



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Chimica Biologica

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOCHIMICA E
BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO: BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO: XX

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI UN CANALE SELETTIVO PER IL POTASSIO DEL CIANOBATTERIO *Synechocystis* sp. PCC 6803

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Lorenzo Pinna

Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio M. Giacometti

Correlatori: Prof.ssa Ildikò Szabò

Dott.ssa Elisabetta Bergantino

Dottoranda: Manuela Zanetti

31 gennaio 2008

INDICE

INDICE	0
DESCRIZIONE RIASSUNTIVA DEL CONTENUTO DELL'ELABORATO	4
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	6
1. INTRODUZIONE	8
1.1 L'omeostasi del potassio nelle cellule	9
1.1.2 Gli ioni potassio e il gradiente elettrochimico	9
1.1.3 Il movimento degli ioni attraverso la membrana cellulare	10
1.1.4 Caratteristiche generali dei canali del potassio	13
1.1.4.1 La struttura di base e l'attività	13
1.1.4.2 Il filtro di selettività (K ⁺ -filter) e le sue varianti	16
1.1.4.3 I meccanismi di regolazione dell'apertura/chiusura dei canali	18
1.1.5 I canali del potassio nei procarioti	20
1.1.6 I canali del K ⁺ nelle piante	24
1.1.6.1 Canali <i>Shaker</i> in pianta	26
1.1.6.2 Altri canali del potassio in pianta	28
1.2 La fotosintesi	29
1.2.1 I fotosistemi	29
1.2.1.1 Lo schema Z	30
1.2.1.2 L'assorbimento della luce e il trasporto elettronico	31
1.3 I cianobatteri e l'origine endosimbiontica dei plastidi	33
1.3.1 I cianobatteri	33
1.3.2 I fotosistemi dei cianobatteri	34
1.3.3 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	36
1.3.4 La teoria endosimbiontica	36
1.4 Il traffico intracellulare delle proteine	40
1.4.1 Traslocazione post-traduzionale delle proteine	40
1.4.2 L'import di proteine al cloroplasto	43
1.5 Ruolo dei canali ionici nella regolazione della fotosintesi	45
1.6 Il canale del potassio SynK	46
2. MATERIALI E METODI	51
2.1 Materiali	51
2.1.1 I plasmidi	51

2.1.1.1 Il plasmide pSynK-EGFP	51
2.1.1.2 Il plasmide pN-tKCh	52
2.1.1.3 Il plasmide pUC4K	53
2.1.1.4 Il plasmide pSynK-His_tag.	54
2.1.2 Ceppi batterici e condizioni di crescita	54
2.1.2.1 Il ceppo batterico <i>E. coli</i> InvαF'	54
2.1.2.2 Il ceppo batterico <i>E. coli</i> BZ37	55
2.1.2.3 Il ceppo batterico <i>E. coli</i> C41(DE3)	55
2.1.2.4 Il ceppo batterico <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	55
2.1.3 L'anticorpo anti-KPORE	56
2.2 Metodi	57
2.2.1 Tecniche di biologia molecolare	57
2.2.1.1 Digestione di DNA mediante enzimi di restrizione	57
2.2.1.2 Ligazione	57
2.2.1.3 Preparazione di batteri <i>E. coli</i> competenti e trasformazione	57
2.2.1.4 Estrazione di plasmidi da batteri	58
2.2.1.5 Preparazioni di DNA plasmidico (mini - midiprep)	59
2.2.1.6 Elettroforesi su gel di agarosio	60
2.2.1.7 Sequenziamento	60
2.2.1.8 Induzione dell'espressione	61
2.2.1.9 Purificazione mediante cromatografia su colonna	62
2.2.1.10 Trasformazione di <i>Synechocystis</i> mediante elettroporazione	63
2.2.1.11 Isolamento di DNA genomico da <i>Synechocystis</i>	63
2.2.1.12 PCR (Polymerase Chain Reaction)	64
2.2.2 Tecniche di biochimica	67
2.2.2.1 Determinazione della concentrazione proteica	67
2.2.2.2 Misura della concentrazione di clorofilla nelle piante	67
2.2.2.3 Determinazione concentrazione clorofilla nei cianobatteri	68
2.2.2.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)	68
2.2.2.5 Trasferimento delle proteine su membrane di PVDF	69
2.2.2.6 Sviluppo della membrana di PVDF	69
2.2.2.7 Colorazione con Blue Commassie	69
2.2.2.8 Calcolo del peso molecolare	70
2.2.2.9 Preparazione dei tilacoidi di pianta	70
2.2.2.10 Cromatografia di immunoaffinità	70
2.2.2.11 Elettroforesi bidimensionale	71
2.2.2.12 Colorazione con argento per analisi di spettrometria di massa	72

2.2.2.13 Digestione triptica ed estrazione dei peptidi	73
2.2.3 Tecniche fluorimetriche	74
2.2.3.1 Misure di fluorescenza dell'Acridine Orange mediante fluorimetro PAM	74
2.2.4 Tecniche di microscopia	74
2.2.4.1 Preparazione dei campioni per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione	74
2.2.4.2 Immunogold labelling	75
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	77
3.1 Produzione di un anticorpo policlonale diretto contro la proteina SynK	78
3.2 Procedura di costruzione del ceppo mutante	82
3.2.1 Controllo della corretta mutagenesi	83
3.3 Analisi del fenotipo	86
3.3.1 Curve di crescita	86
3.3.2 Microscopia elettronica	89
3.3.3 Analisi dei pigmenti	90
3.3.4 Analisi tramite WB dell'espressione del canale	91
3.3.5 Misure di Δ pH con il fluorimetro PAM	94
3.4 Ricerca dell'omologo in piante superiori	97
3.4.1 Analisi bioinformatica dei presunti omologhi	97
3.4.2 Purificazione della proteina mediante immunopurificazione	98
3.4.3 Purificazione da gel e determinazione dell'identità molecolare tramite spettrometria di massa.	100
3.5 Espressione della proteina SynK intera in <i>E.coli</i> .	102
4. CONCLUSIONI	104
BIBLIOGRAFIA	108

DESCRIZIONE RIASSUNTIVA DEL CONTENUTO DELL'ELABORATO

Versione in lingua italiana:

Il mio progetto di dottorato si focalizza sulla caratterizzazione di un canale del potassio (definito SynK) che è stato identificato nel genoma del cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC6803, un organismo fotoeterotrofo. SynK è stato clonato, espresso in cellule di mammifero ed è stato dimostrato che in questo sistema funziona come un canale voltaggio-dipendente, selettivo per il potassio. allo scopo di determinare il ruolo fisiologico di questa proteina, ho prodotto un ceppo mutante di *Synechocystis*, delecto nel gene *synK*, il quale non è in grado di crescere nelle condizioni di crescita standard. La crescita viene ripristinata quando al ceppo viene fornito un donatore artificiale di elettroni o viene irradiato da elevate intensità di luce. Esperimenti di immunoblot, ottenuti sfruttando due specifici anticorpi prodotti contro la proteina SynK, hanno dimostrato che il canale viene differenzialmente espresso nelle diverse condizioni di crescita, in particolare l'espressione viene regolata dallo stato redox del pool di plastocinoni della catena fotosintetica. Mediante esperimenti di immunolocalizzazione abbiamo dimostrato che la proteina SynK si localizza a livello delle membrane tilacoidali dei cianobatteri. Tale canale, inoltre, mostra, in esperimenti fluorimetrici, di essere coinvolto nella formazione del gradiente protonico attraverso la membrana tilacoidale. Questi dati indicano che il canale SynK potrebbe essere coinvolto nella regolazione del processo fotosintetico. Infine mi sono occupata della purificazione e identificazione molecolare di una proteina, presente nella membrana tilacoidale dei cloroplasti delle piante superiori, che viene riconosciuta in maniera specifica dai due anticorpi prodotti contro la proteina canale procariotica.

Versione in lingua inglese:

My Ph.D. project was focused on the characterization of a prokaryotic potassium channel, called SynK, that was identified in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, a photoheterotrophic organism. SynK was cloned, expressed, and assigned as a potassium selective channel. In order to study its physiological role, I produced a SynK-deficient *Synechocystis* strain, which is unable to grow under normal illumination conditions. Growth may be restored if an electron donor is added or if high-intensity illumination is applied. Western blotting experiments, performed with antibodies raised against SynK, revealed that expression of the channel protein is correlated with growth and seems to be regulated by redox-state. The location of SynK in thylakoid membranes was shown by immunogold electron microscopy. Fluorimetric experiments indicated that SynK-deficient cyanobacteria are unable to build up a proton gradient across the thylakoid membrane upon illumination. These data indicate the crucial role played by SynK in regulating photosynthesis in these organisms. I also worked on purification and molecular characterization of a higher plants thylakoid potassium channel that was identified by immunoblot using antibodies raised against the prokaryotic channel.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ADP	Adenosina difosfato
APS	Ammonio persolfato
ASB-14	Amidosulfobetaine-14
ATP	Adenosina trifosfato
BaCl ₂	Cloruro di bario
BCA	Acido bicinconinico
BSA	Albumina di siero bovino
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary
Cyt	Citocromo
DBMIB	(2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone)
DCMU	(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)
DTT	Ditiotreitolo
EDTA	Acido Etilen-di-ammino-tetracetico
ER	Reticolo Endoplasmatico
GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	Acido N-(2-idrossietil)piperazina-N'-(2-etansolfonico)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalatto-piranoside
kDa	kiloDalton
LHC	Light Harvesting Complex
LB	Luria-Bertani
MV	Metilviologeno
P	Poro
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCC	Pasteur Culture Collection
PC	Plastocianina
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
pN-tKCh	Plasmide per l'espressione del peptide N-tKCh della proteina SynK
PQ	Plastochinone
PS	Fotosistema
pSynK-EGFP	Plasmide per l'espressione della proteina di fusione SynK-GFP
pSynK-His_tag	Plasmide per l'espressione della proteina SynK-His_tag
PVDF	Poliviniliden Fluoride
Q	Chinone
S, nS, pS	Siemens, nanoSiemens, picoSiemens
SDS	Sodium Dodecil Solfato
SynK	Canale selettivo per il potassio di <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803
TBS	Tris Buffer Saline

TEMED N, N, M', N', tetrametiletilendiamina
TRIS 2-ammino-2-idrossi-metilpropano-1,3-diolo
TTBS Tween20 Tris Buffer Saline
TM Transmembrana
WOC Water Oxygen Complex

1. INTRODUZIONE

I primi canali ionici ad essere stati studiati e di conseguenza ad essere i meglio conosciuti sono quelli in connessione con il sistema nervoso, specialmente quelli coinvolti nella generazione e nella propagazione del potenziale di azione. Comunque ora sono noti anche per essere coinvolti nella secrezione, nell'endocitosi, nella contrazione muscolare, nella trasmissione sinaptica, nel controllo ciliare, nella fertilizzazione ecc.. I canali ionici sono stati trovati nei batteri, negli Archea e negli eucarioti, indicando radici evolutive molto profonde. Per ragioni tecniche e storiche i canali principalmente studiati sono quelli del regno animale e quelli procariotici.

