuttosto bassa nelle piantine mantenute nelle condizioni di microgravità simulata (RPM), anche se è leggermente più alte nelle piante *eir1/pin2*.

Inoltre, le piante mutate nel trasporto auxinico *aux1* e *eir1/pin2* mostrano danni cellulari più rilevanti rispetto a quello che si osserva nelle radici delle piante WT-Col mantenute nelle medesime condizioni di microgravità e irraggiamento neutronico combinato (CS) (Figura 2).

Infine sono andata ad indagare come si ridistribuisce l'auxina dopo condizioni di microgravità RPM, irraggiamento con neutroni (N) e trattamento simultaneo di crescita in RPM+N (CS). Per investigare ciò ho utilizzato piante trasformate con *dr5::gfp*. Queste piante trasformate con *GFP-protein* mi hanno permesso di studiare i flussi di auxina indotti dai differenti trattamenti, in quanto sono piante transgeniche in cui il promotore del gene *DR5* è fuso con la *GFP*, fluoresce in verde all'aumento dell'auxina cellulare, perché il gene *DR5* noto è per essere indotto da aumenti di auxina.

In figura 3 si evidenzia la presenza della fluorescenza della *GFP* nelle cellule del centro quiescente (QC) della radici primarie per il NT, indicando elevati livelli di auxina in queste cellule. Dopo irradiazioni con neutroni, si osserva un debole segnale fluorescente nelle cellule della radice nella

zona distale laterale del cappuccio in prossimità della columella. Mentre un segnale più forte di *GFP*- fluorescente si osserva anche dopo le condizioni di RPM, nelle zona delle cellule distali della radice adiacenti a tutti gli strati cellulari della columella, con conseguente colorazione di tutta la radice. Infine simile localizzazione di segnale fluorescente verde si è osservato nelle piantine tenute in microgravità e trattate con neutroni (CS) (Fig. 3).

Analisi al microscopio della formazione delle radici laterali (LRF) si è osservato un debole segnale verde, questo segnale appare sempre nella zona di accrescimento ed allungamento a livello del cappuccio della radice laterale. (Figura 4). La microgravità simulata ha inibito la comparsa di foci a livello della LRF tra le radici laterali con *DR5::GFP* analizzate al microscopio in condizioni di RPM. Tuttavia, dopo la radiazione di neutroni, si è osservata una riduzione del segnale fluorescente sia nei primordi radicali o nella zona della cuffia delle radici laterali, rispetto alle piante di controllo (NT) (Fig. 3). Mentre è stato osservato un debole segnale nelle cellule del cappuccio della radice laterale dopo il trattamento combinato di microgravità e neutroni (CS), suggerendo che i neutroni inibiscono o diminuiscono i flussi di auxina nelle regione della columella nella LRF.

Infine sono andate a valutare se le radiazioni con neutroni, la microgravità generano un danno alla molecola di DNA, attraverso la messa a punto di un protocollo di immunomarcatura dell'istone H2AX su piante di *Arabidopsis thaliana*. L'istone H2AX viene correntemente utilizzato come indice di lesioni al DNA. L'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX) è essenziale per un efficiente riconoscimento e riparazione delle *double strand breaks*, (dsb). Spesso le molecole di H2AX vengono rapidamente fosforilate ad ogni sito in cui è presente una dsb (Rogakou *et al.* 1998) ed il sito di fosforilazione è evolutivamente conservata negli organismi. Data la rapida induzione e amplificazione della forma fosforilata dell'istone H2AX, e visto il rapporto di 1:1 tra il numero di foci di γ -H2AX e il numero di dsb (Sedelnikova *et al.* 2002), gli anticorpi che riconoscono l'istone H2AX fosforilato sono diventati degli ottimi reagenti per determinare la presenza di dsb. La riparazione del DNA è stata valutata a livello della radice primaria delle piante mediante la visualizzazione con anticorpi fluorescenti dei siti in cui essa avviene (foci di riparazione). Gli anticorpi utilizzati sono specifici per la forma fosforilata dell'istone H2AX, che si trova nei siti nucleari dove inizia la riparazione delle dsb del DNA.

