

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Dottorato in Biologia Vegetale e Produttività della Pianta Coltivata

XXI ciclo

**Individuazione e caratterizzazione di proteine coinvolte
nella regolazione trascrizionale delle risposte alla
solfo-carezza e a cadmio delle piante**

Area disciplinare: AGR/13, Chimica Agraria

Docente guida: Prof. Gian Attilio Sacchi

Docente di supporto: Dott. Fabio Francesco Nocito

Coordinatore: Prof. Daniele Bassi

Tesi di Dottorato di:
Barbara GIACOMINI
Matr. n. R06714

Anno Accademico 2007-2008

*Al mio Papà
sicura che anche dove sei ora
sarai orgoglioso
di me...*

INDICE

Introduzione	Pag. 3
Obiettivo	Pag. 22
Materiali e Metodi	Pag. 24
Risultati e Discussione	Pag. 53
Conclusioni	Pag. 69
Figure	Pag. 71
Allegati	Pag. 104
Bibliografia	Pag. 129

INTRODUZIONE

Lo zolfo e le piante

Lo zolfo è un nutriente essenziale per la crescita delle piante che lo utilizzano prevalentemente per la sintesi di due amminoacidi, cisteina (Cys) e metionina (Met), e di numerosi metaboliti derivanti da questi amminoacidi. Il nutriente si ritrova, infatti, in glutatione (GSH), fitochelatine (PC), nei clusters ferro-zolfo, in vitamine e cofattori (biotina, tiamina, CoA, S-adenosil-Met) e in una varietà di composti secondari (glucosinolati, allil Cys, solfossidi). Lo zolfo è coinvolto anche nelle modificazioni secondarie di composti quali flavonoidi, steroidi, polisaccaridi e lipidi (Saito 2000; Leustek 2002; Maruyama-Nakashita *et al.* 2003; Saito 2004). Tali molecole sono coinvolte in una moltitudine di processi biochimici e fisiologici, inclusi la regolazione di attività enzimatiche, cicli redox e la detossificazione di metalli pesanti e xenobiotici (Noctor *et al.* 1998; Leustek *et al.* 2000; Rausch e Wachter 2005).

In generale lo zolfo non ricopre specifici ruoli strutturali nei sistemi biologici ma piuttosto è responsabile delle proprietà catalitiche e elettrochimiche dei composti che lo contengono. Ad esempio, la presenza del gruppo sulfidrilico della Cys, gruppo estremamente nucleofilo, permette la formazione di un legame disolfuro, attraverso una reazione di ossidazione, con un altro gruppo sulfidrilico stabilizzando la struttura terziaria delle proteine in cui è presente. Il gruppo tiolico di Cys e GSH è inoltre spesso coinvolto in cicli ossido-riduttivi che prevedono l'interconversione di due tioli in un disolfuro, e ricopre un ruolo fondamentale nel controllo dello stato redox delle cellule e nel moderare gli stress ossidativi (Noctor e Foyer 1998; Leustek e Saito 1999; Leustek 2002; Saito 2004). Inoltre il GSH svolge un ruolo chiave nella detossificazione di alcuni elementi o composti tossici per le piante; le GSH S-transferasi, infatti, mediano la coniugazione diretta di alcuni xenobiotici con il gruppo sulfidrilico, estremamente nucleofilo, del GSH (Kreuz *et al.* 1996; Saito 2004). Diversamente, nel caso della detossificazione di alcuni metalli pesanti, come il cadmio (Cd), il GSH ricopre un ruolo fondamentale in quanto precursore delle PC, peptidi non proteici, a basso peso molecolare, in grado di chelare il metallo e mediarne la successiva compartimentazione all'interno del vacuolo (Zenk 1996; Saito 2004). Infine, alcuni dei prodotti secondari che contengono zolfo hanno un odore caratteristico e agiscono sia come composti di difesa contro alcuni erbivori e

organismi patogeni sia come molecole segnale in alcuni processi cellulari fondamentali (Matsubayashi *et al.* 2002; Saito 2004).

Assimilazione dello zolfo

Diversamente dagli animali, le piante sono in grado di assimilare lo zolfo inorganico in composti organici contenenti zolfo ridotto attraverso una serie di ben caratterizzate reazioni enzimatiche. Sebbene l'anidride solforosa possa essere assorbita dalle foglie e assimilata nella Cys, specialmente in zone inquinate da questo gas (de Kok 1990; de Kok *et al.* 1997), la principale forma di zolfo utilizzata dalla pianta è il solfato. Tale anione, presente nella soluzione circolante del suolo, è assorbito da specifici trasportatori localizzati sulla membrana plasmatica delle cellule radicali. Una volta all'interno delle cellule il solfato è assimilato in composti organici o compartimentalizzato all'interno del vacuolo. L'assorbimento e la traslocazione sistemica del solfato avvengono attraverso diversi sistemi di trasporto che regolano il flusso dello zolfo attraverso l'intera pianta a seconda delle necessità nutrizionali, che variano durante lo sviluppo, e delle diverse condizioni ambientali. L'attività di questi trasportatori è altamente regolata e costituisce uno dei principali punti di controllo del metabolismo dello zolfo (Leustek e Saito 1999; Hawkesford 2000; Leustek 2002; Buchner *et al.* 2004; Saito 2004).

Il trasporto del solfato

Il processo di trasporto del solfato meglio caratterizzato è l'influsso del nutriente attraverso il plasmalemma, che avviene mediante un meccanismo di cotrasporto con i protoni ($1 \text{ SO}_4^{2-} : 3 \text{ H}^+$) energizzato dal gradiente di potenziale elettrochimico dei protoni stabilito dall'attività delle H^+ -ATPasi della membrana plasmatica (Lass e Ullrich-Eberius 1984; Hawkesford *et al.* 1993; Smith *et al.* 1995; Leustek 2002; Hawkesford 2003). Tale meccanismo è utilizzato sia da sistemi di trasporto saturabili e ad alta affinità, con valori di K_m per il solfato dell'ordine del micromolare, sia da sistemi a bassa affinità, con valori di K_m dell'ordine del millimolare, entrambi presenti a livello del plasmalemma delle cellule radicali (Legget e Epstein 1956). Le dinamiche del trasporto attraverso gli altri sistemi di membrane, quali quelli dei plastidi e dei vacuoli, devono ancora essere chiarite; tuttavia si pensa che sulla membrana interna dei cloroplasti sia presente, oltre ad un

simportatore protoni/ione solfato, una permeasi ATP-dipendente simile a quella descritta nei batteri (Saito 2000; Leustek 2002).

Numerosi lavori hanno riportato il clonaggio e la caratterizzazione di geni codificanti per trasportatori del solfato in varie specie vegetali quali *Stylosanthes hamata*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Brassica juncea*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum* e *Lycopersicon esculentum* (Smith *et al.* 1995, 1997; Heiss *et al.* 1999; Hawkesford 2003), evidenziando che tali proteine sono codificate da una famiglia multigenica. La maggior parte degli eventi di duplicazione che sono all'origine di queste famiglie multigeniche sembrano essere avvenuti durante le prime fasi del processo di evoluzione delle piante terrestri e l'espressione di una così grande varietà di trasportatori, mantenuta nonostante la pressione selettiva, suggerisce che i geni abbiano una funzione estremamente specializzata e non siano quindi ridondanti. La maggior parte dei geni codificanti per i trasportatori del solfato codificano per polipeptidi di circa 69-75 kDa caratterizzati dalla presenza di una regione ammino-terminale, citosolica e di una regione centrale piuttosto conservata che rappresenta la parte catalitica della proteina nella quale si susseguono, alternati da loops intra- e extracellulari, 12 domini trans membrana e che contiene diversi residui aminoacidici conservati. Ricorrenti sono, infatti, la posizione dell'argina tra il nono e il decimo MSD, la presenza di alcuni residui di prolina, che sembrano avere un ruolo nella stabilizzazione strutturale del trasportatore, e la presenza di un sito di glicosilazione tra il quinto e il sesto MSD. Caratteristica riscontrata in tutti i trasportatori studiati è anche la presenza di residui basici extracellulari, fenomeno atipico per le proteine di membrana che, associato alla presenza di almeno due residui carichi all'interno dei domini MSD, potrebbe avere importanti conseguenze funzionali per il trasporto del solfato (Smith *et al.* 1995, 2000; Shelden *et al.* 2001; Leustek 2002; Hawkesford 2003). La regione ammino-terminale è poi collegata, attraverso una regione variabile, ad una regione carbossi-terminale conservata, tale regione è denominata STAS (Sulfate Transporter/AntiSigma factor antagonist) per la sua similarità con l'antagonista batterico del fattore antisigma (Aravind e Koonin 2000, Hawkesford 2003). Studi di espressione condotti in lievito hanno dimostrato che la presenza di questa regione è fondamentale per il funzionamento di questi trasportatori; il meccanismo di azione del dominio STAS non è ancora stato chiarito; sembra però che medi il trasporto del solfato attraverso interazioni proteina-proteina (Shibagaki *et al.* 2002; Shibagaki e Grossman 2004; Rouached *et al.* 2005; Shibagaki

e Grossman 2006). Conservata è anche l'organizzazione in esoni ed introni dei geni che codificano per i trasportatori del solfato, come dimostrato da analisi effettuate sulle strutture geniche di sette isoforme di *A. thaliana*. Il confronto tra i cDNA e le corrispondenti sequenze ha evidenziato la presenza di quattro siti di inserzione per gli introni (Takahashi *et al.* 2000).

La specie vegetale meglio studiata e caratterizzata è *A. thaliana*, nella quale è stata descritta una famiglia multigenica composta da 14 elementi, molti dei quali caratterizzati in termini di funzione ed espressione.

L'allineamento delle sequenze amminoacidiche di queste 14 isoforme ha permesso la loro suddivisione in 5 gruppi, ciascun dei quali presenta funzioni specializzate per l'assorbimento e la distribuzione del solfato nella pianta (Allegato 1; Hawkesford 2003).

Il gruppo 1 racchiude trasportatori ad alta affinità del solfato espressi a livello radicale, alcuni dei quali responsabili dell'assunzione del nutriente dalla soluzione circolante. A questo gruppo appartengono AtSultr1;1, AtSultr1;2 e AtSultr1;3 in *A. thaliana*. Studi di espressione condotti su AtSultr1;1 e AtSultr1;2 hanno evidenziato l'espressione di questi due trasportatori prevalentemente a livello dei peli radicali, del rizoderma e del parenchima corticale, dove mediano l'assorbimento primario del solfato dalla rizosfera (Smith *et al.* 1995, 1997; Takahashi *et al.* 2000; Shibagaki *et al.* 2002; Hawkesford 2003); entrambe queste due isoforme sono regolate a livello trascrizionale in risposta a differenti disponibilità di solfato nel mezzo esterno (Smith *et al.* 1995, 1997; Bolchi *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2000; Shibagaki *et al.* 2002; Yoshimoto *et al.* 2002). Diversamente AtSultr1;3 è espresso nelle cellule cribrose di foglie e radici e sembra essere coinvolto nel processo di traslocazione del solfato attraverso il floema. La sua funzione potrebbe essere quella di recuperare il solfato perso dal tubo cribroso durante il trasporto a lunga distanza (Yoshimoto *et al.* 2003).

I trasportatori del gruppo 2 sono AtSultr2;1 e AtSultr2;2, trasportatori a bassa affinità espressi nei tessuti vascolari, sia delle radici sia del germoglio, e presumibilmente coinvolti nel controllo del movimento sistemico del nutriente; anche l'espressione di questi trasportatori è risultata essere regolata dalla disponibilità di solfato (Takahashi *et al.* 2000; Hawkesford 2003). Studi su queste due isoforme, condotti attraverso l'uso di geni reporter, hanno evidenziato profili di espressione particolari e differenziali per i due trasportatori. *AtSultr2;1* risulta localizzato a livello delle cellule parenchimatiche dello xilema radicale e fogliare e

sembrerebbe coinvolto nel controllo del movimento del solfato lungo il vaso attraverso il riassorbimento del nutriente rilasciato negli spazi intercellulari e nelle pareti all'interno della stele. Un altro tessuto in cui è stato localizzato *AtSultr2;1* è il floema dove potrebbe svolgere funzione di caricamento degli elementi cribrosi preposti alla traslocazione dei nutrienti alle giovani foglie (Takahashi *et al.* 2000). *AtSultr2;2* è espresso, invece, nelle cellule floematiche a livello radicale e nelle cellule circondanti i fasci cribro-vascolari a livello fogliare; tale trasportatore sembrerebbe quindi essere coinvolto sia nel movimento floematico del solfato lungo la radice sia nel trasferimento del nutriente nelle cellule del mesofillo dopo il suo rilascio dai vasi xilematici (Takahashi *et al.* 2000).

Il gruppo 3 racchiude trasportatori espressi nelle foglie; in *A. thaliana* sono state identificate 5 isoforme di trasportatori appartenenti a questo gruppo, il cui ruolo rimane ancora da chiarire (Hawkesford 2000, 2003). Il trasportatore del gruppo 3 meglio caratterizzato è *AtSultr3;5* che sembra formare un eterodimero con *AtSultr2;1* controllando il movimento sistemico del solfato dalle radici al germoglio lungo i vasi xilematici (Kataoka *et al.* 2004 a). Per questo motivo *AtSultr3;5* può essere considerato come un componente del sistema di trasporto del nutriente a bassa affinità che presiede al controllo la traslocazione xilematica. Tale ipotesi è supportata da queste osservazioni: i) *AtSultr2;1* e *AtSultr3;5* mostrano gli stessi domini di espressione nei tessuti della pianta; ii) studi di espressione eterologa in mutanti di lievito, difettivi per il meccanismo di assorbimento del solfato, hanno dimostrato l'incapacità di *AtSultr3;5* di assorbire il solfato dal mezzo esterno; tuttavia co-esprimendo *AtSultr3;5* e *AtSultr2;1* sia ha un aumento dell'attività di assorbimento del solfato di *AtSultr2;1* (Kataoka *et al.* 2004 a).

Al gruppo 4 afferiscono due trasportatori, *AtSultr4;1* e *AtSultr4;2*, localizzati a livello del tonoplasto. La funzione di *Sultr4;1* e *Sultr4;2* potrebbe essere quella di controllo dell'efflusso di solfato dal vacuolo e quindi, indirettamente, svolgerebbero un ruolo fondamentale nell'ottimizzazione della distribuzione del solfato nella cellula (Kataoka *et al.* 2004 b).

Infine il gruppo 5 comprende corte sequenze nucleotidiche che mostrano una bassa similarità con gli altri membri della famiglia dei trasportatori del solfato (Hawkesford 2003; Hawkesford e De Kok 2006). Ad oggi non sono disponibili informazioni circa il contributo di questi putativi trasportatori nella definizione dei flussi di solfato nella pianta.

Assimilazione del solfato

Una volta all'interno delle cellule il solfato può venire assimilato attraverso due vie metaboliche; entrambe queste vie prevedono l'iniziale attivazione dell'anione, metabolicamente inerte, attraverso una reazione di adenilazione catalizzata dall'enzima ATP solforilasi con formazione di 5'-adenililsolfato (APS). Tale enzima è prevalentemente localizzato nei plastidi, ma sono state descritte anche isoforme citosoliche (Lunn *et al.* 1990; Renosto *et al.* 1993).

La prima e principale via, denominata assimilazione riduttiva del solfato, prosegue con il trasferimento di due elettroni, provenienti dal glutatione ridotto (GSH), all'APS con formazione di solfito, reazione catalizzata dall'enzima APS reduttasi (Bick *et al.* 1998; Kopriva e Koprivova 2004). Il solfito è a sua volta ridotto a solfuro ad opera di una reduttasi ferredossina dipendente (Aketagawa e Tamura 1980; Krueger e Siegel 1982; Bork *et al.* 1996; Yonekura-Sakakibara *et al.* 1996). Tutti gli enzimi coinvolti nella produzione di solfuro sono compartimentati all'interno dei plastidi (Brunold e Suter 1989). L'ultima fase della via prevede l'assimilazione del solfuro sullo scheletro carbonioso dell'*O*-acetilserina (OAS, un derivato della serina, Ser) a formare Cys. L'assimilazione del solfuro avviene attraverso il coinvolgimento di due enzimi: la Ser acetiltransferasi, che produce OAS da Ser e acetil-CoA, e la OAS(tiolo)-liasi, che trasferisce il solfuro nella posizione beta dell'OAS (Allegato 2). Entrambi gli enzimi, diversamente da quelli coinvolti nella riduzione del solfato a solfuro, sono localizzati nel citosol, nel cloroplasto e nel mitocondrio (Noji *et al.* 1998; Saito 2000; Hell *et al.* 2002; Saito 2004; Kawashima *et al.* 2005). La Cys, che viene incorporata in alcune proteine e nel GSH ed interviene nel processo di biosintesi della Met cedendo il proprio gruppo tiolico, è un intermedio chiave per la sintesi di tutti i composti che contengono zolfo ridotto (Saito 2004).

La seconda via, detta di assimilazione non riduttiva, prevede una fosforilazione dell'APS ad opera di una chinasi con formazione di 3'-fosfoadenililsolfato che viene utilizzato da diverse solfotransferasi come donatore di un gruppo solforilico.

Biosintesi del glutatione

Il GSH, un tripeptide con formula γ -Glu-Cys-Gly, rappresenta il principale composto tiolico non proteico nelle cellule vegetali (Kunert e Foyer 1993), in cui

svolge importanti funzioni sia nella difesa sia nella protezione dagli effetti cellulari di fattori biotici ed abiotici di stress (Noctor e Foyer 1998; Rausch e Wachter 2005). Infatti questa molecola agisce non solo come tampone redox, proteggendo le cellule dalle specie reattive dell'ossigeno che si possono accumulare in risposta ad alcuni stress biotici o abiotici, ma anche nell'adeguamento omeostatico del potenziale redox cellulare (Nocito *et al.* 2007). Inoltre il GSH è coinvolto in molti altri processi tra cui la regolazione del metabolismo e della distribuzione dello zolfo tra i diversi organi (Lappartient e Touraine 1996), il controllo dello sviluppo e del ciclo cellulare (May *et al.* 1998; Vernoux *et al.* 2000), la segnalazione calcio-dipendente (Gomez *et al.* 2004), l'espressione genica (Dron *et al.* 1988; Wingate *et al.* 1988; Herouart *et al.* 1993; Wingsle e Karpinski 1996; Baier e Dietz 1997; Ball *et al.* 2004), e la detossificazione di xenobiotici e metalli pesanti (Rauser 1995; Marrs 1996). Per queste ragioni le variazioni della concentrazione cellulare di GSH possono avere importanti conseguenze per le cellule, a causa delle modificazioni dello stato redox, della trascrizione genica e di alcune funzioni metaboliche.

La via di biosintesi del GSH a partire dalla Cys è ben caratterizzata e coinvolge due reazioni sequenziali dipendenti da ATP nei plastidi e nel citosol (allegato 2). Inizialmente la sintesi di γ -glutamilmisteina (γ -EC; γ -Glu-Cys) viene catalizzata dall'enzima γ -EC sintetasi attraverso la formazione di un legame peptidico tra il gruppo amminico della Cys e il gruppo γ -carbossilico della catena laterale del glutammato. Nel secondo passaggio della via, l'enzima GSH sintetasi catalizza l'addizione di un residuo di glicina all'estremità carbossi-terminale della γ -EC per produrre GSH.

Si ritiene che l'attività della γ -EC sintetasi e la disponibilità di Cys siano i principali fattori di controllo della sintesi di GSH. Infatti è stato mostrato che la soppressione antisense della γ -EC sintetasi di *Arabidopsis* causa una diminuzione del contenuto fogliare di GSH; al contrario, la sua sovraespressione aumenta la quantità di GSH fogliare (Xiang *et al.* 2001). Aumenti sostanziali nei livelli fogliari di GSH sono stati osservati anche in piante di pioppo e tabacco che sovraesprimevano una γ -EC sintetasi di *Escherichia coli* (Noctor *et al.* 1996; Creissen *et al.* 1999). È interessante notare che in piante di *A. thaliana* che sovraesprimono la γ -EC sintetasi, i livelli di Cys non diminuiscono in seguito all'aumento della biosintesi di GSH, suggerendo l'esistenza di una regolazione coordinata della sintesi di GSH e Cys (Xiang *et al.* 2001). Inoltre, la γ -EC sintetasi è controllata attraverso un meccanismo

di feedback negativo esercitato dal GSH, prodotto finale della reazione, sulla sua attività. Si pensa che questo controllo post-traduzionale sia cruciale nel mantenimento dell'omeostasi del GSH (Hell e Bergman 1990; Noctor e Foyer 1998; Noctor *et al.* 2002).

Regolazione dell'assunzione e dell'assimilazione del solfato

Il metabolismo dello zolfo è finemente regolato così da soddisfare la domanda di composti contenenti zolfo, sintetizzati a partire dalla Cys; tale domanda può variare a seconda della specie vegetale, dello stadio fenologico, e in risposta alle diverse condizioni ambientali che le piante si trovano a dover affrontare durante la loro crescita. Per esempio, condizioni di stress biotico od abiotico possono aumentare la domanda di composti contenenti zolfo ridotto, generando un aumento dell'attività della via di assimilazione del solfato (Rausch e Wachter 2005), risposta simile a quella largamente descritta in condizioni di solfato limitante (Lappartient e Touraine 1996; Lappartient *et al.* 1999). In questa condizione i bisogni di zolfo della pianta per sostenere la crescita non variano e perciò l'induzione del meccanismo di assimilazione del solfato riflette le difficoltà nel mantenimento di un adeguato rapporto tra la biosintesi di Cys e l'omeostasi dei composti contenenti zolfo. Infatti nel caso di basse concentrazioni di solfato nel mezzo di crescita i livelli di Cys e GSH nei tessuti della pianta diminuiscono drasticamente e ciò porta all'induzione dei sistemi di trasporto del solfato e degli enzimi chiave posti lungo il metabolismo di assimilazione dell'anione (Lappartient e Touraine 1996; Lappartient *et al.* 1999). La maggior parte di queste risposte sono regolate a livello trascrizionale come indicato dall'accumulo dei livelli di trascritto dei geni codificanti per i trasportatori del solfato, per l'ATP sulfurilasi e per l'APS reductasi. Tali induzioni cessano qualora vengano ripristinati i livelli ottimali di solfato nel mezzo di crescita o somministrando alle piante componenti contenenti zolfo ridotto (Lappartient e Touraine 1996; Takahashi *et al.* 1996; Smith *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 1997; Bolchi *et al.* 1999; Lappartient *et al.* 1999). Da queste osservazioni risulta chiara l'esistenza di un meccanismo omeostatico guidato dalla domanda di zolfo che opera per adeguare la velocità di sintesi della Cys ai bisogni di zolfo dell'intera pianta (Nocito *et al.* 2007). Inoltre esperimenti di tipo "split roots" condotti in *Brassica napus* forniscono evidenze sperimentali dell'esistenza di un meccanismo di controllo per

l'assorbimento e la traslocazione del solfato che risulta direttamente collegato allo stato nutrizionale della pianta piuttosto che alla composizione del mezzo esterno (Lappartient e Touraine 1996; Lappartient *et al.* 1999). Questo controllo coinvolge necessariamente un meccanismo inter-organo per cui un prodotto terminale del metabolismo di assimilazione potrebbe agire come segnale di repressione a lunga distanza. Evidenze sperimentali suggeriscono che il GSH potrebbe agire come un segnale traslocato a livello floematico per questa regolazione (Herschbach e Rennenberg 1991; Lappartient e Touraine 1996, 1997; Lappartient *et al.* 1999); tuttavia esperimenti in radici di mais mostrano che anche la Cys può agire come repressore (Bolchi *et al.* 1999).

Un modello integrato e ampiamente accettato per la regolazione dell'assorbimento del solfato e la sua assimilazione prevede che alcuni metaboliti della via di assimilazione possano agire come segnali positivi o negativi nel controllo sia dell'espressione sia dell'attività di alcuni enzimi chiave (Allegato 3). Secondo questo modello concentrazioni adeguate di composti ridotti dello zolfo, come Cys e GSH, reprimerebbero l'espressione di geni attraverso un meccanismo di feedback negativo che previene un eccessivo assorbimento e metabolismo di solfato; *vice versa* una contrazione dei livelli di questi composti de-reprimerebbe la trascrizione dei geni permettendo al solfato di entrare nella via di assimilazione riduttiva. Tale regolazione è reversibile e permette, quindi, un fine adattamento dei flussi di solfato, consentendo la sopravvivenza della pianta in un ambiente in continuo mutamento.

Un secondo meccanismo di controllo coinvolge l'OAS come intermedio chiave. Questa molecola promuove la de-repressione dei geni coinvolti nell'assimilazione del solfato quando nonostante livelli adeguati di azoto e carbonio scarseggia la disponibilità di zolfo presente nelle cellule. In queste condizioni, poiché la disponibilità di solfuro non è sufficiente per la biosintesi di Cys, l'OAS si accumula, contrastando il feedback negativo esercitato dai composti contenenti zolfo ridotto sulla trascrizione genica (Hawkesford 2000; Hawkesford e Wray 2000). Diverse evidenze sperimentali supportano questo ruolo regolativo dell'OAS: i) la bassa disponibilità di azoto blocca l'accumulo dei livelli di trascritto dell'ATP-sulfurilasi e dell'APS reductasi normalmente indotte in condizioni di bassa disponibilità di zolfo (Yamaguchi *et al.* 1999) e dall'accumulo di OAS (Kim *et al.* 1999); ii) somministrazioni esogene di OAS incrementano sia l'attività dell'APS reductasi sia il contenuto di tioli in *Lemna minor* e inducono sia l'assorbimento di solfato sia

l'accumulo dei livelli di trascritto per i trasportatori del solfato in presenza di alti livelli del nutriente nel mezzo esterno (Neuenschwander *et al.* 1991; Smith *et al.* 1997); iii) un mutante di *A. thaliana* caratterizzata da elevati contenuti cellulari di OAS mostra livelli di trascritto dei geni solfo-responsivi più alti rispetto al wild-type (Ohkama-Ohtsu *et al.* 2004). L'effetto dell'OAS è dominante; infatti, nel caso in cui venga fornita dall'esterno, consente di superare l'effetto della regolazione negativa esercitata da adeguate disponibilità di solfato nel mezzo di crescita (Smith *et al.* 1997).

La biosintesi di Cys è inoltre regolata a livello post-traduzionale attraverso un meccanismo allosterico che coinvolge la formazione reversibile di un complesso enzimatico tra la Ser acetiltransferasi e l'OAS(tuolo)-liasi (Allegato 4). L'OAS(tuolo)-liasi è presente in concentrazione molto superiore alla Ser acetiltransferasi in tutti i compartimenti cellulari in cui avviene la sintesi proteica (Lunn *et al.* 1990; Droux *et al.* 1992; Rolland *et al.* 1993), e solo una parte di OAS(tuolo)-liasi forma il complesso con la Ser acetiltransferasi; soltanto in questa ultima forma la Ser acetiltransferasi è in grado di catalizzare la produzione di OAS. Studi *in vitro*, con proteine ricombinanti, hanno mostrato che un omotetramero della Ser acetiltransferasi si associa con due molecole di un omodimero di OAS(tuolo)-liasi, per formare un complesso bi-enzimatico. L'OAS(tuolo)-liasi agisce nel complesso bi-enzimatico come subunità regolatrice modulando positivamente l'attività della Ser acetiltransferasi; una grande quantità di OAS(tuolo)-liasi libera è responsabile della formazione di Cys. La stabilità del complesso è invece regolata dal solfuro, che ne promuove la formazione, e dalla OAS, che ne favorisce la dissociazione. Per esempio, in condizioni di solfocarenza, l'accumulo di OAS promuove la dissociazione del complesso, allo scopo di ridurre l'attività della Ser acetiltransferasi ed evitare un'ulteriore, ed eccessiva, produzione di OAS. Al contrario, quando la disponibilità di zolfo non è limitante, l'accumulo di solfuro promuove la formazione del complesso, stimola la sintesi di OAS e sostiene la produzione di Cys (Droux *et al.* 1998). Inoltre, la sintesi di OAS potrebbe essere controllata attraverso un feedback negativo esercitato dalla Cys su specifiche isoforme della Ser acetiltransferasi (Urano *et al.* 2000; Noji e Saito 2002; Wirtz e Hell 2003; Saito 2004). Questo sistema permette non solo di mantenere un'adeguata omeostasi della Cys, ma anche di coordinare la sintesi di OAS, dalla Ser, con la riduzione del solfato.

Percezione e trasduzione del segnale

Nonostante l'elegante modello di regolazione sopra descritto i meccanismi generali coinvolti nella percezione dello stato nutrizionale relativo allo zolfo e nella conseguente trasduzione del segnale che si risolve nel mantenimento dell'omeostasi di Cys e GSH rimangono ancora largamente sconosciuti (Nocito *et al.* 2007).

Molti studi identificano l'auxina e il metil jasmonato come possibili componenti del meccanismo di trasduzione del segnale. L'analisi dei profili di espressione, condotti in *A. thaliana*, ha mostrato che molti geni relazionabili al metabolismo dello zolfo sono indotti da trattamento con metil jasmonato (Hirai *et al.* 2003; Maruyama-Nakashita *et al.* 2003; Nikiforova *et al.* 2003; Jost *et al.* 2005). Anche le citochinine sembrano essere coinvolte nella regolazione dell'espressione di geni del metabolismo del solfato, come suggerito dall'osservazione di un loro effetto negativo sull'accumulo di trascritto di un trasportatore del solfato ad alta affinità di *A. thaliana* (Maruyama-Nakashita *et al.* 2004).

Recentemente, alcuni potenziali elementi responsivi allo zolfo (SUREs, *Sulfur Responsive Elements*) sono stati identificati in alcuni promotori di geni solfo-responsivi, sebbene non in tutti i casi siano state individuate le sequenze consenso. Nel promotore del gene codificante per la subunità β della conglucina di soia è stata individuata una regione di 235 pb sufficiente per regolare la trascrizione del gene in risposta allo zolfo (Awazuhara *et al.* 2002); nel promotore del gene *NIT3*, codificante per una nitrilasi di *A. thaliana* e altamente regolato dallo zolfo, è stata invece evidenziata una regione di 317 bp che contiene elementi regolatori essenziali legati alla nutrizione solfatica (Kutz *et al.* 2002). Inoltre, un recente studio condotto sul promotore di *AtSultr1;1* di *A. thaliana* ha permesso l'identificazione di una regione di 5 pb la cui presenza è sufficiente per promuovere la trascrizione del gene *AtSultr1;1* in condizioni di solfocarenza. La presenza di questa regione è stata riscontrata anche nelle sequenze promotrici di altri geni solfo-responsivi, suggerendo un suo coinvolgimento nei meccanismi di regolazione attivati in condizioni di bassa disponibilità di solfato (Maruyama-Nakashita *et al.* 2005; Hawkesford e De Kok 2006).

Per quanto riguarda i fattori che agiscono in *trans*, in *A. thaliana* è stato recentemente identificato un fattore di trascrizione implicato nella regolazione della via di assimilazione dello zolfo, SLIM1 (Maruyama-Nakashita *et al.* 2006). Tale fattore di trascrizione, appartenente alla famiglia EIL (*Ethylene Insensitive Like*),

svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della trascrizione in condizioni di solfocarenza, controllando sia l'acquisizione del solfato sia la degradazione dei glucosinolati (Maruyama-Nakashita *et al.* 2006). E' stato inoltre ipotizzato un possibile coinvolgimento di due fattori nucleari isolati in embrioni di soia (SEFs, *Soybean Embryo Factors*), in grado di legarsi alla regione di 235 pb del promotore del gene codificante per la subunità β della conglucina (Allen *et al.* 1989); le sequenze nucleotidiche per il legame degli elementi SEF sono presenti anche nel promotore del gene della Ser acetiltransferasi di *Citrullus vulgaris* e di *AT5G48850*, codificante per una proteina a funzione sconosciuta, di *A. thaliana*, anch'essi in grado di rispondere allo zolfo (Saito *et al.* 1997; Howarth e Hawkesford, dati non ancora pubblicati).

Lo zolfo e il cadmio

Tossicità del cadmio

I metalli pesanti sono una classe di metalli aventi con densità superiore a 5g cm^{-3} (Elmsey 2001), e possono essere classificati come essenziali o non essenziali per le piante e molti altri organismi. Piccole quantità di metalli pesanti essenziali, come ferro (Fe), rame (Cu) e zinco (Zn), sono necessari per il ciclo vitale delle piante in quanto cofattori di molte attività enzimatiche o mediatori di interazioni con ligandi. Diversamente, i metalli pesanti non essenziali come Cd, mercurio (Hg) e piombo (Pb), non solo non sono necessari per le piante, ma in molti casi possono esercitare effetti tossici su di esse; infatti, possono permeare le membrane plasmatiche cellulari utilizzando gli stessi sistemi di trasporto usati dai metalli pesanti essenziali ed una volta nel simplasto alterare le funzioni cellulari principalmente interagendo con gli atomi di zolfo e azoto nelle catene amminoacidiche. Tuttavia anche livelli di metalli pesanti essenziali superiori a quelli fisiologici ottimali possono influenzare negativamente il metabolismo e la fisiologia degli organismi viventi, a causa principalmente della loro reattività chimica. Per esempio un eccesso di metalli essenziali liberi, attivi da un punto di vista redox, come Fe e Cu, può indurre la genesi di radicali idrossilici altamente reattivi ($\text{OH}\cdot$) (Halliwell e Gutteridge 1984, 1990).

Nell'ambito dei metalli pesanti il Cd è fra quelli di maggior rilevanza rispetto sia all'esposizione delle piante, sia all'accumulo nelle catene alimentari; la sua rilevanza

come inquinante ambientale e la sua relativa mobilità nel sistema suolo pianta l'hanno reso uno dei metalli non essenziali più largamente studiato (McLaughlin *et al.* 1999; Clemens 2006).

Il Cd, come altri ioni metallici non essenziali, è con ogni probabilità assunto dalle piante attraverso i sistemi di trasporto dei cationi normalmente coinvolti nell'assorbimento di elementi essenziali, come i membri delle famiglie ZIP e Nramp o i canali del calcio (Clemens *et al.* 1998; Grotz *et al.* 1998; Korshunova *et al.* 1999; Pence *et al.* 2000; Thomine *et al.* 2000; Lombi *et al.* 2001; Perfus-Barbeoch *et al.* 2002).

La presenza di Cd nelle cellule provoca interferenze con molti processi quali il metabolismo dei carboidrati, l'assorbimento e la riduzione del nitrato, l'attività di molti enzimi, il bilanciamento idrico e la fotosintesi. L'accumulo del Cd nei tessuti della pianta porta quindi al manifestarsi di una varietà di sintomi di tossicità che vanno dalla clorosi all'appassimento, alla riduzione della crescita, fino alla morte cellulare (Van Assche e Clijsters 1990; Costa e Morel 1994; Hernandez *et al.* 1996; Siedlecka e Krupa 1996; Sanità di Toppi e Gabbrielli 1999; Perfus-Barbeoch *et al.* 2002; Pietrini *et al.* 2003). La maggior parte di questi effetti sono dovuti all'estrema affinità del Cd di legare i gruppi sulfidrilici delle proteine con la conseguente formazione di legami che ne modificano la struttura e la funzione. Inoltre l'accumulo di Cd induce stress ossidativo come evidenziato dalla formazione di specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido e il perossido di idrogeno (Romero-Puertas *et al.* 2004). Tuttavia, poiché il Cd non è un metallo attivo dal punto di vista redox, lo stress ossidativo può risultare sia dall'interferenza con il metabolismo del GSH sia dalla sostituzione e dislocazione dalle proteine dei metalli attivi dal punto di vista redox (Stohs e Bagchi 1995).