In questo elaborato verrà discusso in modo approfondito un canale ionico selettivo per il potassio identificato nel cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC 6803 e un suo ipotetico omologo localizzato nel cloroplasto delle piante superiori. Si rende necessaria quindi, una breve introduzione sull'omeostasi del potassio e la regolazione del suo trasporto nelle cellule, in particolare quelle procariotiche e quelle vegetali. Quindi verranno descritti brevemente il processo fotosintetico, i cianobatteri, la teoria endosimbiontica sull'origine dei cloroplasti e l'importanza dei canali ionici nella regolazione della fotosintesi. Infine dopo un accenno allo smistamento delle proteine nella cellula, verrà descritto il canale del potassio SynK.

1.1 L'omeostasi del potassio nelle cellule

1.1.2 Gli ioni potassio e il gradiente elettrochimico

Il potassio è lo ione più abbondante presente nel citosol delle cellule. *Escherichia coli*, per esempio, ha una concentrazione di K^+ interna circa 200 mM, mentre il mezzo di crescita standard per questi batteri (Luria-Bertani) contiene potassio ad una concentrazione circa 7 mM (Kuo 2003). Questa concentrazione interna così elevata viene mantenuta anche quando i batteri sono cresciuti in un mezzo minimo contenente concentrazioni submolari di K^+ (Schulz 1961). I processi enzimatici e metabolici della cellula sono generalmente meglio adattati a concentrazioni interne così alte. Diversamente da altri cationi, queste concentrazioni di potassio non interferiscono con le strutture e le reazioni delle macromolecole come DNA, RNA e proteine in soluzioni acquose. La conseguenza di questa abbondanza di potassio e dei suoi controioni (glutammato, fosfati organici ecc.) è che esso funge da principale osmolita all'interno della cellula. Questo e molecole neutre, quali glicina e betaina, favoriscono l'ingresso dell'acqua, attraverso il doppio strato lipidico, nel citoplasma allo scopo di mantenere il turgore cellulare che è necessario alla distruzione delle strutture esistenti, in modo che il materiale di nuova sintesi possa essere aggiunto durante la crescita. A causa di questo ruolo critico, si ritiene che sia stato evoluto un meccanismo a *feedback* per regolare la concentrazione interna di K^+ , dipendente dalla osmolarità totale esterna. Il potassio contenuto nelle cellule di *E. coli*, per esempio, aumenta in maniera lineare da 200 a 1000 mM quando l'osmolarità esterna cresce da 100 a 1200 mOsm (Epstein 2003, Bakker 1993).

Il doppio strato lipidico delle membrane mantiene la differenza di concentrazione di potassio ed la differenza di potenziale tra l'interno e l'esterno. Il gradiente elettrochimico del potassio attraverso la membrana, espresso in termini di energia, è:

$$\Delta\mu_{K^+} = F\Delta\Psi + RT\ln [K^+]_{in}/[K^+]_{out}, \quad (\text{Equazione 1})$$

dove $\Delta\Psi$ è il potenziale di membrana (ad esempio il potenziale elettrico del citoplasma rispetto all'ambiente esterno), F è la costante di Faraday, R è la costante dei gas e T è la temperatura in gradi Kelvin.

Come abbiamo visto in precedenza, la concentrazione di potassio interna ($[K^+]_{in}$) è maggiore di quella esterna ($[K^+]_{out}$), ma molto spesso il citoplasma è elettricamente negativo (con rare eccezioni). Il potenziale di membrana di *E. coli* cresciuto aerobicamente, per esempio, è stimato essere compreso tra -94 e -157 mV quando il pH esterno è cambiato da 6.25 a 8.25 (Harold 1996, Kashket 1982). La componente elettrica $\Delta\Psi$ quindi tende a portare K^+ nella

cellula mentre la componente chimica dell'equazione 1, $\ln[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$, tende a portarlo fuori. Il potassio quindi può essere guidato passivamente verso l'interno o l'esterno della cellula dipendentemente dalla relativa importanza di queste due componenti nel determinare la forza motrice.

1.1.3 Il movimento degli ioni attraverso la membrana cellulare

Il gradiente di ioni, organici ed inorganici, attraverso la membrana può essere mantenuto grazie agli idrocarburi presenti nel doppio strato lipidico in quanto questi rendono la membrana significativamente impermeabile agli ioni. In mancanza di neutralizzazione da parte dei controioni (NH_4 , acetato ecc..), gli ioni possono attraversare la membrana attraverso il lumen o il poro di diverse proteine di membrana. Ci sono 3 categorie di proteine che regolano il traffico degli ioni: le prime due categorie sono costituite dai trasportatori (pompe ioniche o scambiatori), mentre la terza è costituita dai canali ionici.

Le proteine trasportatrici muovono gli ioni contro gradiente a spese di un consumo di energia sotto forma di idrolisi di ATP (per le pompe) o di gradiente di altri ioni (per gli scambiatori, sia simporti che antiporti). *E. coli* per esempio, ha 3 sistemi di importo del potassio nella cellula, Trk, Kdp e Kup (Epstein 2003). Il sistema principale è Trk (transport of K^+), un sistema costitutivo, a bassa affinità ed alta velocità energizzato dalla forza proton-motrice e dall'idrolisi di ATP. Il secondo sistema di trasporto del potassio è Kdp (K^+ -dependent growth), un sistema ad alta affinità e bassa velocità, inducibile dalla pompa ATPasica di tipo P. Il terzo sistema, Kup, è apparentemente un sistema alternativo a Trk, e funziona prevalentemente quando le cellule vengono cresciute a valori di pH bassi (Trchounian 1999). C'è inoltre un meccanismo di efflusso del potassio, in queste cellule, che include i sistemi KefB e KefC che apparentemente sono più simili agli antiporti Na^+/H^+ e K^+/H^+ che ai canali del potassio.

Nel genoma di *Synechocystis* sp. PCC 6803 sono stati individuati tre sistemi di trasporto del potassio: il trasportatore Ktr, il trasportatore Kdp e i canali del potassio. Il sistema Ktr, un trasportatore dipendente dal Na^+ e costituito da tre subunità KtrA, KtrB e KtrE, sembra essere predominante tra i sistemi di *uptake* di potassio in *Synechocystis* (Berry 2003; Matsuda 2004; Matsuda 2006). (figura 1.1) (figura 1.2) Studi recenti hanno ipotizzato che il sistema Ktr sia regolato da una ATPasi e da un antiporto Na^+/H^+ , che sono ritenuti i maggiori responsabili dell'estrusione di Na^+ in *Synechocystis*. Inoltre, altre proteine di membrana potrebbero essere coinvolte nella formazione del gradiente protonico, in quanto l'estrusione indotta dalla luce di H^+ è stata osservata in vari cianobatteri (Matsuda 2006).

Tutti questi sistemi di influsso ed efflusso non sono da confondere con i canali selettivi per il potassio che sono membri della terza categoria di proteine che regolano il traffico degli ioni. I canali ionici sono differenti dalle precedenti due classi di trasportatori, in quanto un canale consiste esclusivamente di un “poro aperto” attraverso il quale gli ioni possono diffondere seguendo il loro gradiente elettrochimico. A differenza dei β -barrels che formano le porine della membrana esterna dei batteri Gram negativi, le subunità dei canali ionici della membrana plasmatica sono costituite da α -eliche. Questi pori spesso si formano quando le eliche di diverse subunità identiche o simili si trovano insieme a circondare una via di passaggio per gli ioni. La conformazione del poro permette a queste proteine di funzionare in modo completamente differente rispetto a quello delle pompe o degli scambiatori. Quando un canale è aperto, a potenziale di membrana pari a zero, gli ioni si muovono passivamente secondo il preesistente gradiente di concentrazione dissipando il gradiente ionico. Come discusso in precedenza, il potenziale di membrana e il gradiente di concentrazione costituiscono la forza motrice $\Delta\mu_{K^+}$ e possono avere effetti opposti sulla direzione del flusso di ioni potassio. Così, se il flusso di K^+ attraverso i canali è in entrata o in uscita dalla cellula dipenderà dal bilanciamento di queste due componenti. Le funzioni dei flussi passivi di ioni attraverso i canali nei procarioti, però, non è ancora ben nota. Molti canali del potassio negli animali, inoltre, sono in grado di mantenere il potenziale di membrana a riposo o di ristabilirlo rapidamente in seguito ad un evento di depolarizzazione. Altri canali del potassio animali regolano il potenziale di membrana a riposo in base a differenti stimoli. I canali del potassio generalmente non sono atti a condurre influssi di ioni in grandi quantità negli animali, vi sono invece evidenze di questo tipo nelle piante (Kwak 2001, Hirsch 1998). In teoria, i flussi di un tipo di ioni attraverso i canali ionici non sono in grado di avere più effetti sul potenziale di membrana di quanti possa averne una grande concentrazione dello ione stesso.

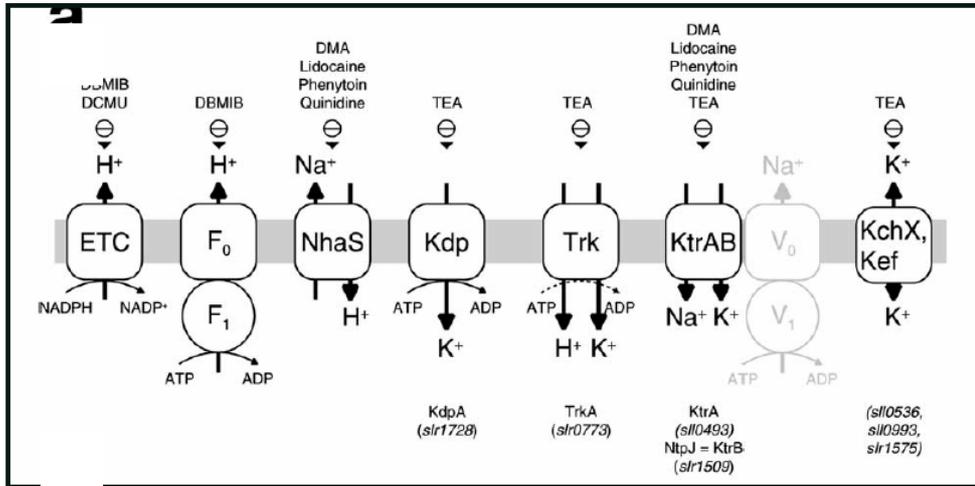


Figura 1.1 Rappresentazione schematica dei principali sistemi di trasporto ionico nei cianobatteri (Berry, 2003)

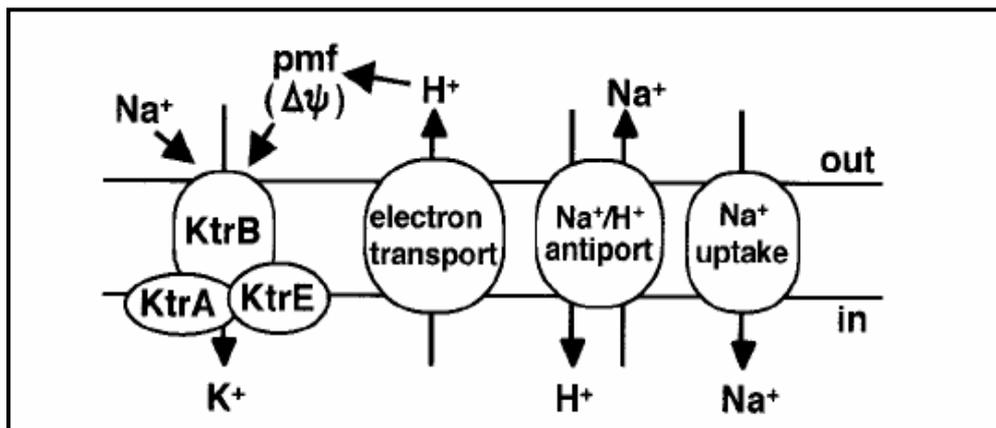


Figura 1.2 Modello di accoppiamento energetico nell'uptake di potassio mediato da KtrABE (Matsuda, 2004)

1.1.4 Caratteristiche generali dei canali del potassio

1.1.4.1 La struttura di base e l'attività

I canali del potassio sono tetrametri, costituiti generalmente da subunità identiche, anche se sono stati trovati negli animali degli eterotetrameri costituiti da subunità simili. Questi tetrametri sono chiamati anche α subunità, o subunità che formano il poro del canale, per distinguerle dalle altre subunità accessorie associate (β , γ , ecc.) che servono a regolare la subunità principale α .

