



Genova, 13 luglio 2015

Oggetto: **Relazione scientifica Short Term Mobility** presso il laboratorio del Prof. Edgar Peiter alla Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Germania.

Titolo del programma: **Mechanisms of vacuolar calcium release in plant cells exposed to abiotic stress**

Ho visitato il laboratorio del Prof. Peiter, principalmente per imparare la tecnica di *Agrobacterium-mediated infiltration* di foglie di tabacco e per applicare questa tecnica alla localizzazione subcellulare della proteina EF-CAX di *Arabidopsis thaliana*. La mia collaborazione con il Prof. Peiter su questa proteina è iniziata nel 2014, al fine di misurare i livelli di diversi elementi fisiologici in piante *knock-out* di EF-CAX da me identificate. Diversi studi di proteomica suggerivano fortemente una localizzazione della proteina sulla membrana del vacuolo centrale. L'espressione transiente di una fusione di EF-CAX con la proteina fluorescente verde EGFP in protoplasti di *Arabidopsis* non ha però dato una risposta chiara perchè, per motivi ancora sconosciuti, il livello di fluorescenza era estremamente basso. L'espressione eterologa in tabacco rappresenta perciò una buona alternativa.

Nella prima e seconda settimana, usando tecniche di biologia molecolare, ho trasferito la cassetta di espressione contenente la fusione EF-CAX::EGFP dal plasmide usato da me per la trasformazione transiente di *Arabidopsis* nel plasmide binario usato per la trasformazione mediante *Agrobacterium-mediated infiltration*. Il plasmide finale è stato quindi usato per trasformare cellule competenti di *Agrobacterium tumefaciens* mediante elettroporazione. Ho avuto modo di conoscere le tecniche avanzate di *live cell imaging* usate dal gruppo e di discutere con i vari membri. Inoltre, ho messo a disposizione la mia esperienza di elettrofisiologia per migliorare il loro set-up di *patch-clamp* e avviare la sperimentazione.

Nella terza settimana, ho imparato la metodica di *Agrobacterium-mediated infiltration*: la preparazione delle colture batteriche, l'applicazione alle foglie di tabacco, l'incubazione delle piante e l'analisi microscopica. Diverse colture batteriche per l'espressione di EGFP solubile, di un marker vacuolare e di EF-CAX::EGFP sono state infiltrate in foglie di tabacco ed analizzate al microscopio per diversi giorni dopo l'infiltrazione. Ho quindi acquisito tutte le competenze per utilizzare la tecnica nel nostro Istituto.

Durante la mia intera permanenza, ho discusso in modo intensivo con il Prof. Peiter i possibili meccanismi di rilascio del calcio vacuolare ed altre possibilità di collaborazione tra i nostri gruppi. Un primo risultato concreto di queste discussioni è lo studio congiunto di mutazioni nel canale cationico vacuolare TPC1, in cui mi occuperò della parte elettrofisiologica.

Joachim Scholz-Starke