Detossificazione del cadmio

Per minimizzare gli effetti dell'accumulo di metalli pesanti le piante hanno evoluto meccanismi di detossificazione principalmente basati sulla chelazione e sulla compartimentalizzazione subcellulare (Clemens 2001). Una delle principali classi di chelanti dei metalli pesanti conosciuti nelle piante e nei funghi è quella delle fitochelatine (PC), una famiglia composta da piccoli peptidi ricchi in Cys e costituiti da solo 3 amminoacidi: acido glutammico (Glu), Cys e glicina (Gly); i residui di Glu e Cys sono legati attraverso un legame γ -carbammidico. Nelle PCs due o più

ripetizioni di unità di γ -EC sono seguite da un residuo di Gly terminale portando alla seguente struttura generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, con n variabile da 2 a 11 (più comunemente 2-5). Varianti di questa regola generale sono PC in cui la Gly terminale o è sostituita da altri amminoacidi (β -Ala: omoPCs, Ser: idrossimetilPCs o Glu: iso PCs) o non è presente; quest'ultima variante è stata identificata solo in lievito (Rauser 1995; Zenk 1996; Kubota *et al.* 2000; Oven *et al.* 2002). La sintesi delle PCs è indotta dopo pochi minuti di esposizione a differenti metalli o metalloidi; tra questi il Cd è il maggior induttore, mentre per altri metalli, come Cu, Zn, Pb e Ni, è richiesta una più alta concentrazione (Grill *et al.* 1987; Maitani *et al.* 1996). Le PCs sono sintetizzate non-traduzionalmente, a partire dal GSH, in una reazione catalizzata dall'enzima PC sintasi (PCS). Una volta sintetizzate, le PC formano complessi citosolici con i metalli; tali complessi sono successivamente compartimentati all'interno dei vacuoli ad opera di specifici trasportatori (Zenk 1996). L'importanza delle PCs per la detossificazione del Cd nelle piante è sottolineata dall'isolamento in *A. thaliana* del mutante *cad*, mancante della formazione del complesso Cd-PC, incapace di sintetizzare PC, e conseguentemente ipersensibile al Cd (Howden *et al.* 1995a, 1995b).

L'identità molecolare della PCS è stata identificata clonando e caratterizzando i corrispondenti geni in *A. thaliana*, *Triticum aestivum* e *Schizosaccharomyces pombe* (Clemens *et al.* 1999; Ha *et al.* 1999; Vatamaniuk *et al.* 1999) attraverso diversi approcci. I tre geni identificati, chiamati rispettivamente *AtPCS1*, *TaPCS* e *SpPCS*, codificano per polipeptidi di 50-55 kDa e mostrano, fra loro, un'identità di sequenza amminoacidica del 40-50% (Rea *et al.* 2004). Esperimenti di caratterizzazione funzionale hanno evidenziato che *AtPCS1* e *TaPCS* sono in grado di sopprimere il fenotipo Cd-ipersensibile di mutanti di *A. thaliana* e lievito (Ha *et al.* 1999; Vatamaniuk *et al.* 1999) o di conferire tolleranza al Cd quando espressi in lievito (Clemens *et al.* 1999). Inoltre, il mutante di *S. pombe* difettivo per *SpPCS* ha evidenziato di essere ipersensibile ai metalli pesanti e privo delle PCs cellulari (Ha *et al.* 1999). Valutando i risultati di questi esperimenti nel loro insieme si può confermare il ruolo delle PC sintasi clonate sia nella biosintesi delle PCs sia nei meccanismi di detossificazione del Cd.

Confronti tra le sequenze amminoacidiche dedotte dalle sequenze clonate di PCS rivelano un dominio ammino-terminale altamente conservato che presumibilmente

rappresenta il domino catalitico e una regione carbossi-terminale contenente residui multipli di Cys e mostrante un'apparente bassa conservazione della sequenza amminoacidica (Cobbett 2000; Rea *et al.* 2004).

Poiché la biosintesi delle PC è così strettamente dipendente dal GSH è giusto presumere che esista una generale relazione tra l'assimilazione del solfato, la biosintesi di GSH e il meccanismo di detossificazione del Cd (Nocito *et al.* 2007). Studi condotti su culture cellulari di *Rauvolfia serpentina* e su radici di mais indicano che l'esposizione e l'accumulo del Cd sono accompagnati da una transiente contrazione dei livelli di GSH cellulare, direttamente usato come substrato per la produzione di PC (Grill *et al.* 1987; Tukendorf e Rauser 1990). Inoltre, una prolungata esposizione al Cd risulta in una massiva sintesi di PC, che rapidamente diventano la più abbondante classe di tioli non proteici nei tessuti della pianta. Analisi comparative dei livelli di composti tiolici nelle piante esposte a Cd rivelano che la concentrazione di PC può raggiungere valori molto più elevati rispetto a quelli del loro precursore GSH, che rappresenta il principale composto tiolico non proteico in piante non stressate (Tukendorf e Rauser 1990; Heiss *et al.* 1999; Nocito *et al.* 2002, 2006, 2007). Quindi, la necessità di sostenere i processi di detossificazione del Cd induce un forte incremento della quantità totale di zolfo ridotto richiesto dalle piante; l'instaurarsi di sink addizionali di zolfo ridotto, in seguito all'esposizione a Cd, potrebbe essere in grado di determinare aumenti dell'attività di alcuni enzimi per l'assunzione, l'assimilazione e il trasporto di solfato, e per la biosintesi del GSH (Nocito *et al.* 2002, 2006).

Nussbaum e collaboratori (1998) per primi hanno dimostrato l'esistenza di una stretta relazione tra l'accumulo di Cd e l'assimilazione di solfato, descrivibile come un effetto di stimolo del metallo sull'attività di diversi enzimi delle vie di assimilazione del solfato e di biosintesi del GSH; in particolare gli enzimi maggiormente responsivi all'esposizione e all'accumulo di Cd sono l'ATP sulfurilasi, l'APS reduttasi, la γ -EC sintetasi e la GSH sintetasi (Nussbaum *et al.* 1988; Rügsegger *et al.* 1990; Rügsegger e Brunold 1992).

L'incremento della domanda di composti contenenti zolfo ridotto, dovuta all'attivazione del meccanismo di detossificazione del Cd basata sulle fitochelatine, sembra essere una risposta comune nelle piante esposte a questo metallo come indicato da differenti studi sulle risposte trascrizionali dei principali geni solfo-responsivi. In *A. thaliana* l'esposizione a Cd porta all'induzione di molti geni lungo

il metabolismo di assimilazione del solfato come differenti isoforme di Ser-acetil transferasi citosolica, di OAS(tio)liasi citosolica, di ATP sulfurilasi e di APS reductasi e anche della γ -EC sintetasi e della GSH sintetasi (Xiang e Oliver 1998; Dominguez-Solis *et al.* 2001; Harada *et al.* 2002; Howarth *et al.* 2003). Un comportamento simile è stato osservato anche in piante di *B. juncea* esposte a diverse concentrazioni di Cd, in cui si verifica un'induzione trascrizionale dei geni per l'ATP sulfurilasi, l'APS reductasi e la γ -EC sintetasi (Lee e Leustek 1998; Schäfer *et al.* 1998; Heiss *et al.* 1999).

Nel loro insieme questi studi indicano che la formazione di sink addizionali di zolfo ridotto, derivanti dalla sintesi di PCs, aumenta la richiesta di Cys e GSH, generando una regolazione trascrizionale coordinata dei geni coinvolti nell'assimilazione del solfato e nella sintesi del GSH, dipendente dalla domanda di composti tiolici. Questo tipo di risposta è fondamentale per la sopravvivenza delle piante in ambienti contaminati da metalli pesanti, poiché una fine modulazione dei flussi di zolfo lungo le vie metaboliche è essenziale per soddisfare due bisogni contrastanti: i) il mantenimento dell'omeostasi del GSH cellulare; ii) la detossificazione dei metalli pesanti per mezzo di attività che consumano il GSH (Nocito *et al.* 2007).

Studi condotti su piante di mais esposte a Cd dimostrano che il bisogno di mantenere un'elevata biosintesi di PC e adeguati livelli di GSH in seguito all'esposizione a Cd può essere soddisfatto anche modulando l'influsso di solfato nella radice, e quindi la quantità totale di zolfo assunta dall'ambiente. Osservazioni derivanti sia da corte che prolungate esposizioni a concentrazione di Cd nell'ordine del micromolare, evidenziano un aumento della capacità di assunzione del solfato grazie ad una induzione di *ZmSt1;1*, gene codificante per un trasportatore del solfato ad alta affinità identificato in *Zea mais* (Nocito *et al.* 2002, 2006). Inoltre la modulazione dell'assorbimento del solfato sembra essere dipendente dalle richieste nutrizionali come suggerito dall'osservazione che sia i cambiamenti nei livelli di trascritto di *ZmSt1;1* sia la capacità di assimilare il solfato delle radici sono strettamente relazionati alla forza del sink addizionale per i composti tiolici indotto dal Cd (Nocito *et al.* 2006). La regolazione dell'assorbimento del solfato può quindi rappresentare il primo passo del processo adattativo richiesto per assicurare un adeguato approvvigionamento di zolfo per la detossificazione del Cd.

Risultati preliminari condotti in *A. thaliana* rivelano che altri trasportatori del

solfato, anche se non coinvolti direttamente nell'assorbimento primario del nutriente dal mezzo esterno, sono regolati trascrizionalmente dopo esposizione a Cd (Herbette *et al.* 2006). Sebbene il significato della maggior parte di questa regolazione trascrizionale rimanga non chiara, è interessante la supposizione degli autori che il Cd induca la sovraespressione del trasportatore del tonoplasto AtSultr4;1 per mobilizzare le scorte vacuolari di solfato al fine di fornire un ulteriore substrato addizionale per il metabolismo di assimilazione. Questi dati suggeriscono anche che la modulazione dei flussi di solfato lungo l'intera pianta possa giocare un ruolo importante nella detossificazione e tolleranza del Cd.

Percezione e trasduzione del segnale

Ad oggi non sono ancora chiari i meccanismi attraverso cui la pianta attivi e regoli la risposta trascrizionale in presenza di metalli pesanti, nonostante negli organismi vegetali siano stati identificati numerosi geni inducibili da tali elementi (Hagen *et al.* 1988; Lescure *et al.* 1991; Berna e Bernier 1999).

In particolare, sono state individuate sequenze simili a *as-1*, un elemento *cis-acting* presente nel promotore CaMV 35S (*Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA*), nei promotori di due geni indotti da Cd e da auxina. Le due sequenze *parA* di tabacco (*Proplast Auxin Regulated*), con funzione non ancora ben caratterizzata, e *GH2/4* di soia, codificante per una GSH *S*-transferasi, sono probabilmente coinvolte nel controllo della trascrizione di questi geni in presenza di Cd (Ellis *et al.* 1993; Kusaba *et al.* 1996). Nell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* sono stati invece identificati un elemento di risposta al Cu di 4 pb (*CuRE*, *Copper Responsive Element*), e un regolatore della risposta, *CRR1* (*Copper Response Regulator*), essenziale per promuovere l'espressione di alcuni geni in condizioni di carenza di Cu (Quinn e Merchant 1995; Quinn *et al.* 2000, 2003). Entrambi questi elementi sono richiesti anche per mediare la risposta al Ni (Quinn *et al.* 2003). Altre due regioni sono state identificate nella regione promotrice di *PvSr2* di fagiolo (*Phaseolus vulgaris Stress-related gene number 2*), gene specificatamente indotto da metalli pesanti e in grado di aumentare la tolleranza al Cd in cellule di *E. coli* e piante di tabacco (Zhang *et al.* 2001; Chai *et al.* 2003). Queste due regioni individuate tra 222/-188 pb e -187/-147 pb, relativamente al sito di inizio della trascrizione, contengono elementi *HMRE* (*Heavy Metal Responsive Elements*), già identificati nei lieviti e negli animali, e sono in grado ciascuna di conferire un'espressione

dipendente dalla presenza dei metalli pesanti al gene reporter *GUS* (Qi *et al.* 2007).

Informazioni ancora più incomplete si hanno riguardo al meccanismo di trasduzione del segnale; le uniche evidenze disponibili derivano da osservazione condotte in piante di riso esposte a Cd, nelle quali sembra che il metallo influenzi la cascata dipendente da alcune chinasi MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), e pertanto è stato suggerito un coinvolgimento di queste chinasi nel mediare la trasduzione del segnale in seguito all'esposizione al Cd (Yeh *et al.* 2004; Qi *et al.* 2007).

OBIETTIVO

L'obiettivo generale del presente lavoro è stato quello di individuare fattori proteici (*DNA binding protein*) coinvolti nella regolazione trascrizionale di alcuni geni modello in risposta allo stato di nutrizione solfatica e/o alla presenza di cadmio nel mezzo di allevamento. Lo studio è stato condotto adottando due specie modello nell'ambito della famiglia delle Brassicacee, *Arabidopsis thaliana* e *Brassica juncea*, e ricorrendo all'impiego di sistemi reporter, di screening e di espressione eterologa (*Saccharomyces cerevisiae*).

MATERIALI E METODI

Materiale biologico

Tutte le esperienze erano condotte con piante di *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Colombia, *Col*), wild-type o appartenenti alla collezione *SALK*, e di *Brassica juncea* (*Brassica juncea* [L.] Czern. Var 426308), allevate in soluzioni idroponiche e in condizioni controllate.

Allevamento delle piante

L'allevamento delle piante avveniva secondo modalità diverse a seconda della specie e dall'utilizzo del materiale biologico, di seguito sono riportati i diversi metodi di allevamento.

1) Allevamento di piante di *Brassica juncea* in coltura idroponica per l'identificazione dei diversi alleli del trasportatore del solfato *BjST1;2*

La germinazione dei semi avveniva in piastre Petri con fondo rivestito da un doppio strato di carta da filtro imbibito con acqua bidistillata, che venivano poste per 96 h in un incubatore mantenuto a 26 °C e in assenza di luce. Ultimato il periodo di germinazione, le plantule venivano trasferite in una serra climatizzata dove venivano allevate in coltura idroponica; la camera era mantenuta a 26 °C, con un fotoperiodo di 16 h. Il sistema di allevamento adottato era costituito da supporti forati di polistirolo, ciascuno in grado di ospitare un numero variabile di piante inserite in appositi contenitori in PVC e riscalzate con agriperlite; i supporti venivano alloggiati in vasche di PVC contenenti 5 L di soluzione nutritiva.

Il protocollo di crescita, di seguito riportato, prevedeva diverse fasi sequenziali, durante le quali le soluzioni nutritive venivano variate in funzione delle esigenze delle piante e dei trattamenti da effettuare.

- *Fase I (Allevamento; durata 14 giorni)*

La soluzione nutritiva adottata (Hoagland 1:2) era così costituita: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,5 mM, KNO_3 3 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM, MgSO_4 1 mM, FeEDTA 50 μM , H_3BO_3 46 μM , MnCl_2 9 μM , ZnCl_2 0,8 μM , CuCl_2 0,3 μM , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,1 μM .

Questa fase aveva come scopo principale quello di ottenere il rapido affrancamento delle plantule.

- *Fase II (Acclimatamento; durata 8 giorni)*

La soluzione nutritiva veniva diluita 5 volte, eccezion fatta per i micronutrienti, allo scopo di portare la concentrazione dello ione solfato a 200 μM .

- *Fase III (Trattamento; durata 48 h)*

Durante questa fase si provvedeva alla somministrazione del Cd^{2+} (in forma di cloruro e in concentrazione 10 μM); durante tale trattamento il Fe-EDTA veniva sostituito con una quantità equivalente di Fe-tartarato, al fine di evitare la chelazione del metallo pesante da parte dell'EDTA.

Le soluzioni nutritive adottate venivano rinnovate ogni 2-3 giorni ed erano mantenute continuamente aerate attraverso un sistema di tubi collegato ad un serbatoio di aria compressa.

Ultimata la fase di trattamento si provvedeva al campionamento delle radici, che venivano rapidamente congelate in N_2 liquido, per poi essere conservate a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2) Allevamento di piante di Arabidopsis thaliana, in coltura idroponica, per ottenere la library di cDNA solfocarente

Prima di procedere alla semina, i semi venivano sottoposti a trattamento di vernalizzazione deponendoli su un foglietto di carta imbibito d'acqua bidistillata posto in una piastra Petri e lasciandoli ad una temperatura di $4\text{ }^\circ\text{C}$ per 4 giorni, in assenza di luce. Al termine del periodo di vernalizzazione, i semi venivano posti su ritagli di grodan e depositati su una piastra Petri con fondo ricoperto in perlite bagnato con acqua bidistillata. La piastra veniva incubata in camera di crescita mantenuta a $22\text{ }^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo di 12 ore di luce ($48\text{ }\mu\text{E m}^{-2}$) e 12 ore di buio, per la durata di 7 giorni. Ultimato il periodo di germinazione, le plantule venivano trasferite su particolari basamenti per essere allevate in coltura idroponica. Il sistema di allevamento adottato era costituito da supporti forati di polistirolo, ciascuno in grado di ospitare un numero variabile di piante inserite in appositi contenitori in PVC e ricalzate con agriperlite; i supporti venivano alloggiati in vasche di PVC contenenti 5L di soluzione nutritiva.

Il protocollo di crescita, di seguito riportato, prevedeva diverse fasi sequenziali, durante le quali le soluzioni nutritive venivano variate in funzione delle esigenze delle piante e dei trattamenti da effettuare.

- *Fase I (Allevamento; durata 7 giorni)*

La soluzione nutritiva adottata (Hoagland 1:2) era così costituita: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 250 mM, KNO_3 1,5 M, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M, MgSO_4 500 mM, FeEDTA 25 mM, H_3BO_3 46 μM , MnCl_2 9 μM , ZnCl_2 0.8 μM , CuCl_2 0,3 μM , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,1 μM .

Questa fase aveva come scopo principale quello di ottenere il rapido affrancamento delle plantule.

- *Fase II (Acclimatamento; durata 7 giorni)*

In questa fase si provvedeva alla riduzione della concentrazione del MgSO_4 a 10 μM .

- *Fase III (Trattamento; durata 72 ore)*

Durante questa fase si provvedeva ad indurre solfocarenza totale attraverso la sostituzione del MgSO_4 con MgCl_2 500 mM.

Le soluzioni nutritive adottate venivano rinnovate ogni 2-3 giorni ed erano mantenute continuamente aerate attraverso un sistema di tubi collegato ad un serbatoio di aria compressa.

3) Allevamento delle piante di Arabidopsis thaliana wild type e della linea SALK_006219.56.00 in vitro su terreni addizionati con differenti concentrazioni di solfato per studiare i profili d'espressione dei vari geni presi in esame.

Prima della messa a dimora i semi subivano un trattamento di sterilizzazione; questi erano incubati in una soluzione 0,01% (v/v) di tween 20 e mantenuti in agitazione a temperatura ambiente per un periodo di 20 min, al termine del quale veniva aggiunto un pari volume di ipoclorito di sodio (candeggina commerciale al 4% di cloro attivo) quale agente sterilizzante. L'incubazione si protraeva, nelle medesime condizioni di temperatura e agitazione, per un ulteriore periodo di 5 min. Al termine del trattamento i semi erano lavati 2 volte con acqua bidistillata sterile per essere infine risospesi in 1 mL di acqua.

La semina avveniva in piastre Petri e in condizioni di sterilità. I semi venivano depositati direttamente sulla superficie di terreno MS agarizzato, circa 20 mL per piastra, completo (1500 μM MgSO_4) o privo di solfato (10 μM MgSO_4). Al termine del trattamento di vernalizzazione dei semi, lasciati a 4 °C per 4 giorni, in assenza di luce, le piastre venivano trasferite in camera di crescita mantenuta a 22 °C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce (48 $\mu\text{E m}^{-2}$) e 8 ore di buio, per la durata di 14 giorni. La composizione dei terreni utilizzati per l'allevamento delle piante è riportata in allegato 5.

Estrazione dell'RNA totale e quantificazione

Le polveri, circa 100 mg e 700 mg per le radici di *Arabidopsis thaliana* e *Brassica juncea* rispettivamente, erano trasferite in tubi da centrifuga sterili, addizionate con 1 ml di TRIZOL[®] ogni 100 g di polvere, miscelate e mantenute a temperatura ambiente per 5 min. I campioni erano quindi addizionati con 200 μ L di cloroformio per ogni mL di TRIZOL[®] e centrifugati a 14000 g per 15 min. La fase acquosa superiore, circa il 60% del volume di TRIZOL[®], veniva prelevata e miscelata a 500 μ l, ogni mL di TRIZOL[®], di alcool isopropilico per precipitare l'RNA totale. Si centrifugava a 14000 g per 15 min, si eliminava il liquido surnatante, si lavava il *pellet* in 1 ml di etanolo al 70 % (v/v) e si centrifugava a 14000 g per 15 min per riprecipitare l'RNA. Il *pellet* ottenuto veniva asciugato sotto vuoto, fino alla completa evaporazione dell'etanolo residuo, per poi essere solubilizzato in 50 μ l di H₂O DEPC. Per la conservazione a -80 °C, i campioni venivano addizionati di altri 350 μ l di H₂O DEPC e miscelati con 40 μ l di sodio acetato 3 M e 1 ml di etanolo assoluto.

L'RNA totale estratto era quantificato spettrofotometricamente, misurando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Un'unità di assorbanza a 260 nm corrisponde ad una concentrazione di RNA di 40 μ g μ l⁻¹. Le letture erano eseguite con due diverse quantità del campione diluite in H₂O DEPC in un volume finale di 1 ml.

Allo scopo di verificare la qualità dell'RNA, un'aliquota della preparazione, corrispondente ad 1 μ g di RNA totale, era sottoposta a separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1 % (w/v) in tampone TBE 1x addizionato di bromuro di etidio (0.5 μ g mL⁻¹). Al termine della corsa, il gel era analizzato su transilluminatore UV.

Purificazione dell'RNA in LiCl

I campioni, conservati a -80 °C, venivano centrifugati a velocità massima per 30 min; i pellet venivano lavati in 500 μ L di etanolo al 70 % (v/v), riprecipitati centrifugando a velocità massima per 15 min e asciugati sotto vuoto. Le frazioni precipitate erano quindi risospese in 500 μ L di H₂O DEPC, addizionate con 0,1 V di LiCl 8 M per essere mantenute a 4 °C per 2 h; alte concentrazioni di LiCl consentono la precipitazione selettiva di RNA ad alto peso molecolare, mantenendo in soluzione tRNA, DNA genomico contaminante e polisaccaridi eventualmente presenti. Al

termine del periodo di incubazione i campioni venivano centrifugati a 13500 g per 30 min allo scopo di recuperare l'RNA precipitato. I pellet erano quindi risospesi in 500 μL di H_2O DEPC, addizionati con 1 mL di etanolo assoluto e 40 μL di sodio acetato 3 M, per essere mantenuti a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ per 20 min; la miscela veniva quindi centrifugata a 13500 g per 30 min e i pellet risospesi in 15 μL di H_2O DEPC. L'RNA totale così estratto e purificato, era infine quantificato spettrofotometricamente, misurando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Una unità di assorbanza a 260 nm corrisponde ad una concentrazione di RNA di $40\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$.

Retrotrascrizione dell'RNA

Per l'ottenimento del cDNA veniva utilizzato il protocollo SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Veniva quindi preparata una miscela contenente 3 μg di RNA, estratto da radici di piante di Arabidopsis allevate in vitro su terreno MS completo e privo di zolfo, secondo le modalità precedentemente descritte, 1 μL di dNTPs 10 mM e 1 μL del primer Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎. Si aggiungeva H_2O fino ad un volume finale di reazione di 10 μL ; la miscela di reazione era successivamente incubata a $65\text{ }^\circ\text{C}$ per 5 min e tenuta in ghiaccio per almeno 1 min. I campioni erano, quindi, addizionati di 10 μL di una miscela contenente 10 μL di RT buffer 5x, 8 μL di MgCl_2 25 mM, 4 μL di DTT 0,1 M, 80 U di RNaseOUT (Recombinant RNase Inibitor) e 400 U di Superscript II RT (trascrittasi inversa) per iniziare la reazione di retrotrascrizione che avveniva ad una temperatura di $50\text{ }^\circ\text{C}$ in un tempo di 50 min per poi essere terminata portando i campioni a $85\text{ }^\circ\text{C}$ per 15 min, allo scopo di denaturare l'enzima. La miscela era poi raffreddata in ghiaccio per 2 min e centrifugata brevemente; vi era quindi addizionato 2 U di RnaseH e si incubava a $37\text{ }^\circ\text{C}$ per 20 min.

Valutazione dell'espressione genica differenziale degli alleli di *BjST1;2*

La RT-PCR semi-quantitativa è una tecnica che consente di valutare il livello di espressione di un gene attraverso l'amplificazione del cDNA ottenuto dal corrispondente mRNA. A tale proposito vengono condotte reazioni di amplificazione del cDNA in condizioni non saturanti, dove la quantità di amplificato prodotto risulta

proporzionale alla concentrazione di template presente. In questo modo è possibile confrontare i livelli di trascritto di un gene in differenti condizioni sperimentali.

I prodotti di amplificazione della PCR semi-quantitativa sono comparati con quelli ottenuti dall'amplificazione di un gene ad espressione costitutiva, ovvero i cui livelli di trascritto non vengono influenzati dalle diverse condizioni in esame.

Allo scopo di evidenziare eventuali differenze di espressione tra i diversi alleli di un gene codificante per il trasportatore del solfato BjST1;2, le reazioni di RT-PCR semiquantitative venivano affiancate ad analisi di restrizione ed alla determinazione delle frequenze di ligazione dei diversi prodotti di amplificazione.

L'espressione del trasportatore del solfato di *B. juncea* era pertanto confrontata con quella della β -tubulina (le sequenze dei primers sono riportate in allegato 6); i retrotrascritti ottenuti da piante controllo e trattate con CdCl₂ 10 μ M venivano amplificati in condizioni semi-quantitative a 35 cicli di PCR, adottando le coppie di primers e i profili di amplificazione riportati in allegato (allegato 6a, b). Le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione sono state disegnate sulla sequenza depositata in banca dati NCBI (www.ncbi.gov) per il gene della β -tubulina e sulla sequenza del trasportatore di Brassica juncea BjST1;2 clonato e sequenziato in un precedente lavoro (Crema 2007, tesi di dottorato). Un'aliquota dei prodotti di amplificazione così ottenuti veniva analizzata previa restrizione enzimatica; le reazioni di restrizione erano condotte a 37 °C per 120 min in miscele contenenti 40 μ L di prodotto di amplificazione, 5 U di ClaI, 5 μ L KGB Buffer 10x e H₂O fino ad un volume finale di 50 μ L. L'enzima di restrizione utilizzato, tagliando in modo diverso nei tre alleli, permetteva di discriminarli. I frammenti ottenuti dalla restrizione erano visualizzati su gel di agarosio al 2 % (w/v) addizionato di bromuro di etidio (0,5 μ g mL⁻¹). La restante quota dei prodotti di amplificazione veniva utilizzata per determinare le frequenze di ligazione dei prodotti di amplificazione dei retrotrascritti di ciascun allele, attraverso il clonaggio all'interno del plasmide pCR[®]4Blunt TOPO[®], secondo il protocollo Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) descritto precedentemente.

Le colonie ottenute venivano diluite in 50 μ L di H₂O; 2 μ L di questa soluzione venivano utilizzati come template in reazioni di PCR condotte adottando lo stesso profilo termico e le medesime coppie di primers sopra descritti. I prodotti di amplificazione erano quindi analizzati tramite reazioni di restrizione condotte a 37 °C per 120 min. La miscela di restrizione era composta da 20 μ L del prodotto di

amplificazione, 1 U di ClaI, 3 µL KGB Buffer 10x e H₂O fino ad un volume di 30 µL. I prodotti di restrizione erano visualizzati su gel di agarosio al 2 % (w/v) al fine di determinare la frequenza di ligazione dei diversi alleli.

Estrazione del DNA per l'identificazione dei promotori del gene *BjST1;2*

L'estrazione veniva condotta a 22 °C. Le foglie di *Brassica juncea* campionate erano macerate in un tubo da 1,5 ml, con l'ausilio di un pestello, in presenza di 500 µl di tampone *high-salt* [urea 2,8 M, Na₂SO₄ 0,3 M, Tris 0,2 M, EDTA 8 mM, *N-Lauroyl-Sarcosine* 35 mM (pH = 8,0)]. I campioni venivano quindi lasciati *overnight* a 4 °C per aumentare la resa di estrazione. Al termine del periodo d'incubazione, si aggiungevano 500 µl di una miscela fenolo:cloroformio:isoamilalcol (25:24:1; v/v/v) e si centrifugava a 14000 g per 10 min, per favorire la separazione delle fasi. L'epifase (400 µl circa) veniva quindi recuperata e miscelata con un volume di acqua distillata e 0,7 volumi di isopropanolo, per consentire la precipitazione degli acidi nucleici. Si centrifugava quindi a 14000 g per 10 min, si eliminava il liquido surnatante, si lavava il *pellet* in 1 ml di etanolo al 70 % (v/v) e si centrifugava a 14000 g. Il *pellet* ottenuto veniva asciugato sottovuoto, fino alla completa evaporazione dell'etanolo residuo, per poi essere risospeso in 50 µl di TE 1x [Tris - HCl 50 mM (pH = 8,0), EDTA 5 mM] contenete RNasi (5 µg). I campioni venivano incubati a temperatura ambiente per 30 min ed infine conservati a -20 °C.

TAIL-PCR

I protocolli di TAIL (*Thermal Asymmetric Inter-Laced*)-PCR prevedono tre cicli di amplificazione *nested* successivi utilizzando primer disegnati sulla sequenza nucleotidica del gene *BjST1;2*, e pertanto specifici, unitamente ad un unico primer degenerato che si appaia in posizioni casuali del genoma (allegato 8).

Nella prima reazione di PCR (TAIL 1) 1 µl di DNA era amplificato utilizzando la coppia di primers: *ST1;2A-B04*. La sequenza di tali primer, la miscela di reazione e il profilo termico di reazione sono riportati in allegato 9.

Nel secondo ciclo di amplificazione (TAIL 2) 1 µl di DNA, proveniente da una diluizione 1:50 del prodotto della TAIL 1, è stato aggiunto ad analoghe miscele (allegato 9b), nelle quali il primer *ST1;2A* era sostituito dal primer *ST1;2B* (allegato

9a). Nel terzo ciclo di amplificazione (TAIL 3) 1,5 µl di DNA, proveniente da una diluizione 1:10 del prodotto della TAIL 2, veniva amplificato impiegando una miscela di reazione (allegato 9b) contenente, come oligo specifico per il gene, il primer *STI;2C1* (allegato 9a).

Ogni campione della TAIL 3 veniva amplificato in triplo. I profili termici delle reazioni di amplificazione della TAIL 2 e della TAIL 3 sono riportati nell'allegato 9c.

I prodotti delle tre successive amplificazioni venivano caricati su gel di agarosio all'1% (w/v) in corsie adiacenti. Il gel veniva preparato sciogliendo a caldo una opportuna quantità di agarosio in tampone TBE 1x [Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, Na₂-EDTA 2 mM (pH = 8,2)] addizionato di bromuro di etidio (0,5 µg ml⁻¹). I campioni impiegati per la corsa elettroforetica venivano preventivamente miscelati con 0,1 volumi di *sample buffer* 10x [Ficoll 400 15% (w/v), blu di bromofenolo 0,25%, xylene cianolo 0,25%, in acqua distillata], allo scopo di facilitarne il carico e di consentirne la visualizzazione durante la corsa, che veniva condotta per 40 min a 10 V cm⁻¹. I risultati della corsa elettroforetica venivano visualizzati su un transilluminatore UV. L'analisi delle immagini consentiva di individuare i prodotti di interesse che venivano purificati secondo il protocollo *DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences). I frammenti purificati venivano ligati, secondo il protocollo *Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen), all'interno del plasmide pCR[®] 4Blunt TOPO[®], che permette una ligazione dell'inserto ad alta efficienza. Tale plasmide viene fornito linearizzato e con le estremità 3' di ciascuna elica legate covalentemente alla Topoisomerasi I del virus *Vaccinia*, un enzima che lega il DNA a doppia elica in siti specifici e taglia il legame fosfodiesterico dopo il 5'-CCCTT di un'elica. L'energia prodotta dalla rottura del legame fosfodiesterico è conservata attraverso la formazione di un legame covalente tra il fosfato in 3' dell'elica tagliata ed un residuo tirosilico (Tyr-274) della Topoisomerasi I. Il legame fosfo-tirosilico fra il plasmide e l'enzima viene attaccato dal gruppo idrossilico in 5' dell'inserto provocando, così, il rilascio della Topoisomerasi I.

Le reazioni di ligazione erano condotte per 25 min a temperatura ambiente in una miscela costituita da 2 µl dell'amplificato purificato, 0,5 µl del vettore TOPO[®] e 0,5 µl di soluzione salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M). Le reazioni di

trasformazione erano condotte aggiungendo 2 μl della reazione di ligazione ad una aliquota di cellule di *E. coli* chimicamente competenti, che venivano poi mantenute in ghiaccio per un periodo di 15 min. Seguiva quindi uno shock termico a 42 °C per 30 secondi, al termine del quale le cellule venivano immediatamente riposte in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 250 μl di SOC MEDIUM e conservato le cellule a temperatura ambiente per 1 min, queste erano incubate a 37 °C per 1 ora mantenendole in agitazione. Un'aliquota di trasformati (50 μl) era infine trasferita su piastre di LB agarizzato addizionato di kanamicina (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), che venivano incubate a 37 °C per 12 ore.

pCR[®] 4Blunt TOPO[®] consente la selezione diretta dei ricombinanti attraverso l'interruzione dell'espressione del gene letale di *E. coli ccdB*, fuso al frammento LacZ α . Infatti il polylinker è posizionato tra il promotore P_{lac} ed il gene letale, e il plasmide presenta il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina; le uniche cellule in grado di crescere su terreno addizionato di antibiotico saranno, pertanto, le trasformate e contenenti l'inserito.

Le colonie positive erano prelevate ed impiegate per inoculare contemporaneamente terreni LB agarizzati e liquidi, che venivano posti ad incubare per un ulteriore periodo di 12-18 ore a 37 °C. Ultimata la fase di crescita esponenziale le colture liquide venivano utilizzate per l'estrazione del plasmide ricombinante.

L'isolamento del DNA plasmidico dalle cellule trasformate veniva condotto secondo il protocollo *NucleoSpin Plasmid* (QIAGEN). Dalle subcolture in liquido erano prelevati 2 ml che successivamente venivano centrifugati a 6000 g per 3 min per permettere la precipitazione delle cellule batteriche. I *pellet* erano quindi risospesi in 250 μl di soluzione di risospensione e addizionati con 250 μl di tampone di lisi; le cellule erano mantenute a temperatura ambiente per un tempo massimo di 5 min. Venivano quindi aggiunti 350 μl di una soluzione bloccante la lisi e, dopo aver miscelato, si centrifugava alla massima velocità per 10 min. Il surnatante veniva caricato su una colonna *NucleoSpin Plasmid* e centrifugato alla massima velocità per 1 min. I plasmidi erano infine eluiti lavando la colonna con 50 μl di H₂O e centrifugando alla massima velocità per 1 min.

I frammenti di DNA ricercati erano quindi ottenuti per digestione dei plasmidi con l'enzima *EcoRI*, per il quale sono presenti due siti di restrizione alle estremità del sito di inserzione del frammento nel plasmide.

Le reazioni di restrizione erano condotte a 37 °C per 120 min in miscele contenenti 2 µl di DNA plasmidico, 2 U di *EcoRI*, 2 µl *buffer* 10x e H₂O fino ad un volume finale di 20 µl; i frammenti di restrizione erano, quindi, visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. I cloni che presentavano un inserto delle dimensioni attese erano quindi sottoposti a sequenziamento. Il ferogramma tuttavia risultava illeggibile dopo le prime 200 pb da entrambi i lati.

Sequenziamento e ricostruzione del promotore del gene di *BjST1*;2

I cloni ottenuti dalla procedura di clonaggio venivano sottoposti a reazioni di restrizione utilizzando gli enzimi di restrizione *EcoRI*, *HindIII* e *SpeI*. Le miscele di restrizione contenevano 2 µL di plasmide, 0,2 µL di enzima e 2 µL di Buffer 10x, la restrizione veniva condotta per 2 h a 37°C. Al termine della restrizione i prodotti venivano visualizzati su gel di agarosio all'1% (w/v) disciolto in tampone TBE 1x [Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, Na₂-EDTA 2 mM (pH = 8,2)] addizionato di bromuro di etidio (0,5 µg ml⁻¹).