Per verificare gli eventuali danni al DNA sia piante mutate nel trasporto auxinico *aux1* e *eir1/pin2* e piante WT-Col trattate con N, RPM ed N+RPM e i rispettivi controlli sono state analizzate per valutare la quantità di foci. I risultati preliminari (foto non riportate) mostrano foci di riparazione presenti in numero esiguo sia alla dose di ca.55 mGy. Una simile situazione è stata riscontrata nelle piante mantenute per 65 ore su RPM e sulle piante trattate con RPM + Neutroni. I foci di riparazione erano presenti anche in cellule non irraggiate, probabilmente questo era legato alla

riparazione di rotture fisiologiche del DNA. Tuttavia ci prefiggiamo di ripetere l'esperimento e di realizzare immagini al microscopio confocale per aumentare la precisione della visualizzazione dei foci di riparazione nelle cellule.

Conclusioni

In conclusione, i nostri risultati mostrano che la dose assorbita di 55 mGy di neutroni non sono sufficienti a indurre un cambiamento nel modello di crescita delle radici in piantine di *Arabidopsis*, come lo fa la microgravità simulata. Inoltre, la combinazione di neutroni e microgravità colpisce fortemente lo sviluppo delle radici primarie e laterali. Questo effetto è probabilmente imputabile ad un trasporto adeguato di auxina attraverso i tessuti radicali, come suggerito dai maggiori danni a livello cellulare osservati nelle piante mutate per il trasposto dell'auxina *aux1* ed *eir1/pin2*. Ulteriori indagini a livello molecolare sono necessari per chiarire il meccanismo di risposta alle condizioni di ambienti spaziali ed infine identificare i fattori genetici che sono coinvolti nell'adattamento a questo particolare ambiente estremo va ulteriormente indagato.

Figure

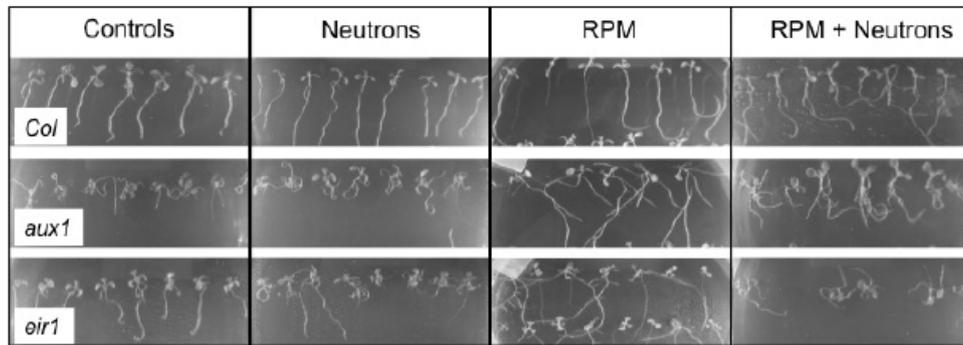


Figura 1. Effetto della simulazione dell'ambiente spaziale sul modello di crescita della radici di piante di 7 giorni in *Arabidopsis thaliana* (Ecotipo Col-wilde-type, *aux1* ed *eir1/pin2*).

Nota: **Controls** = piante non trattate; **neutrons** = piante sottoposte alla dose di 55 mGy di neutroni; **RPM** = piante mantenute sulla Random Positioning Machine; **RPM + neutrons** = irradiazione con neutroni durante il mantenimento delle piante a condizioni di microgravità simulata RPM (n = 120).