Il core delle α subunità dei canali del potassio consiste di due α -eliche transmembrana, tradizionalmente chiamate TM1 e TM2 (TM, helical transmembrane segment), fiancheggianti una corta elica che costituisce il poro (P, pore, helix and filter loop) la quale contiene la sequenza aminoacidica definita K^+ -filter (figura 1.3). La più semplice subunità TM1-P-TM2 è composta di soli 94 residui aminoacidici codificati da un virus (PBCV-1) trovato in un'alga verde (*Chlorella*) che è un simbiote di un paramecio (*Paramecium bursaria*) (Kang 2004). Questa struttura TM1-P-TM2 (2TM) senza domini peptidici addizionali sembra essere la struttura minima necessaria per la permeazione, la filtrazione e l'apertura. La struttura cristallografica del canale del potassio di *Streptomyces lividans*, KcsA (figura 1.4), mostra che l'estremità C-terminale delle 4 subunità 2TM converge verso il citoplasma e occlude il passaggio agli ioni (Doyle 1998, Zhou 2001). Questa convergenza è nota anche come *gate* il quale, nella struttura cristallografica, si trova nella conformazione chiusa (Jiang 2002). Questa struttura a due eliche transmembrana esiste anche in una classe di canali di tipo *inward rectifiers* (Kir) trovata sia nei procarioti che negli eucarioti. I canali Kir hanno una architettura simile a quella del canale KcsA con delle piccole differenze nell'orientamento delle eliche e nell'assemblaggio (Kuo 2003). Non sono ancora stati trovati, invece, nei genomi degli organismi microbici procariotici ed eucariotici, subunità α di tipo TM1-P1-TM2-TM3-P2-TM4, che formano i canali del potassio a due pori, che sono stati trovati negli animali e nelle piante. Ogni subunità è covalentemente legata a due differenti strutture core TM1-P-TM2, presumibilmente formanti canali dimerici. Sembra evidente che questi debbano la loro origine ad un fenomeno di duplicazione genica il quale ha portato alla formazione di un eterotetramero di tipo $(\alpha-\alpha')_2$.

TM1-P-TM2 (o S5-H-S6)

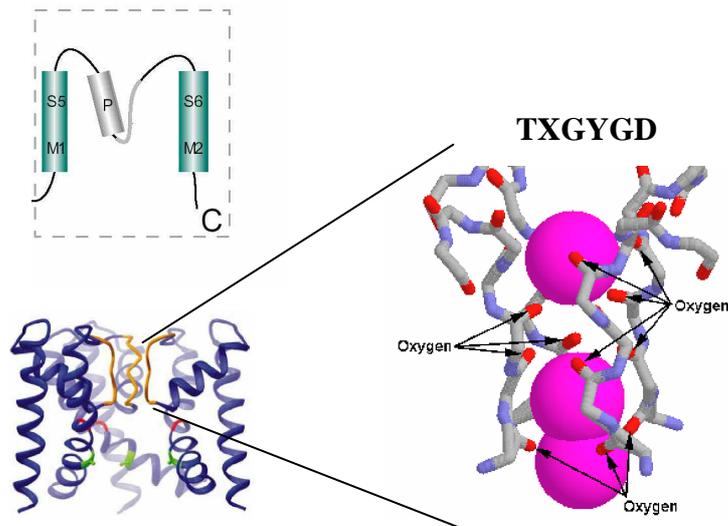


Figura 1.3 Rappresentazione schematica e struttura del motivo TM-P-TM e della regione contenente il filtro di selettività tipiche dei canali del potassio. Passaggio dello ione K⁺ (in rosa) attraverso il filtro di selettività. Sono evidenziati gli ossigeni di coordinazione che mimano la sfera di idratazione dello ione K⁺.

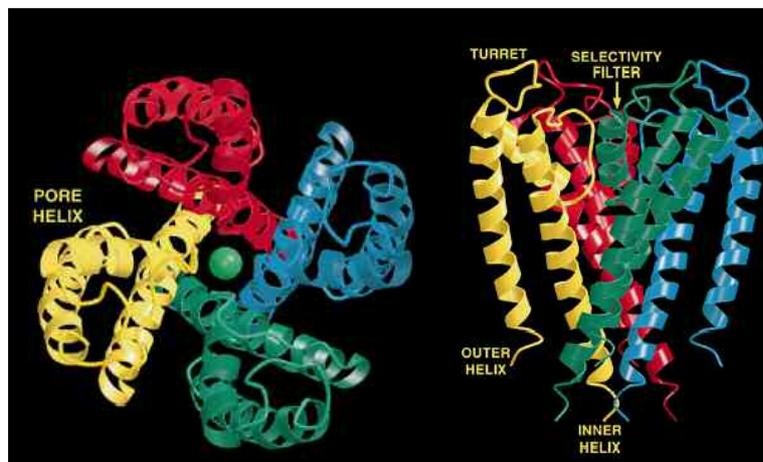


Figura 1.4 Struttura cristallografica del canale del potassio di *St. lividans* (KcsA). A sinistra: visione dal lato extracellulare. A destra: visione perpendicolare a quella a sinistra. La sfera verde rappresenta lo ione potassio (Doyle, 1998)

Un altro motivo strutturale comune alle α subunità dei canali del potassio è S1-S2-S3-S4-S5-P-S6 (S, helical transmembrane segment) definita anche (6TM) (figura 1.5). Questo motivo è spesso chiamato *Shaker*, nome dovuto ad un mutante di *Drosophila melanogaster*, che corrisponde al primo gene di canali del potassio clonato (Papazian 1987, Tempel 1987). In questo motivo, il frammento S5-P-S6 mantiene le stesse caratteristiche del core TM1-P-TM2 descritto precedentemente. Le eliche S1-S2-S3-S4 fungono da regolatori per il core. Differenti forme addizionali sono state scoperte in studi su eucarioti

unicellulari come i ciliati e i funghi. Per esempio, i funghi hanno canali del potassio con motivi ad 8 segmenti transmembrana (S1-S2-S3-S4-S5-P1-S6-S7-P2-S8) e il paramecio ha canali del potassio con motivo a 12 TM (S1-S2-S3-S4-S5-P1-S6-S7-S8-S9-S10-S11-P2-S12) (Ketchum 1995, Zhou 1995).

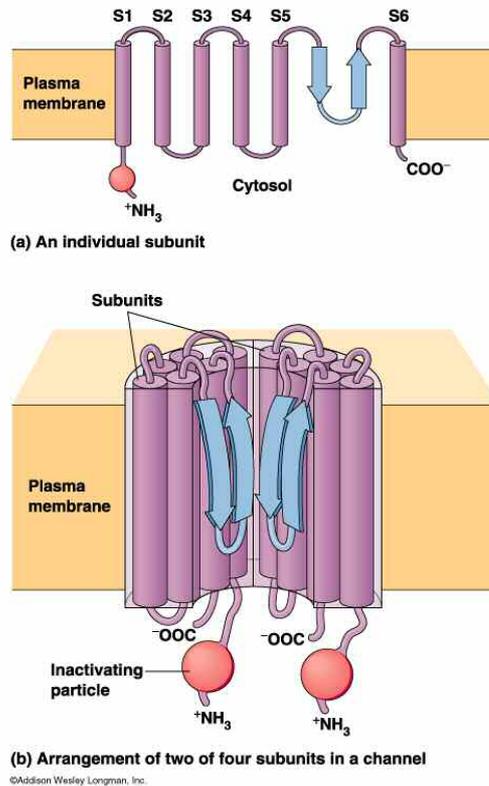


Figura 1.5 Struttura di un tipico canale del potassio nella famiglia *Shaker*

Come diretta conseguenza dell'essere un "poro aperto" l'attività dei canali del potassio può essere misurata direttamente utilizzando gli isotopi radioattivi oppure tecniche elettrofisiologiche come il patch-clamp e il bilayer lipidico planare artificiale. Le tecniche elettrofisiologiche permettono di descrivere il particolare comportamento che distingue un canale dagli altri: per ognuno è possibile, quindi, valutare la conduttanza, la selettività, la cinetica, il meccanismo di attivazione e la farmacologia.

Per quanto riguarda la conduttanza elettrica (G) (misurata in Siemens, S), essa misura la facilità con cui un flusso di corrente avviene fra due punti ed è definita per i conduttori semplici come la corrente divisa per la differenza di voltaggio attraverso il conduttore. Praticamente ogni canale funziona come un conduttore elementare nella membrana. Esistono canali ad alta conduttanza (nell'ordine di 1 nS) e canali a bassa conduttanza (nell'ordine di alcuni pS). Per quanto riguarda la selettività, generalmente i canali ionici sono altamente permeabili solo per alcuni ioni, ma non per altri. Non esistono comunque canali

perfettamente selettivi per un solo ione. Possiamo quindi distinguere canali selettivi al potassio per esempio, che comunque lasceranno passare in piccola quantità anche ioni sodio. Esistono comunque canali che non hanno una selettività particolare (lasciano passare anioni e cationi con uguale efficienza) e anche quelli che sono selettivi in generale per i cationi ma che non distinguono fra i vari tipi di cationi (per esempio sono permeabili ugualmente al sodio, potassio e calcio, ma non agli anioni).

Per quanto riguarda la cinetica di un canale, ossia la frazione di tempo trascorso da esso nello stato aperto o nello stato chiuso, rappresenta una informazione importante, spesso la principale variabile coinvolta nella determinazione della sensibilità di un canale a stimoli diversi. Ad esempio, un aumento della frazione di tempo trascorsa dal canale nello stato chiuso, da parte di un farmaco, implica l'inibizione del canale da parte del farmaco stesso, che viene quindi definito inibitore; viceversa, gli attivatori si comportano favorendo lo stato aperto. L'insieme delle sostanze in grado di agire su uno specifico canale modulandone l'attività, vengono identificate con il termine farmacologia.