Il clone sequenziato veniva suddiviso in due frammenti utilizzando gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *SpeI* a tale scopo 2µL del vettore venivano miscelati con 1 U di ciascuno enzima, 2 µL di 10x KGB Buffer [potassium acetate 1 M; Tris-acetate 0.25 M (pH 7,6); magnesium acetate 0.1 M; 2-mercaptoethano 15 mM; BSA 0.1 mg mL⁻¹] e H₂O fino ad un volume finale di 20 µL KGB. Al termine della restrizione i prodotti venivano visualizzati su gel di agarosio all'1% (w/v) disciolto in tampone TBE 1x [Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, Na₂-EDTA 2 mM (pH = 8,2)] addizionato di bromuro di etidio (0,5 µg mL⁻¹), eluiti secondo il protocollo *DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences). I due prodotti così ottenuti venivano clonati nel vettore pBluescript II (Stratagene). A tale scopo 9 µg del vettore venivano miscelati con 1U di *EcoRI* e 1 U di *SpeI*, 2 µL di 10x KGB Buffer e H₂O fino ad un volume finale di 20 µL. Le reazioni di ligazione erano condotte miscelando 45 ng di ciascun frammento, 115 ng di vettore tagliato, 2 µL di 10x buffer {300mM Tris-HCl (pH 7.8), 100mM MgCl₂, 100mM DTT and 10mM ATP} e 1U di T4DNA ligasi (Promega) e H₂O fino ad un volume finale di 10 µL. La reazione di ligazione era condotta per 4 ore ad una temperatura di 20° C, al termine di questo periodo la miscela era utilizzata per trasformare un'aliquota di cellule di *E. coli* chimicamente competenti, che venivano poi mantenute in ghiaccio per un periodo di 30 min. Seguiva quindi uno shock

termico a 42 °C per 1 min, al termine del quale le cellule venivano immediatamente riposte in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 1 mL di LB e conservato le cellule a temperatura ambiente per 1 min, queste erano incubate a 37 °C per 1 ora mantenendole in agitazione. Le cellule venivano quindi centrifugate per 5 min ad una velocità di 4000 g e il *pellet* risospeso in 200 µL di LB. I trasformati, suddivisi in due aliquote da 100 µL ciascuna, erano infine trasferiti su piastre di LB agarizzato addizionato di ampicillina (50 µg ml⁻¹), che venivano incubate a 37 °C per 12 ore.

Il medesimo clone veniva amplificato utilizzando una coppia di primers disegnata sulle sequenze ottenute dalle regioni di ferogramma leggibili (Allegato 10). La reazione di amplificazione del clone era condotta per PCR su 1 µL del plasmide diluito di un fattore 1000 con H₂O distillata. A tale scopo si preparava una miscela di reazione contenente il vettore, la coppia di primers specifici per la sequenza, ciascuno in concentrazione 300 nM, dNTPs 0,3 mM, 0,75 U di Pfu DNA polimerasi (Promega, genera prodotti con estremità blunt), il corrispondente Buffer 1x (già addizionato di magnesio 2 mM), e acqua per raggiungere un volume finale di reazione di 25 µL. A ciascun campione si aggiungevano due gocce di olio minerale per evitarne l'evaporazione durante i cicli di PCR. Il profilo termico della reazione di amplificazione era il seguente: denaturazione iniziale a 94 °C per 2 min, seguita da 35 cicli costituiti da una fase di denaturazione a 94 °C per 45 s, una fase di *annealing* a una temperatura di 69° per 45 s, una fase di sintesi a 72 °C per 2 min e 30 s. I cicli erano seguiti da una fase di estensione finale a 72 °C per 30 min.

I prodotti di PCR venivano quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Analisi *One-Hybrid* utilizzando come *target* l'elemento SURE

Il sistema one-hybrid si basa sul principio che molti attivatori trascrizionali degli eucarioti presentano domini di binding al DNA e domini di attivazione (AD) fisicamente indipendenti. Il sistema one-hybrid era allestito impiegando l'elemento SURE identificato nel promotore del gene del trasportatore *Sultr1;1*. In particolare, il sistema di screening era preparato integrando all'interno del genoma del ceppo di lievito Y187 [MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1] di *Saccharomyces cerevisiae*, auxotrofo per l'istidina, un costrutto costituito dalla sequenza promotrice target posta

a monte di un gene reporter (*HIS3*; rimuove l'auxotrofia per l'istidina consentendo al ceppo di crescere su terreni privi di questo amminoacido). Il reporter così costituito veniva impiegato per lo screening di una libreria AD di fusione ottenuta ligando i cDNA, derivati dalla reazione di retrotrascrizione dell'mRNA estratto da piante allevate in presenza/assenza di solfato nel mezzo di crescita, in un opportuno vettore AD. I trasformanti erano quindi selezionati per la presenza di proteine interagenti con la sequenza target, ricercando le colonie in grado di crescere su terreni minimi privi di istidina. Il principio base dell'analisi one-hybrid e i terreni utilizzati nell'analisi sono riportanti rispettivamente in figura 7 e in allegato 11.

Preparazione del vettore reporter pHIS2 portante l'elemento SURE

Allo scopo di costituire il vettore reporter pHIS2, portante l'elemento SURE, venivano sintetizzati due oligonucleotidi formati da 3 ripetizioni dell'elemento SURE posto in orientamento SENSO o ANTISENSO. L'oligonucleotide costituito dalle 3 ripetizioni dell'elemento in orientamento senso portava alle estremità due adattatori contenenti i siti di restrizione per gli enzimi *EcoRI* e *SacI*. I due oligonucleotidi venivano fatti appaiare attraverso una reazione di *annealing*, ottenuta miscelando 0,1 µg di entrambi i filamenti, 10 µL di NaCl 50 mM e incubando la miscela a 70 °C per 5 min; tale reazione permetteva di ottenere una molecola di DNA a doppio filamento con le estremità che permettevano il clonaggio direzionale dell'inserto all'interno del multiple cloning site (MCS) del vettore pHIS2.

Il vettore pHIS2 (Figura 8) veniva quindi tagliato con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *SacI* per il clonaggio direzionale dell'oligonucleotide. La reazione di restrizione veniva condotta miscelando 17 µg di pHIS2, 20 U dell'enzima *SacI*, 20 U dell'enzima *EcoRI*, 5 µL di 10x KGB Buffer [potassium acetate 1 M; Tris-acetate 0.25 M (pH 7,6); magnesium acetate 0.1 M; 2-mercaptoethano 15 mM; BSA 0.1 mg mL⁻¹] e H₂O fino ad un volume finale di 50 µL. La miscela di restrizione era mantenuta a 37 °C per 2 ore; seguiva l'inattivazione termica degli enzimi aggiungendo alla reazione di digestione Na-EDTA per una concentrazione finale 5 mM e incubando a 65 °C per 20 min.

La reazione di digestione era quindi visualizzata su gel di agarosio all'1,5% (w/v) in tampone TBE 1x [Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, Na₂-EDTA 2 mM (pH 8,2)] addizionato di bromuro di etidio (0,5 µg mL⁻¹), allo scopo di visualizzare i frammenti di restrizione. I campioni impiegati per la corsa elettroforetica venivano

preventivamente miscelati con 0,1 V di *sample buffer* 10x [Ficoll 400 15% (w/v), Blu di bromofenolo 0,25% (w/v) in TBE 1x], allo scopo di facilitarne il carico e di consentire la visualizzazione durante la corsa. Quest'ultima era condotta in tampone TBE 1x, applicando una differenza di potenziale elettrico di 5 mV cm^{-1} . I frammenti, così separati, venivano visualizzati su transilluminatore UV.

Il frammento di interesse veniva purificato secondo il protocollo *DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences). Si aggiungevano quindi 10 μ L di capture buffer per ogni 10 mg di gel d'agarosio prelevato per la purificazione, si miscelava vigorosamente e si incubava a 60 °C fino alla completa dissoluzione dell'agarosio. Seguiva il trasferimento della miscela su una colonna *GFX* e un'incubazione di 1 min a temperatura ambiente. Dopo aver centrifugato per 30 sec alla massima velocità, si aggiungevano 500 μ L di *wash buffer* e si centrifugava nuovamente per 30 sec a velocità massima. I frammenti di restrizione venivano quindi eluiti lavando la colonna con 50 μ L di H₂O, incubando per 1 min a temperatura ambiente e centrifugando alla massima velocità per 1 min.

I prodotti di digestione così eluiti venivano infine purificati e concentrati utilizzando protocolli standard basati sulla ripartizione di fase (fenolo-cloroformio) e sulla precipitazione in alcoli. Al campione veniva aggiunta acqua, fino ad un volume finale di 500 μ L, e 500 μ L di una miscela fenolo:cloroformio:isoamilalcol (25:24:1; v/v/v). Si centrifugava a 13000 g per 10 minuti, per favorire la separazione delle fasi. L'epifase (400 μ L circa) era quindi recuperata e veniva miscelata con 1 mL di etanolo assoluto e 40 μ L di sodio acetato 3 M, per consentire la precipitazione degli acidi nucleici e la miscela veniva lasciata a -20 °C per 30 min. Si centrifugava quindi a 13000 g per 20 minuti, a 4 °C, e si eliminava il liquido surnatante. Si lavava il pellet in 1 mL di etanolo al 70% (v/v) e si centrifugava a 13000 g. Il pellet ottenuto veniva asciugato sottovuoto, fino alla completa evaporazione dell'etanolo residuo, per poi essere risospeso in 20 μ L di acqua.

La reazione di ligazione era condotta per 4 ore a 20 °C in una miscela costituita da 1 μ L dell'oligonucleotide precedentemente ottenuto, 0,025 μ g del vettore pHis2 digerito, 1,2 μ L di T4 *ligation buffer* 10x, 1 U di T4 DNA ligasi e 4 μ L di H₂O distillata. La reazione di ligazione veniva poi terminata a 4 °C per 16 ore.

La reazione di trasformazione era condotta aggiungendo 10 μ L della reazione di ligazione ad una aliquota di cellule di *E. Coli* chimicamente competenti, e veniva mantenuta in ghiaccio per un periodo di 15 min. Seguiva quindi uno shock termico a

42 °C per 1 min, al termine del quale le cellule venivano immediatamente riposte in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 1 mL di terreno liquido LB, le cellule erano incubate a 37 °C per 1 ora mantenendole in agitazione. Le cellule venivano centrifugate per 5 min ad una velocità di 4000 g e quindi risospese in 200 µL di terreno LB, e infine trasferite su piastre di LB agarizzato (100 µL piastra) addizionato di kanamicina (50 µg mL⁻¹), che venivano incubate a 37 °C per 16 ore. Il vettore pHIS2 porta il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina pertanto le uniche cellule in grado di crescere su terreno addizionato di tale antibiotico erano quelle contenenti il vettore.

Le colonie positive erano prelevate ed impiegate per inoculare contemporaneamente terreni LB agarizzati e liquidi, posti ad incubare per un ulteriore periodo di 12-18 ore a 37 °C. Ultimata la fase di crescita esponenziale le colture liquide venivano utilizzate per l'estrazione del plasmide ricombinante. L'isolamento del DNA plasmidico dalle cellule trasformate veniva condotto secondo il protocollo *NucleoSpin Plasmid* (QIAGEN). Dalle subcolture in liquido erano prelevati 2 mL che successivamente venivano centrifugati a 6000 g per 3 min per permettere la precipitazione delle cellule batteriche. I pellet erano quindi risospesi in 250 µL di soluzione di risospensione e addizionati con 250 µL di tampone di lisi; le cellule erano mantenute a temperatura ambiente per un tempo massimo di 5 min. Venivano quindi aggiunti 350 µL di una soluzione bloccante la lisi e, dopo aver miscelato, si centrifugava alla massima velocità per 10 min. Il surnatante veniva caricato su una colonna *NucleoSpin Plasmid* e centrifugato alla massima velocità per 1 min. I plasmidi erano infine eluiti lavando la colonna con 50 µL di H₂O e centrifugando alla massima velocità per 1 min.

I plasmidi isolati erano quindi digeriti con l'enzima *SmaI*, per il quale è presente un sito unico di restrizione all'interno del MCS del vettore pHIS2; tale sito di restrizione non è più presente, però, nel caso in cui l'oligonucleotide portante l'elemento SURE si sia inserito nel vettore. Le reazioni di restrizione erano condotte a 30 °C per 120 min in miscele contenenti 2 µL di DNA plasmidico, 2 U dell'enzima *SmaI*, 2 µL di buffer 10x e H₂O fino ad un volume finale di 20 µL. I frammenti di restrizione erano, quindi, separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati su transilluminatore UV. I cloni che non venivano tagliati dall'enzima *SmaI* erano quindi sottoposti a sequenziamento per verificarne la bontà.

Preparazione della libreria AD da piante di Arabidopsis allevate in sofo carenza

La costruzione della library di cDNA avveniva utilizzando il protocollo SMARTTM (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript) technology (Zhu *et al.* 2001) che permette, attraverso l'inserimento di specifiche ancore alle estremità 3' e 5' dell'RNA stampo, la trascrizione e la completa amplificazione dell'RNA messaggero.

Veniva preparata quindi una miscela contenente 3 µg di RNA, 1 µL di CDS III Primer (oligo (dT) che appaia con la coda polyA al 3' dell'RNA stampo) e 1 µL di H₂O DEPC; tale miscela era incubata a 72 °C per 2 min, al fine di distendere l'RNA, e tenuta poi in ghiaccio per almeno 1 minuto. Si aggiungeva quindi 2 µL di 5x First-Strand *buffer* [250 mM Tris (pH 8,3); 30 mM MgCl₂; 375 mM KCl], 1 µL di DTT 20 mM, 1 µL di dNTP Mix 10 mM e 1 µL di MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase e s'incubava a 42 °C per 10 min. In seguito si aggiungeva alla miscela 1 µL di SMART IIITM Oligonucleotide che veniva inserito all'estremità 3' della molecola di sintesi per le successive reazioni di amplificazioni. La reazione di retrotrascrizione, che avveniva ad una temperatura di 42 °C per 60 min, era poi terminata portando il campione a 75 °C per 10 min, allo scopo di denaturare l'enzima. La miscela era raffreddata a temperatura ambiente per 2 min e centrifugata brevemente; si addizionavano infine 2 U di RnasiH e si incubava a 37 °C per 20 min.

Le successive reazioni di amplificazione del cDNA erano condotte tramite reazioni di PCR su aliquote di 2 µL della precedente miscela. Si preparavano miscele di reazione contenenti cDNA, 0,5 µL dei primers 5' PCR primer e 3' PCR primer, ciascuno in concentrazione 10 µM, 0,5 µL di dNTPs Mix 50x, 0,5 µL di *Advantage 2 Polymerase Mix 50x* (contenente TITANIUMTM Taq DNA Polymerase, TaqStartTM Antibody e una quantità minore di polimerasi con attività proofreading), 2,5 µL di BD Advantage 2 PCR buffer 10x [Triacine-KOH 400 mM (pH 8,7); KOAc 150 mM; Mg(OAc)₂ 35 mM; BSA 37,5 µg mL; Tween 20 0,05%; Nonidet-P40 0,05%], 2,5 µL di GC-Melt Solution 10x e H₂O per un volume finale di reazione di 25 µL. A ciascun campione si aggiungevano due gocce di olio minerale per evitarne l'evaporazione durante i cicli di PCR. Le sequenze delle coppie di primer utilizzate e i profili termici della reazione di amplificazione sono riportati in allegato 12.

La libreria di cDNA così ottenuta veniva quindi caricata e purificata su colonne CHROMA SPINTM TE-400. La colonnina utilizzata per la purificazione

della library veniva equilibrata mediante centrifugazione a vuoto a 750 g per 5 min. La library di cDNA veniva quindi caricata sulla colonnina e centrifugata a 750 g per 5 min. Al campione purificato si miscelava acqua distillata fino a raggiungere un volume di 400 μ L, 40 μ L di sodio acetato 3 M e 1 mL di etanolo assoluto per consentire la precipitazione degli acidi nucleici. Si centrifugava quindi a 14000 g per 10 min, si eliminava il liquido surnatante, si lavava il pellet in 1 mL di etanolo al 75 % (v/v) e si centrifugava a 14000 g. La frazione precipitata veniva asciugata sottovuoto, fino alla completa evaporazione dell'etanolo residuo, e poi risospesa in 20 μ L di H₂O.

Determinazione della concentrazione ottimale di inibitore 3AT da utilizzare nelle fasi di screening

L'inserimento del vettore reporter all'interno del ceppo di lievito Y187 può generare interazioni aspecifiche tra le proteine del lievito ed il vettore reporter stesso. Il background di crescita dovuto all'alterazione dell'espressione *HIS3* del vettore p*HIS2* veniva controllato attraverso l'aggiunta al mezzo di crescita, privo di istidina, di 3-amino-1,2,4-triazole (3AT), un inibitore competitivo della proteina di lievito His3 (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993). Al fine di determinare la concentrazione ottimale di 3AT da utilizzare per azzerare il background di crescita durante l'analisi one-hybrid, le cellule di lievito Y187 venivano trasformate col solo vettore reporter portante l'elemento SURE.

Preparazione delle cellule di lievito chimicamente competenti

Un'aliquota del ceppo di lievito Y187 veniva impiegato per l'inoculo di terreni agarizzati YPAD, posti ad incubare a 30 °C per alcuni giorni, fino alla comparsa delle colonie. Una delle colonie era prelevata ed utilizzata per inoculare 3 mL di terreno liquido YPAD, posto ad incubare in agitazione termostata per 8 ore. Si trasferivano 5 μ L di tale inoculo in 50 mL di terreni liquido YPAD, mantenuto in agitazione termostata a 30 °C per 16-20 ore. La crescita veniva condotta fino al raggiungimento di un valore di densità ottica, misurata a 600 nm, compresa fra 0,15 e 0,3. La subcultura veniva precipitata a 700 g per 5 min. Una volta eliminato il liquido surnatante, il pellet era risospeso in 100 mL di YPAD; le cellule erano lasciate crescere a 30 °C in agitazione fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ compresa fra 0,4 e 0,5. La coltura era centrifugata a 700 g per 5 min a temperatura ambiente e poi

risospesa in 60 mL di H₂O distillata. Le cellule venivano precipitate a 700 g per 5 min, a temperatura ambiente, risospese in 3 mL di soluzione 1,1x di TE/LiAc [TE buffer 10x; LiAc 1M 10x], centrifugate nuovamente per 15 sec alla velocità massima e infine risospese in 600 µL di soluzione 1,1x di TE/LiAc.

Trasformazione

Le reazioni di trasformazione erano condotte per 30 min a 30 °C in una miscela costituita da 500 ng di vettore reporter portante l'elemento SURE, 5 µL di Herring Testes Carrier DNA (10 µg mL⁻¹) precedentemente denaturato a 100 °C per 5 min, 50 µL di cellule di lievito Y187 rese chimicamente competenti e 500 µL di una soluzione contenente PEG/LiAc [TE buffer 10x; LiAc 1M 10x; PEG 3350 50%]. Le miscele di reazione venivano agitate durante l'incubazione ad intervalli di 10 min. Si aggiungevano 20 µL di DMSO e s'incubava la miscela a 42 °C per 15 min. Le cellule erano precipitate centrifugando per 15 sec alla velocità massima e, eliminato il surnatante, si risospendevano in 1 mL di YPD Plus Liquid Medium; s'incubavano quindi in agitazione termostata a 30 °C per 90 min. A seguito di un'ultima centrifugazione di 15 sec alla massima velocità, le cellule venivano risospese in 1 mL di NaCl (0,9%). I trasformanti così ottenuti venivano diluiti di un fattore 10, 100 e 1000 e aliquote di queste preparazioni (100 µL) erano infine trasferite su terreno SD/-Trp per il controllo della trasformazione e su terreno SD/-His/-Trp e SD/-His/-Trp+ 3AT a differenti concentrazioni (da 10 a 60 mM), per la scelta della concentrazione ottimale di inibitore 3AT da utilizzare nell'analisi one-hybrid. Le piastre erano quindi incubate a 30 °C per 4 giorni.

Co-trasformazione

Le reazioni di co-trasformazione erano condotte miscelando alla library di cDNA, 3 µg del vettore d'espressione pGADT7-Rec2 (Figura 8), 5 µg del vettore reporter pHIS2 portante l'elemento SURE, 0,20 µg di Herring Testes Carrier DNA denaturato, 600 µL di cellule di lievito rese competenti secondo il protocollo riportato precedentemente, 2,5 mL di soluzione di PEG/LiAc e incubando a 30 °C per 45 min. La miscela veniva addizionata con 160 µL di DMSO e mantenuta poi in agitazione termostata a 42 °C per 20 min. Successivamente le colture erano precipitate a 700 g per 5 min e, eliminato il surnatante, risospese in 3 mL di terreno YPD Plus Liquid Medium. Le cellule erano quindi poste in un bagnetto termostato

a 30 °C e in agitazione (265 rpm) per 90 min, centrifugate a 700 g per 5 min e infine risospese in 6 mL di NaCl (0,9 %). Al fine di calcolare l'efficienza di trasformazione, venivano piastrati 100 µL della miscela di trasformazione diluita di un fattore 10, 100 e 1000 su terreni agarizzati SD/-Leu, SD/-Trp, e SD/-Leu/-Trp. Il resto della miscela di trasformazione veniva piastrata in aliquote da 150 µL su terreno agarizzato SD/-His/-Leu/-Trp + 3AT 40 mM. Le piastre venivano quindi incubate a 30° per 4 giorni.

Parallelamente venivano eseguiti i controlli della reazione di co-trasformazione miscelando 500 ng del vettore pGAD-Rec2-53 (Figura 8d), codificante per la proteina p53 di topo come proteina di fusione con GAL4 AD, o a 500 ng di vettore p53HIS2 (Figura 8c), portante le sequenze in *cis* riconosciute dalla proteina p53, per il controllo positivo della reazione di trasformazione, o a 500 ng del vettore pHIS2 per il controllo negativo. In entrambi i casi le miscele di reazione erano addizionate di 0,05 µg di Herring Testes Carrier DNA denaturato, 50 µL di cellule competenti di lievito e di 500 µL di soluzione di PEG/LiAc e poi incubate a 30 °C per 30 min, durante i quali venivano miscelate ad intervalli di 10 min. In seguito all'aggiunta di 20 µL di DMSO, si poneva la miscela ad incubare a 42 °C per 15 min e la si centrifugava poi per 15 sec alla massima velocità. Le colture erano quindi risospese in 1 mL di YPD Plus Liquid Medium e incubate in agitazione termostata a 30 °C. Eliminato il surnatante a seguito di una centrifugazione di 15 sec a velocità massima, le cellule erano risospese in 1 mL di NaCl (0,9 %). Un'aliquota (100 µL) delle diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000 dei trasformanti così ottenuti era infine piastrata su terreni SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp, per il controllo della reazione di co-trasformazione, e su terreno SD/-His/-Leu/-Trp + 3AT 10 mM per l'individuazione delle interazioni positive. Le piastre erano quindi incubate a 30 °C per 4 giorni.

Analisi delle interazioni positive

Al fine di identificare i geni responsabili delle interazioni positive individuate nell'analisi one-hybrid, le cellule di lievito cresciute sui terreni di selezione venivano prelevate ed impiegate per inoculare contemporaneamente terreni SD/-Trp/-Leu agarizzati e liquidi, posti poi ad incubare a 30 °C per un periodo di 12-18 ore; i terreni liquidi erano mantenuti in agitazione. Al termine dell'incubazione, le colture liquide erano utilizzate per l'estrazione del plasmide ricombinante utilizzando il

protocollo di estrazione QIAprep® Spin Miniprep Kit modificato per l'estrazione dei plasmidi da lievito. Le cellule venivano centrifugate a 5000 g per 5 min e quindi risospese in 250 µL di Buffer P1 contenente 0,1 mg mL⁻¹ di RNase A. Alla miscela si aggiungevano poi 50 µL di *beads* autoclavate, si agitava per 5 min, e si lasciavano decantare. Il surnatante veniva poi prelevato e addizionato di 250 µL di buffer di lisi P2 per esser incubato a temperatura ambiente per 5 min. Si aggiungevano quindi 350 µL di buffer di neutralizzazione N3 al lisato che in seguito veniva centrifugato alla massima velocità per 10 min e caricato su una colonna QIAprep Spin per un'altra centrifugazione alla massima velocità di 1 min. Il surnatante veniva quindi eliminato, la colonna lavata con 750 µL di buffer PE e la miscela centrifugata nuovamente a massima velocità per 1 min e poi per un ulteriore minuto allo scopo di eliminare eventuali residui del buffer di lavaggio. Il DNA plasmidico isolato veniva infine eluito attraverso un secondo lavaggio della colonna con 25 µL di H₂O distillata e centrifugando per 1 min a velocità massima.

Seguiva la trasformazione di cellule di *E. Coli* rese chimicamente competenti con i plasmidi così ottenuti secondo il protocollo riportato precedentemente. I trasformanti venivano impiegati per inoculare terreni LB liquidi addizionati di ampicillina e le colture cellulari utilizzate per l'estrazione dei plasmidi, secondo i protocolli Quiagen già descritti.

I vettori così estratti erano sottoposti ad analisi di restrizione con l'enzima *HindIII* (Allegato 13a), avente un sito unico di restrizione all'interno del vettore reporter pGADT7-Rec2, e infine a sequenziamento. Le sequenze ottenute venivano inserite in banca dati per verificarne l'omologia con quelle note e analizzate con il programma ClustalW (<http://align.genome.jp/>).

Clonaggio e caratterizzazione funzionale dei membri della famiglia S1Fa

Le reazioni di amplificazione del cDNA, necessarie per il clonaggio dei tre membri della famiglia S1Fa1, erano condotte per PCR su aliquote di 1 µL della miscela così ottenuta e diluita 1:40 con acqua distillata. A tale scopo si preparavano miscele di reazione contenenti cDNA, la coppia di primers specifici per il gene da amplificare, ciascuno in concentrazione 10 mM, dNTPs 2,5 mM, 0,75 U di Pfu DNA polimerasi, il corrispondente buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,8); KCl 100 mM;

(NH₄)₂SO₄ 100 mM; MgSO₄ 20 mM; Triton[®] X-100 1,0%; Nuclease free BSA 1 mg mL⁻¹], e acqua per raggiungere un volume finale di reazione di 25 µL. Le coppie di primers utilizzate per l'amplificazione sono state disegnate sulle sequenze nucleotidiche dei tre membri della famiglia S1Fa1 (At3G53370), S1Fa2 (AT2G37120) e S1Fa3 (At3G09735) disponibili in banca dati TAIR (<http://arabidopsis.info/>). A ciascun campione si aggiungevano due gocce di olio minerale per evitarne l'evaporazione durante i cicli di PCR. Le sequenze dei primers utilizzati e il profilo termico di ciascuna reazione di amplificazione sono riportati in allegato 14. I prodotti di PCR venivano quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel. I frammenti d'interesse venivano eluiti e clonati secondo il protocollo *DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences) e Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen), rispettivamente, precedentemente descritti.

Le colonie positive erano prelevate ed impiegate per inoculare contemporaneamente terreni LB agarizzati e liquidi addizionati di kanamicina, che venivano posti ad incubare per un ulteriore periodo di 12-18 ore a 37 °C. Ultimata la fase di crescita esponenziale le colture liquide venivano utilizzate per l'estrazione dei plasmidi ricombinanti (protocollo Quiagen). I vettori così purificati erano tagliati con l'enzima *EcoRI*, allo scopo di verificare la lunghezza degli inserti clonati, e quindi sottoposti a sequenziamento per verificarne la bontà. La miscela di reazione è riportata in allegato 13b.

Valutazione dell'espressione genica dei membri della famiglia S1Fa

La RT-PCR semi-quantitativa è una tecnica che consente di valutare il livello di espressione di un gene attraverso l'amplificazione del cDNA ottenuto dal corrispondente mRNA. A tale proposito vengono condotte reazioni di amplificazione del cDNA in condizioni non saturanti, dove la quantità di amplificato prodotto risulta proporzionale alla concentrazione di template presente. In questo modo è possibile confrontare i livelli di trascritto di un gene in differenti condizioni sperimentali.

I prodotti di amplificazione della PCR semi-quantitativa sono comparati con quelli ottenuti dall'amplificazione di un gene ad espressione costitutiva, ovvero i cui livelli di trascritto non vengono influenzati dalle diverse condizioni in esame.

L'espressione dei geni appartenenti alla famiglia S1Fa era pertanto confrontata con quella dei geni S16; i retrotrascritti ottenuti da piante diversamente

trattate venivano amplificati in condizioni semi-quantitative a 35 cicli di PCR, adottando le stesse coppie di primers utilizzate per le strategie di clonaggio. Si procedeva alla taratura del sistema variando le quantità di template utilizzata per amplificare i cDNA codificati dai geni S16, in tutte le condizioni prese in esame, allo scopo di ottenere bande quanto più uniformi tra loro. Le quantità di cDNA, così individuate, venivano utilizzate durante le successive analisi condotte sulle sequenze dei geni S1Fa1, S1Fa2 e S1Fa3, allo scopo di evidenziare eventuali differenze di espressione tra le proteine e tra le condizioni prese in esame.

Le reazioni di amplificazione erano condotte tramite reazione di PCR su aliquote di 1 µL di cDNA, ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione e di amplificazione precedentemente condotte sull'RNA estratto dalle radici di *Arabidopsis* allevate in vitro su terreno completo e privo di solfato, e diluito 1:2560 con acqua distillata. La coppia di primers utilizzata per l'amplificazione dei cDNA codificati dai geni S16, le miscele di reazione ed il profilo termico di ciascuna reazione di amplificazione sono riportati in allegato 15. I prodotti di PCR venivano quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

Propagazione della linea mutante SALK_006219.56.00

Allo scopo di ottenere progenie omozigote per l'inserzione del t-DNA, i semi della linea SALK venivano posti in plateau Arabasket (Beta Tech.) da 42 vasetti, su terriccio imbibito con acqua. Il trattamento di vernalizzazione avveniva ponendo il plateau a 4 °C per 4 giorni. Al termine di tale periodo il materiale era trasferito in una camera di crescita, mantenuta a 24 °C e con un fotoperiodo di 12 ore; la densità di flusso fotonico a livello delle piante era pari a 280 µmol m⁻² sec⁻¹. All'emissione dell'infiorescenza le piante venivano incappucciate in modo tale da impedire fenomeni di impollinazione incrociata e garantire l'autofecondazione, e in ogni vasetto veniva posizionato un dispositivo di raccolta dei semi. A maturazione i semi erano raccolti e catalogati a seconda della pianta di origine.

Conferma dell'inserzione e selezione dei mutanti omozigoti

Allo scopo di verificare i risultati relativi al posizionamento del t-DNA venivano condotte reazioni di amplificazione dal DNA impiegando 2 µl del medesimo template utilizzato nei protocolli TAIL-PCR. Le coppie di primer utilizzate erano

composte da oligonucleotidi disegnati uno sulla sequenza del t-DNA e l'altro sulle regioni fiancheggianti l'inserzione. Le sequenze di tali primer, le miscele di reazione e i profili termici di reazione sono riportati in allegato 16. I frammenti ottenuti dopo corsa elettroforetica venivano eluiti, clonati in un vettore e sequenziati.

Per individuare i mutanti omozigoti per l'inserzione, 2 µl di DNA genomico estratto dai singoli individui parentali mantenuti in isolamento riproduttivo erano impiegati in reazioni di amplificazione condotte con le coppie di primer N506219LP/N506219 e N506219LP/LB1.3 (allegato 16a). Le miscele e il profilo di amplificazione utilizzati sono riportati negli allegati 16b e 16c. I prodotti di amplificazione venivano caricati su gel per la corsa elettroforetica, visualizzati su un transilluminatore UV e fotografati. A seconda del numero e della grandezza dei frammenti ottenuti era possibile l'identificazione di piante omozigoti wild-type, omozigoti mutanti o eterozigoti.

Valutazione dell'espressione genica dei geni *at1G12030* sultr1;1 e *s1fa3* in piante *wild type* e omozigoti per l'inserzione della linea Salk_006219.56.00

La valutazione dell'espressione dei geni *At1G12030*, *Sultr1;1* e *S1Fa3* è stata valutata attraverso analisi di RT-PCR semiquantitativa confrontando il loro livello di espressione con quello del gene β -tubulina.

La taratura del sistema veniva condotta variando le quantità di templatò utilizzata per amplificare i cDNA codificanti il gene β -tubulina, in tutte le condizioni prese in esame, allo scopo di ottenere bande quanto più uniformi tra loro. Le quantità di cDNA, così individuate, venivano utilizzate durante le successive analisi. Le coppie di primers utilizzate per l'amplificazione venivano disegnate sulla base delle sequenze nucleotidiche depositate in banca dati per i geni *At1G12030* e *Sultr1;2*; per il gene *S1Fa3* veniva invece utilizzata la stessa coppia di primers utilizzata per il clonaggio sopra descritto. Le coppie di primers utilizzate sono riportate in allegato 14 e 17a. Le miscele di reazione erano preparate aggiungendo alla quantità di cDNA, stabilita durante le prove di taratura, le coppie di primers, ciascuna in concentrazione 10 mM, dNTPs 2,5 mM, 0,75 U di Pfu DNA polimerasi, il corrispondente buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,8); KCl 100 mM; (NH₄)₂SO₄ 100 mM; MgSO₄ 20 mM; Triton[®] X-100 1,0%; Nuclease free BSA 1 mg mL⁻¹], e acqua per raggiungere un

volume finale di reazione di 25 μ L. I profili di amplificazione sono riportati in allegato 17b. I prodotti di PCR venivano quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

Analisi *One-Hybrid* utilizzando come *target* la regione promotrice di 1331 pb del gene *At1G12030*

Preparazione del vettore reporter pHIS2 portante la regione intergenica del gene At1G12030

Un'aliquota del clone di *E. Coli* conservato come glicerinato contenente il plasmide TOPO[®] portante la regione intergenica a monte del gene *At1G12030*, e un'altra aliquota del glicerinato portante il vettore pHIS2 erano impiegate per l'inoculo di terreni LB liquidi addizionati di kanamicina, posti ad incubare a 37 °C in agitazione 12-18 ore. Ultimata la fase di crescita esponenziale le colture liquide venivano utilizzate per l'estrazione dei plasmidi condotta secondo il protocollo *NucleoSpin Plasmid* (QIAGEN), descritto in precedenza.

Allo scopo di costituire il secondo vettore reporter, venivano tagliati con l'enzima di restrizione *EcoRI* sia il vettore pHIS2 sia la regione intergenica del gene *At1G12030*. Le reazioni di restrizione del vettore venivano condotte miscelando 20 μ g di pHIS2, 18 U di *EcoRI*, 5 μ L del corrispondente buffer 10x, 5 μ L di 10x BSA buffer ed H₂O fino a 50 μ L. Parallelamente venivano digeriti 10 μ g del vettore portante la regione intergenica del gene *At1G12030* utilizzando 30 U di enzima. Le reazioni di restrizione erano condotte a 37 °C per 2 ore; seguiva l'inattivazione termica dell'enzima, la purificazione e la concentrazione dei prodotti di digestione secondo i protocolli standard basati sulla ripartizione di fase (fenolo-cloroformio) e sulla precipitazione in alcoli, precedentemente descritti.

La reazione di ligazione era condotta per 3 ore a 22 °C in una miscela costituita da 0,072 μ g del vettore pHIS2, 0,42 μ g della regione intergenica posta a monte del gene *At1G12030*, precedentemente incubato con il vettore a 65 °C per 5 min al fine di permetterne la distensione, 1 μ L di T4 *ligation buffer* 10x, 1 U di T4 DNA ligasi e 2 μ L di H₂O distillata. Al termine dell'incubazione, la ligasi era inattivata termicamente a 65 °C per 10 min.

Al fine di ridurre il numero di falsi positivi nella successiva reazione di trasformazione, la miscela di ligazione precedentemente preparata veniva utilizzata

in una reazione di restrizione con l'enzima *NotI*, in grado di tagliare all'interno del vettore TOPO[®]. La reazione di restrizione era condotta a 37 °C per 2 ore aggiungendo 1 U dell'enzima *NotI*, 2 µL del corrispondente buffer e acqua fino ad un volume finale di reazione di 20 µL.

La reazione di trasformazione di cellule di *E. Coli* rese chimicamente competenti era effettuata tramite shock termico secondo i protocolli precedentemente descritti. I trasformanti venivano piastrati su terreni LB agarizzati addizionati di kanamicina e incubati a 37 °C per 12-18 ore. Al fine di identificare i cloni positivi, le colonie cresciute erano analizzate attraverso reazioni di PCR su colonia. Il protocollo di reazione e le sequenze dei primers utilizzati sono riportati in allegato 18. I cloni individuati come positivi venivano impiegati per inoculare contemporaneamente terreni LB agarizzati e liquidi, che venivano posti ad incubare per un periodo utile ad ultimare la fase di crescita esponenziale delle colture liquide, utilizzate poi per l'estrazione dei plasmidi.

Seguiva l'analisi di restrizione dei plasmidi individuati come positivi utilizzando gli enzimi *EcoRI*, in grado di tagliare alle estremità dell'inserto clonato, *SmaI*, avente un sito unico di restrizione sia all'interno del vettore p^{HIS2} sia all'interno del vettore TOPO[®], e *NotI*, enzima in grado di tagliare solo all'interno del vettore TOPO[®]. Le singole reazioni di restrizione erano condotte su aliquote di 2 µL di plasmide precedentemente estratto. Le miscele di reazione sono riportate in allegato 13b, 13c e 13d.