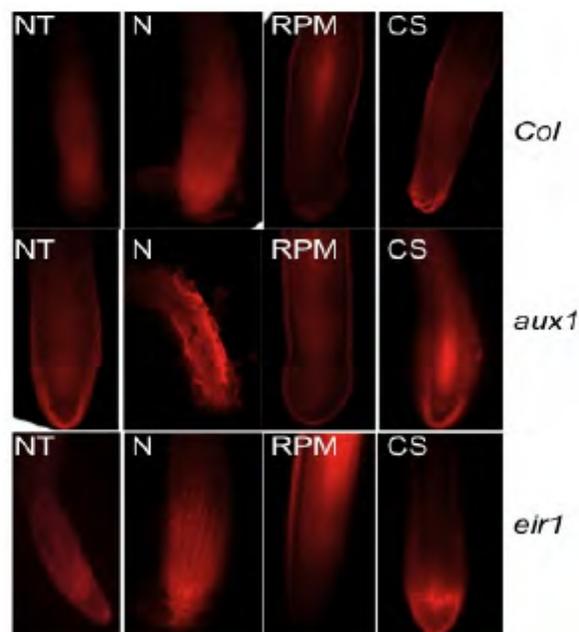


Figure 2: Controllo dello stato cellulare delle radici primarie di *Arabidopsis* dopo simulazione dell'ambiente spaziale (Ecotipo Col-wilde-type, *aux1* ed *eir1*).

Nota: **NT** = piante non trattate; **N** = piante sottoposte alla dose di 55 mGy di neutroni; **RPM** = piante mantenute sulla Random Positioning Machine; **CS** = irradiazione con neutroni durante il mantenimento delle piante a condizioni di microgravità simulata RPM (n = 120).

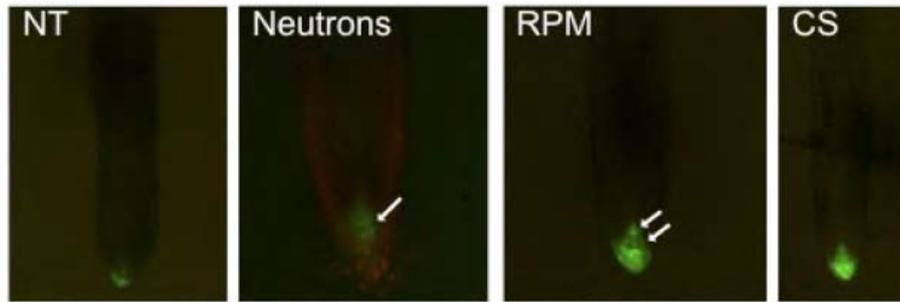


Figure 3: Localizzazione di *DR5::GFP* dopo simulazione dell'ambiente spaziale. Il flusso dell'auxina nelle radici primarie era monitorato e analizzando attraverso la fluorescenza nelle piante *dr5::gfp*.

Nota: **NT** = piante non trattate; **Neutrons** = piante sottoposte alla dose di 55 mGy di neutroni; **RPM** = piante mantenute sulla Random Positioning Machine; **CS** = irradiazione con neutroni durante il mantenimento delle piante a condizioni di microgravità simulata RPM (n = 120).

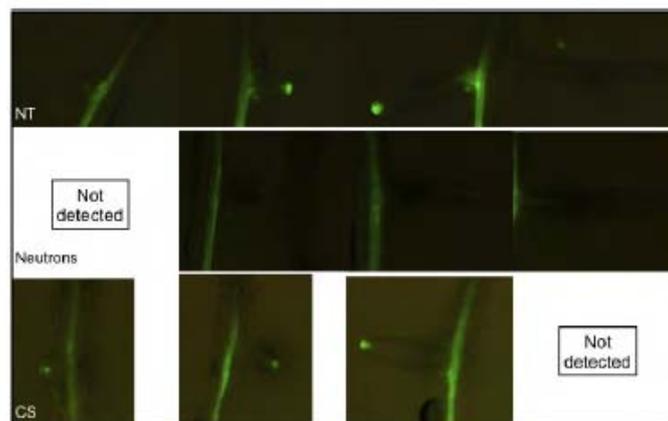


Figure 4: Monitoraggio della formazione della radice laterale durante il trattamento di simulazione dell'ambiente spaziale. Lo Sviluppo della formazione delle radici laterali è seguita attraverso l'analisi del segnale *GFP* prima e dopo i trattamenti in piantine *dr5::gfp*.