I fattori che modulano l'attività dei canali ionici nella membrana possono essere di varia natura. Possiamo distinguere fra canali dipendenti dal voltaggio (*voltage-gated*), canali che si aprono come conseguenza dell'applicazione di una tensione a carico della membrana (*stretch-activated*) e canali modulati da ligandi (*ligand-gated*). I canali di quest'ultima categoria possono essere modulati da vari tipi di ligandi, come neurotrasmettitori, ioni, nucleotidi, proteine G, etc. (figura 1.6)

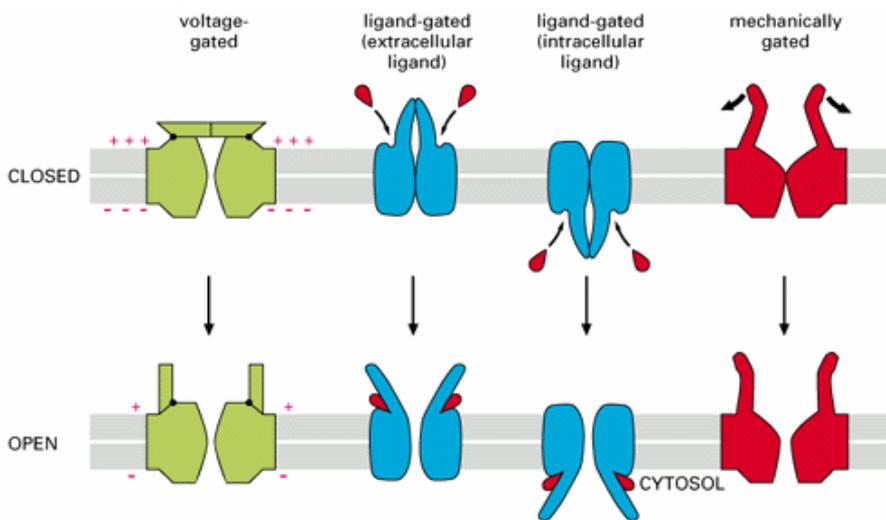


Figura 1.6 Rappresentazione schematica dei quattro metodi con cui può essere stimolata l'apertura del canale (Alberts B., terza edizione).

1.1.4.2 Il filtro di selettività (K^+ -filter) e le sue varianti

Il termine canale, come precedentemente menzionato, si riferisce alla via che permette un flusso passivo di soluti. I canali sono simili agli enzimi in cui ci sono siti che preferenzialmente interagiscono con molecole specifiche o con ioni. In molti casi, i canali aperti agiscono come un filtro così che i soluti di certe dimensioni e forme possono passare. I recettori acetilcolinici negli animali e i canali ionici *stretch-activated* MscL e MscS dei procarioti sono canali di questo tipo.

I canali del potassio, in generale, hanno la regione del filtro separata dalla regione responsabile della regolazione dell'apertura e chiusura (*gate*). Questo è stato verificato a livello atomico grazie alla struttura cristallografica di KcsA.

Il meccanismo di filtrazione degli ioni nei canali del potassio è altamente efficiente e discriminante al tempo stesso. Al contrario degli enzimi che hanno una velocità di turnover di circa 10^3 molecole di substrato per secondo, molti tipi di canali hanno una velocità maggiore di 10^7 ioni per secondo, e allo stesso tempo mantengono alta la selettività. Un canale del potassio può avere un rapporto di permeabilità di 300 a 1 in favore del K^+ rispetto al Na^+ . Questo sembra in disaccordo con i principi energetici di legame degli ioni. La struttura cristallografica del KcsA ha spiegato una parte del mistero. (figura 1.4). Ogni canale del potassio è formato da α -eliche che provengono da 4 subunità separate a racchiudere un passaggio acquoso al centro, il quale si stringe in un filtro selettivo di 2.0 Å di diametro vicino alla superficie citoplasmatica (Doyle 1998, Zhou 2001). Il filtro è caratterizzato dall'allineamento degli ossigeni carbonilici disposti orizzontalmente appartenenti alla sequenza aminoacidica canonica TXGYGD per ognuna delle 4 subunità. Coppie di questi quartetti di ossigeni parzialmente negativi circondano gli ioni K^+ con maggiore efficienza rispetto agli otto ossigeni dell'alone di idratazione che lo circondano in soluzione acquosa. La rimozione dell'alone di idratazione richiede un elevato costo energetico, quindi, il filtro di selettività è strutturato in modo tale da mimare perfettamente la sfera di idratazione di uno ione K^+ , riducendo al minimo il costo energetico per ogni ione che entra o esce dal filtro. (figura 1.3) Cationi di differenti dimensioni, quali Na^+ e Ca^{2+} , richiedono energie sostanzialmente diverse per il passaggio. La struttura, quindi, ha permesso la comprensione dell'alta selettività al potassio e della velocità di permeazione simile a quella per diffusione semplice. Nella struttura tridimensionale di KcsA, il filtro centrale è sostenuto da 4 eliche del poro in una forma a *teepee* rovesciato. Sotto il cono c'è una cavità riempita d'acqua, che è sigillata dal lato citoplasmatico dalla convergenza delle 4 eliche TM2 quando il canale è nella conformazione chiusa. Le eliche TM2 inoltre formano il *gate* (Jiang 2002). (figura 4)

La canonica sequenza del filtro di selettività, TXGYGD, mostra delle piccole varianti tra i canali descritti. Nei canali animali, per esempio, qualche volta la

tirosina (Y) viene sostituita con la fenilalanina (F) e questa sostituzione è conservativa in quanto conserva il gruppo aromatico della catena laterale che circonda e supporta il filtro. Sia per il canale Kch di *E. coli* che KcsA di *S. lividans* questa sostituzione mantiene inalterata la funzione di filtrazione del potassio (Kuo 2003, Splitt 2000). La sequenza GFG è presente nei filtri di selettività dei canali del K⁺ di alcune specie di batteri, come ad esempio *Thermoplasma volcanium*, *Mycoplasma mobile*, *Magnetococcus* sp. MC1 e altri. Un'altra variante che spesso si riscontra nei canali animali è la sostituzione del residuo di aspartato (D) con un glutammato (E). Molto probabilmente questa sostituzione è permessa in quanto mantiene inalterata la carica negativa. Nei procarioti questa variante è stata riscontrata esclusivamente nei canali (2TM)-KTN/RCK di numerosi cianobatteri, di alcune specie di proteobatteri e poche specie di altri phyla.

Sono state dimostrate possibili altre varianti che sono elencate nella tabella 1.1.

The variations of K⁺-filter sequence (GYGD) among the prokaryotic K⁺ channels

Organisms	2TM			6TM		
	Channel core	RCK/KTN	unknown domain	Voltage gated	RCK	core only
<i>Archaea</i>						
Crenarchaeota						
<i>Su. solfataricus</i> P2		<u>GLYS</u>				
<i>Su. tokodaii</i> str. 7		<u>GLYA</u>				
<i>Bacteria</i>						
Chlorobi						
<i>Chl. tepidum</i> TLS		<u>GPSE</u>				
Cyanobacteria						
<i>C. watsonii</i> WH 8501		<u>GPSE</u>				
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313				<u>GHGD</u>		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		<u>GYSD</u>				
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1		<u>GYSE</u>			<u>EPTE</u>	
Deinococcus-Thermus						
<i>D. radiodurans</i> R1			<u>GLGD</u>			
Firmicutes						
<i>B. anthracis</i> (4 strains)	<u>GDAN</u>					
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	<u>GDAN</u>					
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<u>GDGM</u>					
<i>Bacillus cereus</i> G9241	<u>GDGQ</u>					
<i>Bacillus cereus</i> ZK	<u>GDAN</u>					
	<u>GDGQ</u>					
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	<u>GLGD</u>					
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168			<u>GHGD</u>			
<i>Bacillus thuringiensis</i> str. 97-27	<u>GDAN</u>					
<i>Exiguobacterium</i> sp. 255-15	<u>GHPT</u>					
<i>Ureaplasma parvum</i> ATCC 700970						<u>AYGD</u>
Proteobacteria						
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1		<u>GYQE</u>				
<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	<u>GASG</u>					
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	<u>SLGD</u>					
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	<u>SLGD</u>					
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSV54	<u>GLAD</u>					
<i>D. desulfuricans</i> G20		<u>GPQE</u>				
<i>G. metallireducens</i> GS-15		<u>GPKE</u>				
<i>Microbulbifer degradans</i> 2-40	<u>GMSE</u>					
<i>Azotobacter vinelandii</i>					<u>GLGD</u>	
Thermotogae						
<i>T. maritima</i> MSB8		<u>GYSI</u>				

The residues that deviate from the consensus, G(Y/F)G(D/E), are underlined.

Tabella 1.1 Varianti alla sequenza GYGD presente nel filtro di selettività dei canali del potassio. (Kuo, 2003)

1.1.4.3 I meccanismi di regolazione dell'apertura/chiusura dei canali

I canali solitamente si trovano nello stato chiuso, in quanto il flusso di ioni attraverso un poro aperto è sfavorevole al metabolismo cellulare. Il tetrametro

può esistere, quindi, in almeno due conformazioni: chiusa e aperta (in realtà analisi biofisiche hanno rivelato che esistono multipli stati o sub Stati aperto/chiuso). Sia in MscL che in KcsA, i cambiamenti conformazionali delle subunità durante l'apertura del canale mostrano un meccanismo simile a quello di apertura del diaframma di una macchina fotografica. Il termine corrente è "trasduzione del segnale" che significa convertire una forma di energia in un'altra nel suo significato originale in fisica. I canali ionici sono considerati dei trasduttori nel senso che convertono l'energia di legame del ligando, o il cambiamento nel voltaggio, o il lavoro meccanico nell'apertura del canale ionico trasducendo il segnale esterno chimico, o elettrico, o meccanico in un segnale elettrico o chimico all'interno, nel citoplasma. Questi differenti parametri fisici che aprono i canali sono spesso definiti principi di apertura o stimoli.

In generale, molte proteine percepiscono il campo elettrico attraverso i loro residui aminoacidici carichi. I canali voltaggio-dipendenti spesso mostrano *pattern* di aminoacidi carichi particolarmente sensibili ai cambiamenti del potenziale di membrana.

Il meccanismo di apertura dei canali dipendenti da ligandi è molto simile all'attivazione di un enzima. Il legame di un ligando, infatti, induce un cambiamento dalla conformazione chiusa (inattiva) a quella aperta (attiva). I canali ionici negli animali possono essere aperti da differenti tipi di ligandi, quelli localizzati esternamente (glutammato, acetilcolina, protoni, ecc..) e quelli che si trovano internamente (ATP, nucleotidi ciclici, Ca^{2+} , ecc).

Le forze meccaniche, infine, possono essere trasmesse ai canali attraverso il doppio strato lipidico per indurne l'apertura. Questo tipo di meccanismo è stato riscontrato nei canali batterici MscL e MscS e in alcuni canali animali (Blount 2003, Patel 2001).

In fisiologia spesso viene descritto, in associazione all'apertura, l'insorgere di una corrente elettrica attraverso il canale dovuto ad un preciso stimolo, fenomeno definito "attivazione" dei canali. Il termine "attivazione" inoltre indica l'aumento della probabilità di apertura del canale. Per molti canali, la corrente diminuisce dopo l'iniziale attivazione, anche se lo stimolo è mantenuto. Questo processo è noto come "inattivazione" che non deve essere confuso con la "disattivazione", il processo per cui la corrente svanisce dopo la rimozione dello stimolo. Molti differenti meccanismi molecolari addizionali sono stati deteminati per descrivere l'attivazione, l'inattivazione e la disattivazione (Hille 2001).