I frammenti di restrizione erano, quindi, separati mediante elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati su transilluminatore UV. I cloni che venivano tagliati dall'enzima *SmaI* e da *EcoRI*, producendo frammenti di restrizione delle dimensioni attese, ma non dall'enzima *NotI*, erano quindi individuati come positivi.

Determinazione della concentrazione ottimale di inibitore 3AT da utilizzare nelle fasi di screening

Al fine di individuare la concentrazione di inibitore 3AT in grado di minimizzare il background di crescita durante l'analisi one-hybrid, le cellule di lievito Y187 venivano trasformate, secondo il protocollo precedentemente descritto, con il solo vettore reporter p^{HIS2} portante la regione intergenica a monte del gene At1G12030. I trasformanti ottenuti venivano trasferiti su terreni SD/-His/-Leu/-Trp addizionati di 3AT concentrato 50 e 100 mM. Le piastre erano quindi incubate a 30

°C per 4 giorni.

Trasformazione

La library di cDNA e la trasformazione venivano condotte nelle medesime condizioni descritte precedentemente. Le colonie positive venivano prelevate con un'ansa e stemperate in 200 µL di H₂O. 10 µL di ogni colonia venivano depositi su terreni SD/-His/-Trp/-Leu addizionati di 3AT in concentrazione di 100 e 150 mM. Le piastre erano incubate a 30°C per 5 giorni e osservate giornalmente. L'analisi delle colonie che emergevano veniva condotta nel medesimo modo utilizzato nel lavoro di screening sopra descritto.

Co-trasformazione

Il vettore pHIS2 portante la regione intergenica di 1331 pb veniva utilizzato per co-trasformare il ceppo di lievito Y187 unitamente al vettore reporter di espressione pGADT-Rec2 portante il gene codificante per la proteina S1Fa3, ottenuto dalla precedente analisi one-hybrid. La reazione di co-trasformazione era condotta per 30 min a 30 °C in una miscela costituita da 0,5 µg di entrambi i vettori, 50 µg di Herring Testes Carrier DNA precedentemente denaturato, 50 µL di cellule di lievito Y187 chimicamente competenti e 500 µL di soluzione di PEG/LiAc. La miscela di reazione era miscelata, durante il periodo d'incubazione, ad intervalli di 10 min. Addizionati 20 µL di DMSO, la miscela veniva mantenuta in agitazione termostata a 42 °C per 15 min. In seguito le colture erano pellettate alla massima velocità per 15 sec, il surnatante eliminato e le cellule risospese in 1 mL di terreno YPD Plus Liquid Medium. Le cellule venivano incubate in un bagnetto termostato a 30 °C e in agitazione (265 rpm) per 90 min, passati i quali venivano centrifugate per 15 sec alla velocità massima e risospese in 1 mL di NaCl (0,9 %). Un'aliquota (100 µL) dei trasformanti così ottenuti e diluiti di un fattore 10 e 100 venivano infine piastrati su terreni agarizzati SD/-Leu/-Trp, SD/-His/-Leu/-Trp e SD/-His/-Leu/-Trp + 3-AT 50 mM. Le piastre venivano quindi incubate a 30° per 4 giorni.

Preparazione dei vettori reporter pHIS2 portanti i frammenti della regione di 1331 pb promotrice del gene At1G12030

Allo scopo di individuare quale zona della regione di 1331 pb fosse coinvolta nel legame con la proteina ERF15 sono stati costruiti 7 vettori reporter. Le reazioni

di amplificazione del plasmide TOPO portante la regione erano condotte per PCR su aliquote di 2 μL del vettore diluito 1:100 con acqua distillata. A tale scopo si preparavano miscele di reazione contenenti vettore, la coppia di primers specifici per il frammento da amplificare, ciascuno in concentrazione 10 mM, dNTPs 2,5 mM, 0,75 U di Pfu DNA polimerasi, il corrispondente buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,8); KCl 100 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM; MgSO_4 20 mM; Triton[®] X-100 1,0%; Nuclease free BSA 1 mg mL⁻¹], e acqua per raggiungere un volume finale di reazione di 25 μL . Le coppie di primers utilizzate per l'amplificazione sono state disegnate sulle sequenze nucleotidiche della regione. A ciascun campione si aggiungevano due gocce di olio minerale per evitarne l'evaporazione durante i cicli di PCR. Le sequenze dei primers utilizzati e il profilo termico di ciascuna reazione di amplificazione sono riportati in allegato 19a e b. I prodotti di PCR venivano quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel. I frammenti d'interesse venivano eluiti secondo il protocollo *DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences). Parallelamente il vettore pHIS2 veniva tagliato con l'enzima di restrizione *SmaI* per il clonaggio. La reazione di restrizione veniva condotta miscelando 9 μg di pHIS2, 10 U dell'enzima *SmaI*, 2 μL di 10x KGB Buffer [potassium acetate 1 M; Tris-acetate 0.25 M (pH 7,6); magnesium acetate 0.1 M; 2-mercaptoethano 15 mM; BSA 0.1 mg mL⁻¹] e H₂O fino a un volume finale di 20 μL . La miscela di restrizione era mantenuta a 30 °C per 2 ore; seguiva l'inattivazione termica degli enzimi aggiungendo alla reazione di digestione Na-EDTA per una concentrazione finale 5 mM e incubando a 65 °C per 20 min. Il prodotto di digestione veniva eluito secondo il protocollo *DNA and gel band purification kit* (Amersham Biosciences), purificato e concentrato. Al campione veniva aggiunta acqua, fino ad un volume finale di 500 μL , e 500 μL di una miscela fenolo:cloroformio:isoamilalcol (25:24:1; v/v/v). Si centrifugava a 13000 g per 10 minuti, per favorire la separazione delle fasi. L'epifase (400 μL circa) era quindi recuperata e veniva miscelata con 1 mL di etanolo assoluto e 40 μL di sodio acetato 3 M, per consentire la precipitazione degli acidi nucleici e la miscela veniva lasciata a -20 °C per 30 min. Si centrifugava quindi a 13000 g per 20 minuti, a 4 °C, e si eliminava il liquido surnatante. Si lavava il pellet in 1 mL di etanolo al 70% (v/v) e si centrifugava a 13000 g. Il pellet ottenuto veniva asciugato sottovuoto, fino alla completa evaporazione dell'etanolo residuo, per poi essere risospeso in 20 μL di acqua.

La ligazione era condotta per 8 h ore a 16 °C in una miscela costituita dal vettore digerito e inserito in rapporto 1:3 o 1:10, 2µL di T4 *ligation buffer* 10x, 1 U di T4 DNA ligasi e H₂O fino a un volume di 10 µL. La reazione di ligazione veniva poi continuata a 4 °C per 16 ore. La reazione di ligazione era terminata a 75°C per 10 min. Alla miscela di ligazione venivano aggiunti 2 µL di Buffer 10x (25 mM Tris-Acetato, pH 7,5, 100 mM potassio acetato, 10 mM magnesio acetato, 1 mM DTT), 1 U di SmaI e H₂O fino ad un volume di 20 µL. La reazione di restrizione era condotta per 1h e 30 min a 37°C e terminata a 75°C per 10 min.

La reazione di trasformazione era condotta aggiungendo 10 µL della reazione di ligazione ad una aliquota di cellule di *E. Coli* chimicamente competenti, e veniva mantenuta in ghiaccio per un periodo di 15 min. Seguiva quindi uno shock termico a 42 °C per 1 min, al termine del quale le cellule venivano immediatamente riposte in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 1 mL di terreno liquido LB, le cellule erano incubate a 37 °C per 1 ora mantenendole in agitazione. Le cellule venivano centrifugate per 5 min ad una velocità di 4000 g e quindi risospese in 200 µL di terreno LB, e infine trasferite su piastre di LB agarizzato (100 µL piastra) addizionato di kanamicina (50 µg mL⁻¹), che venivano incubate a 37 °C per 16 ore. Il vettore pHIS2 porta il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina pertanto le uniche cellule in grado di crescere su terreno addizionato di tale antibiotico erano quelle contenenti il vettore.

Le colonie positive erano prelevate ed impiegate per inoculare contemporaneamente terreni LB agarizzati e liquidi, posti ad incubare per un ulteriore periodo di 12-18 ore a 37 °C. Ultimata la fase di crescita esponenziale le colture liquide venivano utilizzate per l'estrazione del plasmide ricombinante. I plasmidi ricombinanti erano isolati con il protocollo *NucleoSpin Plasmid* (QIAGEN).

Co-trasformazione

I vettori pHIS2 portanti i 7 frammenti della regione intergenica di 1331 pb venivano utilizzati per co-trasformare il ceppo di lievito Y187 sia unitamente al vettore *reporter* di espressione pGADT-Rec2 portante il gene codificante per la proteina ERF15, ottenuto dalla precedente analisi one-hybrid, sia da soli. Le reazioni di trasformazione erano condotte per 30 min a 30 °C in una miscela costituita da 0,5 µg di entrambi i vettori o del singolo vettore *reporter*, 50 µg di Herring Testes Carrier DNA precedentemente denaturato, 50 µL di cellule di lievito Y187 chimicamente competenti e 500 µL di soluzione di PEG/LiAc. Le miscele di

reazione erano miscelate, durante il periodo d'incubazione, ad intervalli di 10 min. Addizionati 20 μ L di DMSO, le miscele venivano mantenute in agitazione termostata a 42 °C per 15 min. In seguito le colture erano precipitate alla massima velocità per 15 sec, il surnatante eliminato e le cellule risospese in 1 mL di terreno YPD Plus Liquid Medium. Le cellule venivano incubate in un bagnetto termostato a 30 °C e in agitazione (265 rpm) per 90 min, passati i quali venivano centrifugate per 15 sec alla velocità massima e risospese in 1 mL di NaCl (0,9 %). Un'aliquota (100 μ L) dei trasformanti così ottenuti e diluiti di un fattore 10 e 100 venivano infine piastrate su un terreno agarizzato SD/-His/-Trp addizionati con 3AT in concentrazione 3AT 150 mM. Le piastre venivano quindi incubate a 30° per 4 giorni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Effetto dell'esposizione a Cd sui livelli di trascritto delle diverse varianti alleliche del gene *BjST1;2*.

Brassica juncea è una specie anfidiplioide naturale che possiede i corredi cromosomici di entrambe le specie ancestrali che la hanno generata a seguito di incrocio interspecifico: *Brassica nigra* e *Brassica campestris*. La complessità del genoma di *B. juncea*, soprattutto in relazione alla presenza di geni duplicati, potrebbe aver consentito l'accumulo di mutazioni altrimenti eliminate dalla selezione naturale. Questa caratteristica potrebbe riflettersi in una maggiore plasticità nelle risposte a diversi stress tra cui quello derivante dall'esposizione a metalli pesanti (Wagner 2001).

Numerosi studi hanno dimostrato come un fenomeno di poliploidizzazione sia solitamente seguito da fenomeni di rimozione o silenziamento del materiale genico ridondante. La perdita differenziale di geni sembra essere responsabile della deviazione nella co-linearità tra specie filogeneticamente vicine. Lavori in mais hanno evidenziato che circa la metà dei geni duplicati è stata persa in 11 milioni di anni dopo che l'evento di poliploidizzazione aveva dato origine al progenitore ancestrale (Adams e Wendel 2005). Analisi sui più recenti fenomeni di duplicazione di *Arabidopsis* hanno contribuito a spiegare i meccanismi attraverso i quali i geni vengono eliminati, silenziati o conservati. Da questi lavori è emerso che alcune classi di geni, come quelle coinvolte nella trascrizione e trasduzione del segnale, sono preferenzialmente conservate mentre altre classi, come quelle coinvolte nella riparazione del DNA, sono perse. Inoltre questi lavori hanno sottolineato come entrambe le copie di un gene possano essere conservate nel caso in cui uno dei due alleli acquisisca una nuova funzione (Adams e Wendel 2005; Moore e Purugganan 2005; Osborn *et al.* 2003). Questa ipotesi è stata confermata da alcuni lavori condotti su cotone; amplificando 40 geni omologhi in piante di cotone tetraploidi naturali o sintetiche si sono, infatti, evidenziate numerose differenze di espressione in vari organi. Le differenze erano riscontrate sia nel tessuto sia nel momento di espressione dell'allele. Questo tipo di risultato suggerisce che i geni abbiano raggiunto un'alta specificità di espressione (Adams *et al.* 2003).

Il gene *BjST1;2* codifica per un trasportatore del solfato ad alta affinità di *Brassica juncea*; i livelli di trascritto di tale trasportatore aumentano sia in condizioni di solfocarenza sia in presenza di cadmio (Crema 2007, tesi di dottorato). Vista la

configurazione cromosomica di *Brassica juncea* è possibile ipotizzare la presenza di un massimo di quattro differenti alleli per questo trasportatore e possibili differenze nelle loro risposte trascrizionali ai vari stimoli ambientali. Si è quindi deciso di ricercare comportamenti differenziali nella modulazione delle risposte trascrizionali dei geni ortologi a *BjST1;2* presenti sui due set cromosomici della specie in presenza di cadmio. L'analisi delle sequenze precedentemente ottenute durante le procedure di clonaggio di *BjST1;2* ha evidenziato la presenza di sequenze nucleotidiche polimorfiche; i confronti tra le diverse sequenze ottenute sono mostrati nella figura 1 (Crema 2007, tesi di dottorato). Dalle sequenze nucleotidiche parziali sono state dedotte le corrispondenti sequenze amminoacidiche; il confronto delle diverse sequenze mostrava un'identità amminoacidica pressoché totale (Figura 2). Queste osservazioni, insieme alle considerazioni sulle caratteristiche di ploidia di *B. juncea*, hanno suggerito che per *BjST1;2* fossero stati clonati tre diversi geni, allelici e/o ortologi, presenti sui due set cromosomici della specie. Per convenzione i cloni verranno successivamente indicati come allele *a*, *b* e *c*.

Eventuali comportamenti differenziali nell'attività di trascrizione degli alleli di *BjST1;2* presenti sui due set cromosomici della specie sono stati ricercati sia utilizzando tecniche di RT-PCR semiquantitativa accoppiate all'uso di enzimi di restrizione, sia determinando le frequenze di ligazione dei prodotti di amplificazione dei retrotrascritti di ciascun ortologo.

I cDNA ottenuti da radici di piante allevate in soluzioni nutritive complete ed esposte a Cd^{2+} 10 μM per 48 h venivano amplificati in condizioni non saturanti utilizzando la stessa coppia di primer utilizzata per il clonaggio, che permetteva l'amplificazione di tutti e tre gli alleli. Come evidenziato in precedenti lavori, i livelli di trascritto di *BjST1;2* aumentavano nella condizione di esposizione a cadmio rispetto al controllo (Figura 3a). Le analisi successive erano condotte per restrizione su questi prodotti di amplificazione utilizzando l'enzima *ClaI* che, grazie alla presenza di polimorfismi nelle sequenze nucleotidiche dei tre alleli, permette di discriminarli. Il trattamento con *ClaI*, infatti, produceva frammenti di dimensione diversa a seconda dell'allele: le reazioni di restrizione restituivano due frammenti di 177 bp e 870 bp nel caso di *BjST1;2a*, due frammenti di 255 bp e di 792 bp nel caso di *BjST1;2b*, ed un unico frammento di 1047 bp nel caso di *BjST1;2c*, che non veniva tagliato. I risultati ottenuti mostravano un aumento dell'intensità delle bande corrispondenti alla variante *BjST1;2a* in seguito all'esposizione a cadmio.

Diversamente, l'intensità delle bande relative a *BjST1;2b* e *BjST1;2c* sembrava costante, suggerendo che l'incremento nei livelli di trascritto di *BjST1;2* fosse imputabile al solo allele *a* (Figura 3b). Queste osservazioni sono state confermate determinando le frequenze di ligazione dei prodotti di amplificazione dei retrotrascritti di ciascun ortologo, analizzando per PCR più di cento colonie per ogni condizione. In seguito a esposizione a cadmio la frequenza di ligazione di *BjST1;2a* passava dal 4 % del controllo al 15 %, quella di *BjST1;2b* dal 25 % al 33 % e quella di *BjST1;2c* dal 71 % al 52 % (Allegato 5).

I risultati nel loro insieme suggeriscono che l'incremento nei livelli di trascritto di *BjST1;2*, e il conseguente aumento della capacità delle radici di assumere solfato dal mezzo di crescita osservato in presenza di cadmio (Crema 2007, tesi di dottorato), siano prevalentemente riconducibili ad una modulazione pre-traduzionale dell'allele *a* di *BjST1;2*.

La differente risposta trascrizionale dei 3 alleli/ortologi in presenza di cadmio potrebbe essere imputabile a differenze di sequenza nella regione promotrice dei tre geni; tali differenze di sequenza potrebbero coinvolgere diverse box di regolazione ed essere quindi responsabili delle differenti risposte trascrizionali evidenziate.

Identificazione della regione promotrice del gene *BjST1;2*

Allo scopo di indagare sui comportamenti differenziali sopra descritti si è deciso di clonare i promotori dei tre alleli/ortologi del gene *BjST1;2* utilizzando protocolli di TAIL (*Thermal Asymmetric Inter-Laced*)-PCR (Allegato 6; Liu *et al.* 1995). Per l'amplificazione è stato utilizzato un primer degenerato che si appaia in punti casuali del genoma e tre primers specifici per il trasportatore del solfato usati in amplificazioni successive. La tecnica consente quindi di ottenere nei diversi cicli ampliconi di dimensioni ignote (in quanto strettamente dipendenti dall'appaiamento del primer degenerato con il template) che tuttavia differiscono nelle loro lunghezze per un numero di basi noto. Il template utilizzato per l'amplificazione era il DNA estratto da piante di *B. juncea* allevate in soluzione nutritiva completa. I prodotti di PCR di lunghezza attesa venivano clonati e inviati al sequenziamento; tuttavia i ferogrammi restituiti risultavano illeggibili dopo le prime 200 pb su entrambe le estremità. Tale risultato ha portato alla formulazione di due differenti ipotesi: 1) la

presenza di una popolazione di cloni; 2) la presenza di sequenze complementari ripetute e invertite alle estremità dei cloni. In entrambi i casi, infatti, il ferogramma risulterebbe illeggibile a causa della sovrapposizione di segnali, dovuta alla presenza di due differenti cloni nella miscela di sequenziamento, nel caso della prima ipotesi, o all'appaiamento del primer usato nel sequenziamento in due diversi punti del clone, nel caso della seconda ipotesi. La prima ipotesi è stata smentita da analisi di restrizione condotte sui cloni: utilizzando diverse endonucleasi di restrizione e analizzando i prodotti ottenuti su gel di agarosio non erano evidenziabili differenze imputabili alla presenza di differenti tipi di cloni. La seconda ipotesi è stata invece valutata suddividendo il clone in 3 frammenti, sia mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione sia amplificando una regione del clone utilizzando una coppia di primers interni (Figura 4). I frammenti così ottenuti venivano clonati e inviati al sequenziamento permettendo la ricostruzione del clone (Figura 5). Dalla ricostruzione si evidenziava che la sequenza promotrice clonata era quella dell'allele *BjST1;2c* e si confermava l'ipotesi relativa alla presenza di sequenze ripetute invertite alle sue estremità. All'estremità 5' era infatti presente una sequenza avente una alta similarità con quella del gene *BjST1;2*, priva però del codone inizio e per questo presumibilmente non tradotta. All'estremità 3' era invece identificabile la sequenza del gene *BjST1;2c* identificata precedentemente (Figura 6).

L'analisi del promotore di *BjST1;2c*, condotta *in silico*, ha evidenziato la presenza di 3 elementi SURE (Figura 5). Questo elemento identificato nel promotore di *AtSultr1;1* di *Arabidopsis thaliana* è una sequenza in grado di indurre l'espressione di un gene *reporter* in esperimenti di minimal promoter in condizioni di solfocarenza (Maruyama-Nakashita *et al.* 2005). La presenza di questo elemento ha suggerito l'ipotesi di concentrare i successivi studi su questo *cis acting element* e in particolare sulla ricerca di *trans acting elements* in grado di riconoscerlo, e quindi in grado di modulare l'espressione del gene in condizioni di bassa disponibilità di solfato e/o presenza di cadmio. Inoltre la complessità del genoma di *Brassica juncea* avrebbe reso il clonaggio delle regioni promotrici degli alleli *BjST1;2a* e *BjST1;2b* difficile e laboriosa.

Identificazione di trans-acting element in grado di interagire con l'elemento SURE

Principio della tecnica one-hybrid

Per identificare i *trans acting elements* in grado di interagire con l'elemento SURE si è scelto di utilizzare la tecnica *one-hybrid* in *Saccharomyces cerevisiae*. L'approccio *one-hybrid* è basato sul fatto che molti attivatori trascrizionali degli eucarioti presentano domini di legame al DNA e domini di attivazione (AD) fisicamente e funzionalmente separati. Tale caratteristica consente in molti casi di poter costruire proteine di fusione in grado di legare una sequenza target e contemporaneamente di attivare la trascrizione di un gene reporter. Questo approccio permette, sfruttando un sistema di espressione eterologa, di individuare, all'interno di una *library* di cDNA di fusione, putative DNA *binding protein* in grado di interagire con una sequenza *target* e, nel contempo, di trans-attivare la trascrizione di un gene reporter. L'uso della sequenza SURE in qualità di elemento *target* dovrebbe quindi permettere l'individuazione dei putativi fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione delle risposte trascrizionali delle piante alla solfocarenza (Figura 7).

L'applicazione di questa tecnica prevede la costruzione di un vettore denominato *reporter* e di una *library* di espressione di fusione portante i cDNA espressi dalla pianta in un determinato momento, ad esempio in condizioni di solfocarenza. Il vettore *reporter* presenta diversi elementi fondamentali: i) un gene *reporter* in grado di evidenziare possibili interazioni fra una proteina eterologa e l'elemento *target*; ii) un promotore minimo in grado di mediare la trascrizione del gene *reporter* in particolari condizioni; iii) un elemento *target* (porzioni della sequenza di un promotore o singoli elementi *cis-acting*), in grado di funzionare in qualità di "antenna" nella ricezione di proteine capaci di legarlo.

La contemporanea presenza in una cellula di lievito di un vettore *reporter* e di un vettore di espressione portante una chimera costituita da un cDNA codificante per una proteina capace di interagire con il *target* e un attivatore trascrizionale di lievito, dovrebbe condurre alla trans-attivazione del gene *reporter*, che evidenzierà in questo modo la presenza di una putativa DNA *binding protein* nell'ospite.

In questo lavoro sono stati costruiti e utilizzati due differenti vettori *reporter* portanti due diverse regioni *target*: i) l'elemento SURE; ii) una porzione di 1331 pb del putativo promotore del gene At1G12030 di *Arabidopsis thaliana*, codificante una

proteina a funzione sconosciuta, precedentemente identificata (Lancilli 2008, tesi di dottorato). Tale regione è in grado di promuovere la trascrizione di un gene *reporter* in condizioni di solfocarenza e presenta al suo interno l'elemento SURE.

Applicazione della tecnica one-hybrid utilizzando come target l'elemento SURE

La tecnica *one-hybrid* prevede tre distinte fasi:

- i) realizzazione del vettore *reporter* portante l'elemento SURE come *target*;
- ii) costruzione della *library* di fusione;
- iii) trasformazione del ceppo Y187 di *Saccharomyces cerevisiae* e *screening* dei positivi.

i) Realizzazione del vettore reporter portante l'elemento SURE.

In qualità di vettore *reporter* si è utilizzato il vettore pHIS2; (Figura 8a). Tale vettore presenta nella sua sequenza un promotore minimo (PminHIS3) ed il gene *HIS3* come *reporter*. Questo gene appartiene alla via di biosintesi dell'istidina e consente transattivandosi di revertire l'auxotrofia per questo amminoacido del ceppo Y187 (MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *met-*, *URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-LacZMEL1*; Harper *et al.* 1993), ripristinandone la capacità di crescere su terreni selettivi privi di istidina. Per la costruzione del vettore *reporter* pHIS2 portante l'elemento SURE sono stati sintetizzati due oligonucleotidi costituiti da tre ripetizioni dell'elemento in orientamento senso e antisenso; la reiterazione dell'elemento porta ad un aumento della probabilità di interazione tra il *cis acting element* e un'eventuale *DNA binding protein* (Gosch *et al.* 1993). All'estremità dell'oligonucleotide senso sono stati inoltre inseriti due adattatori che permettevano il clonaggio direzionale dell'oligonucleotide, sfruttando i siti di taglio riconosciuti dagli enzimi di restrizione *EcoRI* e *SacI*. I due oligonucleotidi sono stati fatti appaiare e clonati all'interno del *Multiple Cloning Site* (MCS) del vettore pHIS2 preventivamente tagliato con le endonucleasi di restrizione *EcoRI* e *SacI* per permettere il clonaggio direzionale. La strategia impiegata per la realizzazione del vettore reporter è riportata schematicamente in figura 9.

Per selezionare quali vettori avessero legato l'oligonucleotide si è utilizzata la miscela di ligazione per trasformare ceppi competenti di *E. coli*, che sono stati successivamente piastrati su terreni selettivi addizionati con kanamicina. La presenza dell'antibiotico permetteva la selezione dei ceppi portanti il vettore pHIS2 nelle sue

forme circolare nativa e ricombinante. Per l'individuazione dei ceppi portanti il solo vettore ricombinante si è proceduto all'isolamento dei vettori ed alla loro analisi elettroforetica dopo restrizione con l'endonucleasi *SmaI*. La presenza di un sito di restrizione per questo enzima nel MCS del vettore pHIS2 circolare e non nel vettore ricombinante, perché eliminato dalla presenza dell'oligonucleotide, permetteva di discriminare le due forme del plasmide.

ii) Costruzione della library di fusione.

Per la realizzazione della *library* di fusione è stato utilizzato il cDNA ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione dell'RNA totale estratto da radici di piante di *Arabidopsis thaliana* allevate in condizioni di limitata disponibilità solfato (10 μ M). Tale condizione dovrebbe favorire la comparsa e/o l'accumulo di trascritti coinvolti nei processi di regolazione trascrizionale dei geni solfo-responsivi, aumentando, quindi, le probabilità di successo nella fase di *screening*.

L'RNA estratto dalle radici è stato retrotrascritto utilizzando un protocollo (SMARTTM technology) che permette l'inserimento alle estremità dei cDNA sintetizzati di adattatori in grado di mediare la loro ricombinazione omologa con il vettore di espressione pGADT7-Rec2 (Figura 8b). Il protocollo di costituzione della *library* è riportato in figura 10. Il vettore di espressione pGADT7-Rec2 è caratterizzato dalla presenza del dominio di attivazione GAL4AD necessario per l'attivazione del gene *reporter*, espresso in fusione con la proteina codificata dal cDNA. In questo vettore sono presenti anche i geni marcatori *Amp^r*, per la selezione di *E. coli*, e *LEU2*, per la reversione dell'auxotrofia per la leucina del ceppo di lievito Y187.

iii) Trasformazione del ceppo Y187 di *Saccharomyces cerevisiae* e screening dei positivi.

Il vettore *reporter* pHIS2 portante l'elemento SURE è stato preventivamente provato nel ceppo Y187 per la sua potenziale capacità di interagire con proteine endogene del lievito che potrebbero portare all'espressione costitutiva del gene *reporter* HIS3 e, quindi, alla riattivazione metabolica dell'ospite, generando numerosi falsi positivi nelle successive fasi di *screening*. A tale scopo, i ceppi trasformati con il vettore ricombinante sono stati piastrati su terreni privi di istidina e selettivi per il vettore, privi cioè di triptofano; infatti il vettore pHIS2 codifica per il

gene *TRP1* ed è quindi in grado di revertire l'auxotrofia del lievito per tale aminoacido. I terreni erano inoltre addizionati con diverse quantità di 3-amino-1,2,4-triazole (3AT), un inibitore dell'attività della proteina HIS3 del lievito. Nello specifico, i ceppi trasformanti sono stati piastrati in presenza di concentrazioni di 3AT comprese fra 10 e 60 mM ed i loro comportamenti di crescita sono stati osservati per un periodo di 4 giorni. I risultati ottenuti hanno mostrato che i ceppi trasformanti erano in grado di sostenere la crescita su terreno selettivo privo di 3AT; la presenza dell'inibitore nel terreno riduceva la velocità di crescita dei ceppi in modo concentrazione dipendente, fino alla concentrazione di 40 mM, al di sopra della quale non era possibile osservare alcuna colonia sulla superficie del terreno (Figura 11). Sulla base di queste informazioni si è deciso di condurre la successiva fase di *screening* utilizzando terreni selettivi contenenti una concentrazione di 3AT pari a 40 mM. Tale concentrazione, infatti, consentiva una minima e lenta crescita aspecifica dei ceppi (colonie di dimensioni inferiori ad 1 mm dopo 4 giorni di incubazione), senza determinare eccessive pressioni selettive che avrebbero potuto portare all'affermarsi di ceppi revertenti per mutazione.

La fase di *screening* è stata condotta sui ceppi Y187 cotrasformati con una miscela contenente il vettore *reporter* e l'intera *library* di fusione. I trasformanti così ottenuti erano piastrati su terreni selettivi per i due vettori e privi di istidina, addizionati con 3AT 40 mM per poi essere analizzati nei loro comportamenti di crescita per un periodo di 4 giorni. Parallelamente i trasformanti erano piastrati anche su 2 terreni controllo privi di Leu o Leu e Trp e quindi selettivi rispettivamente per il solo vettore di espressione o per entrambi i vettori. Tale controllo è necessario per valutare sia il titolo della *library* sia l'efficienza di trasformazione. Anche in questo caso la crescita era osservata per un periodo di 4 giorni. Al termine del periodo di incubazione si passava alla conta delle colonie sui terreni controllo per calcolare l'efficienza di trasformazione e il titolo della *library* utilizzando la seguente formula: $[(\text{numero colonie} \times \text{fattore di diluizione}) / \text{volume piastrato in mL}] \times \text{volume di risospensione dei trasformati}$. Da tale calcolo risultava che il titolo della *library* era $2,34 \times 10^6$ (il valore consigliato è maggiore di 1×10^6), e l'efficienza di trasformazione $1,07 \times 10^6$, (il valore consigliato è maggiore di 3×10^5), permettendo di affermare la buona riuscita tecnica dell'esperimento. Dallo *screening* dei trasformati sono state ottenute 15 colonie ritenute positive sulla base della loro velocità di crescita e del diametro da queste raggiunto al termine del periodo di osservazione. Tali colonie

sono state successivamente isolate, sub-colturate su terreni selettivi, per poi essere analizzate per la presenza di vettori ricombinanti pGAD7-Rec2. La selezione dei vettori di interesse avveniva in cellule di *E. coli* piastrate su terreni selettivi contenenti ampicillina. I vettori così selezionati sono stati sequenziati allo scopo di risalire all'identità dei cDNA responsabili della trans-attivazione del gene *reporter* HIS3. I risultati ottenuti relativamente al sequenziamento dei cloni ed all'analisi delle loro sequenze sono riportati in figura 12. La maggior parte delle sequenze ottenute codificava per proteine non identificabili come fattori di trascrizione e quindi non direttamente associabili alla regolazione dell'espressione genica in solfocarenza, oppure per proteine a funzione sconosciuta. Tuttavia, il clone numero 7 (*At3G09735*) presentava alcune caratteristiche interessanti per poter essere eletto come putativo elemento del sistema di regolazione trascrizionale dei geni solfo-responsivi. *At3G09735*, infatti, codifica per un putativo fattore di trascrizione, S1Fa3, a funzione tuttora sconosciuta, appartenente ad una piccola famiglia genica di fattori di trascrizione (S1Fa). Questa famiglia si ritrova altamente conservata sia nelle monocotiledoni sia nelle dicotiledoni. In *Arabidopsis thaliana* risulta composta da soli tre elementi, codificanti per proteine di circa 70 amminoacidi, caratterizzate dalla presenza di un dominio basico contenente un segnale di localizzazione nucleare ed un putativo sito di legame al DNA (Figura 13).

La famiglia multigenica S1Fa

La struttura altamente conservata delle proteine appartenenti alla famiglia S1Fa di *Arabidopsis thaliana*, ha condotto alla formulazione dell'ipotesi che tutti i membri del gruppo potessero essere coinvolti nella regolazione delle risposte trascrizionali della pianta alla solfocarenza. Allo scopo di indagare su questa ipotesi sono stati definiti i profili di espressione dei singoli membri della famiglia multigenica in radici di piante allevate *in vitro* in condizioni di diversa disponibilità di solfato (1500 μ M o 10 μ M) per 15 giorni. L'analisi di espressione è stata condotta per RT-PCR, impiegando come template il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA estratto dalle radici. Le coppie di *primers* utilizzate per questi esperimenti sono state disegnate sulla base delle informazioni di sequenza disponibili in banca dati (<http://www.arabidopsis.org/>). Le sequenze dei membri della famiglia S1Fa di *A. thaliana* sono riportate nelle figure 14a, b e c. L'identità di ciascun prodotto di

amplificazione è stata preventivamente verificata attraverso il clonaggio ed il successivo sequenziamento dei cDNA amplificati. I risultati ottenuti mostravano profili di espressione differenziale relativamente ai trascritti dei tre membri della famiglia (Figura 15). In particolare, i trascritti di *SIFa1* e *SIFa3* tendevano ad accumularsi in condizione di limitazioni da solfato (10 micro), mentre quello di *SIFa2* non risultava amplificabile nelle condizioni sperimentali adottate.

I particolari profili di espressione di *SIFa1* e *SIFa3*, ed in particolar modo la loro capacità di rispondere alle concentrazioni di solfato nel mezzo di allevamento, suggeriva che le proteine codificate da questi geni potessero essere coinvolte, in qualità di fattori di trascrizione, nei processi di regolazione delle risposte delle radici alla solfocarenza.

Linee mutanti per il gene S1Fa3

Per ottenere maggiori informazioni sul ruolo della proteina S1Fa3 nel possibile controllo delle risposte trascrizionali alla solfocarenza è stata studiata la linea mutante, per inserzione di T-DNA, SALK_006219.56.00 (Scholl *et al.* 2000).

La collezione SALK è stata generata infettando piante di *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Colombia, con un ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* trasformato con il vettore pROK2 (Figura 16; Scholl *et al.* 2000). La linea SALK_006219.56.00 è classificabile come popolazione segregante ottenuta per autofecondazione di individui eterozigoti per l'inserzione del T-DNA. All'interno della linea analizzata è quindi, in linea teorica, possibile riscontrare la presenza di individui *wild-type* ed individui mutanti eterozigoti ed omozigoti per l'inserzione. Allo scopo di individuare gli omozigoti si è proceduto a testare i semi prodotti per autofecondazione da distinti individui della popolazione per le loro caratteristiche di resistenza alla kanamicina, realizzando una selezione a favore del T-DNA, che conferisce un carattere dominante di resistenza all'antibiotico. Con questa metodologia è stata valutata la segregazione della resistenza all'antibiotico nella progenie di 12 individui della linea, classificando un caso come individuo omozigote mutante per l'inserzione (100 % di resistenza all'antibiotico), cinque casi come eterozigoti (segregazione 3:1 KAN^R : KAN^S), ed infine due casi come omozigoti *wild-type* (100% di sensibilità all'antibiotico).

Allo scopo di confermare i risultati ottenuti dalle analisi di segregazione sono state condotte ulteriori indagini per PCR sul DNA genomico estratto dai singoli individui parentali che hanno fornito la progenie testata su kanamicina. Sono state utilizzate coppie di primer formate o da un primer specifico per la sequenza fiancheggiante l'inserzione e un primer specifico per il T-DNA, o da due primer specifici per le sequenze fiancheggianti l'inserzione. I risultati ottenuti hanno confermato quelli delle prove di segregazione su kanamicina, mostrando prodotti di amplificazione di dimensioni attese in tutti i casi analizzati.

La progenie degli individui omozigoti per l'inserzione del T-DNA veniva seminata su terriccio e confrontata con quella di individui *wild-type* al fine di evidenziarne possibili differenze fenotipiche (Figura 17). L'analisi così condotta ha evidenziato l'assenza di differenze fenotipiche macroscopiche fra le linee mutanti e i *wild-type*.

