

## PROGRAMMA SHORT TERM MOBILITY 2015

Soggiorno di Ricerca della Professoressa Natasha Vladimir Raikhel, University of California, Riverside, CA, U.S.A.

*Proponente e Istituzione ospitante:* Alessandro Vitale, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR, via Bassini 15, 20133 Milano

*Titolo del programma:* Meccanismi di degradazione delle proteine del tonoplasto delle cellule vegetali

### RELAZIONE SCIENTIFICA SULL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA.

*Attività da svolgere prevista nel Programma di ricerca.* Nel nostro laboratorio stiamo caratterizzando i meccanismi di sintesi e degradazione che regolano l'abbondanza e l'attività di alcune proteine del tonoplasto della pianta modello *Arabidopsis thaliana* (Maîtrejean et al, 2011; Rocchetti et al, 2012). Utilizzando agenti chimici che inibiscono attività cellulari specifiche del sistema di endomembrane (inibitori del traffico proteico intracellulare), identificati e caratterizzati funzionalmente nel laboratorio del Fruitore (Hicks and Raikhel, 2014), si programmeranno nei dettagli e inizieranno a svolgere esperimenti al fine di discriminare fra diverse possibili vie degradazione delle proteine del tonoplasto.

#### *Attività svolta*

Al suo arrivo, la Prof. Raikhel ha fornito al nostro laboratorio il seguente materiale:

1. Agenti chimici inibitori: wortmannin, sortin 1 and 3, and ES 16, ES2. Tali inibitori agiscono su specifici passaggi del traffico intracellulare che potrebbe essere coinvolto nella sintesi e degradazione delle proteine del tonoplasto (Hicks and Raikhel, 2014).
2. Anticorpo specifico contro lo scambiatore di cationi CAX1 di *Arabidopsis thaliana*, una proteina della membrana del tonoplasto. Mediante analisi bioinformatica condotta nel nostro laboratorio (Pedrazzini et al., dati non pubblicati), tale proteina è stata identificata come una delle poche proteine del tonoplasto di *Arabidopsis* potenzialmente N-glicosilate.

Sono stati condotti i seguenti esperimenti :

1. Abbiamo pianificato con la Prof. Raikhel le strategie sperimentali e deciso di iniziare a testare l'attività di wortmannin (WM). Questo composto inibisce le funzioni degli endosomi secondari (multivesicular bodies, MVB), che sono potenzialmente coinvolti sia nella sintesi sia nella degradazione di proteine del tonoplasto (Hicks and Raikhel, 2014). Abbiamo utilizzato piante transgeniche di *Arabidopsis* prodotte nel nostro laboratorio, esprimenti tre diverse proteine del tonoplasto (TPK1, KCO3 e alfa-TIP) fuse a green fluorescent protein, o la proteina solubile vacuolare faseolina. Quest'ultima funge da controllo sulla funzionalità di WM nei nostri esperimenti, poiché è noto che il traffico al vacuolo di questa classe di proteine coinvolge i MVB. Gli esperimenti sono stati condotti su protoplasti di tabacco isolati dalle piante sopra descritte e i trattamenti sono stati compiuti per diversi periodi di tempo, fino a 27 ore. Il materiale è stato raccolto ed è in corso

l'analisi mediante elettroforesi per valutare l'effetto di WM sulla stabilità delle proteine del tonoplasto sopra descritte. L'effetto degli altri inibitori sopra elencati sarà studiato secondo un protocollo simile

2. I vacuoli sono compartimenti subcellulari ricchi di proteasi, come gli analoghi lisosomi delle cellule animali, Le principali proteine della membrana dei lisosomi sono estensivamente glicosilate; si ipotizza che i glicani proteggano i polipeptidi dall'azione delle proteasi residenti nel lume dei lisosomi (Winchester, 2001). Nessuna delle proteine del tonoplasto che sono state caratterizzate per quanto riguarda il traffico intracellulare o la stabilità è glicosilata, e la nostra analisi bioinformatica predice che solo una minima percentuale del proteoma di questa membrana possa in effetti essere glicosilata (Pedrazzini et al., dati non pubblicati). Per stabilire se la glicosilazione possa avere un effetto sulla stabilità è necessario identificare almeno una proteina glicosilata del tonoplasto. Abbiamo dunque verificato, come esperimento preliminare, se gli anticorpi anti-CAX1 riconoscono specificamente una proteina in estratti di *Arabidopsis thaliana*. L'esperimento, riportato nella figura 1, ha dato risultato positivo. Si sta ora procedendo a verificare se la proteina sia effettivamente glicosilata.

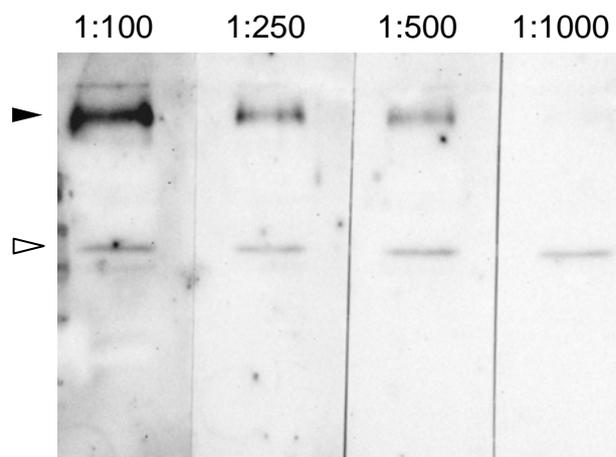


Figura 1. Estratti di foglie di *Arabidopsis* sono stati analizzati mediante SDS-PAGE seguita da protein blot con diverse diluizioni di anticorpi anti-CAX1. In ogni corsia è indicata la diluizione utilizzata. La freccia nera indica la banda corrispondente a CAX1. La freccia bianca indica un polipeptide irrilevante, probabilmente riconosciuto dall'anticorpo secondario poiché l'intensità della banda non cambia diluendo l'anticorpo primario.

#### Riferimenti bibliografici

- Hicks GR, Raikhel NV (2014) Plant chemical biology: are we meeting the promise? *Front Plant Sci.* 2014; 5: 455.
- Maîtrejean M, Wudick MM, Voelker C, Prinsi B, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Pedrazzini E, Vitale A (2011) Assembly and sorting of the tonoplast potassium channel AtTPK1 and its turnover by internalization into the vacuole. *Plant Physiol.* 156,1783-1796.

Maîtrejean M, Vitale A (2011) How are tonoplast proteins degraded? *Plant Signal. Behav.* 6, 1809-1812.

Pedrazzini E, Komarova N, Rentsch D, Vitale A (2013) Traffic routes and signals for the tonoplast. *Traffic* 14, 622–628.

Rocchetti A, Sharma T, Wulfetange C, Scholz-Starke J, Grippa A, Carpaneto A, Dreyer I, Vitale A, Czempinski K, Pedrazzini E (2012) The putative K<sup>+</sup> channel subunit AtKCO3 forms stable dimers in transgenic Arabidopsis plants. *Front. Plant Sci.* 3, Article 251.

Winchester BG (2001) Lysosomal membrane proteins. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 5, 11–19

Firma del Proponente



.....