Il sensore del voltaggio è una regione del canale arricchita in cariche elettriche che può muoversi in risposta a cambiamenti nel voltaggio causando l'apertura o la chiusura del canale. L'elica S4 di ogni subunità di diversi canali di tipo *Shaker* contiene una serie di arginine e lisine distanziate regolarmente da 2

residui come ad esempio nel motivo mostrato di seguito: **RXXRXXRXXRXXKXXRXXKXX**. Questo motivo (o motivi simili con differente numero di residui carichi) è stato evidenziato in molti canali del potassio attivati da voltaggio ed è stato dimostrato costituire la parte più importante del sensore del voltaggio. I residui carichi positivamente al terminale amminico costituiscono un'altra parte importante del sensore del voltaggio (Seoh 1996).

Molti genomi procariotici contengono geni che codificano ipotetici canali del potassio di tipo *Shaker*. Due di questi geni sono stati clonati con successo ed è stata dimostrata, con tecniche elettrofisiologiche, la loro attività come canali del K⁺ voltaggio-dipendenti. Il primo di questi è il canale KvAP di *Aeropyrum pernix*, che è un canale specifico per il potassio attivato da depolarizzazione, il secondo è MVP di *Methanocaldococcus jannaschii*, un canale selettivo per il potassio attivato da iperpolarizzazione (Ruta 2003, Sesti 2003).

1.1.5 I canali del potassio nei procarioti

Nello studio dei canali del potassio procariotici, è di interesse notare che, proseguendo lungo il genoma di *E. coli* oltre la sequenza dell'operone *trp*, si trova una *open reading frame* (*kch*) che concettualmente potrebbe dare origine ad una proteina con la canonica sequenza del filtro di selettività, simile a quella dei canali del potassio di tipo *Shaker* degli eucarioti (Milkman 1994). Anche se la tecnica del patch-clamp è stata applicata con successo alle membrane native di *E. coli*, non è stata, però, registrata alcuna conduttanza elettrica specifica del K⁺. Il passo fondamentale nella cristallografia dei canali ionici, usando una proteina procariotica (KvAP) è stato ottenuto nel laboratorio del professor MacKinnon ed ha attratto un intenso interesse nei riguardi dei canali dei procarioti (Doyle 1998). I canali del K⁺ procariotici che sono stati completamente o parzialmente cristallizzati e/o esaminati per le loro attività elettrofisiologiche sono riassunti nella tabella 1.2.

Le attività elettriche dei canali del potassio procariotici sono state registrate con successo in 6 casi quando le proteine canale sono state espresse in sistemi eterologhi quali *E. coli*, lievito, oociti di *Xenopus*, cellule di mammifero in coltura, o ricostituite in membrane lipidiche artificiali (tabella 1.2). Comunque, le attività dei canali del K⁺ procariotici nelle loro membrane native non sono mai state riportate.

The studied prokaryotic K ⁺ channels					
Channel type	Name	Organism	Activity ^a measured	Crystallized	References
<i>2TM</i>					
K ⁺ -channel core	KcsA	<i>St. lividans</i>	Yes	Yes	[1,147]
	LctB	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Yes	No	[148]
RCK/KTN domain	MthK	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	Yes	Yes	[83]
	Mjk1	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Indirect ^b	No	[149]
Glutamate receptor	GluR0	<i>Synechococcus</i>	Yes	Partial ^e	[88,91]
Inward rectifier	KirBac1.1	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Indirect ^c	Yes	[32,150]
<i>6TM</i>					
Voltage-gated	KvAP	<i>Aeropyrum pernix</i>	Yes	Yes	[62,64,74]
	MVP	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Yes	No	[63]
Cyclic nucleotide-gated	MolK1	<i>Mesorhizobium loti</i>	Indirect ^c	Partial ^f	[86,87]
RCK domain	Kch	<i>Escherichia coli</i>	Indirect ^d	Partial ^f	[14,82]

^a Various methods were used to assess channel activities. Direct measurements were made with electrodes.

^b Supports the growth of a K⁺-uptake-system deficient *E. coli* mutant (kup1, ΔkdpABC5, AtrkA) in low K⁺ media.

^c Flux of ⁸⁶Rb⁺ into liposomes.

^d Gain-of-function mutations of Kch render cells sensitive to K⁺.

^e The glutamate-binding core was crystallized.

^f The cytoplasmic C-terminus was crystallized.

Tabella 1.2 Tabella riassuntiva delle conoscenze attuali riguardanti i canali del potassio procariotici. (Kuo, 2003)

L'analisi dell'informazione contenuta nelle sequenze geniche, attualmente fornisce informazioni sulla prevalenza e sulla variabilità tra i geni dei canali del potassio nei procariotici. Per identificare i geni che codificano per canali del K⁺ nei genomi, infatti, vengono utilizzati i programmi bioinformatici BLASTP e TBLASTN del sito web NCBI, i quali allineano i 270 genomi procariotici sequenziati totalmente o parzialmente. Il prodotto di traduzione degli *open reading frame* che concettualmente soddisfa i criteri elencati di seguito viene considerato un omologo dei canali del potassio. Come primo passo, la sequenza del filtro di selettività di Kch (TITTVGYGDITP) viene utilizzata come *query* nell'allineamento. Successivamente la topologia delle sequenze ottenute, contenenti indifferentemente GYG o GFG, vengono esaminate utilizzando il pattern di idropaticità "Kyte-Doolittle" per determinare se la sequenza K⁺-filter si localizza, come ci si aspetta, verso il terminale carbossilico in un piccolo frammento idrofobico (l'elica del poro) tra due lunghe eliche transmembrana (secondo il motivo TM-P-TM). La maggior parte delle sequenze simili, quindi, si possono dividere in 3 gruppi: quelle che hanno solo 2 segmenti transmembrana che fiancheggiano il poro, chiamate 2TM, e quelle che hanno 4 o 2 TM a monte della regione della *core*, chiamate rispettivamente a 6TM e a 4TM. (figura 1.7).

Tra questi canali del K⁺, alcuni comprendono solamente la regione delle eliche TM, altri contengono anche delle code estese, sia tra le eliche transmembrana, che ai terminali amminico e carbossilico. Gli omologhi ai canali 2TM senza espansioni ai terminali, che includono il canale KcsA, fanno parte della tipologia K⁺-channel core (figura 1.7). Molti degli omologhi ai canali 6TM, senza terminali lunghi sono riconoscibili in quanto contengono residui aminoacidici carichi (arginina, lisina, istidina) nell'elica S4, conferendo al canale la caratteristica della voltaggio dipendenza per la regolazione

dell'apertura. Per determinare le caratteristiche della dipendenza dal voltaggio, sono state allineate queste sequenze con il programma bioinformatico ClustalX. In questo modo sono stati classificati come canali voltaggio-dipendenti quelle proteine che mostravano aminoacidi carichi nel segmento S4 e classificati nella tipologia "6TM *core only*" i restanti canali (Kuo, 2005) (figura 1.7). Tutti gli omologhi dei canali 4TM che sono stati trovati non mostrano lunghe sequenze aminoacidiche ai terminali amminico e carbossilico (figura 1.7). Questo tipo di canali sembrano essere unici nelle cellule procariotiche in quanto non sono noti canali simili nelle cellule eucariotiche. È da notare che questi geni per i canali del K^+ sono stati identificati utilizzando come criterio di appartenenza la presenza del motivo minimo TM-P-TM e la sequenza del filtro di selettività. È stato anche proposto che il segmento del poro e le altre differenti componenti (come per esempio la regione del *gate*) delle subunità α dei canali del K^+ possono derivare dall'associazione di due differenti peptidi (i cui geni si trovano nello stesso operone) (Kumanovics 2002).

Per quanto riguarda i canali con le estremità caratterizzate da lunghe catene peptidiche, sono stati trovati omologhi con i canali eucariotici *inward rectifier*, i "recettori del glutammato" e i "canali leganti nucleotidi ciclici". Un elevato numero di canali del potassio 2TM e 6TM trovati presentano un dominio chiamato KTN (*Rossmann fold* or NAD-binding domain) o RCK (regulating the conductance of K^+), tra i quali troviamo Kch e MthK (un canale di *Methanothermobacter thermautotrophicus*), e vengono classificati come canali con "dominio KTN/RCK" (figura 1.7) (Rossmann 1974). Alcuni canali 2TM presentano una lunga coda che non risulta omologa a nessun tipo di dominio conosciuto, denominato "unknown domain" (Figura 1.7). È interessante notare che alcune sequenze aminoacidiche che contengono domini simili a quelli descritti fino ad ora presentano le regioni del poro con la sequenza del filtro di selettività alterata rispetto a quella descritta. Non è ancora stato dimostrato se queste proteine funzionino effettivamente come canali selettivi per il potassio. La distribuzione di questi ipotetici canali del potassio nei 270 genomi sequenziati è rappresentata nella tabella 1.3.

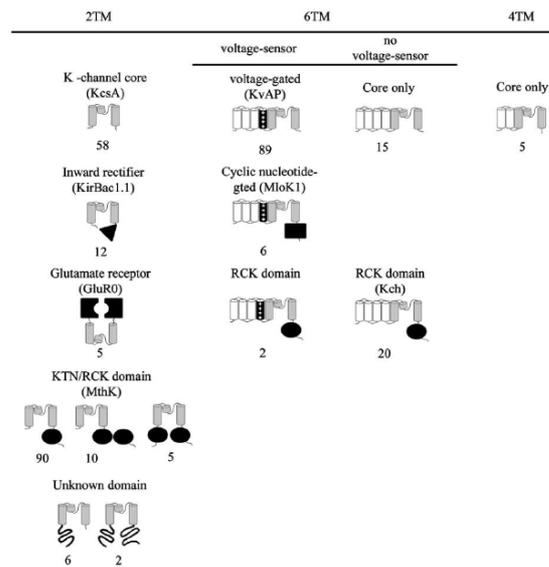


Figura 1.7 Principali tipologie di canali del potassio procariotici. La struttura minima del *core* dei canali del potassio è rappresentata in grigio. I domini regolatori sono rappresentati in nero. I numeri indicano il numero totale di canali per ogni categoria che sono stati identificati nei genomi procariotici. (Kuo, 2003)

The distribution of various types of K⁺ channels among the 17 prokaryotic phyla

Kingdom; Phylum ^a	Genome ^b	2TM					6TM			4TM	
		Channel core	Inward rectifier	Glutamate receptor	RCK/KTN	Unknown domain	Voltage gated	cNMP gated	RCK	Core only	Core only
<i>Archaea</i>											
Crenarchaeota	4	–	–	–	2	–	1	–	–	–	–
Euryarchaeota	18	7	–	–	15	4	5	–	5	–	
Nanoarchaeota	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Bacteria</i>											
Actinobacteria	21	1	–	–	13	–	6	–	–	1	4
Aquificae	1	–	–	–	1	–	–	–	1	–	–
Bacteroidetes	4	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–
Chlamydiae	8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Chlorobi	1	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
Chloroflexi	1	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–
Cyanobacteria	13	2	5	5	18	–	11	1	1	3	–
Deinococcus-Thermus	3	–	–	–	1	1	1	–	–	–	–
Firmicutes	67	29	–	–	20	1	18	–	–	1	–
Fusobacteria	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Planctomycetes	1	–	–	–	1	–	1	–	–	1	–
Proteobacteria	118	19	7	–	31	2	41	5	15	9	1
Spirochaetes	6	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
Thermotogae	1	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
Total	270	58	12	5	105	8	90	6	22	15	5

^a The classification is based on NCBI Taxonomy database.