Risposte trascrizionali alla solfocarenza di piante mutanti nel gene S1Fa3

Per valutare quale possa essere il contributo della proteina S1Fa3 nella regolazione delle risposte della pianta alla solfocarenza sono stati condotti esperimenti su piante *wild-type* e omozigoti per l'inserzione allevate per 15 giorni su terreni agarizzati caratterizzati da buona (1500 μM) o limitata (50 μM e 10 μM) disponibilità di solfato. Sul cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA estratto dalle radici di queste piante si sono condotte analisi di RT-PCR allo scopo di valutare i profili di espressione dei geni *AtSultr1;1* e *At1G12030*; entrambi questi geni risultano, infatti, variare i loro livelli di trascritto in risposta alla solfocarenza e presentano nelle loro regioni promotrici l'elemento SURE (Lancilli 2008, tesi di dottorato; Maruyama-Nakashita *et al.* 2005). Le coppie di *primers* utilizzate per l'amplificazione sono state disegnate sulla base delle informazioni di sequenza disponibili in banca dati (<http://www.arabidopsis.org/>).

In particolare, il livello di trascritto dei due geni nelle piante *wild-type* e mutanti aumentava progressivamente al diminuire della concentrazione di solfato nel mezzo di allevamento (Figura 18). Tuttavia, le risposte del mutante alla limitazione di solfato risultavano meno evidenti rispetto a quelle del *wild-type*, suggerendo per la

proteina S1Fa3 un ruolo di modulatore positivo delle risposte trascrizionali alle variazioni dello stato di nutrizione solfatica delle piante.

Analisi della regione di 1331 pb

La seconda fase del lavoro si è concentrata sull'analisi della sequenza promotrice del gene *At1G12030*. Tale sequenza di 1331 pb individuata in un precedente lavoro è, come già detto, in grado di promuovere la trascrizione di un gene *reporter* in condizioni di solfocarenza e presenta al suo interno l'elemento SURE (Figura 5 ;Lancilli 2008).

Il lavoro di analisi della sequenza ha comportato la sua amplificazione per PCR e la successiva realizzazione di un vettore *one-hybrid reporter* portante l'intera sequenza in qualità di elemento target. Questo vettore è stato impiegato sia per uno studio *one-hybrid* classico, sia per valutare, in esperimenti di cotrasformazione, l'eventuale interazione della proteina S1Fa3-GAL4AD (ottenuta dallo *screening* precedente) con il l'intero target.

i) Realizzazione del vettore reporter portante la regione di 1331 pb come target.

Per la costruzione del vettore *reporter* pHIS2 portante la regione di 1331 pb in qualità di target, si è proceduto alla amplificazione della sequenza ed al suo successivo clonaggio all'interno del MCS del vettore di clonaggio TOPO PCR 4 Blunt, Invitrogen. Il vettore così ottenuto ed il vettore pHIS2 sono stati tagliati con l'enzima di restrizione *EcoRI* ottenendo una miscela composta dai due vettori e dalla regione di interesse. La miscela così ottenuta è stata ligata generando una nuova miscela di prodotti costituita dai due vettori ricircularizzati, dai due vettori contenenti l'inserito e delle possibili chimere formate dai vettori e l'inserito. La miscela è stata quindi tagliata con l'enzima di restrizione *NotI*, allo scopo di linearizzare tutti i costrutti portanti il vettore TOPO PCR 4 Blunt, Invitrogen, ed impiegata per la trasformazione di cellule competenti di *E. coli*. I trasformati così ottenuti sono stati selezionati tramite PCR su colonia, utilizzando una coppia di primers disegnata sul MCS del vettore pHIS2 e ricercando quei cloni che restituivano un amplificato di 1400 pb costituito dalla somma della lunghezza della regione di interesse e delle basi amplificate sul MCS (Figura 19).

ii) Costruzione della library di fusione.

Il vettore *reporter* pHIS2 portante la regione di 1331 pb è stato, anche in questo caso, preventivamente testato nel ceppo Y187 per la sua potenziale capacità di interagire con proteine endogene del lievito. A tale scopo si è provveduto a piastrare i lieviti trasformanti su terreni privi di istidina, selettivi per il vettore e addizionati con diverse quantità di 3AT. In questo caso la concentrazione in grado di ridurre al minimo la crescita dovuta ad interazioni tra il vettore *reporter* e le proteine endogene del lievito risultava essere 50 mM.

Per la realizzazione della *library* di fusione anche in questo caso è stato utilizzato il cDNA ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione dell'RNA totale estratto da radici di piante di *Arabidopsis thaliana* allevate in condizioni di limitata disponibilità di solfato per 15 giorni. Il metodo utilizzato per la costruzione della *library* è stato il medesimo utilizzato in precedenza (Figura 10).

iii) Trasformazione del ceppo Y187 di *Saccharomyces cerevisiae* e screening dei positivi.

La fase di *screening* è stata condotta, come nel precedente caso, sul ceppo Y187 cotrasformato con una miscela contenente il vettore *reporter* e l'intera *library* di fusione. I trasformanti così ottenuti sono stati piastrati su terreni selettivi per i due vettori e privi di istidina, addizionati con 3AT 50 mM, per poi essere analizzati nei loro comportamenti di crescita per un periodo di 4 giorni. L'efficienza di trasformazione e il titolo della *library* risultavano rispettivamente $4,29 \times 10^5$ e $1,87 \times 10^6$.

Dopo 4 giorni di osservazione sono state individuate 800 colonie positive. Il gran numero di colonie ottenute era da attribuire alla lunghezza della regione utilizzata come *target* e quindi alla maggior probabilità di ottenere dei falsi positivi. Allo scopo di aumentare la pressione selettiva, diminuendo così il numero dei falsi positivi, tutti i cloni positivi sono stati sub-culturati su terreni selettivi addizionati con concentrazioni di 3AT pari a 100 e 150 mM. La crescita dei cloni era analizzata per un periodo complessivo di quattro giorni, prendendo ogni giorno nota di quali cloni emergessero (Figura 20). Questa analisi ha permesso di individuare 10 colonie positive che, successivamente, sono state isolate e sub-colturate su terreni selettivi, per poi essere analizzate per la presenza di vettori ricombinanti pGAD7-Rec2. La selezione dei vettori di interesse avveniva in cellule di *E. coli* piastrate su terreni

selettivi contenenti ampicillina. I vettori così selezionati sono stati sequenziati allo scopo di risalire all'identità dei cDNA responsabili della trans-attivazione del gene *reporter HIS3*. I risultati ottenuti relativamente al sequenziamento dei cloni ed all'analisi delle loro sequenze sono riportati in figura 21. Anche in questo caso la maggior parte delle sequenze ottenute codificava per proteine non identificabili come fattori di trascrizione e, quindi, non direttamente associabili alla regolazione dell'espressione genica in solfocarenza, o per proteine a funzione sconosciuta, ad eccezione del clone 3 (*At2G31230*). Tale clone presentava alcune caratteristiche interessanti per poter essere eletto come putativo elemento del sistema di regolazione trascrizionale dei geni solfo-responsivi. *At2G31230*, infatti, codifica per il putativo fattore di trascrizione ERF15 (figura 22), appartenente alla famiglia ERF (Ethylene Responsive Factor) che in *Arabidopsis thaliana* è costituita da 122 elementi. La famiglia ERF è caratterizzata dalla presenza del dominio AP2/ERF formato da 60-70 amminoacidi e coinvolto nel legame al DNA. I membri appartenenti a questa famiglia sono coinvolti in numerosi processi biologici correlati alla crescita, allo sviluppo e alle risposte ambientali (Nakano *et al.* 2006). Il putativo fattore di trascrizione ERF15 appartiene al gruppo IX.

Cotrasformazione del ceppo Y187

Per valutare se la proteina S1Fa3 fosse in grado di interagire con la regione di 1331 bp sono stati condotti due esperimenti paralleli: il primo ha previsto la trasformazione del ceppo di lievito Y187 con il solo vettore *reporter*, mentre il secondo ha comportato la trasformazione dello stesso ceppo sia con il vettore *reporter* sia con il vettore di espressione pGADT7-Rec2 codificante per la proteina S1Fa3. I trasformati sono stati selezionati su terreni privi di istidina e selettivi per i due vettori, addizionati con 3AT in concentrazione di 50 mM. Anche in questo caso è stata valutata l'efficienza di trasformazione utilizzando l'equazione precedentemente descritta; l'efficienza risultava essere di $5,30 \times 10^4$, per la trasformazione con il solo vettore *reporter*, e di $4,25 \times 10^5$ per il doppio trasformato.

I risultati ottenuti, dopo quattro giorni di crescita, mostravano che la concentrazione di 3AT adottata non consentiva la crescita del ceppo Y187 portante il solo vettore *reporter* (Figura 23a); vice versa la presenza di entrambi i vettori all'interno dell'ospite ripristinava la capacità di questo di crescere in assenza di

istidina, mostrando quindi una interazione fra la proteina S1Fa3 e la regione *target* (Figura 23b).

Individuazione della regione candidata al possibile legame con ERF15

Vista l'ampiezza della regione utilizzata come target (1331 pb) si è deciso di condurre degli esperimenti per meglio caratterizzare quale parte della sequenza fosse effettivamente coinvolta nel legame con la proteina ERF15. A tale scopo la regione di 1331 pb è stata suddivisa in 7 frammenti di circa 325 pb ciascuno; la rappresentazione schematica della suddivisione in frammenti è riportata in figura 24. Ogni frammento è stato amplificato tramite PCR utilizzando le coppie di primers disegnate sulla sequenza nucleotidica e clonato all'interno del MCS del vettore pHIS2 preventivamente linearizzato con l'enzima di restrizione *SmaI*. Come nei casi precedenti la selezione dei vettori ricombinanti è stata condotta trasformando ceppi competenti di *E. coli*. I trasformati sono stati selezionati su terreni selettivi addizionati di kanamicina e la selezione dei vettori ricombinanti è stata condotta mediante analisi di restrizione utilizzando l'enzima *SmaI*.

I 7 vettori *reporter* così ottenuti sono stati utilizzati per trasformare il ceppo di lievito Y187. Per ognuno dei 7 vettori venivano condotte due trasformazioni: la prima utilizzando il solo vettore *reporter*; la seconda utilizzando oltre al vettore *reporter* anche il vettore di espressione pGADT7-Rec2 codificante per la proteina ERF15 ottenuto durante la fase di *screening*. I trasformati erano piastrati su terreni selettivi addizionati di 3AT 150 mM e la loro crescita era osservata per un periodo di 4 giorni, confrontando la capacità e la velocità di crescita dei singoli trasformati con quella dei doppi trasformati. I risultati evidenziavano che solo i vettori *reporter* portanti i frammenti 2, 3, 6 e 7 erano in grado revertire l'auxotrofia del lievito per l'istidina (Figura 25). Tale analisi ha portato all'individuazione di due regioni: la prima comune ai frammenti 3 e 7, mentre la seconda comune ai frammenti 2 e 6 (Figura 26). Analisi *in silico* hanno inoltre evidenziato la presenza in queste due regioni delle box TGACC e TGACA riconosciute dal fattore di trascrizione ERF3, un altro membro della famiglia ERF. Tale risultato supporta l'ipotesi del coinvolgimento di queste due zone nell'interazione con la proteina ERF15.

CONCLUSIONI

Nel loro insieme i risultati del presente lavoro hanno permesso di:

- 1) evidenziare un differente comportamento nei livelli di trascrizione dei tre alleli identificati del trasportatore del solfato BjST1;2 in presenza di cadmio;
- 2) stabilire un coinvolgimento dei membri della famiglia S1Fa nella regolazione delle risposte trascrizionali delle piante in condizioni di solfocarenza. In particolare il fattore di trascrizione S1Fa3 potrebbe agire come modulatore positivo della trascrizione di geni solforesponsivi;
- 3) individuare la proteina ERF15 come possibile fattore di controllo della trascrizione di geni solforesponsivi.

FIGURE

Figura 1. Confronto fra le sequenze nucleotidiche dei tre alleli di *BjST1;2*

BjST1;2a	1	-----ACACCAAG	8
BjST1;2b	1	-----ATCACA	6
BjST1;2c	1	CCATCTCCTGGTTAGATTATGTTCAAATAATTTTAAACTAAACCTCAA	50
BjST1;2a	9	CCAAC TATTCA-CTTTAT TCACTTTTCCAGCAATCTCTCCT-TCTCCTGA	56
BjST1;2b	7	CTTTAAGTCACATACAAACCATATATCCAGCTATCTATTCTATCTCCTGC	56
BjST1;2c	51	CATATTGGCAAACGAACTAACCTAACTATTCTCTTGTTCTGTTTGATA	100
BjST1;2a	57	TACGTACT-TAGCTATGCTGGGAGAGCTCATCCTG-----ATGTG	96
BjST1;2b	57	TCCTGATAATAACTATGGCCTCGAGAGCCCACCCTGTGGACGGTGATCTA	106
BjST1;2c	101	TACGTACG-TAGCTATGCTGGGAGAGCTCATCCTG-----ATGTA	140
BjST1;2a	97	AATCCTGTGACGGATGGTGGAGATCTTCCGATCAAATCGTCGCCTCACCG	146
BjST1;2b	107	AGTCCGGCAACGGACGGTGGAGATCTTCCGATCAAATCGTCGCCTCACCG	156
BjST1;2c	141	AATCCGGTGACGGATGGTGGAGATCTTCTATCAAATCGTCGCCTCACCG	190
BjST1;2a	147	ACATAAAGTTGGTGTCACCGAAGCAAAACATGTTCCATGATTTTCATGT	196
BjST1;2b	157	GCATAAAGTTGGGATCCCACCGAAGCAAAACATGTTCCATGACTTCATGT	206
BjST1;2c	191	GCATAAAGTTGGGGTCCCACCGAAGCAAAACATGTTCCATGATTTTCATGT	240
BjST1;2a	197	ACACGTTCAAAGAAACGTTCTTCCATGATGATCCTCTCAGACACTTTAAG	246
BjST1;2b	207	ACACGTTCAAAGAAACTTTCTTCCATGATGATCCTCTCAGACATTTAAG	256
BjST1;2c	241	ACACGTTCAAAGAAACCTTCTTTCATGATGATCCTCTCAGACATTTAAG	290
BjST1;2a	247	GATCAGCCTAAGTCTAAGAAGTTCATGCTCGGTCTCCAATCTGTGTTCCC	296
BjST1;2b	257	GATCAGCCTAAGTCCAAGCAGTTCATGCTCGGTCTCCAATCTGTGTTTCC	306
BjST1;2c	291	GATCAGCCTAAGTCCAAAAGTTCATGCTCGGTCTTCAATCTGTCTTCCC	340
BjST1;2a	297	GGTTTTCGATTGGGGACGTAACATAAATCTCAAGAAGTTCCGTGGTGATC	346
BjST1;2b	307	GGTTTTCGACTGGGGACGTAGCTACAATCTCAAGAAGTTTCGTGGTGATC	356
BjST1;2c	341	GGTTTTCGATTGGGGACGTAACATAAATCTCAAGAAGTTCCGTGGTGATC	390
BjST1;2a	347	TCATTGCCGGTTTAACTATTGCCAGTCTTTGTATCCCTCAGGATATTGGA	396
BjST1;2b	357	TCATTGCCGGTTTAACTATTGCCAGTCTCTGTATTCCTCAGGATATTGGA	406
BjST1;2c	391	TCATTGCCGGTTTAACTATTGCCAGTCTTTGTATTCCTCAGGATATTGGA	440
BjST1;2a	397	TATGCTAAGCTTGCGAACCTGGATCCTAAATACGGTTTATATTTCGAGTTT	446
BjST1;2b	407	TACGCTAAGCTCGCGAATCTGGACCCTAAATACGGTTTATATTTCGAGTTT	456
BjST1;2c	441	TATGCTAAGCTTGCAAATCTGGACCCTAAATACGGTTTATATTTCGAGTTT	490
BjST1;2a	447	TGTTCCACCGTTGGTGTATGCTTGATGGGGAGTTCTAGGGATATAGCAA	496
BjST1;2b	457	TGTACCTCCATTGGTGTATGCATGTATGGGGAGTTCAAGGGATATAGCAA	506
BjST1;2c	491	TGTTCCACCGTTGGTGTATGCTTGATGGGGAGTTCTAGGGATATAGCAA	540
BjST1;2a	497	TTGGACCTGTTGCTGTGGTATCTCTTCTGCTAGGTA CTCTCCTTCGAGCT	546
BjST1;2b	507	TAGGACCCGTCGCTGTGGTTTCTCTGCTGCTAGGTA CTCTCCTTCGAGCT	556
BjST1;2c	541	TCGGACCTGTCGCTGTGGTTTCTCTTCTGCTAGGTA CTCTCCTTCGAGCT	590
BjST1;2a	547	GAGGTTGATCCAAACACAAATCCTGATGAGTATCTCCGACTTGCCTTCAC	596
BjST1;2b	557	GAGATCGATCCAAACACAAACCTGATGAATACCTCCGACTTGCCTTCAC	606
BjST1;2c	591	GAGATTGATCCAAACACAAATCCTGATGAGTATCTCCGACTTGCCTTCAC	640
BjST1;2a	597	GGCTACGTTTTTTGCGGGTGTCACTGAAGCAGCCCTTGGCTTCTTCAGAT	646
BjST1;2b	607	CGCCACGTTTTTTCGCGGGTGTCACTGAAGCAGCCCTTGGTTTTCTTCAGAT	656
BjST1;2c	641	CGCCACGTTTTTTCGCTGGTGTCACTGAAGCAGCCCTTGGCTTCTTCAGAT	690

BjST1;2a	647	TAGGGTCTTGATTGATTTCCCTTCCATGCGGCTGTGGTTGGATTTCATG	696
BjST1;2b	657	TAGGGTCTTGATTGATTTCCCTTTCACACGCGGCCGTAGTTGGATTTCATG	706
BjST1;2c	691	TAGGATTCTTGATTGATTTCCCTTCCATGCGGCTGTGGTTGGATTTCATG	740
BjST1;2a	697	GGTGGTGCAGCCATCACAATAGCTCTTCAGCAGCTCAAGGGTTTCTTAGG	746
BjST1;2b	707	GGTGGTGCAGCCATTACAATTGCTCTTCAGCAGCTCAAAGGGTTCTTAGG	756
BjST1;2c	741	GGTGGTGCAGCCATCACAATCGCTCTTCAGCAGCTCAAAGGGTTTCTTAGG	790
BjST1;2a	747	GATCAAGAAATTCACCAAGAAAACCTGATATCATCGCTGTTTTAGATTTCAG	796
BjST1;2b	757	GATCAAACAGTTCACCAAGAAGACCGATATCATTGCTGTTTTAGATTCTG	806
BjST1;2c	791	GATCAAAAAGTTCACCAAGAAAACCGATATCATCGCTGTTCTAGATTTCAG	840
BjST1;2a	797	TCTTTAGCGCAGCTCATCATGGTTGGAATTGGCAGACTATACTCATTGGT	846
BjST1;2b	807	TCTTCAGCTCAGCTCGTCATGGTTGGAATTGGCAGACTATACTCATTGGT	856
BjST1;2c	841	TCTTTAGTGCAGCTCATCATGGCTGGAACCTGGCAGACTATACTCATTGGT	890
BjST1;2	847	GCATCCTTCTTGACATTCCTTCTCACATCTAAGTTCATTGGCAAAAAGAG	896
BjST1;2b	857	GCATCCTTCTTGACCTTCCTTCTAACTTCCAAGCTCATTGGGAAAAAGAA	906
BjST1;2c	891	GCATCCTTCTTGACCTTCCTTCTCACATCTAAGTTCATTGGCAAAAAGAG	940
BjST1;2a	897	CAAGAAACTGTTCTGGATTCCAGCTGTTGCGCCATTGATATCAGTTATCA	946
BjST1;2b	907	CAAGAAACTGTTCTGGATTCCAGCAGTGGCCCCATTGATATCAGTTATCA	956
BjST1;2c	941	CAAGAAACTGTTCTGGATTCCAGCGGTTGCACCACTGATATCAGTTATCA	990
BjST1;2a	947	TCTCCACATTCTTTGTCTACATAACCAGAGCTGACAAACAAGGAGTCCAA	996
BjST1;2b	957	TCTCCACCTTCTTTGTCTACATAACTAGAGCCGACAAACAAGGAGTCCAA	1006
BjST1;2c	991	TTCCACCTTCTTTGTTTACATAACCAGAGCAGACAAACAAGGAGTCCAA	1040
BjST1;2a	997	ATCGTGAAACACCTTGACAAAGGCATCAATCCTTCATCGTTCCATCAAAT	1046
BjST1;2b	1007	ATTGTGAAACACCTTGACAAAGGGATCAACCCTTCTCTTTTGATCAAAT	1056
BjST1;2c	1041	ATCGTGAAACACCTTGACAAGGCATCAACCCTTCATCTTTTAATCAAAT	1090
BjST1;2a	1047	CTACTTCTCCGGACATTACCTTGCTAAGGGCATTGATATCGGTGTAGTCG	1096
BjST1;2b	1057	TTACTTCTCCGGAGATAACTTGGCCAAGGGGATTGATATCGGTGTAGTCG	1106
BjST1;2c	1091	ATACTTCTCCGGCCATTACCTAGCTAAGGGCATTGATATCGGTGTAGTCG	1140
BjST1;2a	1097	CTGGAATGGTCGCCTTAACGGAAGCTGTGGCCATTGGAAGAACGTTTGCT	1146
BjST1;2b	1107	CTGGAATGGTCGCCTTAACAGAAGCAGTAGCGATTGGAAGAACGTTTGCT	1156
BjST1;2c	1141	CTGGAATGGTTGCCTTAACGGAAGCTGTGGCTATTGGAAGAACATTTGCT	1190
BjST1;2a	1147	GCAATGAAAGACTATCAAATCGATGGTAACAAAAGAGATGGTAGCACTAGG	1196
BjST1;2b	1157	GCAATGAAAGACTACCAAATCGACGGTAACAAAAGAGATGGTAGCACTAGG	1206
BjST1;2c	1191	GCAATGAAAGACTATCAAATAGATGGTAACAAAAGAGATGGTAGCACTAGG	1240
BjST1;2a	1197	TGTTATGAACGTTGTTGGTTCCATGTCTTCTTGCTACGTAGCCACTGGAT	1246
BjST1;2b	1207	TGTTATGAACGTTGTTGGTCCATGTCTTCTTGCTATGTAGCCGACAGGAT	1256
BjST1;2c	1241	TGTTATGAACGTTGTTGGTCCATGTCTTCTTGCTACGTAGCCACTGGAT	1290
BjST1;2a	1247	CATTCTCAAGATCAGCTGTAAACTTCATGGCTGGATGTCAAACCTGCGGTT	1296
BjST1;2b	1257	CGTTCTCAAGATCAGCTGTAAACTTCATGGCTGGATGTCAAACCTGCGGTT	1306
BjST1;2c	1291	CGTTCTCGAGATCAGCTGTAAACTTCATGGCTGGATGTCAAACCTGCGGTT	1340
BjST1;2a	1297	TCAAACATCATAATGTCAATCGTTGTTCTCTTGACATTGCTCTTCCTCAC	1346
BjST1;2b	1307	TCCAACATCATTATGTCAATCGTAGTTCTCTTGACGTTGCTCTTCCTCAC	1356
BjST1;2c	1341	TCAAACATCATAATGTCAATCGTTGTTCTCTTGACATTGCTTTTCCTCAC	1390

BjST1;2a 1347 TCCGTTGTTTAAGTACACACCAAACGCCATCCTCGCAGCTATTATCATCA 1396
 BjST1;2b 1357 ACCTCTCTTCAAGTACACACCAAACGCCATCCTCGCTGCTATTATCATCA 1406
 BjST1;2c 1391 TCCACTATTTAAGTACACACCAAACGCAATCCTCGCAGCTATTATCATCA 1440

 BjST1;2a 1397 ATGCTGTGATTCCTTTGATTGATATCCAAGCTGCGATATTGATCTTCAAG 1446
 BjST1;2b 1407 ACGCGGTGGTTCCTTTGATTGATATCCAAGCTGCGATTCTGATCTTCAAG 1456
 BjST1;2c 1441 ATGCTGTGATTCCTTTGATTGATATCCAAGCTGCAATATTGATCTTCAAG 1490

 BjST1;2a 1447 GTCGATAAGCTTGACTTCGTTGCTTGTATGGGAGCTTTCTTTGGCGTCAT 1496
 BjST1;2b 1457 GTCGATAAGCTCGACTTCATCGCTTGTATGGGAGCTTTCTTTGGCGTCAT 1506
 BjST1;2c 1491 GTCGATAAGCTTGATTTTCGTTGCTTGTATGGGAGCTTTCTTTGGCGTCAT 1540

 BjST1;2a 1497 CTTTGCTTCCGTTGAGATAGGGCTTCTCATTGCCGTCTCTATATCATTCTG 1546
 BjST1;2b 1507 CTTTGTTTCCGTTGAGATTGGACTTCTCATTGCCGTTTCTATATCGTTTG 1556
 BjST1;2c 1541 CTTTGTTTCTGTTGAGATAGGGCTTCTCATTGCCGTTTCTATATCATTTG 1590

 BjST1;2a 1547 CTAAGATTCTCTTGCAAGTAAACAAGACCTAGAACGGCGGTTCTTGAAAC 1596
 BjST1;2b 1557 CTAAGATTCTCTTGCAAGTACAAGACCTAGAACCCTGTTCTTGAAAC 1606
 BjST1;2c 1591 CAAAGATTCTCTTGCAAGTAAACAAGACCTAGAACCCTGTTCTTGAAAC 1640

 BjST1;2a 1597 ATTCCGAGAACTTCAGTTTACAGAAACATCCAACAGTATCCTGAAGCCAC 1646
 BjST1;2b 1607 ATTCCAAGAACTTCAGTATACCGAAACATCCAACAGTATCCTGAAGCCAC 1656
 BjST1;2c 1641 ATTCCGAGAACTTCAGTTTATAGAAACATCCAACAGTATCCTGAAGCCAC 1690

 BjST1;2a 1647 TATGGTTCCAGGGGTTCTCACCATTGTTGACTCAGCCATTTACTTCT 1696
 BjST1;2b 1657 CATGGTTCCAGGGGTTCTTACCATTGTTGACTCAGCCATTTACTTCT 1706
 BjST1;2c 1691 TATGGTTCCAGGGGTTCTTACCATTGTTGACTCAGCCATTTACTTCT 1740

 BjST1;2a 1697 CCAACTCAAATTACGTCAGAGAAAGGATCCAAAGATGGTTACTAGAGGAA 1746
 BjST1;2b 1707 CCAACTCAAATTACGTCAGGGAAAGGATCCAAAGATGGTTACTAGAGGAA 1756
 BjST1;2c 1741 CCAACTCAAATTACGTCAGAGAAAGGATCCAAAGATGGTTACTAGAGGAA 1790

 BjST1;2a 1747 GAAGAGAAGGTGAAAGCAGCAAGCTTACCTAGGATCCAGTTTCTAATCAT 1796
 BjST1;2b 1757 GAAGAGAAGGTGAAAGCAGCAAGCTTACCTAGGATCCAGTTTCTAATCAT 1806
 BjST1;2c 1791 GAAGAGAAGGTGAAAGCAGCAAGCTTACCTAGGATCCAGTTTCTAATCAT 1840

 BjST1;2a 1797 CGAGATGTCACCCGTGACGGATATCGATACAAGTGGTATCCACGCCCTAG 1846
 BjST1;2b 1807 TGAAATGTCACCTGTTACGGACATCGATACTAGTGGTATCCACGCCCTAG 1856
 BjST1;2c 1841 CGAAATGTCACCTGTTACGGACATCGATACAAGTGGTATCCACGCCCTAG 1890

 BjST1;2a 1847 AAGACTTATACAAATCTCTCCAGAAGAGAGATATTCAGCTGATTCTTGCA 1896
 BjST1;2b 1857 AAGATTTATACAAATCTCTCCAGAAAAGAGATATTCAGTTGGTTCTTGCG 1906
 BjST1;2c 1891 AAGACTTATATAAGTCTCTACAGAAGAGAGATATTCAGCTGATTCTTGCT 1940

 BjST1;2a 1897 AATCCTGGACCATTGGTGATAGGCAAATTACACTTGTCTCACTTTGCTGA 1946
 BjST1;2b 1907 AACCCTGGACCATTGGTGATTGGCAAGCTACACTTGTCTCACTTTGCTGA 1956
 BjST1;2c 1941 AATCCTGGACCATTGGTGATAGGCAAAGCTACACTTGTCTCACTTTGCTGA 1990

 BjST1;2a 1947 CATGTTGGGATATGACCATATCTTTCTGACGGTGGCTGACGCCGTCGAAG 1996
 BjST1;2b 1957 CATGTTAGGACAAGACAAAATTTTCTGACGGTGGCTG----- 1994
 BjST1;2c 1991 TATGTTAGGACACGACAAAATTTTCTGACGGTGGCTG----- 2028

 BjST1;2a 1997 CTTGTGGTCCAAAACCTCCGACGAGGTCTGAAATTGATGATGATAATGA 2046
 BjST1;2b 1994 ----- 1994
 BjST1;2c 2028 ----- 2028

 BjST1;2a 2047 CGAAGAACATGATTTCTAAGTGGTGTACAGTGGAGTTAAGAAAGTGAGTT 2096
 BjST1;2b 1994 ----- 1994
 BjST1;2c 2028 ----- 2028

BjST1;2a	2097	TTGCTTTCAAATTGTTGTGACTTGTGTCTTTGGTCTCCTTTTTTTTTTGT	2146
BjST1;2b	1994	-----	1994
BjST1;2c	2028	-----	2028
BjST1;2a	2147	ACAAGAGAGTGTAAGTGTGACCTCTACATCCCACCTTAGCGTCTTTTTG	2196
BjST1;2b	1994	-----	1994
BjST1;2c	2028	-----	2028
BjST1;2a	2197	TTCACTTAAAAAAAAA	2212
BjST1;2b	1994	-----	1994
BjST1;2c	2028	-----	2028

Gli allineamenti sono stati prodotti con il programma ClustalW. Le regioni colorate di grigio corrispondono ai punti di identità tra le sequenze.

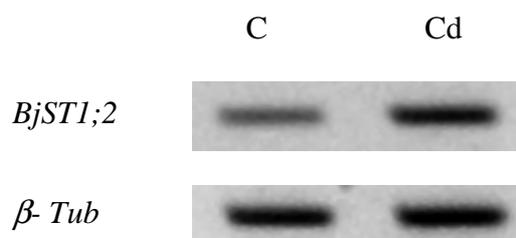
Figura 2. Confronto fra le sequenze amminoacidiche dei tre alleli di B_JST1;2

B _J ST1;2a	1	MSGRAHP---D ^Y VNPVTDGGDLPKSSSPHRHKVGVPPKQNMFHDFMYTFKE	47
B _J ST1;2b	1	MASRAHPVDGDLSPATDGGDLPKSSSPHRHKVGI ^Y PPKQNMFHDFMYTFKE	50
B _J ST1;2c	1	MSGRAHP---D ^Y VNPVTDGGDLPKSSSPHRHKVGVPPKQNMFHDFMYTFKE	47
B _J ST1;2a	48	TFFHDDPLRHF ^Y FKDQPKSKK ^Y FMLGLQSVFPVFDWGRN ^Y YNLKKFRGD ^Y LIAGL	97
B _J ST1;2b	51	TFFHDDPLRHF ^Y FKDQPKSK ^Y QFMLGLQSVFPVFDWGRS ^Y YNLKKFRGD ^Y LIAGL	100
B _J ST1;2c	48	TFFHDDPLRHF ^Y FKDQPKSKK ^Y FMLGLQSVFPVFDWGRN ^Y YNLKKFRGD ^Y LIAGL	97
B _J ST1;2a	98	TIASLCIPQDIGYAKLANLDPKYGLYSSFVPPPLVYACMGSSRDIAIGPVA	147
B _J ST1;2b	101	TIASLCIPQDIGYAKLANLDPKYGLYSSFVPPPLVYACMGSSRDIAIGPVA	150
B _J ST1;2c	98	TIASLCIPQDIGYAKLANLDPKYGLYSSFVPPPLVYACMGSSRDIAIGPVA	147
B _J ST1;2a	148	VVSLLLGTLLRAE ^Y VD ^Y PN ^Y TNPDEYLRLAFTATFFAGVTEAALGFFRLGFLI	197
B _J ST1;2b	151	VVSLLLGTLLRAE ^Y ID ^Y PN ^Y TNPDEYLRLAFTATFFAGVTEAALGFFRLGFLI	200
B _J ST1;2c	148	VVSLLLGTLLRAE ^Y ID ^Y P ^Y STNPDEYLRLAFTATFFAGVTEAALGFFRLGFLI	197
B _J ST1;2a	198	DFLSHA ^Y AVVGF ^Y MGGAAITIALQQLKGFLG ^Y IKK ^Y FTKKTDI ^Y IAVLDSVFS ^Y SAA	247
B _J ST1;2b	201	DFLSHA ^Y AVVGF ^Y MGGAAITIALQQLKGFLG ^Y IKK ^Y QFTKKTDI ^Y IAVLDSVFS ^Y SA	250
B _J ST1;2c	198	DFLSHA ^Y AVVGF ^Y MGGAAITIALQQLKGFLG ^Y IKK ^Y FTKKTDI ^Y IAVLDSVFS ^Y SAA	247
B _J ST1;2a	248	HHGWNWQTILIGASFLTFL ^Y LT ^Y SKF ^Y IGKK ^Y SKK ^Y LFWIPAVAPLISVIISTFF	297
B _J ST1;2b	251	RHGWNWQTILIGASFLTFL ^Y LT ^Y SKL ^Y IGKK ^Y NK ^Y LFWIPAVAPLISVIISTFF	300
B _J ST1;2c	248	HHGWNWQTILIGASFLTFL ^Y LT ^Y SKF ^Y IGKK ^Y SKK ^Y LFWIPAVAPLISVIISTFF	297
B _J ST1;2a	298	VYITRADKQGVQIVKHL ^Y DKGINPSS ^Y FH ^Y QIYFSGH ^Y YLAKGIRIGVVAGMVA	347
B _J ST1;2b	301	VYITRADKQGVQIVKHL ^Y DKGINPSS ^Y F ^Y D ^Y QIYFSGD ^Y NLAKGIRIGVVAGMVA	350
B _J ST1;2c	298	VYITRADKQGVQIVKHL ^Y DKGINPSS ^Y F ^Y N ^Y QIYFSGH ^Y YLAKGIRIGVVAGMVA	347
B _J ST1;2a	348	LTEAVAIGRTFAAMKDYQIDGNKEMVALGVMNVVGSMS ^Y SCYVATGSFSRS	397
B _J ST1;2b	351	LTEAVAIGRTFAAMKDYQIDGNKEMVALGVMNVVGSMS ^Y SCYVATGSFSRS	400
B _J ST1;2c	348	LTEAVAIGRTFAAMKDYQIDGNKEMVALGVMNVVGSMS ^Y SCYVATGSFSRS	397
B _J ST1;2a	398	AVNFMAGCQTAVSNI ^Y IMSI ^Y VVLLTLLFL ^Y TPL ^Y FKYTPNAILAAII ^Y INAVIP	447
B _J ST1;2b	401	AVNFMAGCQTAVSNI ^Y IMSI ^Y VVLLTLLFL ^Y TPL ^Y FKYTPNAILAAII ^Y INAVVP	450
B _J ST1;2c	398	AVNFMAGCQTAVSNI ^Y IMSI ^Y VVLLTLLFL ^Y TPL ^Y FKYTPNAILAAII ^Y INAVIP	447
B _J ST1;2a	448	LIDIQAAILIFKVDKLD ^Y FVACMGAFFGVIFASVEIGLLIAVSISFAKILL	497
B _J ST1;2b	451	LIDIQAAILIFKVDKLD ^Y FIACMGAFFGVIFVSVEIGLLIAVSISFAKILL	500
B _J ST1;2c	448	LIDIQAAILIFKVDKLD ^Y FVACMGAFFGVIFVSVEIGLLIAVSISFAKILL	497
B _J ST1;2a	498	QVTRPRTAVLGNIPRTSVYRNIQQYPEATMVPGLTIRVDS ^Y SAIYFSNSNY	547
B _J ST1;2b	501	QVTRPRTAVLGNIPRTSVYRNIQQYPEATMVPGLTIRVDS ^Y SAIYFSNSNY	550
B _J ST1;2c	498	QVTRPRTAVLGNIPRTSVYRNIQQYPEATMVPGLTIRVDS ^Y SAIYFSNSNY	547
B _J ST1;2a	548	VRERIQRWLEEEEEK ^Y VKAASLPRIQFLI ^Y IE ^Y MSPVTDIDTSGIHALEDLYK	597
B _J ST1;2b	551	VRERIQRWLEEEEEK ^Y VKAASLPRIQFLI ^Y IE ^Y MSPVTDIDTSGIHALEDLYK	600
B _J ST1;2c	548	VRERIQRWLEEEEEK ^Y VKAASLPRIQFLI ^Y IE ^Y MSPVTDIDTSGIHALEDLYK	597
B _J ST1;2a	598	SLQKRDIQL ^Y ILANPGPLVIGKLHLSHFADMLGYDHI ^Y FLTVA ^Y DAVEACGPK	647
B _J ST1;2b	601	SLQKRDIQL ^Y VLANPGPLVIGKLHLSHFADMLGQDKI ^Y FLTVA ^Y -----	641
B _J ST1;2c	598	SLQKRDIQL ^Y ILANPGPLVIGKLHLSHFADMLGHDKI ^Y FLTVA ^Y -----	638

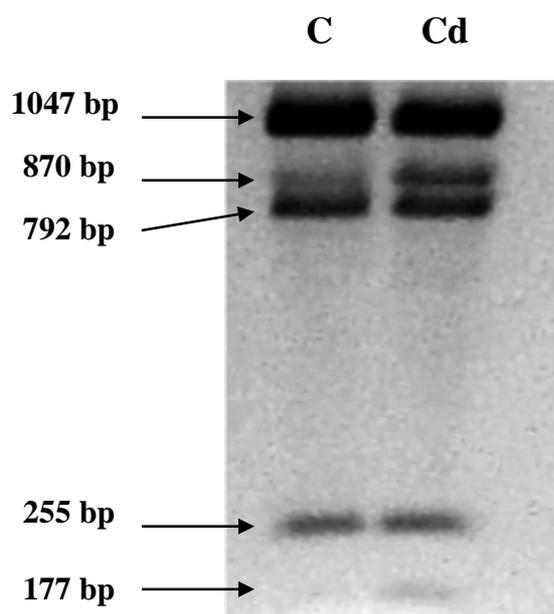
Gli allineamenti sono stati prodotti con il programma ClustalW. Le regioni colorate di grigio e di giallo corrispondono ai punti di identità e positività amminoacidica tra le tre sequenze.