Nota: **NT** = piante non trattate; **Neutrons** = piante sottoposte alla dose di 55 mGy di neutroni; **RPM** = piante mantenute sulla Random Positioning Machine; **CS** = irradiazione con neutroni durante il mantenimento delle piante a condizioni di microgravità simulata RPM (n = 120).

Bibliografia

- Benton E.R. & Benton E.V. (2000). Space radiation dosimetry in low-Earth orbit and beyond Nuclear Instruments Methods and Physical Research B 184, 25-294
- Cho H.S., Lee H.S. & Pai H.S. (2000). Expression patterns of diverse genes in response to gamma-irradiation in *Nicotiana tabacum*. Journal of Plant Biology 43, 82-87.
- Fortunati A., Tassone P., Damasso M. & Migliaccio F. (2010). Neutron irradiation affects the expression of genes involved in the response to auxin, senescence and oxidative stress in *Arabidopsis*. Plant Signaling & Behaviour, 5(8).
- Kim J.H., Chung B.Y., Kim J.S. & Wi S.G. (2005). Effect of in plant gamma irradiation on growth, photosynthesis and antioxidative capacity in red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. Journal of Plant Biology 48, 47-56.
- Kranz A.R. (1994). Heavy ion and cosmic radiation effects in different targets of the *Arabidopsis* seed. Acta Astronautica 33, 201-210.
learned from the EVIDOS project. Radiation Protocols Dosimetry 126, 471-476.
- Miller M.W. (1985). Radiation hormesis in plants. Health Physics 2, 607-616.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7, 405-410.
- Nagata T., Todorichi S., Hayashi Y., Shibata M. & Mori H. (1999). Gamma-radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. Plant Physiology 120, 113-119.
- Nagata T., Yamada H., Du Z., Todoriki S. & Kikuchi S. (2005). Microarrays analysis of genes that respond to gamma irradiation in *Arabidopsis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1022-1030.
- Ngo F.Q., Schroy CB, Jia X.L., Kalvakolanum I., Roberts W.K., Blue J.W. & Antunez A.R., Higgins P.D., Tefft M. (1991). Basic radiobiological investigations of fast neutrons. Radiation Research 128, S94-S102.
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. (1998). DNA double strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine. J. Biol. Chem., 139. 273, 5858-5868,
- Sahr T., Voigt G., Scimmack W., Paretzke T. & Ernst D. (2005). Low level radiocesium exposure alters gene expression in roots of *Arabidopsis*. New Phytologist 168, 141-148.
- Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G. e Bonner W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. Radiat. Res., 158, 486-492,
- Tanner R.J. et al. (2007). Achievements in workplace neutron dosimetry in the last decade: lessons

Tim J.H., Moon Y.R., Kim J.S. & Lee J.W. (2007). Transcriptomic profile of Arabidopsis rosette leaves during the reproductive stage after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research* 168, 267-280.

Todd P. (2001). Overview of the spaceflight radiation environment and its impact on cell biology experiments. *Journal of Gravitational Physiology* 11, 11-16.

Wada H., Koshihara T. & Matsui T.M. (1998). Involvement of peroxidase in differential sensitivity to γ -radiation in seedlings of two *Nicotiana* species. *Plant Science* 132, 109-119.

Wang W., Vinocur B. & Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.

Yannarelli G.G., Noriega G.O., Batle A. & Tomaro M.L. (2006). Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta* 224, 1154-1162.