^b Numbers of genomes that have been completely or shotgun sequenced as of December 2004.

Tabella 1.3 Distribuzione delle diverse tipologie di ipotetici canali del potassio nei 270 genomi procariotici sequenziati. (Kuo, 2003)

1.1.6 I canali del K⁺ nelle piante

Nelle piante sono state ottenute evidenze che il potassio gioca un ruolo importante in una serie di funzioni quali l'allungamento delle cellule, il movimento degli stoma, la regolazione dello scambio dei gas e la trasduzione di vari segnali (Clarkson 1980, Zimmermann 1999, Vèry 2003). (tabella 1.4)

Il sequenziamento dell'intero genoma di *Arabidopsis* ha permesso l'identificazione, mediante studi di omologia di sequenza con i canali animali, di 15 putativi canali del potassio. Questi possono essere raggruppati in tre famiglie principali, che prendono il nome dalla loro controparte negli animali: *Shaker*, KCO (o KCNK) e Kir. (figura 1.8)

Nelle piante, come negli animali, l'attività dei canali del potassio determina le proprietà elettriche delle membrane. La loro funzione fisiologica è stata chiarita attraverso analisi di *patterns* di espressione e analisi mutazionali.

Tramite l'utilizzo di lieviti mutanti difettivi per l'*uptake* di potassio, nel 1992, un gruppo francese ha clonato, da *Arabidopsis thaliana*, i primi sistemi di trasporto ionico vegetali: AKT1 e KAT1 (Sentenac 1992). Studi strutturali hanno evidenziato che questi canali *inward rectifying*, sono strutturalmente molto simili ai canali del potassio *Shaker* animali.

TABLE 1 Cloned K⁺ channels in plants: functional properties, localization, and regulation

Name	Sp. ^a	Group ^b	Type ^c	pH sensit. ^d	Organ/Tissue ^d	Mh. ^e	Regulation ^f	Role	References
SHAKER family									
KAT1	At	KAT1	IR	Act ac pH	gc	PM	—	Stomatal movement?	4, 62, 66, 77, 104, 127, 136, 147
KAT2	At	KAT1	IR	Act ac pHe	gc, l phloem, f	PM?	—	Stomatal movement?	109
AKT1	At	AKT1	IR	—	r cortex, epidermis & hair, hydathode, mesophyll, gc?	PM	Low K ⁺ , salt stress & ABA: (=) BA & 2,4-D. (-) in root	Root K ⁺ absorption	10, 31, 51, 60, 81, 108, 133, 136
SPIK	At	AKT1	IR	Act ac pHe	Pollen	PM	—	Tube development	101
AKT6	At	AKT1	—	—	f	—	—	—	80
AKT2	At	AKT2	WIR	Act al pH	Phloem, l epidermis, gc, mesophyll, sepal	—	Light, photosynthesis & ABA: (+) salt stress: (-); low K ⁺ & BA: (=)	Phloem K ⁺ loading/unloading?	29, 80, 96, 108
AtKC1	At	AtKC1	Silent?	—	r epidermis, hair, cortex & endodermis, trichome, hydathode, l epidermis, stipule	PM	Interaction with AKT1 ABA: (-); salt stress: (+) in leaf; BA & 2,4-D. (-) in root; K ⁺ deprivation: (=)	Root K ⁺ absorption?	108, 113
SKOR	At	SKOR	OR	Act al pH	r pericycle & xylem parenchyma, pollen	—	ABA, BA, 2,4-D, K ⁺ starvation: (-) in root; salt stress: (=) in root	Xylem sap K ⁺ loading	52, 79, 101, 108
GORK	At	SKOR	OR	—	gc, stem, f, r hair & epidermis	PM?	—	Stomatal movement?	2, 68
KDC1	Dc	AtKC1	IR	Act ac pHe	r hair	—	—	—	34
LKT1	Le	AKT1	IR	Act ac pHe	r hair, r, l	—	—	—	59
KMT1	Mc	KAT1	—	—	l, seed capsule	—	Salt stress: transient (+)	—	134
MKT1	Mc	AKT1	—	—	r epidermis, cortex & stele, f	PM	Salt stress: (-) (& less protein)	—	134
MKT2	Mc	AKT2	—	—	l, f, seed capsule	—	Salt stress: (-)	—	134
SPIK1	Ss	AKT2	—	—	Pulvinus	—	Light & internal clock	Leaf movement?	100

TABLE 2 Cloned K⁺ transporters in plants: functional properties, localization, and regulation

Name ^a	Perm. ^b	Type ^b	Affinity ^b	pH sensit. ^b	Organ/Tissue ^c	Regulation ^c	Role	References
KUP/HAK/KT family								
AtKUP1	K ⁺ , Na ⁺ ?	—	HA K ⁺ , LA Na ⁺ ?	—	f, l, s, r	—	Root K ⁺ uptake?	47, 73
AtKUP2	K ⁺ , Na ⁺ ?	—	LA	—	f, l, s, r	Low K ⁺ : slight (-) in root	Cell expansion?	41, 73, 112
AtKUP3	—	—	—	—	f, l, s, r	Low K ⁺ : (+) in root	—	73
AtKUP4	K ⁺	—	HA	—	f, l, s, r, silique	—	Root hair elongation	73, 114
AtHAK5	K ⁺ , Na ⁺ ?	—	HA K ⁺ , LA Na ⁺ ?	—	r (mainly), sh	K ⁺ deprivation: (+) in shoot	—	118
CnHAK1	K ⁺	H ⁺ -K ⁺ ?	LA	Act ac pHe	l	—	—	49
CnHAK2	K ⁺ ?	—	LA?	—	l	—	—	49
GhKT1	—	—	—	—	Cotton fiber	Developmentally regulated	Fiber elongation?	116
HvHAK1	K ⁺ , Na ⁺ ?	—	HA K ⁺ , LA Na ⁺ ?	—	r	Ext K ⁺ depletion: (+)	—	118, 124
HvHAK2	K ⁺ , Na ⁺ ?	H ⁺ -K ⁺ ?	LA	Act ac pHe	r	—	—	132
MeHAK1	K ⁺	—	LA?	—	l, s, r	Low ext K ⁺ & salt stress: (+)	—	135
MeHAK2	K ⁺	—	LA?	—	s mainly	Salt stress: slight (+)	—	135
MeHAK3	—	—	—	—	r mainly	Salt stress: slight (+)	—	135
MeHAK4	K ⁺	—	LA?	—	l, s, r	Low ext K ⁺ : slight (+)	—	135
OsHAK1	K ⁺ , Na ⁺ ?	—	HA K ⁺ , LA Na ⁺ ?	—	r mainly	Ext K ⁺ depletion: (+)	—	8
OsHAK7	K ⁺	—	LA	Act ac pHe?	r & sh	K ⁺ deprivation: (+)	—	8
OsHAK10	K ⁺	—	LA	Act ac pHe?	r & sh	Ext K ⁺ , Na ⁺ , pH, Ca ²⁺ : (=)	—	8
HKT family								
AtHKT1	Na ⁺	—	LA	None	r	Ext K ⁺ & Na ⁺ : (=)	Root Na ⁺ uptake?	120, 142
EcHKT1	K ⁺ , Na ⁺	Na ⁺ -K ⁺ ?	LA Na ⁺	—	l, s, r	—	—	44, 87
EcHKT2	K ⁺ , Na ⁺	Na ⁺ -K ⁺ ?	LA Na ⁺	—	l, s, r	—	—	44, 87
HvHKT1	—	—	—	—	r	Ext K ⁺ depletion: (+)	—	152
OsHKT1	Na ⁺	—	—	—	r	High ext K ⁺ & Na ⁺ : (-)	—	61
OsHKT2	K ⁺ , Na ⁺	Na ⁺ -K ⁺ ?	HA K ⁺ ?, LA Na ⁺	—	r	High ext K ⁺ & Na ⁺ : (-)	—	61
TaHKT1	K ⁺ , Na ⁺	Na ⁺ -K ⁺	HA K ⁺ , LA Na ⁺	None	r cortex mainly	Ext K ⁺ depletion: (+)	—	117, 126, 152

^aAt: *Arabidopsis thaliana*; Cn: *Cymodocea nodosa*; Gh: *Gossypium hirsutum*; Hv: *Hordeum vulgare*; Me: *Mesembryanthemum crystallinum*; Os: *Oryza sativa*; Ec: *Eucalyptus calmdulensis*; Ta: *Triticum aestivum*.

^bPerm.: permeability; H⁺(Na⁺)-K⁺: H⁺(Na⁺)-K⁺ symport; HA (LA): high (low) affinity; pH sensit.: pH sensitivity; Act ac pHe: activation by acidic external pH.

^cf. flower; l. leaf; s. stem; r. root; sh. shoot; Regulation: increased (+), decreased (-) or unaltered (=) transcript level upon indicated treatment.

Tabella 1.4 Canali del potassio identificati nelle piante (Very, 2003).

K⁺ channels

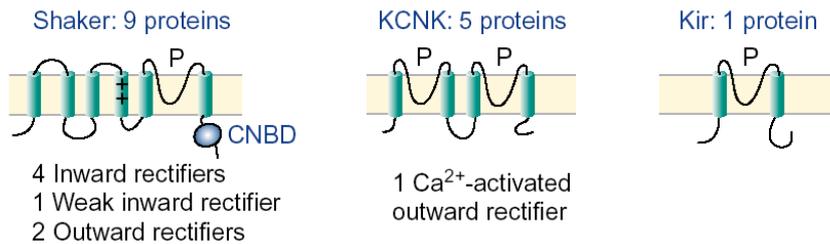


Figura 1.8 Le tre differenti famiglie dei putativi canali del potassio nel genoma di *Arabidopsis*. *Shaker*, *KCNK* (o *KCO*) e *Kir*. Abbreviazioni: ++, aminoacidi carichi positivamente nel sensore del voltaggio; CNBD, putativo dominio di legame a nucleotidi ciclici; P, dominio del poro. (Very, 2002).

1.1.6.1 Canali *Shaker* in pianta

I canali *Shaker* in pianta sono simili ai canali a sei eliche transmembrana *Shaker* animali. I canali meglio caratterizzati negli animali sono quelli della famiglia Kv (*Shaker* voltaggio dipendenti), sia da un punto di vista strutturale che funzionale. L'omologia tra i canali delle piante e i canali Kv è confinata al *core* ed in particolare alla regione del poro. I canali animali maggiormente omologhi a quelli delle piante sono i canali *Shaker* EAG (EAG, ELK, ERG, HCN e CNG). In pianta, di solito, i canali di tipo *Shaker* mostrano una regione più corta (circa 60 aminoacidi) al dominio ammino-terminale, seguita da un *core* idrofobico composto da sei eliche transmembrana (da S1 a S6, con il dominio del poro tra S5 ed S6), ed una lunga regione citoplasmatica. Il quarto segmento transmembrana contiene aminoacidi carichi positivamente (R e K) ed è atteso che agiscano come sensori del voltaggio. Il dominio del poro altamente conservato, contenente il motivo GYGD/E, è presente tra S5 ed S6. La regione carbossi-terminale contiene un putativo sito di legame per i nucleotidi ciclici e nella maggior parte dei casi un dominio *ankyrin repeat*, potenzialmente coinvolto nelle interazioni proteina-proteina (Chérel 2004). All'estremità carbossi-terminale vi è la regione K_{HA} (ricca in aminoacidi idrofobici ed acidi), che potrebbe essere coinvolta nella tetramerizzazione delle subunità.