Figura 3. Effetto dell'esposizione a Cd^{2+} sui livelli di trascritto degli alleli di *BjST1;2*

3a) Effetto dell'esposizione a Cd^{2+} sui livelli di trascritto di *BjST1;2*

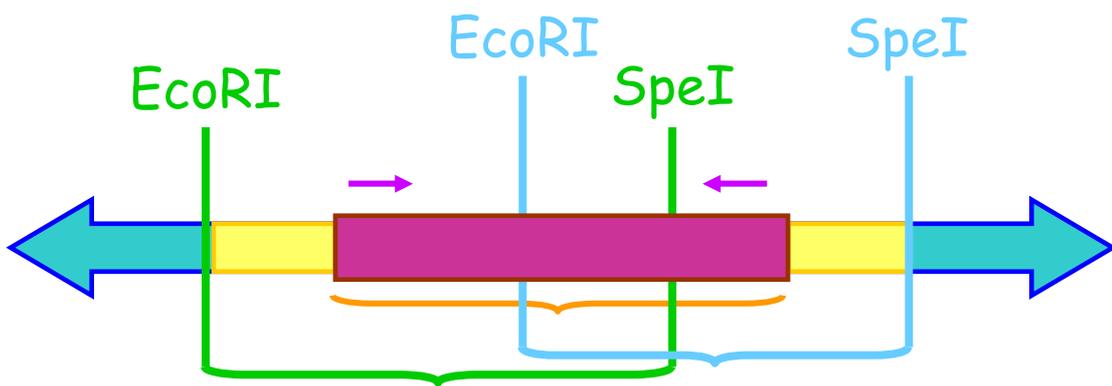


3b) Effetto dell'esposizione a Cd^{2+} sui livelli di trascritto dei tre alleli di *BjST1;2*



I prodotti di amplificazione dei cDNA erano visualizzati sotto luce UV dopo separazione elettroforetica su gel di agarosio al'2% in tampone TBE 1x addizionato con etidio bromuro $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4. Rappresentazione schematica della suddivisione in frammenti per la ricostruzione del promotore del gene *BjST1;2*.



Il clone è stato suddiviso in tre frammenti:

- In verde e in azzurro sono rappresentati i frammenti ottenuti utilizzando gli enzimi di restrizione EcoRI e SpeI;
- In viola è rappresentato il frammento ottenuto amplificando il clone con una coppia di primers interna (freccie viola).

Figura 5. Sequenza nucleotidica della regione promotrice del gene *BjST1;2*

```

1      AATTCTCCATTAATCATGTTCTAAGTAGTGTAAATAGCACTAGTGTGTGGCTGGCCATGAA 60
61     CCAACATGGAGAGCCAATAGGTTCGTAGCCACCAAAGCACAGCGTAGTCAATGACTAATGC 120
121    ACCGAGGGGTGTTCAAAAAAAAAAAGACTAATGCACCGAGGAAGAACCTAGCCATGCCACA 180
181    GTCCAAGTTCAAGTTAACTGGGGCAGGGCCCACTATATTCTTAAAGTCAACTCTAGCC 240
241    CCCAAAGAGATCGCTGCTTTCTTTTGACCTTTTCGCTTTTCTCGATTTAGAGCCAGTGGC 300
301    ATTGTCGTAACGACAACCTTCGATTTAGCTGCTTCGGTGTTGTTTCTAGCTTTTCATTTTCA 360
361    TAACTTATGTCATTATCACTTCATATGATTTTTTTGTTTCTCGGAAAAAAGAAGAATAGC 420
421    ATAATCAGCATCTTTATCATTTCATATGATTTTTTTGTTTCCAGAAAAGAAGAATATCATA 480
481    ATCATGATCTTTATCTTTTATAATTTATAAAGTTTATTTCAATTATAATATCTAAAACTA 540
541    CAAAAATCTTGATTAATTTTTCTGTTTATCCTCATTAAATACGTTTTTCTTATACTGCTA 600
601    CTCCCTCTGTCCCCTTTAAGTGGTGTAAAGGTTTTTGCACAAATATTAAGAAAATACA 660
661    AGTTTTTATGCATTAGTATTAATTTCAACTAATTCAACCAATAAAAAAAGATGTAGTAT 720
721    TTTGTAACCTGGTCAAAATTTTTAAATAACAATAAATTTCTATCTAGATTTGTGAGAACATC 780
781    ACTTAAATGAGACAAAATAAAAACCTAAAACACCACCTAAAGTGGGACAGAGGGAGTA 840
841    ATTCTTTGCATTAATTTCAAGGAATTTCCACAGTTTCAAAGAATATATTTTCTCGGAAA 900
901    ATTGACCTATTTATTTCTGTATACTTTGGGTTTCGATTGATATTTTAAAGAGAAATTCAG 960
961    CGAACCTGGACAATATTCGGGTTTGCTGATTAATAACATATAAAGGGGAGGTTGTATGATC 1020
1021  TGTCTCTCTCGTGAACCTTTCTTCTAGTTTTTTTTTCTTTTTTTTTCGGCTAAAAAACTTTAA 1080
1081  TTTTCGCATAAAGAAATAAATAAAATCATGTGAAAGATCTTTGGAGGAAGAGGCTGAAAAA 1140
1141  ACGAGATCGAAATTTCTTCTTTTCCAGGTATGTGATGATTTTCACCTTCCAACATATCA 1200
1201  ACGGTTATGCATCTTCTTGTTACTTTACCCACTTATTATTTTCATCATATATATAAATATA 1260
1261  TAGCTTTAGAATTTCCCAATTATAGAATACACGTGCGTATTTCTCCCAATCATATGCAGT 1320
1321  TTTTAAATGTTAAAGCTTAATCATAGTTTTGATCAGTTCCTTTTTTCAGTAGTATTTTGT 1380
1381  GTGATACCTGGATAATCATTAATATTATAATTGATTATATGCAGTCATGGAAAAGCATTCA 1440
1441  TTATGACGATTAGAGCGTTTCTTTTTGATAAATATATCAATGAAAACCTCAACTTCAATCA 1500
1501  TGCATACAGCATTCTTGTATGGATACAAAGTCAAACATGTGGTGTTCAGTTGTTCACTTT 1560
1561  GGCAGTTTGGCTACAACCTAGTAACAAACTTAAAATTATTATTAGAATATAATGCTACTGG 1620
1621  GGAAATACGAAGTTGATTTTTGTATACCTTTTCAGCTTCTCTGAAAGAAATTAACATAAGGT 1680
1681  TTTAAGGTTTTGCATATAAGTTGGAAAACGCCAATTTGAAAATTATTTGTTGGTTGAAAG 1740
1741  AAAACTTATAAGAAGAGCAGACAAAGGGTTTTAAATAATCCAGACACTCTATCACCTTGCG 1800
1801  GCTTGACAAAAGACTTTTGTCCAGAACTGACTTGATTCAATTTCAAGTAGTTATTATT 1860
1861  TAATACACGTGTATATAAAAATTCCTTCAAATTATGATAAATAAAAACCTGTTACGAAATTGA 1920
1921  CATAACAGCTACTGAGGTACATAGTTTGGAGTTTGGACAAGATGCCGAGTCCACATTAGAA 1980
1981  GCTTAGAACCCTAAACTATAACATATCTATGAGTTAATTAGGTTTGGCTTGTATTTTTTTA 2040
2041  GGTCATGTTTCTAATATTTGTTTTAGTTAGGTTTGTATTCCGAAATTTTAGGCTTTGTTT 2100
2101  CTAAAATTTCTGTTCAAGCAACTAATCATAGAAAATCCGGGTATCACATGTTAACTAATTA 2160
2161  TATTTTTCGAATAATGCGATAATCCCGTAAATTTTTCAGGGACAAGTGAAAGTATTTG 2220
2221  CATCATAAACGTATTTATCTACATTTATTTCAAATTTGTTTGCTTTTACCACGTGGCAGT 2280
2281  TCTGGTCAACGATCTCTCCTTATGGCAAACTCAACGAGATCATTGAATTGAGATTGTTT 2340
2341  GCAGTTTGCACACAACAGTTGCCACAAAACCATTGACTTGAATTGTTTAACTTAATGTC 2400
2401  GATAGACACATAAAGAATTTGATATCATCTTAGACTTTTCATCTTTTCGTCATGCACCTTG 2460
2461  TCTCTTTAACTATCTAGATTCATTAATCTAAACGATGACACTCCCTTCTCATAATTAATTT 2520
2521  AAAACAATCTCCTAACTTTAATTTCACTATAAATAAGCTTCATCAATGTTGCTACAAA 2580
2581  TTCACACTAAGCCAAATATTCACCTTTATTCACTTTTCCAGCTATCTAT 2628

```

In giallo è evidenziato l'elemento *SURE* senso; in azzurro gli elementi *SURE* antisenso.

Figura 6. Rappresentazione della ricostruzione del promotore del gene *BjST1;2c*

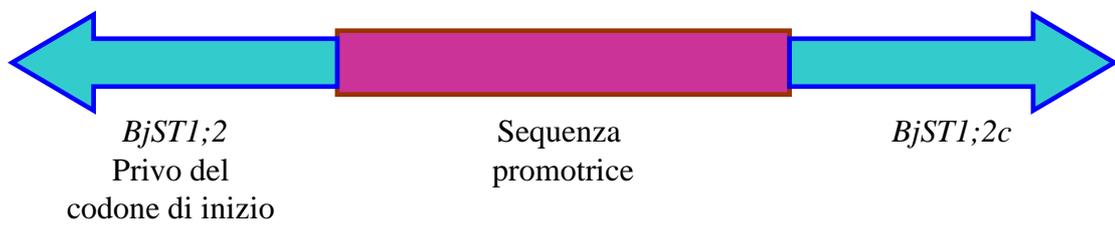
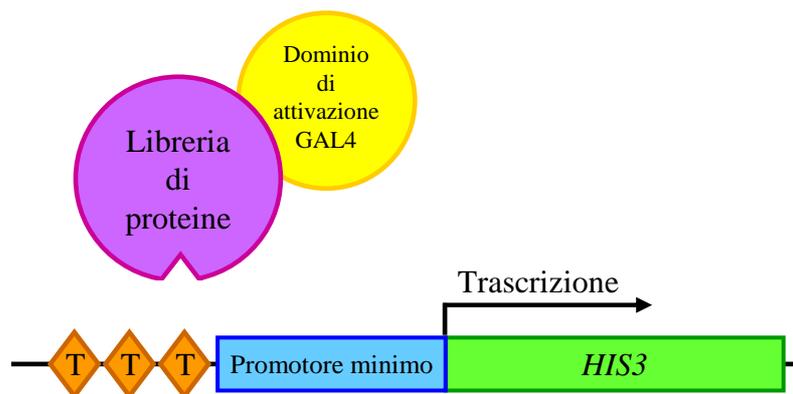


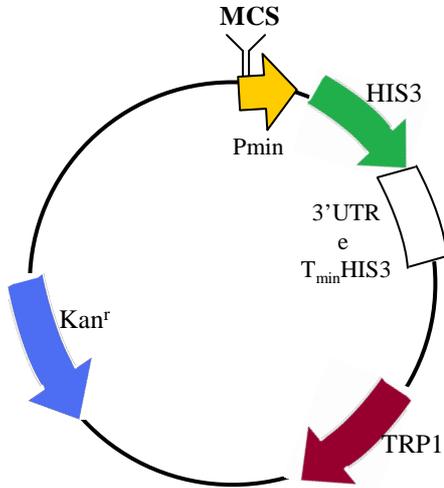
Figura 7. Principio base dell'analisi one-hybrid



Il sistema one-hybrid si basa sul principio che molti attivatori trascrizionali degli eucarioti presentano domini di legame al DNA e domini di attivazione (AD) fisicamente indipendenti. Tale approccio prevede la costruzione di un vettore reporter, costituito da una sequenza target (T), ripetuta in triplo e posta a monte del gene reporter *HIS3*, gene in grado di rimuovere l'auxotrofia per l'istidina del ceppo di lievito Y187, utilizzato nell'analisi. Il vettore così costituito viene impiegato per lo screening di una libreria AD di proteine di fusione, ottenuta ligando i cDNA della library d'interesse, in un opportuno vettore di espressione. Le interazioni tra la DNA binding protein della library e la sequenza target portata dal vettore reporter sono manifestate dall'attivazione trascrizionale del gene reporter *HIS3*.

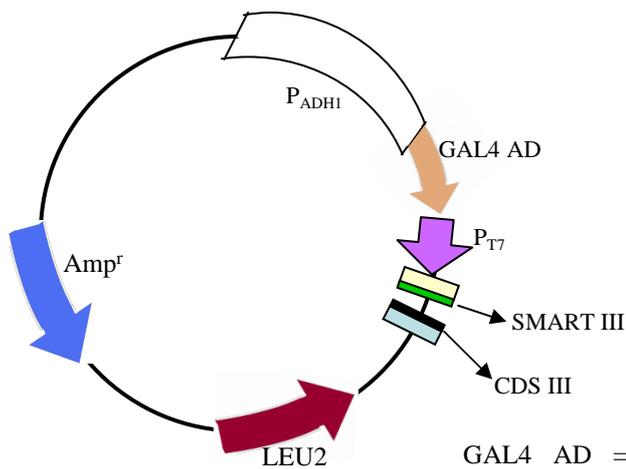
Figura 8. Vettori utilizzati nella tecnica *one-hybrid*

8a) Vettore *reporter* pHIS2



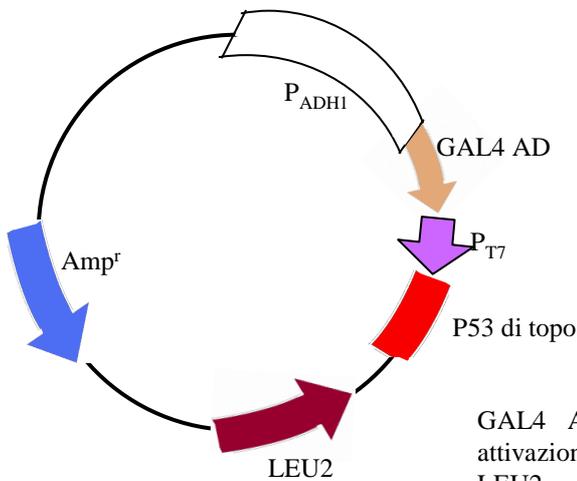
HIS3 = gene reporter; la sua espressione permette la reversione dell'auxotrofia del lievito per l'istidina
 Pmin = promotore minimo del gene reporter HIS3
 TRP1 = gene che permette la reversione dell'auxotrofia del lievito per il triptofano
 Kan^r = gene codificante per la resistenza all'antibiotico kanamicina
 MCS = multiple cloning site; sito multiplo di clonaggio

8b) Vettore di espressione pGADT7-Rec2



GAL4 AD = gene codificante per il dominio di attivazione GAL4
 SMART IIITM = sequenza per la ricombinazione omologa
 CDS III = sequenza per la ricombinazione omologa
 LEU2 = gene che permette la reversione dell'auxotrofia del lievito per la leucina
 Amp^r = gene codificante per la resistenza all'antibiotico ampicillina

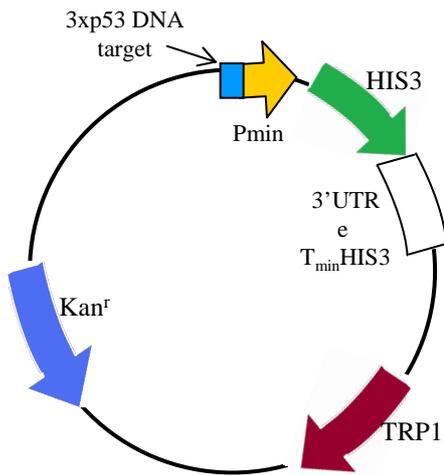
8c) Vettore di espressione controllo pGAD-Rec2-53



GAL4 AD = gene codificante per il dominio di attivazione GAL4
 LEU2 = gene che permette la reversione dell'auxotrofia del lievito per la leucina
 Amp^r = gene codificante per la resistenza all'antibiotico ampicillina

Il vettore di controllo pGAD-Rec2-53 a differenza del vettore di espressione pGADT7-Rec2, possiede il gene p53 codificante per la proteina p53 di topo.

8d) Vettore di controllo p53HIS2



HIS3 = gene reporter; la sua espressione permette la reversione dell'auxotrofia del lievito per l'istidina
 P_{min} = promotore minimo del gene reporter HIS3
 TRP1 = gene che permette la reversione dell'auxotrofia del lievito per il triptofano
 Kan^r = gene codificante per la resistenza all'antibiotico kanamicina
 3x p53 DNA elements = sequenza target per la proteina p53 di topo

Figura 9. Strategia di clonaggio utilizzata per la costruzione del vettore *reporter* pHIS2 portante l'elemento SURE

9a) Oligonucleotide clonato nel MCS del vettore pHIS2

AATT GGAGACA **GGAGACA** GGAGACA **AGCT**
 CCTCTGT **CCTCTGT** CCTCTGT

9b) MCS del vettore pHIS2

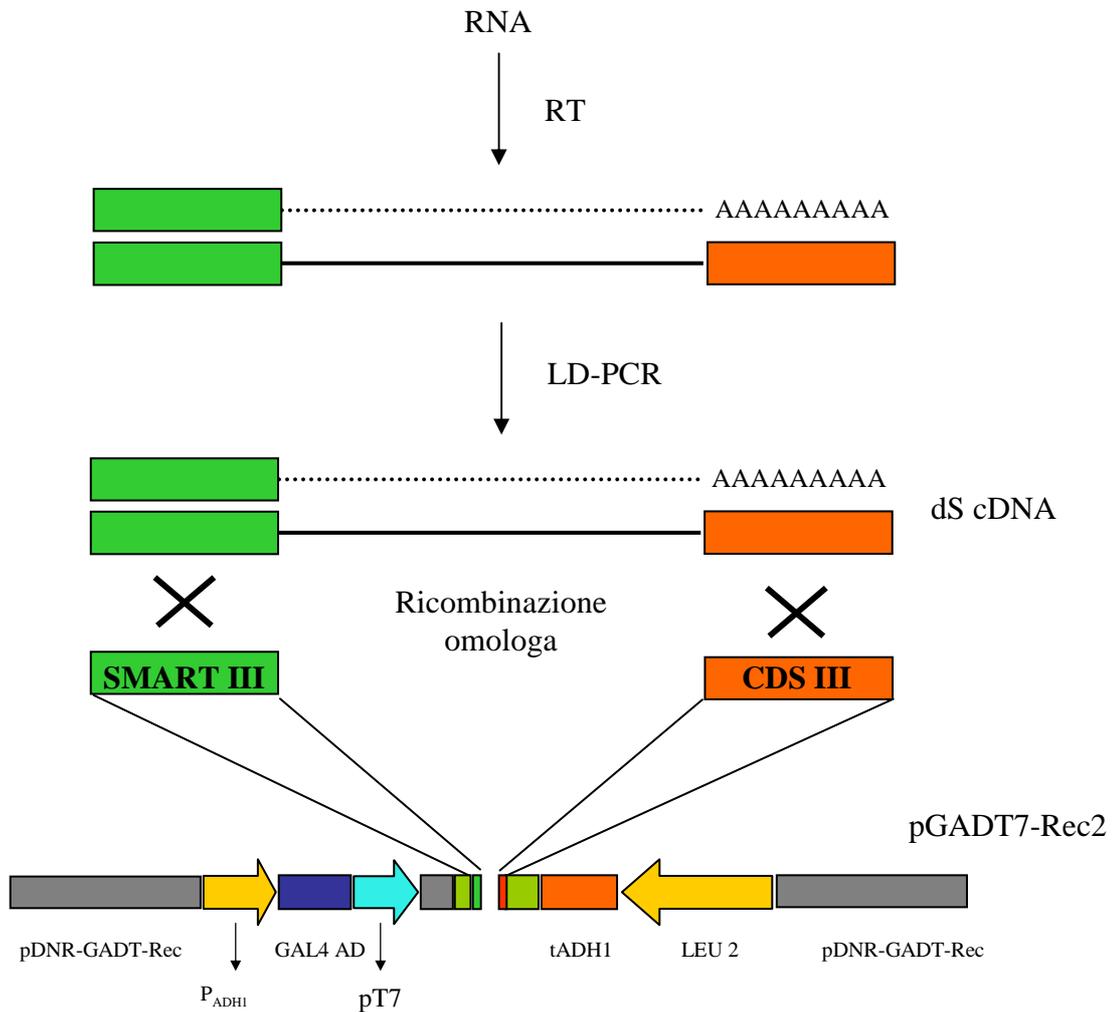
EcoRI *SmaI* *SacI*

```

G | AATT CCC | GGGGAGCT | CACGCGTTCGCGAATCGATCCGCGGTCTAGA
C | TTAA GGG | CCCC | TCGAGTGCGCAAGCGCTTAGCTAGGCGCCAGATCA
  
```

L'oligonucleotide clonato all'interno dell'MCS del vettore pHIS2 è costituito da tre ripetizioni in tandem dell'elemento SURE (**GGAGACA**) ed è stato fatto sintetizzare nei due filamenti SENSO e ANTISENSO, fatti poi appaiare. Il clonaggio direzionale all'interno del vettore pHIS2 è stato mediato dall'inserimento, alle estremità del filamento SENSO, di due adattatori contenenti i siti di restrizione per gli enzimi *EcoRI* e *SacI*. All'interno del MCS del vettore è contenuto un sito unico di restrizione *SmaI*, perso nel caso in cui l'oligonucleotide si inserisca nel vettore.

Figura 10. Costruzione della libreria di cDNA (SMART™ technology)



P_{ADH1} : promotore, in *S. cerevisiae*, del gene ADH1;

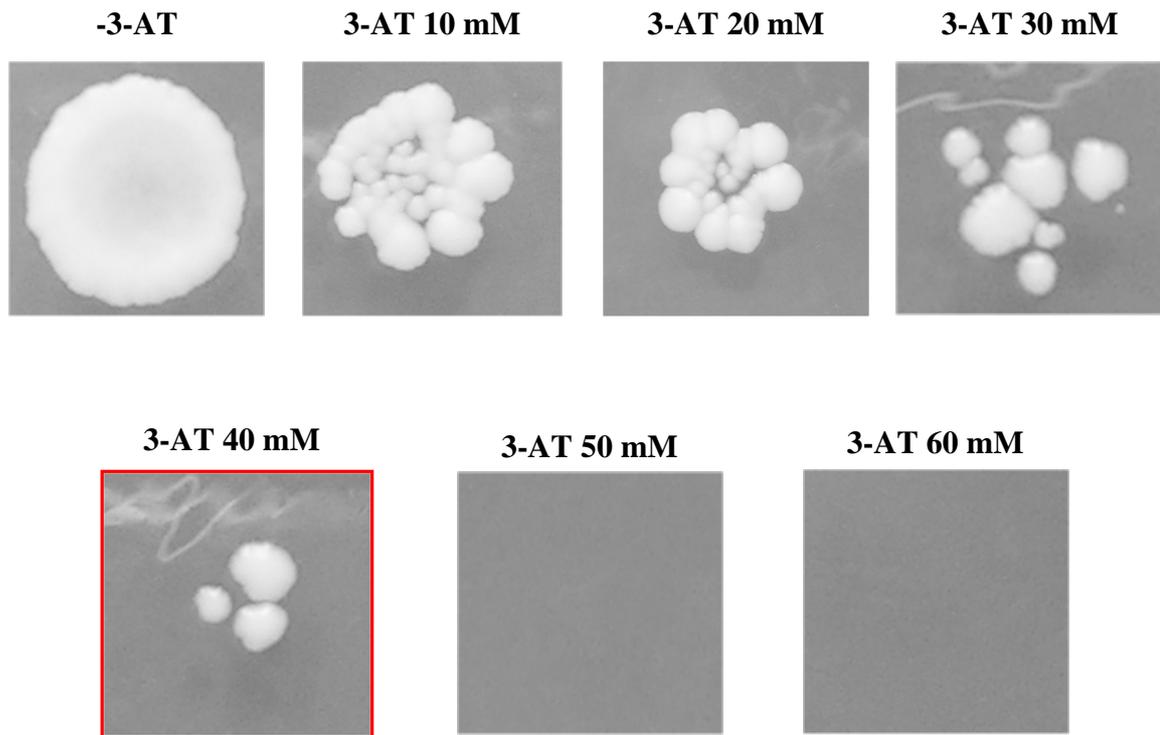
GAL4 AD: dominio di attivazione trascrizionale;

pT7: promotore per la trascrizione *in vitro*;

tADH1: terminatore della trascrizione, in *S. cerevisiae*, del gene ADH1

Nella reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il primer CDS III che appaia con la coda polyA al 3' dell'RNA stampo; l'oligonucleotide BD SMART™ III s'inscrive sulla corta sequenza nucleotidica inserita dall'enzima MMLV RT all'estremità 5' del template. La molecola di cDNA a singolo filamento ottenuta contiene la sequenza completa dell'mRNA e le sequenze complementari per i primers da utilizzare nelle successive reazioni di amplificazione previste nel secondo step del protocollo. La libreria di cDNA ottenuta è costituita da molecole di cDNA a doppio filamento, portanti alle estremità specifiche ancore per il clonaggio mediato da ricombinazione omologa all'interno del vettore pGADT7-Rec2. La ricombinazione omologa tra le sequenze BD SMART III e CDS III del ds cDNA e del vettore determinano la ricircolarizzazione del plasmide e l'espressione della proteina di fusione GAL4 AD/cDNA.

Figura 11. Determinazione della concentrazione ottimale di 3AT da utilizzare per l'analisi one-hybrid con il vettore reporter pHIS2 portante l'elemento SURE



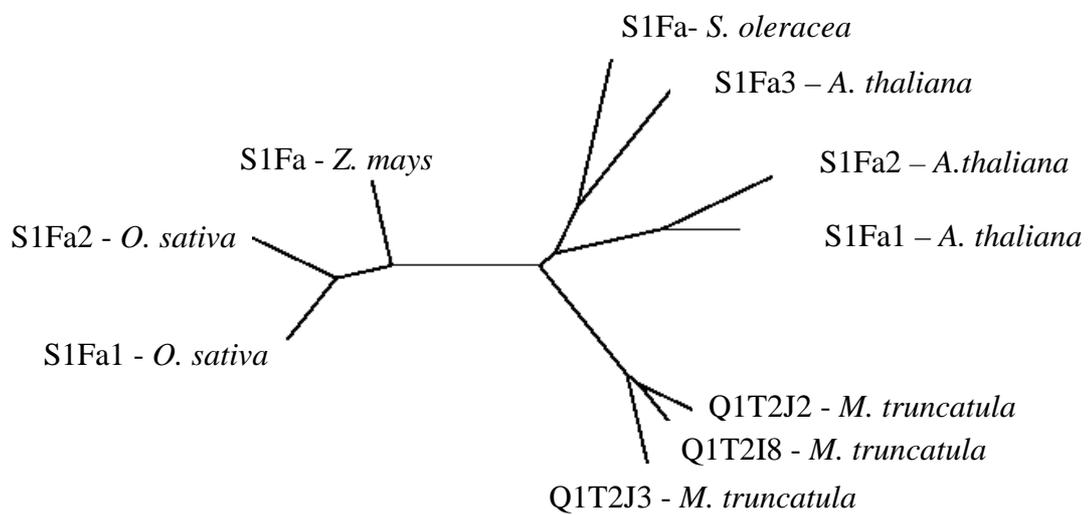
Osservazione della crescita su terreno SD/-His/-Trp + 3AT a differenti concentrazioni (da 10 a 60 mM) dei lieviti trasformati con il solo vettore reporter pHIS2 portante l'elemento SURE.

Figura 12. Risultati del sequenziamento dei vettori positivi all'analisi one-hybrid utilizzando come target tre ripetizioni dell'elemento SURE

Clone	Gene	Funzione
1	<i>At5G18380</i>	proteina ribosomiale 40S
2	<i>At5G14590</i>	Isocitrato deidrogenasi
3	<i>At4G38250</i>	Proteina della famiglia dei trasportatori degli amminoacidi
4	<i>At1G48950</i>	Proteina di legame con gli ioni zinco
5	<i>At4G38680</i>	<i>Cold shock protein 2</i>
6	<i>At1G07310</i>	Proteina a funzione sconosciuta
7	<i>At3G09735</i>	Proteina S1Fa3 appartenente alla famiglia delle DNA-binding protein S1Fa
9	<i>At2G33120</i>	Proteina della famiglia delle Sinaptobrevine
10	<i>At1G15370</i>	Proteina contenente il dominio InterPro
11	<i>At1G77710</i>	Probabile precursore dell'ubiquitina
12	<i>At5G05440</i>	Proteina a funzione sconosciuta
13	<i>At3G44670</i>	Proteina di risposta agli stress
14	<i>At3G51250</i>	Proteina relazionata con la senescenza e la deidratazione
15	<i>At1G35580</i>	Proteina con attività citosolica di invertasi

In rosso è evidenziato il risultato ritenuto maggiormente interessante

Figura 13. Rappresentazione schematica del grado di conservazione degli elementi S1Fa tra monocotiledoni e dicotiledoni



Il dendrogramma è stato disegnato utilizzando il programma ClustalW.

Figura 14. Sequenze nucleotidiche dei membri della famiglia S1Fa

14a) S1Fa1

S1Fa1 1 CTTATTAATCTCTGTGTCGAAAACAGATCCTCGTTTCCTTCCTCCTCTC 50
S1Fa1 51 TTCCTACCATTAGTACGTTACTGGAGCTGATCTCACGTATATTTTGGATC 100
S1Fa1 101 GTAATCATGGACGGCGAAGATTTTGCCGGAAAGGCGGCTGCTGAAGCCAA 150
S1Fa1 151 GGGATTGAACCCGGGATTAATCGTGCTGCTTGTGTTGGAGGTCCGCTTC 200
S1Fa1 201 TTGTGTTCCCTAATCGCCAACACTACGTGCTTTACGTTTATGCTCAGAAGAAC 250
S1Fa1 251 CTACCTCCAAGGAAGAAGAAGCCCGTTTCCAAAAGAAGCTCAAGCGGGA 300
S1Fa1 301 GAAGCTAAAGCAAGGAGTCCCTGTCCCTGGAGAATAAAAAGCCAGCTTAAG 350
S1Fa1 351 CTTCTTCACTTGTGCCTCCTTCAAAGCGGTTTTTGTTCGGTTACCAAAT 400
S1Fa1 401 TTCACCCTTGCGGGTTTTTCTTCTTTACTTCTGTCATGAGGATTATCT 450
S1Fa1 451 TGAGTCCTGTATGATTTACATGGAGAGTGTAGACTATTGTTTTGGTCTG 500
S1Fa1 501 ACTTGTTTTTCCTTCATACACACATTTGGTTGCTACTGTAGAGTCTCTCA 550
S1Fa1 551 CATCATCTTTGCTACAAATTCTCATCTTCAATATCATTTAACTTATTTAC 600
S1Fa1 601 TA 602

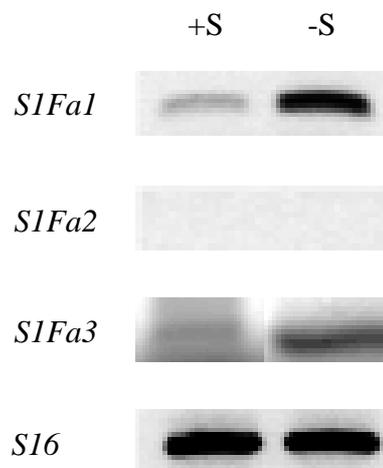
14b) *SIFa2*

S1Fa2 1 ATAATTTATTTATTTTGTCTAAGTATACATGTCTTTTTTGTCTTTTGTCT 50
S1Fa2 51 TGAATCTTTCTCGTCGGAAACACAGATCTCAGTTCCTTACAGAAGAATCT 100
S1Fa2 101 CCGACTCGTTTCTTTGCCGGCATTCTCAGATTTCCGGATACTAGCCATGA 150
S1Fa2 151 GCAGTGATGGTTCCGCCGGAAAGGCGGTTGTTGAAGCCAAAGGATTGAAC 200
S1Fa2 201 CCTGGATTGATAGTGCTGCTTGTTATTGGAGGTCTGCTTGTGACATTTCT 250
S1Fa2 251 CATAGCCAATTACGTTATGTACATGTATGCTCAGAAGAATCTACCTCCAA 300
S1Fa2 301 GGAAGAAGAAGCCTCTTTCCAAAAGAAGCTCAAGCGTGAGAAGCTGAAG 350
S1Fa2 351 CAGGGAGTCCCTGTGCCCGGCGAATAGATTCCAGCTTCTTCAACAGTCTG 400
S1Fa2 401 TGTTTTTAACCTGTAATCACAATGTCATTGAGACTTTTGTATGGGAGAGT 450
S1Fa2 451 AGCAAACGTCCCTTGTTCTGTTTTGGTTAGACTACAAAATTGAATCTCA 500
S1Fa2 501 TCAACTTCTGTTTTCCCTTACATATTTGATTGCAGTTGTAGAGTCTATC 550
S1Fa2 551 ATGTTCACTTTACTTTATTTGTCCATATATCGTTGCCTTTTGTCTGGA 597

14c) *SIFa3*

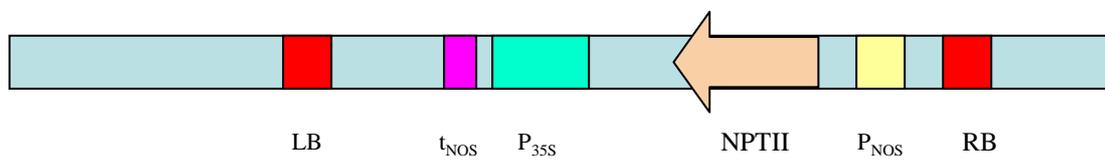
S1Fa3 1 TTGCTGTTACTTATGGCTATGAGTCTTTTCTTGGCAAAACTCGTCTTCAA 50
S1Fa3 51 GCTGTCTATATTTTCTCCGGCGAGCGGTGCTGATAACCTCGTAGCTCCGA 100
S1Fa3 101 AACGCCGCCATGGCCGCAGAATTTGATGGAAAATCGAAAGCAAAGGGCT 150
S1Fa3 151 AAACCCGGGACTGATCGTCCTTCTTGTAATAGGAGGGTTGCTACTGACAT 200
S1Fa3 201 TCCTTGTAGGAAACTTCATCCTTTACACATACGCACAGAAGAATTTACCT 250
S1Fa3 251 CCGAGGAAGAAGAAACCCGTTTCTAAGAAGAAGATGAAGAAAGAGAAGAT 300
S1Fa3 301 GAAGCAAGGCGTCCAAGTTCCTGGCGAGTAGCTTTTGTTATATGTTGTCTG 350
S1Fa3 351 GGATTATCCTTTGATGATAACTCACTCTGCTGGACTAGAACTTGTATGAC 400
S1Fa3 401 TCCGTTACTCATTAGTTTTTTTGATGTTTTTCGATGTAGCATGCATGATATT 450
S1Fa3 451 TTCTTGAGTTGACAATCTATAAGCTTTACTGAGATAATTTCATTAGAAGA 500
S1Fa3 501 CAAAATATGAAACTGATTGTT 521

Figura 15. Analisi RT-PCR semi-quantitativa dei geni appartenenti alla famiglia *S1Fa*



Visualizzazione elettroforetica dei prodotti delle reazioni di amplificazione delle analisi di RT-PCR condotte sui cDNA dei geni *S1Fa* e dei geni *S16*, ottenuti dalle reazioni di retrotrascrizione dell'RNA estratto da piante di *Arabidopsis thaliana* allevate in vitro su terreni agarizzati +S e -S.

Figura 16. Vettore pROK2 utilizzato per la generazione delle linee mutanti SALK di Arabidopsis



LB: Bordo sinistro

t_{NOS} : terminatore della trascrizione del gene NOS

P_{35S} : promotore del gene 35S

NPTII: gene codificante per la resistenza all'antibiotico kanamicina

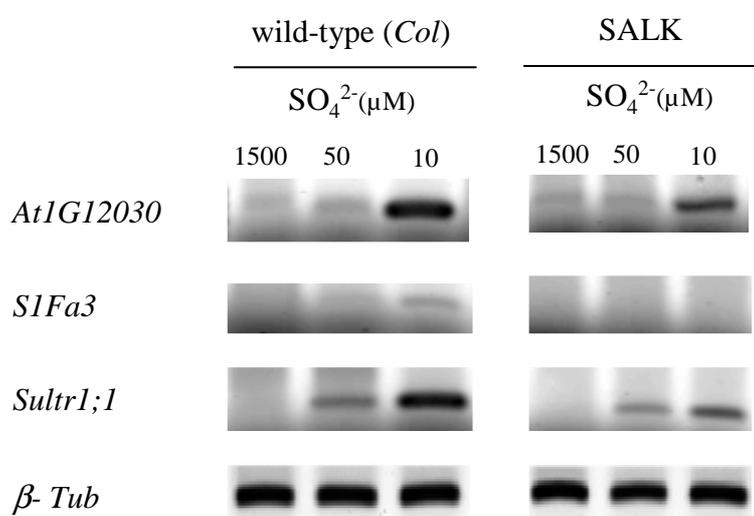
P_{NOS} : promotore della trascrizione del gene NOS

RB: Bordo destro

Figura 17. Fenotipo di un individuo omozigote delle linea SALK omozigote per l'inserzione del t-DNA nel gene codificante per la proteina S1Fa3.



Figura 18 Effetto dell'inserzione dell'elemento *t-DNA* sull'espressione dei geni *AtSultr1;1* e *AtIG12030*.



La foto dei gel evidenzia il profilo di espressione dei geni *ATIG12030*, *SIFa3*, *Sultr1;1* e del gene di riferimento β -*Tub* in piante wild-type e in piante omozigoti per l'inserzione, sottoposte a condizioni di differente disponibilità di solfato per 15 giorni. I prodotti di amplificazione erano visualizzati sotto luce UV dopo separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1 % (w/v) in tampone TBE 1x addizionato con etidio bromuro 0,5 μ g ml⁻¹.

Figura 19 Rappresentazione schematica della realizzazione del vettore reporter portante la regione di 1331 pb come target

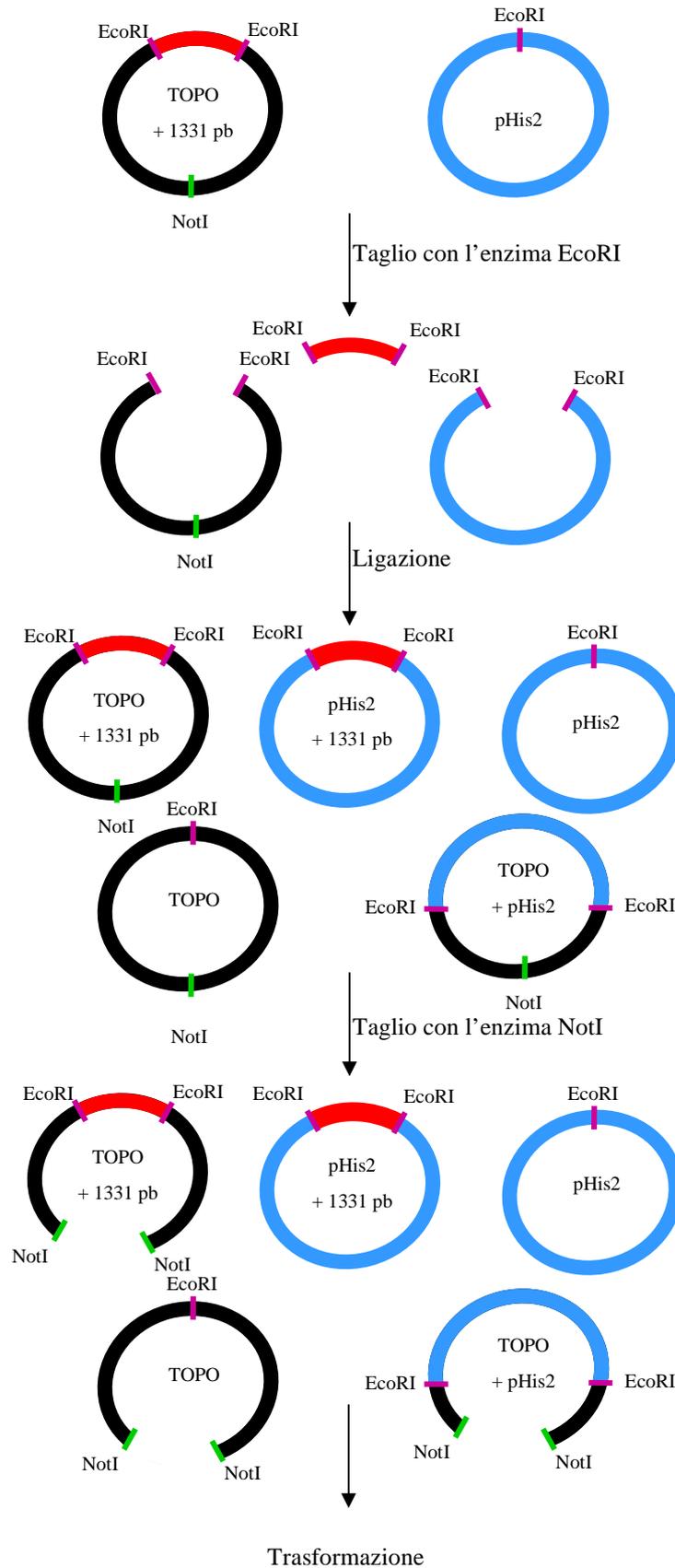
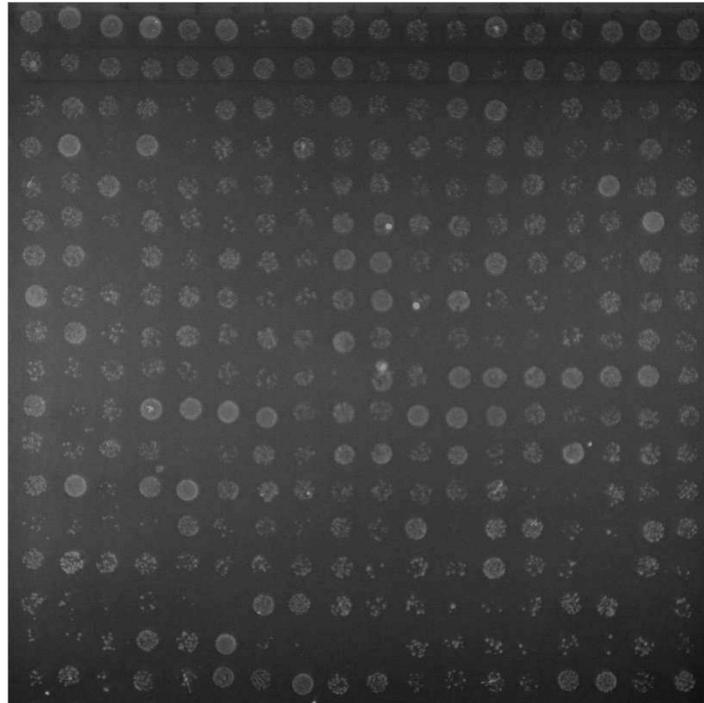
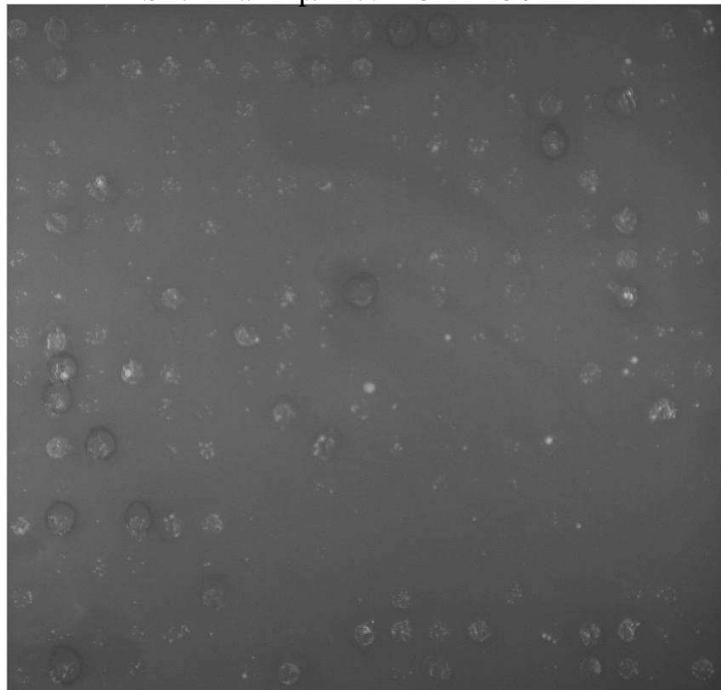


Figura 20. Selezione delle colonie positive ottenute mediante la tecnica *one-hybrid* utilizzando come target la regione di 1331 pb

SD/-His/-Trp/-Leu + 3AT 100 mM



SD/-His/-Trp/-Leu + 3AT 150 mM



Le immagini rappresentano la crescita delle colonie positive, ottenute dall'analisi *one-hybrid* condotta utilizzando come target la regione di 1331 pb, su terreni addizionati con una più alta concentrazione di 3AT (100 mM e 150 mM). Per ogni colonia positiva venivano testate entrambe le concentrazioni di 3AT.

Figura 21. Risultati del sequenziamento dei vettori positivi all'analisi *one-hybrid* utilizzando come target la regione di 1331 pb

Clone	Gene	Funzione
1	<i>At3G58500</i>	Subunità catalitica della fosfatasi 2A
2	<i>At1G01020</i>	Proteina ARV1
3	<i>At2G31230</i>	Proteina ERF15 appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione ERF (Ethylene Responsive Factor)
4	<i>At5G09220</i>	Amminoacidi permeasi
5	<i>At5G23820</i>	Proteina contenente il dominio di riconoscimento dei lipidi MD-2
6	<i>At4G10140</i>	Proteina a funzione sconosciuta

In rosso è evidenziato il risultato ritenuto maggiormente interessante

Figura 22. Sequenza nucleotidica del gene codificante per la proteina ERF15

ERF15 1 ACAACAAGAAGAGATAACAAAAAGAAAAGAAAAGAGAAATCGTAAAAAA 50
ERF15 51 AAAAAAAAAAAAAAACTTATGGAATATTCCCAATCTTCCATGTATTCATC 100
ERF15 101 TCCAAGTTCTTGGAGCTCATCACAAGAATCACTCTTATGGAACGAGAGCT 150
ERF15 151 GTTTCTTGGATCAATCATCTGAACCTCAAGCCTTCTTTTGCCCTAATTAT 200
ERF15 201 GATTACTCCGATGACTTTTTTCTCATTTGAGTCACCGGAGATGATGATTAA 250
ERF15 251 GGAAGAAATTCAAACGGCGACGTTTCTAACTCCGAAGAAGAAGAAAAGG 300
ERF15 301 TTGGAATTGATGAAGAAAGATCATAACAGAGGAGTGAGGAAAAGGCCGTGG 350
ERF15 351 GGGAAATTTGCAGCGGAGATAAGAGATTCAACGAGGAATGGAATTAGGGT 400
ERF15 401 TTGGCTCGGGACATTTGACAAAGCCGAGGAAGCCGCTCTTGCTTATGATC 450
ERF15 451 AAGCGGCTTTCGCCACAAAAGGATCTCTTGCAACACTTAATTTCCCGGTG 500
ERF15 501 GAAGTGGTTAGAGAGTCGCTAAAGAAAATGGAGAATGTGAATCTTCATGA 550
ERF15 551 TGGAGGATCTCCGGTTATGGCCTTGAAGAGAAAACATTCTCTTCGAAACC 600
ERF15 601 GGCCTAGAGGGAAAAAGCGATCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTAAT 650
ERF15 651 TCTTCTTCTTGCTCTTCTTCTTCGTCTACTTCTTCAACATCAAGAAGTAG 700
ERF15 701 TAGTAAGCAGAGTGTTGTGAAGCAAGAAAGTGGTACACTTGTGGTTTTTG 750
ERF15 751 AAGATTTAGGTGCTGAGTATTTAGAACAACCTTCTTATGAGCTCATGTTGA 800
ERF15 801 TCTTGTAATTGATTTTCAGCAAAAGCCACTATTAACTTTAATTTTGTGAT 850
ERF15 851 AATTAATCTTGAAATTTGTTTTGTTTCATTCTGC 883

Figura 23. Verifica delle interazioni tra la regione di 1331 pb e la proteina S1Fa3

23 a)



Trasformazione del ceppo di lievito Y187 con il vettore reporter pHIS2 portante la regione 1331 pb.

SD/-His/-Trp + 3AT 50 mM

23 b)



Trasformazione del ceppo di lievito Y187 con il vettore reporter pHIS2 portante regione 1331 pb ed il vettore d'espressione pGADT7-Rec2 codificante per la proteina S1Fa3

SD/-His/-Trp/-Leu + 3AT 50 mM

Figura 24. Suddivisione in frammenti della regione di 1331 pb

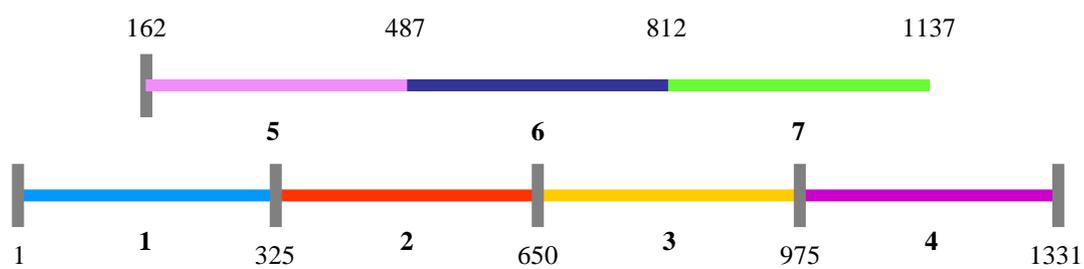
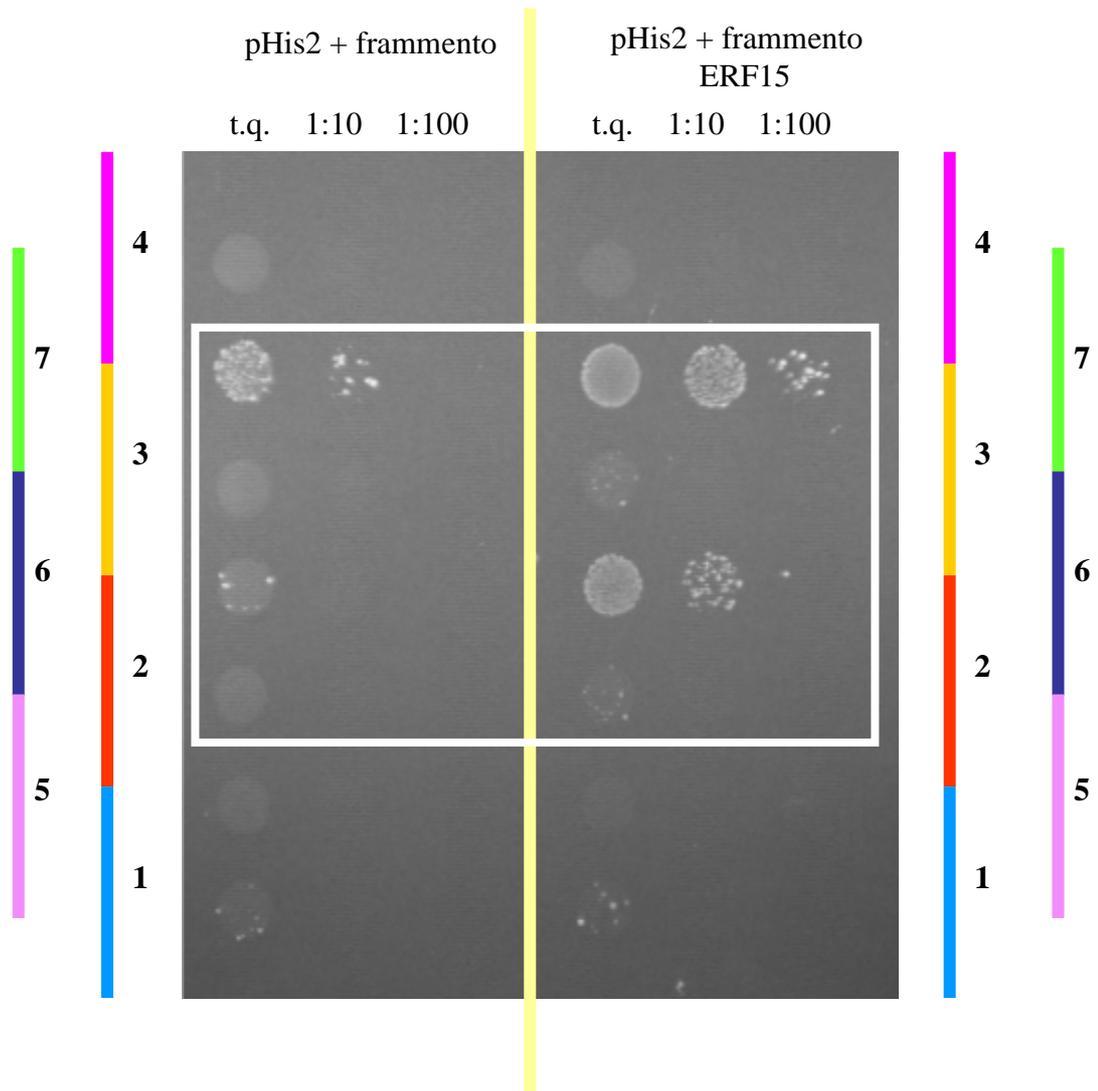


Figura 25. Verifica delle interazioni tra i frammenti della regione di 1331 pb e la proteina ERF15



L'immagine rappresenta la crescita dopo 4 giorni dei lieviti trasformati o con il solo vettore reporter pHis2 portante la regione di 1331 pb (a sinistra della linea gialla) o con sia il vettore reporter sia con il vettore di espressione pGADT7-Rec2 codificante per la proteina ERF15 (a destra della linea gialla). Ogni trasformazione era piastrata in 3 differenti diluizioni: tal quale (t.q.); 1:10 e 1:100. Il rettangolo bianco evidenzia i frammenti in cui si riscontrava una diversa velocità di crescita tra il singolo trasformato e il doppio.

Figura 26 Sequenza nucleotidica delle regioni coinvolte nell'interazione tra il vettore reporter pHis2 portante la regione di 1331 pb e la proteina ERF15.

26 a) Regione comune ai frammenti 3-7

```
CCGGTACGTGTGTCCACGCGCTACTATGTAACCGTTGACCGTTGACCTAG  
CTTTTTAGTTTTTACTCCAAGTGGAACTGGTTATGGATACTTTGTCAC  
GGACGTTAGTTAATAAATGTTGGCGTCCGTTAATCAG
```

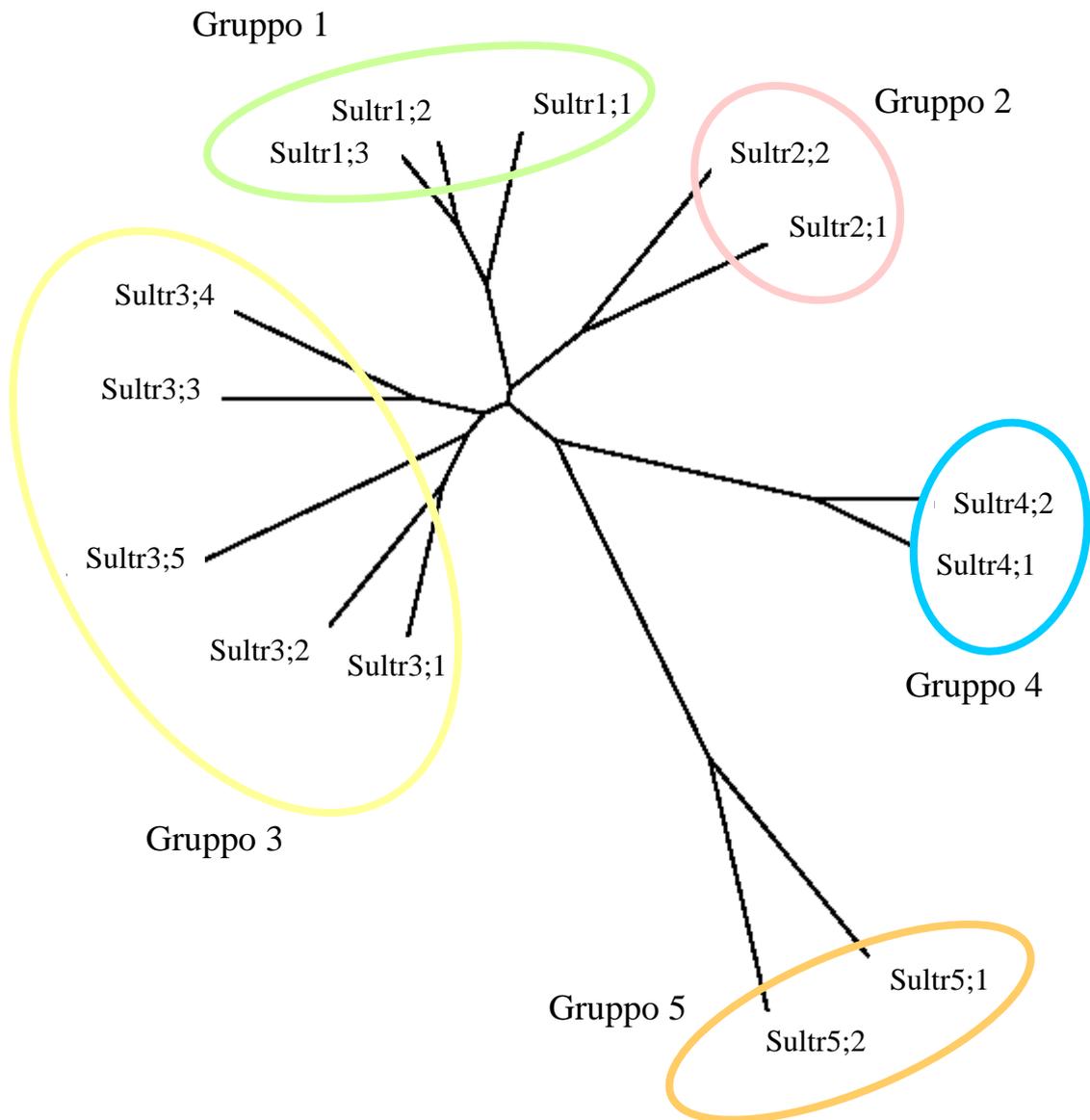
26 b) Regione comune ai frammenti 2-6

```
GCCAAACACTAGTGCCGTCACGTGTAATAGATAAGTTTCTATCCGGAT  
GAAGCCATTAGCGGTGACAAGTTTTAATATTATTCAACTACTAATTGC  
AAGAAGTTTAGATACATTGAATCTAGACAGCATTTCAGATTCATTGAA  
CTTGGACGTGTT
```

Nei rettangoli sono evidenziati le box riconosciute dalla proteina ERF3

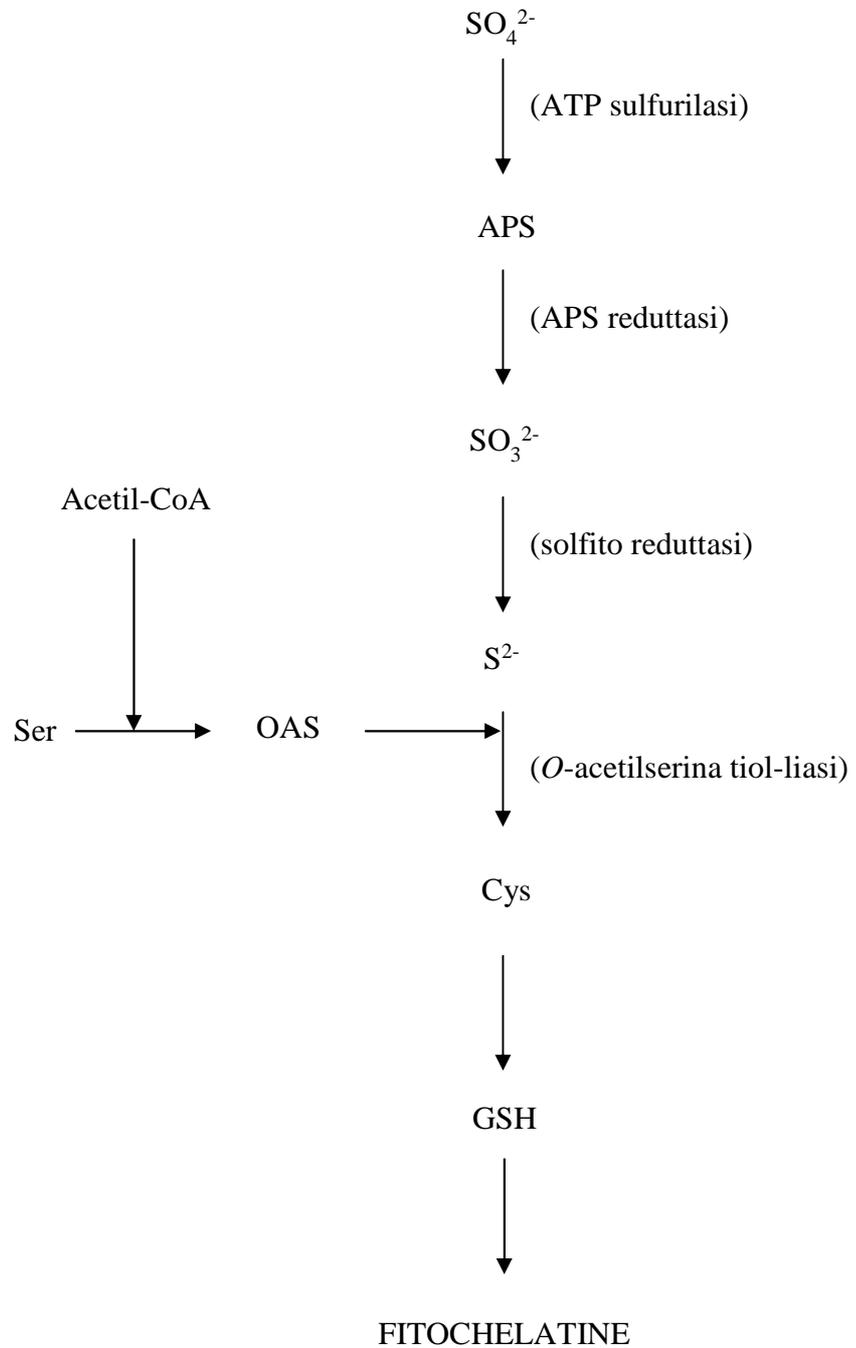
ALLEGATI

Allegato 1. Rappresentazione schematica della famiglia multigenica dei trasportatori del solfato di *Arabidopsis thaliana*.



Il dendrogramma è stato disegnato utilizzando il programma ClustalW.

Allegato 2. Via di assimilazione riduttiva del solfato.

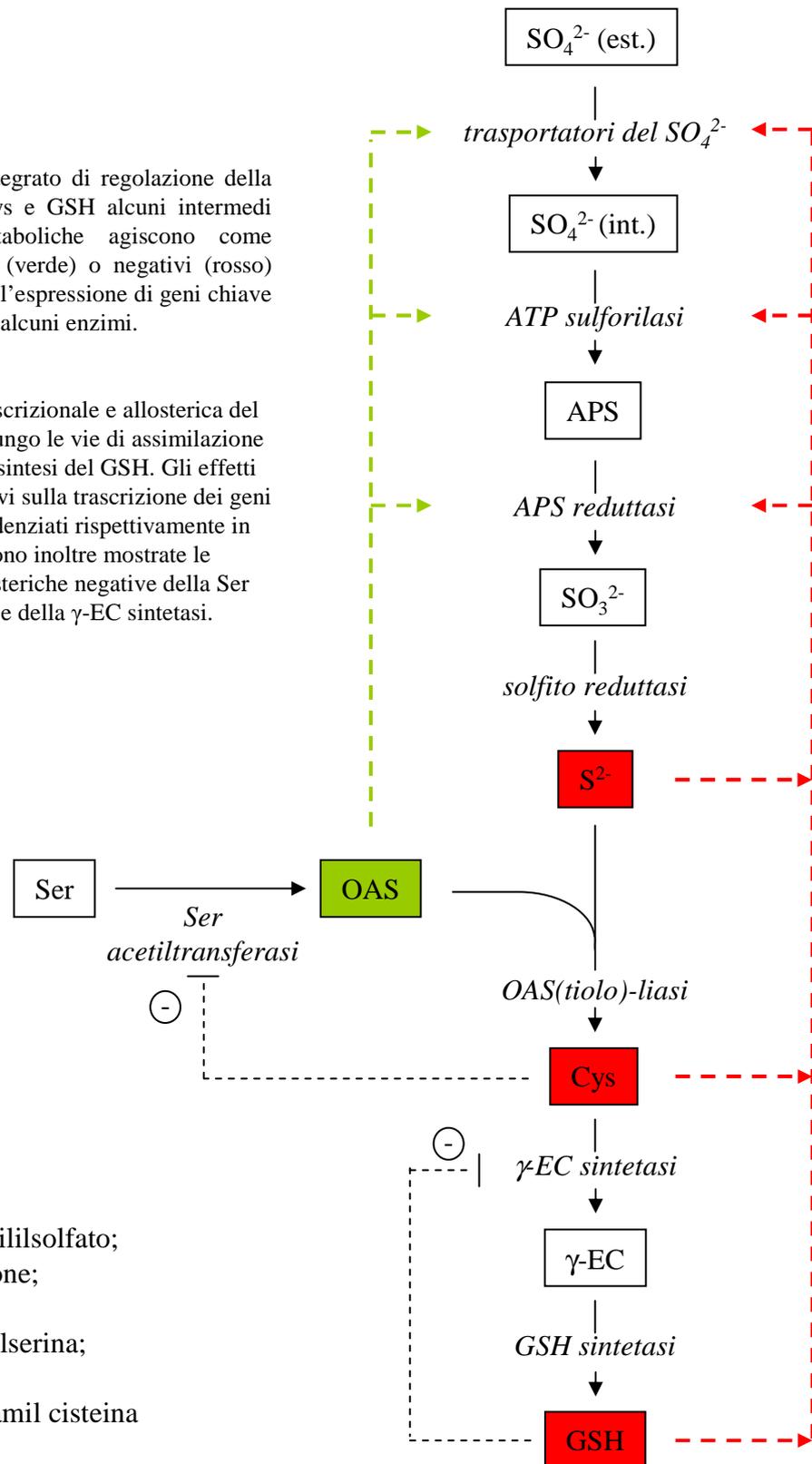


APS = 5'- adenililsolfato
OAS = O-acetilserina

Allegato 3. Meccanismo di controllo metabolico dell'assunzione e assimilazione del solfato.

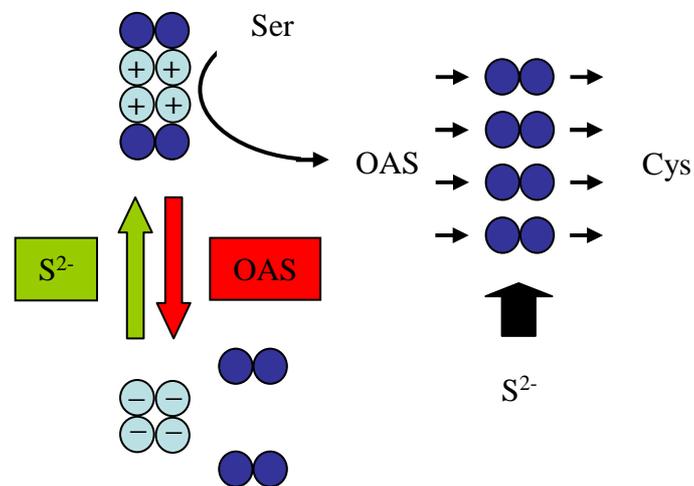
Nel modello integrato di regolazione della biosintesi di Cys e GSH alcuni intermedi delle vie metaboliche agiscono come segnali positivi (verde) o negativi (rosso) nel controllo dell'espressione di geni chiave e dell'attività di alcuni enzimi.

Regolazione trascrizionale e allosterica del flusso di zolfo lungo le vie di assimilazione del solfato e biosintesi del GSH. Gli effetti positivi o negativi sulla trascrizione dei geni chiave sono evidenziati rispettivamente in verde e rosso; sono inoltre mostrate le regolazioni allosteriche negative della Ser acetiltransferasi e della γ -EC sintetasi.



APS: 5'-adenililsolfato;
 GSH: glutatione;
 Ser: serina;
 OAS: O-acetilserina;
 Cys: cisteina;
 γ -EC: γ -glutamil cisteina

Allegato 4. Meccanismo di controllo della biosintesi di cisteina.



Regolazione della biosintesi di Cys attraverso la formazione di un complesso bi-enzimatico tra omotetrameri di Ser acetiltransferasi (cerchi azzurri) e omodimeri di OAS(tuolo)liasi (cerchi blu), in cui l'OAS(tuolo)liasi agisce come subunità regolatrice della Ser acetiltransferasi. La disponibilità di solfuro promuove la formazione del complesso, permettendo la produzione di OAS e quindi la biosintesi di Cys; l'accumulo di OAS determina la dissociazione del complesso bi-enzimatico.

Ser: serina; OAS: *O*-acetilserina; Cys: cisteina.

Allegato 5. Composizione del terreno base per l'allevamento delle piante.

Macronutrienti	
NH ₄ NO ₃	20,61 mM
CaCl ₂	2,99 mM
MgSO ₄	1,5 mM
KNO ₃	18,79 mM
KH ₂ PO ₄	1,25 mM

Altri componenti	
Saccarosio	10 g L ⁻¹
Agar	8 g L ⁻¹

Micronutrienti	
Ac-Borico	100 μM
Na-EDTA	100 μM
CoCl ₂	0,11 μM
MnCl ₂	100 μM
Ammonio molibdato	1,03 μM
KI	5 μM
Fe-tartarato	25 μM
ZnCl ₂	29,91 μM
CuCl ₂	0,1 μM

I terreni -S erano ottenuti sostituendo il MgSO₄ con il 1,5 mM MgCl₂ e aggiungendo 10 μM MgSO₄.

Allegato 6. Analisi RT-PCR semiquantitative degli alleli del gene *BjST1;2*.

6a). Elenco dei primers utilizzati per l'identificazione dei cDNA dei trasportatori del solfato e per le analisi di RT-PCR semiquantitativa.