In aggiunta alla subunità α , i canali *Shaker* di pianta possono avere delle subunità β , con funzione attualmente incerta. Sono stati identificati, per esempio, i geni *kab1* in *Arabidopsis*, codificanti per proteine omologhe alle subunità Kv β animali. Esiste la possibilità che le subunità β si associno con altri tipi di canale non *Shaker*, come quelli con rettificazione *outward* (come KCO e SKOR). Come negli animali anche le subunità α dei canali *inward rectifying* di pianta formano omo- ed etero-tetrametri. Nelle piante, la

composizione degli eterotetrameri sembra essere determinata più dall'espressione tessuto specifica dei geni per i canali piuttosto che dalla sequenza.

In *Arabidopsis* sono state caratterizzate nove proteine appartenenti alla famiglia *Shaker* suddivise in tre sottofamiglie a seconda delle loro proprietà di rettificazione: *inward*, *outward* e *weakly inward rectifier* (Schachtman 2000).

Sebbene il meccanismo molecolare che determina la rettificazione non sia ancora ben compreso, gli esperimenti mostrano che possa essere dovuta a un intrinseco processo di *gating*, piuttosto che al bloccaggio da parte di ioni Mg^{2+} come avviene nei canali *inward rectifying* animali. In KAT1, per esempio, la rettificazione *inward* è dovuta alla regione ammino-terminale ed ai primi 4 segmenti transmembrana. Il coinvolgimento della regione ammino-terminale nella rettificazione è in contrasto con quanto avviene nei canali *inward rectifying* animali, in cui sembra essere coinvolta la regione carbossi-terminale (Véry 2002).

Oltre ai canali *Shaker* con rettificazione *inward*, le tecniche elettrofisiologiche hanno dimostrato la presenza, in pianta, di canali *Shaker* con rettificazione *outward*, come SKOR. Questo canale è coinvolto nel rilascio di K^+ nello xilema.

In pianta, i canali *Shaker* sono espressi in differenti tessuti (figura 1.9, tabella 1.4). Le informazioni disponibili suggeriscono che questi canali siano implicati nella nutrizione e nella regolazione dello stato osmotico della cellula. Un approccio multidisciplinare, comprendente l'espressione in sistemi eterologhi, la caratterizzazione elettrofisiologica e la produzione di mutanti knockout, ha permesso di svelare il ruolo di alcuni canali *Shaker*. ATK1 è un canale *inward rectifier* risultato essere il maggiore sistema di *uptake* di potassio nelle radici e nel mesofillo (Hirsch 1998, Ivashikina 2001, Dennison 2001), mentre SPIK (*Shaker Pollen Inward Potassium channel*) è coinvolto nell'*uptake* del potassio nel polline. La sua attività è necessaria per il corretto sviluppo dei tubetti pollinici (Mouline 2001). KAT1, KAT2 e GORK (canale *Shaker* che nelle piante funziona come *outward rectifier*) sono espressi nelle cellule di guardia (Nakamura 1995, Pilot 2001, Szyroky 2001). AtKC1 è espresso nelle cellule periferiche di radice dove potrebbe avere un ruolo nell'*uptake* di potassio (Véry 2003). Infine, i mutanti *atk2*⁻ hanno dimostrato che ATK2 è coinvolto nel controllo del potenziale di membrana delle cellule del floema e nel trasporto del saccarosio nel fluido floematico (Deeken 2002).

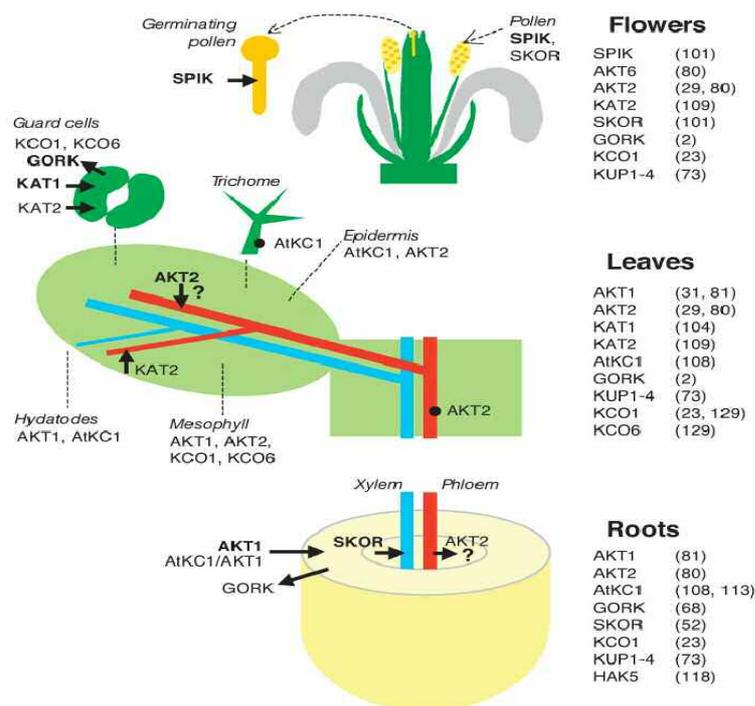


Figura 1.9 Espressione e funzione dei canali del potassio in *Arabidopsis*. (Véry, 2003)

1.1.6.2 Altri canali del potassio in pianta

Studi di omologia di sequenza con canali animali hanno portato, in *Arabidopsis*, all'identificazione di altre famiglie geniche codificanti canali del potassio, come i canali KCNK e i canali Kir (K^+ inward rectifier). I canali KCNK vegetali, come quelli animali, hanno un *core* idrofobico composto da quattro segmenti transmembrana, contenenti due domini P e sono privi del sensore di voltaggio. In *Arabidopsis* sono stati identificati cinque canali che hanno omologia strutturale con questi canali animali, tre dei quali presentano anche un sito di legame per il Ca^{2+} a livello della regione carbossi-terminale (figura 1.8). Recenti studi hanno dimostrato la loro attività nelle membrane vacuolari (Schönknecht 2002).

I canali Kir sono stati osservati nella membrana plasmatica delle radici, essi sono caratterizzati da un *core* idrofobico composto da soli due segmenti transmembrana e un dominio P (Véry 2002) (figura 1.8).

Sistemi di geni reporter, utilizzati per studiare la localizzazione dei canali del potassio in piante, hanno dimostrato la loro presenza a livello di diversi compartimenti vegetali quali la membrana plasmatica, il tonoplasto e l'apparato del Golgi di differenti tessuti come radici, foglie, semi e fiori (Schachtman 2000).

1.2 La fotosintesi

Gli organismi fotosintetici utilizzano l'energia luminosa per la produzione di equivalenti riducenti e di energia necessari all'organizzazione del carbonio. Nelle reazioni di trasporto elettronico fotosintetico (fase luminosa) l'energia solare energizza un elettrone nella clorofilla, rendendolo capace di muoversi lungo una catena di ossidazione nelle membrane tilacoidali. Questo processo di trasporto elettronico genera elettroni ad alta energia in grado di ridurre il NADP^+ e allo stesso tempo determina un gradiente protonico nella membrana che viene utilizzato per la sintesi dell'ATP. Nella cosiddetta fase buia il NADPH e l'ATP vengono utilizzati rispettivamente come fonte di equivalenti riducenti e di energia per le reazioni che determinano la conversione dell'anidride carbonica in carboidrati, in una serie di reazioni note come "Ciclo di Calvin".

Le reazioni della fase luminosa sono svolte da complessi multiproteici localizzati nella membrana tilacoidale che, nei batteri fotosintetici è costituita da una specializzazione della membrana plasmatica, mentre nelle piante è localizzata nel cloroplasto, l'organello intracellulare deputato alla fotosintesi. Il cloroplasto è delimitato da una doppia membrana: lo spazio intermembranale tra le due membrane è molto ridotto, mentre lo spazio delimitato dalla membrana più interna, lo stroma, è molto maggiore. Lo stroma contiene il terzo sistema di membrane, i tilacoidi, costituiti da una serie di cisterne appiattite e impilate tra loro (i grana o lamelle granali) intercomunicanti tramite un sistema di tubuli membranosi (lamelle stromatiche). Lo spazio continuo interno all'insieme delle membrane tilacoidali prende il nome di lumen. Negli organismi fotosintetici ossigenici, ovvero piante superiori, alghe e cianobatteri, la prima fase della fotosintesi è svolta dai complessi proteici della membrana tilacoidale: il fotosistema II (PSII) e il relativo apparato antenna o *Light Harvesting Complex* (PSII-LHCII), il citocromo (cyt) b_6/f , il fotosistema I (PSI) con la sua antenna (PSI-LHCI), e l'ATP sintetasi. Le reazioni della fase buia avvengono nello stroma dei cloroplasti o nel citoplasma dei cianobatteri.

1.2.1 I fotosistemi

I fotosistemi possono essere suddivisi in due parti, una costituita dall'antenna, cioè i complessi clorofilla-proteina con funzione di raccolta dell'energia luminosa, e l'altra costituita dai centri di reazione con la duplice funzione di catena di trasporto degli elettroni e di generatore di gradiente protonico. Il fotosistema I presenta un set di pigmenti che vengono eccitati preferenzialmente dalla luce alla lunghezza d'onda di 700 nm mentre il

fotosistema II viene eccitato in maniera più efficiente dalla luce alla lunghezza d'onda di 680 nm.

1.2.1.1 Lo schema Z

Nel 1960 è stato proposto da Hill e Bendall che i due fotosistemi cooperino nel determinare il trasferimento degli elettroni dall'acqua all'anidride carbonica. Secondo questo modello, chiamato "schema Z", l'attività accoppiata dei due fotosistemi consente di superare il salto di potenziale redox esistente tra l'ossidazione dell'acqua e la riduzione del NADP^+ , non altrimenti superabile con l'attività di un solo fotosistema. Il PSII, in seguito all'assorbimento di un fotone, produce un potenziale di ossidazione sufficiente a scindere l'acqua in ossigeno ed equivalenti riducenti trasferiti poi al citocromo b_6f . Quando invece è eccitato il PSI, esso produce il basso potenziale redox necessario a ridurre il NADP^+ a NADPH, tramite la ferredossina. I due fotosistemi sono immersi nella membrana tilacoidale e sono connessi da una catena di trasportatori di elettroni, il plastochinone (PQ) e la plastocianina (PC), e i cofattori del complesso del citocromo b_6f (figura 1.10). L'evento primario di tutto il processo è dato dall'eccitazione del PSII da parte della luce. In questa forma è in grado di strappare un elettrone dall'acqua, producendo una molecola di ossigeno ogni due molecole d'acqua scisse. L'elettrone strappato all'acqua va a sostituire quello ceduto dal PSII eccitato al citocromo b_6f . L'elettrone è poi trasferito attraverso una catena di reazioni di ossido-riduzione, dove ogni elemento del percorso viene ridotto dall'elettrone e ritorna allo stato ossidato trasferendo l'elettrone all'elemento successivo. La separazione di carica catalizzata dalla luce a livello del PSII e del PSI, contemporaneamente ai processi di trasferimento elettronico, genera un gradiente protonico transmembrana che alimenta la fosforilazione dell'ADP in ATP ad opera del complesso dell'ATP sintetasi. Questo tipo di produzione dell'energia, in cui vengono utilizzati i due fotosistemi, viene chiamato fosforilazione non ciclica, in opposizione al processo della fosforilazione ciclica. In quest'ultimo processo viene "disattivato" il PSII e viene prodotto ATP in assenza di glucosio generando un gradiente protonico di membrana utilizzando solo il PSI. In questo caso l'elettrone trasferito non proviene dall'acqua ma dal PSI e viene riciclato al PSI stesso.