Nome Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
<i>BjST1;2 Dir</i>	GTYYTTCGATTGGGGRCGTAR	20	52
<i>BjST1;2 Rev</i>	RAGGAAGAGCAATGTCAAGAGA	22	60
<i>Tub2 Dir</i>	TACACSGAGGGAGCKGAGTTGAT	23	64
<i>Tub2 Rev</i>	TCCTGTGTACCAATGAAGG	19	56

Secondo il codice universale i nucleotidi degenerati sono così indicati: M (A/C), R (A/G), S (G/C), Y (C/T), K (G/T), N (A/G/C/T).

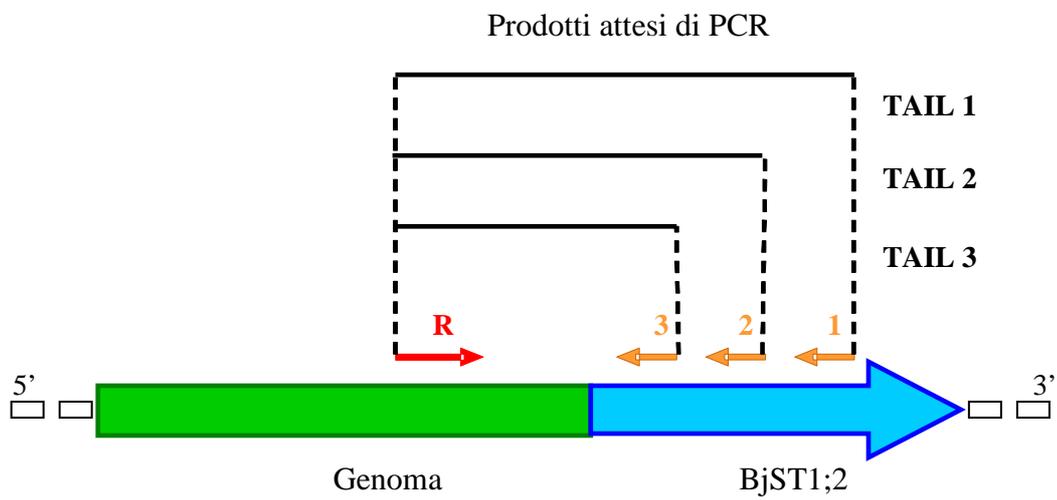
6b). Protocollo di amplificazione della reazione di PCR su di *BjST1;2* e *BjST2;1*.

Numero di cicli	Temperatura	Tempo
1	94 °C	2 min
35	94 °C	45 s
	56 °C	45 s
	72 °C	2 min e 30 s
1	72 °C	30 min

Allegato 7. Frequenze di ligazione dei prodotti di amplificazione dei retrotrascritti dei tre orologi di *BjST1;2*.

	C		Cd 10 μ M	
Allele a	4	4 %	19	15 %
Allele b	29	25 %	41	33 %
Allele c	79	71 %	65	52 %
Colonie analizzate	112		125	

Allegato 8. Strategia utilizzata per l'amplificazione della regione promotrice del gene *BjST1;2*.



1, 2 e 3 : primers specifico disegnato sul gene *BjST1;2*;

R: primer degenerato, si appaia in posizioni casuali del genoma.

Allegato 9. TAIL-PCR.

9a). Primer

Oligo	Sequenza	Mer	Descrizione
<i>ST1;2A</i>	AGACTGGCAATAGTTAAACCGGCA ATGAG	29	Con B04 per TAIL 1
<i>ST1;2B</i>	CGGCAATGAGATCACCACGGAAC	23	Con B04 per TAIL 2
<i>ST1;2C</i>	CCAATCGAAAACCGGGAACAC	21	Con B04 per TAIL 2
Tube B-04	GGACTGGAGT	10	Con i vari primer <i>ST1;2</i>

9b). Miscele di amplificazione

Reagenti	TAIL 1	TAIL 2	TAIL 3
Templato	1 µl DNA t.q.	1 µl prodotto TAIL 1 1:50	1,5 µl prodotto TAIL 2 1:10
<i>ST1;2</i> (20 µM)	0,2 µl	0,2 µl	0,3 µl
<i>B-04</i> (20 µM)	3 µl	3 µl	3 µl
dNTPs (2,5 mM)	1,6 µl	1,6 µl	2,4 µl
Pfu buffer 10X	2 µl	2 µl	3 µl
Pfu (3 U µl ⁻¹)	0,2 µl	0,2 µl	0,3 µl
H ₂ O	12 µl	12 µl	19,5 µl
Volume totale	20 µl	20 µl	30 µl

9c). Profili termici di amplificazione

TAIL 1

94 °C per 1 min; 5 cicli di 94 °C per 10 sec, 62 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec; 94 °C per 10 sec, 25 °C per 3 min, (incremento di 0,2 °C/sec fino a 72 °C) 72 °C per 2 min e 30 sec; 15 cicli di 94 °C per 10 sec, 68 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec, 94 °C per 10 sec, 68 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec, 94 °C per 10 sec, 44 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec; 72 °C per 5 min.

TAIL 2

94 °C per 1 min; 15 cicli di 94 °C per 10 sec, 64 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec, 94 °C per 10 sec, 64 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec, 94 °C per 10 sec, 44 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec; 72 °C per 5 min.

TAIL 3

94 °C per 1 min; 30 cicli di 94 °C per 15 sec, 44 °C per 1 min, 72 °C per 2 min e 30 sec; 72 °C per 5 min.

Allegato 10. Primer interni per l'amplificazione del promotore del gene BjST1;2.

Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
ST1;2promintdir	AGCCAAACTGCCAAAGTG	18	54
ST1;2promintrev	CCTCTGTCCCACTTTAAGT	19	56

Allegato 11. Terreni di crescita per i lieviti.

11a). YPAD

Componente	concentrazione (g L⁻¹)
Estratto di lievito	10
Bacto peptone	20
Destrosio	20
Adenina	0,03
Agar	20

11b). SD

Macronutrienti	
Sale	concentrazione (g L⁻¹)
Ammonio solfato	5
Potassio fosfato monobasico	0,85
Potassio fosfato di basico	0,15
Magnesio solfato	0,5
Sodio cloruro	0,1
Calcio cloruro	0,1

Micronutrienti	
Sale	concentrazione (µg L⁻¹)
Acido borico	500
Rame solfato	40
Potassio ioduro	100
Cloruro ferrino	200
Manganese solfato	400
Sodio molibdato	200
Zinco solfato	400

Vitamine in polvere	
Vitamina	concentrazione (µg L⁻¹)
Biotina	20
Pantotenato di calcio	2000
Acido folico	2
Inositolo	10000
Niacina	400
Acido p-amino-benzoico (4°C)	200
Piridossina HCl	400
Riboflavina	200
Tiamina HCl	400

AA dropout	
Amminoacido	concentrazione (mg L⁻¹)
Arginina HCl	20
Tiroxina	30
Lisina	30
Fenilalanina	50
Acido glutammico	100
Acido aspartico	100
Valina	150
Treonina	200
Serina	400
Adenina emisolfato	75
Gracile	20
Metionina	20
Triptofano	20
Leucina	60
Istidina	20

Altri componenti	
Agar	20 g L ⁻¹
Glucosio (destrosio)	20 g L ⁻¹

I terreni SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Met, SD/-Ura, SD/-His, SD/-Ade, SD/-His/-Trp, SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His erano ottenuti eliminando dalla composizione base del terreno SD i relativi amminoacidi.

Allegato 12. Preparazione della libreria AD (protocollo SMART™ technology).

12a). Sequenze dei primers utilizzati nella reazione di retrotrascrizione dell'RNA

Nome Oligo	Sequenza	Mer
<i>CDS III Primer</i>	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACAT G-d(T)30	57
<i>SMART III Oligo</i>	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGC CATTATGGCCGGG	39

12b). Sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione dei cDNA

Nome Oligo	Sequenza	Mer
<i>5' PCR Primer</i>	TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGC AGAGTGG	33
<i>3' PCR Primer</i>	GTATCGATGCCACCCCTCTAGAGGCC GAGGCGGCCGACA	39

12c). Profilo termico delle reazioni di amplificazione del cDNA

Numero di cicli	Temperatura	Tempo
1	95 °C	45 sec
26	95 °C	10 sec
	68 °C	6 min *
1	68 °C	5 min

* Il tempo di estensione nella reazione di amplificazione era aumentato di 5 sec ad ogni ciclo.

Allegato 13. Analisi di restrizione.

13a). Miscela di restrizione *Hind III*

Componenti	Quantità
Plasmide	2 μL
Buffer 10X	2 μL
<i>HindIII</i> (10 U μL^{-1})	0,2 μL
H ₂ O	15,8 μl
Volume totale	20 μL

Le reazioni di restrizione erano condotte a 37 °C per 2 ore.

13b). Miscela di restrizione *EcoRI*

Componenti	Quantità
Plasmide	2 μL
Buffer 10X	2 μL
BSA Buffer 10X	2 μL
<i>EcoRI</i> (12 U μL^{-1})	0,5 μL
H ₂ O	13,5 μl
Volume totale	20 μL

Le reazioni di restrizione erano condotte a 37 °C per 1ora.

13c). Miscela di restrizione *SmaI*

Componenti	Quantità
Plasmide	2 μL
Buffer 10X	2 μL
<i>SmaI</i> (10 U μL^{-1})	0,5 μL
H ₂ O	15,5 μl
Volume totale	20 μL

Le reazioni di restrizione erano condotte a 30 °C per 1 ora.

13d). Miscela di restrizione *NotI*

Componenti	Quantità
Plasmide	2 μL
Buffer 10X	2 μL
<i>NotI</i> (15 U μL^{-1})	0,5 μL
H ₂ O	15,5 μl
Volume totale	20 μL

Le reazioni di restrizione erano condotte a 37 °C per 1 ora.

Allegato 14. Reazione di amplificazione dei cDNA dei geni S1Fa.

14a). Sequenze dei primers utilizzati nell'amplificazione dei cDNA dei geni S1Fa

Nome Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
<i>S1Fa1 dirA</i>	TTTGGATCGTAATCATGGACGGC	23	66
<i>S1Fa1 rev</i>	GTGAAGGAAGCTTAAGCTGGCTTT	24	68
<i>S1Fa2 dirA</i>	ACTCAGTTCCTTACAGAAGAA	24	74
<i>S1Fa2 rev</i>	AAACAGAAGTTGATGAGATTCAAT	24	62
<i>S1Fa3 dir</i>	CCTCGTAGCTCCGAAACGCC	20	66
<i>S1Fa3 revB</i>	AAACTAATGAGTAACGGAGTCA	22	60

14b). Profili termici di amplificazione

Numero di cicli	Temperatura			Tempo
1	94 °C			2 min
35	94 °C			45 sec
	S1Fa1 57,5 °C	S1Fa2 54,8°C	S1Fa3 55,9 °C	45 sec
	72 °C			45 sec
1	72 °C			30 min

Allegato 15. Valutazione dell'espressione genica dei geni della famiglia S1Fa.

15a). Miscela di reazione di amplificazione

Reagenti	Quantità
Templato (cDNA 1:40)	1 µL
Primer dir (10 µM)	0,75 µL
Primer rev (10 µM)	0,75 µL
Taq DNA buffer 10X	2,5 µL
dNTPs (2,5 mM)	3 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
Taq (5U µL ⁻¹)	0,15 µL
H ₂ O	15,85 µL
Volume totale	25 µL

15b). Sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione dei geni S16

Nome Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
<i>S16 dir</i>	GGCGACTCAACCAGCTACTGA	21	66
<i>S16 rev</i>	CGGTAACCTCTTCTGGTAACGA	21	62

15c). Profili termici di reazione

Numero di cicli	Temperatura				Tempo
1	94 °C				2 min
35	94 °C				45 sec
	S1Fa1 57,2 °C	S1Fa2 54 °C	S1Fa3 53,5 °C	S16 54 °C	45 sec
	72 °C				45 sec
1	72 °C				30 min

Allegato 16. Conferma dell'inserzione e selezione dei mutanti omozigoti.

16a). Elenco dei primer utilizzati

Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
N506219 LP	ATCTTGCCATGGAATGTCAAG	21	60
N506219 RP	CTTGCAACACCAAAATGATCC	21	60
N506219 LP	ATCTTGCCATGGAATGTCAAG	21	60
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	21	62

16b). Miscela

Reagenti	µl
Templato	2
Primer dir (10 µM)	0,75
Primer rev (10 µM)	0,75
dNTPs (2,5 mM)	3
Pfu buffer 10X	2,5
Pfu (3 U µl ⁻¹)	0,25
H ₂ O	15,75
Volume totale	25

16c). Profilo termico di reazione

94 °C per 2 min; 35 cicli di 94 °C per 45 sec, 45 sec alla temperatura specifica di ciascuna coppia di primer utilizzata, 72 °C per 1 min; 72 °C per 30 min

Allegato 17 Valutazione dell'espressione genica dei geni Sult1;1 e At1G12030.

17a). Elenco dei primer utilizzati

Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
Sultr1;1dir	GCTAGCTCCTCCGAAAGCGGGTT	23	60
Sultr1;1rev	TTGGGTCGATCACGGCCTGGCA	22	72
At1G12030dir	TGTGGGAACACCTGAGGAGC	20	64
At1G12030rev	TCACTGCCGTTGAAAGCCAC	20	62

17b). Profilo termico di reazione

94 °C per 2 min; 35 cicli di 94 °C per 45 sec, 45 sec alla temperatura specifica di ciascuna coppia di primer utilizzata, 72 °C per 1 min; 72 °C per 30 min.

Allegato 18. Analisi delle colonie positive tramite reazione di PCR su colonia.

18a). Miscele di reazione di amplificazione

Reagenti	Quantità
Templato	2 µL
pHIS2 dir (10 µM)	0,75 µL
pHIS2 rev (10 µM)	0,75 µL
Taq DNA buffer 10X	2,5 µL
dNTPs (2,5 mM)	3 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
Taq (5U µL ⁻¹)	0,15 µL
H ₂ O	14,85 µL
Volume totale	25 µL

18b). Sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione della regione intergenica di *ATIG12030*

Nome Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
<i>pHIS2 dir</i>	CCAGGGTTTTCCCAGTCACG	20	64
<i>pHIS2 rev</i>	TGCCTTCGTTTATCTTGCCTG	21	62

18c). Profili termici di reazione

Numero di cicli	Temperatura	Tempo
1	94 °C	2 min
35	94 °C	45 sec
	59 °C	45 sec
	72 °C	2 min
1	72 °C	30 min

Allegato 19. Amplificazione dei frammenti della regione promotrice del gene At1G12030.

19a). Elenco dei primer utilizzati

Oligo	Sequenza	Mer	Tm (°C)
718-1 dir	GCTAGCTCCTCCGAAAGCGGGTT	23	74
718-1 rev	TTTATGCCCTTTTCTTGATTTCT	21	52
718-2 dir	ACTGGGTTTTGAGAGTTAAG	20	56
718-2 rev	AACACGTCCAAGTTCAATG	19	54
718-3 dir	TTGAACTTGGACGTGTTTGGTT	22	62
718-3 rev	CTGATTAACGGACGCCAACATT	22	68
718-4dir	TGTTGGCGTCCGTTAATCAGA	21	58
718-4 rev	CTTCGAAATAGATAAGCGATCAT	23	62
718-5 dir	ATTGTCAGTCAAACAGATCA	20	54
718-5 rev	TTACACGTGACGGCACTAG	19	58
718-6 dir	CAGAGCCAAACACTAGTGCCG	21	66
718-6 rev	CACGGTTACATAGTAGCGCGT	21	64
718-7 dir	CCGGTACGTGTGTCCACGCGC	21	72
718-7 rev	GAGAAACCCTAAATCCCGTTA	21	60

19b). Profilo termico di reazione

94 °C per 2 min; 35 cicli di 94 °C per 45 sec, 45 sec alla temperatura specifica di ciascuna coppia di primer utilizzata, 72 °C per 45 sec; 72 °C per 30 min

BIBLIOGRAFIA

- Adams KL, Wendel JF (2005).** Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 135-141
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF (2003).** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *PNAS* **100**: 4649-4654
- Aketagawa J, Tamura G (1980).** Ferredoxin-sulfite reductase from spinach. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**: 2371-2378
- Allen RD, Bernier F, Lessard PA, Beachy RN (1989).** Nuclear factors interact with a soybean β -conglycinin enhancer. *Plant Cell* **1**: 623-631
- Aravind L, Koonin EV (2000).** The STAS domain – a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Current Biology* **10**: R53-R55
- Awazuhara M, Kim H, Goto DB, Matsui A, Hayashi H, Chino M, Kim SG, Naito S, Fujiwara T (2002).** A 235-bp region from a nutritionally regulated soybean seed-specific gene promoter can confer its sulfur and nitrogen response to a constitutive promoter in aerial tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **163**: 75-82
- Baier M, Dietz KJ (1997).** The plant 2-cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant Journal* **12**: 179-190
- Ball L, Accotto G-P, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland L, Mejia-Carranza J, Reynolds H, Karpinski S, Mullineaux PM (2004).** Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defence gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2448-2462
- Berna A, Bernier F (1999).** Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant Molecular Biology* **39**: 539-549
- Bick JA, Åslund F, Chen Y, Leustek T (1998).** Glutaredoxin function for carboxyl-terminal domain of the plant-type 59-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **95**: 8404-8409
- Bolchi A, Petrucco S, Tenca PL, Foroni C, Ottonello S (1999).** Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific downregulation by L-cysteine. *Plant Molecular Biology* **39**: 527-537

- Bork C, Schwenn JD, Hell R (1996).** Isolation and characterization of a gene for assimilatory sulfite reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **212**: 147-153
- Brunold C, Suter M (1989).** Localization of enzymes of assimilatory sulfate reduction in pea roots. *Planta* **179**: 228-234
- Buchner P, Stuiver C, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ (2004).** Regulation of sulfate uptake in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology* **136**: 3396-3408
- Chai TY, Chen Q, Zhang YX, Dong J, An CC (2003).** Cadmium resistance in transgenic tobacco plants enhanced by expressing bean heavy metal-responsive gene *PvSR2*. *Science in China Series C-Life Sciences* **46**: 623-630
- Clemens S (2001).** Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486
- Clemens S (2006).** Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707-1719
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI (1998).** The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 12043-12048
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI (1999).** Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* **18**: 3325-3333
- Cobbett CS (2000).** Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* **123**: 825-832
- Costa G, Morel J (1994).** Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 561-570
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Neil Baker N, Wellburn A, Mullineaux P (1999).** Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277-1292
- Crema B (2007).** Caratterizzazione funzionale della famiglia multigenica dei trasportatori del solfato di *Brassica juncea*: regolazione dell'espressione genica in risposta all'esposizione a Cd²⁺ ed allo stato nutrizionale della pianta. Tesi di dottorato

- De Kok LJ (1990).** Sulfur metabolism in plants exposed to atmospheric sulfur. In: Rennenberg H, Brunold C, de Kok LJ, Stulen I (Eds). *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants; Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects*, SPB Academic Publishing, The Hague, pp 111-130
- De Kok LJ, Stuiver CEE, Rubinigg M, Westerman S, Grill D (1997).** Impact of atmospheric sulfur deposition on sulfur metabolism in plants: H₂S as sulfur source for sulfur deprived *Brassica oleracea* L. *Botanica Acta* **110**: 411-419
- Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Vega JM, Romero LC, Gotor C (2001).** The cytosolic *O*-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 9297-9302
- Dron M, Clouse SD, Dixon RA, Lawton MA, Lamb CJ (1988).** Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**: 6738-6742
- Droux M, Martin J, Sajus P, Douce R (1992).** Purification and characterization of *O*-acetylserine (thiol) lyase from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **295**: 379-390
- Droux M, Ruffet ML, Douce R, Job D (1998).** Interactions between serine acetyltransferase and *O*-acetylserine (thiol) lyase in higher plants: structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *European Journal of Biochemistry* **225**: 235-245
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993).** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & Development*, **7**: 555-569
- Ellis JG, Tokuhisa JG, Llewellyn DJ, Bouchez D, Singh K, Dennis ES, Peacock WJ (1993).** Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *Plant Journal* **4**: 433-443
- Elmsley J (2001).** *Nature's Building Blocks. An A-Z Guide to the Elements*. Oxford University Press, Oxford, UK, 552 pp
- Fields S (1993).** The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *METHODS: A companion to Methods in Enzymology*, **5**: 116-124
- Gomez LD, Noctor G, Knight MR, Foyer CH (2004).** Regulation of calcium signalling and expression by glutathione. *Journal of Experimental Botany* **55**:

1851-1859

- Ghosh S, Selby MJ, Peterlin BM (1993).** Synergism between Tat and VP16 in trans-activation of HIV-1 LTR. *Journal of Molecular Biology* **234**: 610–619
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1987).** Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plant, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**: 439-443
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D (1998).** Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 7220-7224
- Ha S-B, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999).** Phytochelatase synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1163
- Hagen G, Uhrhammer N, Guilfoyle TJ (1988).** Regulation of expression of an auxin-induced soybean sequence by cadmium. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 6442-6446
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984).** Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends in Biochemical Sciences* **11**: 372-375
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990).** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease - an overview. *Methods in Enzymology* **186**: 1-85
- Harada E, Yamaguchi Y, Koizumi N, Hiroshi S (2002).** Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology* **159**: 445-448
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993).** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805–816.
- Hawkesford MJ (2000).** Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* **51**: 131-138
- Hawkesford MJ (2003).** Transporter gene families in plants: the sulphate transport gene family - redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* **117**: 155-163

- Hawkesford MJ, Davidian J-C, Grignon C (1993).** Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* **190**: 297-304
- Hawkesford MJ, Wray JL (2000).** Molecular genetics of sulphur assimilation. *Advances in Botanical Research* **33**: 159-223
- Hawkesford MJ, De Kok LJ (2006).** Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* **29**: 382-395
- Heiss S, Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1999).** Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Molecular Biology* **39**: 847-857
- Hell R, Bergmann L (1990).** γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localisation. *Planta* **180**: 603-612
- Hell R, Jost R, Berkowitz O, Wirtz M (2002).** Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **22**: 245-257
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux H, Piette L, Magniette M-LM, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou J-P, Vavasseur A, Leonhardt N (2006).** Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* **88**: 1751-1765
- Hernandez L, Carpena-Ruiz R, Garate A (1996).** Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **19**: 1581-1598
- Herouart D, Van Montagu M, Inzé D (1993).** Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **90**: 3108-3112
- Herschbach C, Rennenberg H (1991).** Influence of glutathione (GSH) on sulfate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. *Journal of Experimental Botany* **42**: 1021-1029
- Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji N, Saito K (2003).** Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of *O*-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulphur nutrition. *Plant Journal* **33**: 651-663

- Howarth JR, Domínguez-Solís JR, Gutiérrez-Alcalá G, Wray JL, Romero LC, Gotor C (2003).** The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Molecular Biology* **51**: 589-598
- Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1995a).** A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **107**: 1067-1073
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995b).** Cadmium-sensitive, cad-1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* **107**: 1059-1066
- Jefferson RA (1987).** Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**: 387-405
- Jost R, Altschmied L, Bloem E, Bogs J, Gershenzon J, Hähnel U, Hänsch R, Hartmann T, Kopriva S, Kruse C, Mendel RR, Papenbrock J, Reichelt M, Rennenberg H, Schnug E, Schmidt A, Textor T, Tokuhisa J, Wachter A, Wirtz M, Rausch T, Hell R (2005).** Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* **86**: 491-508
- Kataoka T, Hayashi N, Yamaya T, Takahashi H (2004a).** Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of Sultr3;5 as component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiology* **136**: 4198-4204
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Yamaya T, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H (2004b).** Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2693-2704
- Kawashima CG, Berkowitz O, Hell R, Noji M, Saito K (2005).** Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulphur assimilation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 220-230
- Kim H, Hirai MY, Hayashi H, Chino M, Naito S, Fujiwara T (1999).** Role of *O*-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed-storage gene by sulfur and nitrogen nutrition. *Planta* **209**: 282-289

- Kopriva S, Koprivova A (2004).** Plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1775-1783
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999).** The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* **40**: 37-44
- Kreuz K, Tommassini R, Martinoia E (1996).** Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology* **111**: 349-353
- Krueger RJ, Siegel LM (1982).** Spinach siroheme enzymes: isolation and characterization of ferredoxin-sulfite reductase and comparison of properties with ferredoxin-nitrite reductase. *Biochemistry* **21**: 2892-2904
- Kubota H, Saito K, Yamada T, Maitani T (2000).** Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* **53**: 239-245
- Kunert KJ, Foyer CH (1993).** Thiol/disulphide exchange in plants. In: De Kok LJ, Stulen I, Rennenberg H, Brunold C, Rauser WE, eds. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants: Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 139-151
- Kusaba M, Takahashi Y, Nagata T (1996).** A multiple-stimuli-responsive as-1-related element of *parA* gene confers responsiveness to cadmium but not to copper. *Plant Physiology* **111**: 1161-1167
- Kutz A, Muller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW (2002).** A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **30**: 95-106
- Lancilli C (2008).** Individuazione e caratterizzazione di geni coinvolti nella nutrizione solfatica e nelle risposte a cadmio delle piante: loro possibile utilizzo per la costituzione di bioindicatori. Tesi di dottorato
- Lappartient AG, Touraine B (1996).** Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. *Plant Physiology* **111**: 147-157
- Lappartient AG, Touraine B (1997).** Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity, SO_4^{2-} uptake, and oxidative stress response in intact canola roots. *Plant Physiology* **114**: 177-183
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass AMD, Touraine B (1999).** Inter-organ signalling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant*

Journal **18**: 89-95

- Lass B, Ullrich-Eberius CI (1984).** Evidence for proton/sulfate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta* **161**: 53-60
- Lee S, Leustek T (1998).** APS kinase from *Arabidopsis thaliana*: genomic organisation, expression, and kinetic analysis of the recombinant enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247**: 171-175
- Legget JE, Epstein E (1956).** Kinetics of sulfate absorption by barley roots. *Plant Physiology* **31**: 222-226
- Lescure AM, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat JF (1991).** Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**: 8222-8226
- Leustek T (2002).** Sulfate Metabolism. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, eds. *The Arabidopsis Book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, doi/10.1199/tab.0009, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Leustek T, Saito K (1999).** Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**: 637-643
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP (2000).** Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 141-165
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995).** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal* **8**: 457-463
- Lombi F, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA (2001).** Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist* **149**: 53-60
- Lunn JE, Droux M, Martin J, Douce R (1990).** Localization of ATP-sulfurylase and *O*-acetylserine (thiol) lyase in spinach leaves. *Plant Physiology* **94**: 1345-1352
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T (1996).** The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in roots cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology* **110**: 1145-1150
- Marrs KA (1996).** The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**:

- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H (2003).** Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology* **132**: 597-605
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H (2004).** A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant Journal* **38**: 779-789
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H (2005).** Identification of a novel *cis*-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* **42**: 305-314
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, Takahashi H (2006).** *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell* **18**: 3235-3251
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y (2002).** An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* **296**: 1470-1472
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzè D (1998).** Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**: 649-667
- McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM (1999).** Metals and micronutrients - food safety issues. *Field Crops Research* **60**: 143-163
- Moore RC, Purugganan MD (2005).** The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 122-128
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006).** Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiology* **140**: 411-432
- Neuenschwander U, Suter M, Brunold C (1991).** Regulation of sulfate assimilation by light and *O*-acetyl-L-serine in *Lemna minor* L. *Plant Physiology* **97**: 253-258
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R (2003).** Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal* **33**: 633-

- Nocito FF, Pirovano L, Cocucci M, Sacchi GA (2002).** Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology* **129**: 1872-1879
- Nocito FF, Lancilli C, Crema B, Fourcroy P, Davidian JC, Sacchi GA (2006).** Heavy metal stress and sulphate uptake in maize roots. *Plant Physiology* **141**: 1138-1148
- Nocito FF, Lancilli C, Giacomini B, Sacchi GA (2007).** Sulfur metabolism and cadmium stress in higher plants. *Plant Stress* **1**: 142-156
- Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H (1996).** Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* **112**: 1071-1078
- Noctor G, Foyer C (1998).** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH (2002).** Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1283-1304
- Noji M, Inoue K, Kimura N, Gouda A, Saito K (1998).** Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 32739-32745
- Noji M, Saito K (2002).** Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulfur metabolic engineering in plants. *Amino Acids* **22**: 231-243
- Nussbaum S, Schmutz D, Brunold C (1988).** Regulation of assimilatory sulphate reduction by cadmium in *Zea mays* L. *Plant Physiology* **88**: 1407-1410
- Ohkama-Ohtsu N, Kasajima I, Fujiwara T, Naito S (2004).** Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant that overaccumulates O-acetyl-L-Ser. *Plant Physiology* **136**: 3209-3222
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003)** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* **19**: 141-147

- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM (2002).** Molecular characterization of the homophytochelatase synthase of soybean *Glycine max*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 4747-4754
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV (2000).** The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 4956-4960
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002).** Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant Journal* **32**: 539-548
- Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massacci A (2003).** Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology* **133**: 829-837
- Qi X, Zhang Y, Chai T (2007).** Characterization of a novel plant promoters induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring heavy metal responsiveness. *Plant Physiology* **143**: 50-59
- Quinn JM, Merchant S (1995).** Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* *Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators. *Plant Cell* **7**: 623-638
- Quinn JM, Barraco P, Eriksson M, Merchant S (2000).** Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 6080-6089
- Quinn JM, Kropat J, Merchant S (2003).** Copper response element and Crr1-dependent Ni²⁺-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **2**: 995-1002
- Rausch T, Wachter A (2005).** Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* **10**: 503-509
- Rausser WE (1995).** Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiology* **109**: 1141-1149
- Rea PA, Vatamaniuk OK, Rigden DJ (2004).** Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatase synthase. *Plant Physiology* **136**: 2463-2474
- Renosto F, Patel HC, Martin RL, Thomassian C, Zimmerman G, Segel IH (1993).** ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf.

Archives of Biochemistry and Biophysics **307**: 272-285

- Rolland N, Droux M, Lebrun M, Douce R (1993).** *O*-Acetylserine (thiol) lyase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf: cDNA cloning, characterization and overexpression in *Escherichia coli* of the chloroplast isoform. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**: 213-222
- Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano M, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2004).** Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1122-1134
- Rouached H, Berthomieu P, El Kassis E, Cathala N, Catherinot V, Labesse G, Davidian JC, Fourcroy P (2005).** Structural and functional analysis of the C-terminal STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) domain of the *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter SULTR1;2. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 15976-15983
- Rüegsegger A, Schmutz D, Brunold C (1990).** Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* **93**: 1579-1584
- Rüegsegger A, Brunold C (1992).** Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiology* **99**: 428-433
- Saito K (2000).** Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 188-195
- Saito K (2004).** Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology* **136**: 2443-2450
- Saito K, Inoue K, Fukushima R, Noji M (1997).** Genomic structure and expression analyses of serine acetyltransferase gene in *Citrullus vulgaris* (watermelon). *Gene* **189**: 57-63
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R (1999).** Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**: 105-130
- Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1998).** cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L: evidence for Cd induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* **37**: 87-97
- Scholl RL, May ST, Ware DH (2000).** Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 1477-80
- Shelden MC, Loughlin P, Tierney ML, Howitt SM (2001).** Proline residues in two

- tightly coupled helices of the sulphate transporter, SHST1, are important for sulphate transport. *Biochemical Journal* **356**: 589-594
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T, Davies JP (2002)**. Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify *Sultr1;2*, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant Journal* **29**: 475-486
- Shibagaki N, Grossman AR (2004)**. Probing the function of STAS domains of the Arabidopsis sulfate transporters. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 30791-30799
- Shibagaki N, Grossman AR (2006)**. The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 22964-22973
- Siedlecka A, Krupa SK (1996)**. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* **34**: 834-841
- Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT (1995)**. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 9373-9377
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Vanden Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS (1997)**. Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant Journal* **12**: 875-884
- Smith FW, Rae AL, Hawkesford MJ (2000)**. Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 236-245
- Stohs SJ, Bagchi D (1995)**. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* **18**: 321-336
- Takahashi H, Sasakura N, Noji M, Saito K (1996)**. Isolation and characterisation of a cDNA encoding a sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **392**: 95-99
- Takahashi H, Yamazaki M, Sasakura N, Watanabe A, Leustek T, Engler J, Engler G, VanMontagu M, Saito K (1997)**. Regulation of sulphur assimilation in higher plants: a sulphate transporter induced in sulphate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **94**: 11102-11107
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford**

- MJ, Saito K (2000).** The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **23**: 171-182
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000).** Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 4991-4996
- Tukendorf A, Rauser WE (1990).** Changes in glutathione and phytochelatin in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Science* **70**: 155-166
- Urano Y, Manabe T, Noji M, Saito K (2000).** Molecular cloning and functional characterization of cDNAs encoding cysteine synthase and serine acetyltransferase that may be responsive for high cellular cysteine content in *Allium tuberosum*. *Gene* **257**: 269-277
- Van Assche F, Clijsters H (1990).** Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* **13**: 195-206
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P, Rea PA (1999).** AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana*: isolation and in vitro reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 7110-7115
- Vernoux T, Wilson TC, Seeley KA, Reichheld J-P, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D, May MJ, Sung ZR (2000).** The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**: 97-110
- Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ (1988).** Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology* **87**: 206-210
- Wingsle G, Karpinski S (1996).** Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* **198**: 151-157
- Wirtz M, Hell R (2003).** Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: application of cysteine feedback-insensitive isoforms of serine acetyltransferase. *Amino Acids* **24**: 195-203
- Xiang C, Oliver DJ (1998).** Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1539-1550
- Xiang C, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ (2001).** The biological functions

- of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* **126**: 564-574
- Yamaguchi Y, Nakamura T, Harada E, Koizumi N, Sano H (1999).** Differential accumulation of transcripts encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and/or nitrogen deprivation in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63**: 762-766
- Yeh CM, Hsiao LJ, Huang HJ (2004).** Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1306-1312
- Yonekura-Sakakibara K, Ashikari T, Tanaka Y, Kusumi T, Hase T (1996).** Molecular characterization of tobacco sulfite reductase: enzyme purification, gene cloning, and gene expression analysis. *Journal of Biochemistry* **124**: 615-621
- Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T, Saito K (2002).** Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in Arabidopsis roots. *Plant Journal* **29**: 465-473
- Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H (2003).** Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**: 1-7
- Zenk MH (1996).** Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **179**: 21-30
- Zhang YX, Chai TY, Dong J, Zhao WM, Cheng AC, Chen ZL, Burkard G (2001).** Cloning and expression analysis of the heavy metal-responsive gene *PvSR2* from bean. *Plant Science* **161**: 783-790
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD (2001).** Reverse transcriptase template switching: A SMARTTM approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, **30**: 892-897

Ed eccoci giunti ai ringraziamenti...

Un sentito grazie va

*Al **Prof. Sacchi** per l'opportunità di intraprendere questo percorso e il sostegno che mi hanno permesso di portarlo a termine..*

*Al **Dott. Fabio Francesco Nocito** che mi ha sempre dato fiducia, appoggio e consigli che mi hanno aiutata a crescere non solo lavorativamente ma anche umanamente. Un grazie anche per la grande pazienza portata nei miei momenti di sfiducia e sconforto.*

*Alla **Dott.ssa Clarissa Lancilli** senza la quale non sarei giunta a questo traguardo. Grazie per i momenti in cui hai saputo consolarmi ma anche per quelli in cui mi hai rimproverata ben bene per spronarmi ad andare avanti...Semplicemente grazie di esserci stata e di essere diventata molto più che una semplice collega.*

*A **Simona, Silvia, Federica, Alessandra, Serena** e tutti coloro che frequentando il laboratorio per tempi più o meno lunghi mi hanno sempre fatto sentire come a casa. Grazie anche per le pause caffè spesso fondamentali nella lunga giornata in laboratorio.*

Un pensiero particolare a:

***Mamma e Fede** che nonostante tutto non mi hanno mai fatto sentire di non esserci stata e per essermi stati sempre vicini anche se so che non è stato facile. Vi voglio bene e non ci sarei riuscita senza di voi.*

Sonia, Barbara e Francesca** amiche carissime ormai da un po' sulle quali posso sempre contare in ogni momento e per ogni cosa...**GRAZIE!!!

***Michele** entrato come un fulmine nel mio mondo e che è stato in numerosi momenti il mio raggio di sole personale.... Grazie semplicemente di esserci! Un grazie speciale anche per aver portato il mio PC nel suo zaino in ben due occasioni in quota, so che pesava, per permettermi di finire la scrittura!!!!*

Un grazie va anche a tutti coloro che sono passati anche solo per un attimo durante questi tre anni e che mi hanno dato forza e coraggio a volte anche solo con un sorriso