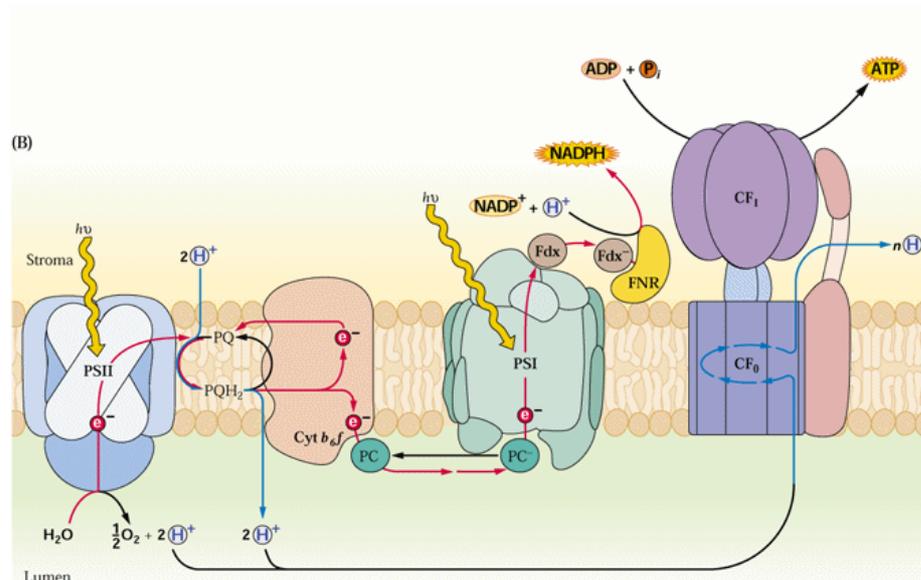


Figura 1.10 Rappresentazione schematica dei complessi proteici coinvolti nel trasporto elettronico nel processo fotosintetico. In figura è indicata la direzione del flusso elettronico e di quello protonico.

1.2.1.2 L'assorbimento della luce e il trasporto elettronico

L'evento fondamentale della fotosintesi consiste nell'assorbimento della luce e nel trasferimento di energia da parte delle molecole pigmento. L'assorbimento di un fotone da parte di un pigmento provoca la transizione di un elettrone dallo stato normale a quello eccitato, ad alta energia, di singoletto. Nel PSI e nel PSII, l'assorbimento di un fotone da parte di un pigmento dell'antenna è in genere seguito da un rapido trasferimento dell'energia di eccitazione al centro di reazione, dove si verifica una separazione di carica. Questo evento iniziale viene stabilizzato da successive separazioni di carica tramite catene di trasferimento elettronico. Un'organizzazione ottimizzata dei pigmenti-proteine dell'antenna e dei cofattori nel centro di reazione consente di ottenere un'elevata efficienza di cattura e limita la perdita di energia da parte di altri meccanismi di rilassamento del singoletto. Il complesso antenna (LCH), inoltre, consente al sistema di funzionare in un ampio spettro di intensità di luce e di lunghezze d'onda, incrementando così l'efficienza globale. Il passo fondamentale per la cattura dell'energia è la separazione di carica fotoindotta tra un donatore primario (P) e un accettore primario (A). Sia nel PSI che nel PSII, i donatori primari sono molecole di clorofilla. Dopo essere stato eccitato dalla luce, P diventa un potente riducente (P*) e interagisce con un accettore (A) determinando l'evento primario del trasferimento elettronico:



La clorofilla del centro di reazione del PSII, chiamata P680 viene fotoossidata e l'elettrone viene trasferito al "pool" dei plastochinoni di membrana. Il P680 viene ridotto dal complesso di ossidazione dell'acqua (WOC) con produzione di ossigeno. Eventi analoghi si verificano nel PSI il cui risultato è la riduzione via ferredossina (Fd) del NADP⁺ e l'ossidazione della plastocianina o del citocromo c da parte della clorofilla P700 del centro di reazione. Sia nel PSI che nel PSII, sono utilizzati cofattori inorganici e organici per il trasferimento elettronico. La parte iniziale di ogni catena di trasferimento elettronico è legata al centro di reazione, mentre nelle fasi successive le reazioni di protonazione e di trasferimento dei riducenti che avvengono fuori dal centro di reazione, sono svolte da "carrier" di elettroni mobili. Gli eventi di trasferimento elettronico tra PSI e PSII sono collegati dal complesso del cyt b₆f, un complesso proteico di membrana contenente citocromi e un centro ferro-zolfo, detto di Rieske. Il complesso b₆f catalizza l'ossidazione del plastochinolo e la riduzione della plastocianina o del cyt c. Questo complesso è anche coinvolto nel flusso elettronico ciclico attorno al PSI.

Il complesso del PSII contiene più di 20 polipeptidi e diversi cofattori. Il centro di reazione è formato dalle proteine di membrana D1 e D2 e dal cyt b₅₅₉; ad esso è strettamente associata l'antenna interna costituita da complessi di membrana clorofilla (chl) *a* - proteina CP47 e CP43. Il PSII si completa con un'antenna esterna (LHCII, Light Harvesting Complex II), costituita da proteine leganti clorofilla *a/b* e con il complesso di ossidazione dell'acqua (WOC, Water Oxidation Complex).

1.3 I cianobatteri e l'origine endosimbiontica dei plastidi

1.3.1 I cianobatteri

Esistono 3 gruppi principali di batteri fotosintetici: i batteri pupurei, i batteri verdi ed i cianobatteri.

I cianobatteri, chiamati anche alghe azzurre o blu-verdi, assomigliano ai fototrofi eucariotici, in quanto possiedono un fotosistema II e producono ossigeno durante la fotosintesi. Appartengono alle Cianofite e si distinguono dagli altri batteri per la presenza di membrane interne (i tilacoidi) contenenti la clorofilla *a* e altre strutture coinvolte nella fotosintesi.

Sono organismi ubiquitari che riescono a vivere in condizione di vita estreme. La CO₂ è assimilata con il ciclo di Calvin ed il carboidrato di riserva è il glicogeno, inoltre, in alcuni casi, i cianobatteri possono conservare dell'azoto "extra" sotto forma di polimeri di arginina o acido aspartico nei granuli di cianoficina (Kolodny 2006). Sono privi dell'enzima α -chetoglutarato deidrogenasi, per cui non sono in grado di svolgere un ciclo dell'acido citrico pienamente funzionale e la via del pentoso fosfato gioca un ruolo essenziale nel metabolismo dei carboidrati. Molti cianobatteri sono fotolitoautotrofi obbligati, mentre altri possono crescere lentamente anche in assenza di luce come chemioeterotrofi, tramite l'ossidazione di glucosio e di qualche altro zucchero. Il diametro può variare da 1 a 10 μm . Si riproducono per scissione binaria, per gemmazione, per frammentazione e per scissione multipla. Possono essere unicellulari o formare colonie di varie forme, oppure formano filamenti chiamati tricomi. Un tricoma è una fila di cellule batteriche che hanno un rapporto di contatto esteso ad una vasta area delle cellule stesse (Van den Hoek 1995).

I cianobatteri hanno le strutture tipiche di una cellula procariotica ed una parete cellulare tipicamente Gram negativa. Utilizzano spesso dei vacuoli gassosi per spostarsi nell'H₂O in senso verticale e molti cianobatteri filamentosi sono dotati di mobilità strisciante. Sono privi di flagelli.

I cianobatteri possono effettuare la fotosintesi e la respirazione simultaneamente nello stesso compartimento (Scherer 1988). Sia la fotosintesi che la respirazione richiedono una catena di trasporto degli elettroni catalizzata da complessi proteici di membrana. Le membrane tilacoidali, contengono la catena di trasporto elettronico sia fotosintetica che respiratoria. Queste catene di trasporto si intersecano ed in parte utilizzano gli stessi componenti nella membrana. La membrana plasmatica, che separa il citoplasma dal periplasma, contiene la catena di trasporto elettronico respiratoria ma non quella fotosintetica. Perciò nella maggior parte dei cianobatteri la fotosintesi avviene solo nei tilacoidi, mentre il

trasporto elettronico della respirazione avviene sia nei sistemi di membrana citoplasmatica che tilacoidale. Gli elementi dei sistemi di trasporto che si intersecano sono il pool di plastochinoni (PQ), il complesso citocromo b_6f ed i trasportatori solubili di elettroni nel lumen.

Sono stati trovati fossili di cianobatteri risalenti a più di tre miliardi di anni fa. Queste forme di vita si formarono in ambiente totalmente privo di ossigeno libero, e la loro comparsa modificò radicalmente le condizioni di vita del pianeta, in quanto la loro attività fotosintetica permise il lento accumulo (avvenuto nell'arco di un miliardo di anni circa) di ossigeno nell'atmosfera del nostro pianeta. Fino alla comparsa delle prime alghe eucariotiche, verificatasi circa un miliardo di anni fa. I cianobatteri rappresentarono dunque l'unica fonte biologica di ossigeno libero. Anche oggi essi svolgono un ruolo ecologico fondamentale, in quanto sono in grado di fissare l'azoto atmosferico, che non può essere altrimenti assimilato dalle piante, in ammoniaca (NH_3), nitriti (NO_2^-) o nitrati (NO_3^-).

Negli ultimi anni i cianobatteri sono divenuti organismi molto usati nello studio della struttura dei fotosistemi. Essi possiedono fotosistemi che sono altamente omologhi, per composizione e funzione, a quelli delle piante superiori, malgrado alcune evidenti differenze, come ad esempio i loro complessi di raccolta della luce. Due ceppi risultano particolarmente adatti a questo tipo di analisi: *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Synechococcus* sp. PCC 7002.

1.3.2 I fotosistemi dei cianobatteri

Le membrane tilacoidali dei cianobatteri sono strutturalmente e funzionalmente simili a quelle dei cloroplasti delle piante superiori. In entrambi i casi si ha una fotosintesi ossigenica svolta dai complessi multiproteici PSI e PSII. Il centro di reazione del PSII dei cianobatteri è costituito dal dimero di proteine D1 e D2, a livello delle quali si trovano le molecole di clorofilla coinvolte nelle reazioni fotochimiche, l'accettore primario degli elettroni, e gli altri cofattori coinvolti nel trasferimento elettronico fotosintetico. La proteina D1, come nelle piante, è il bersaglio di diverse classi di erbicidi, come ad esempio il DCMU e l'atrazina, che inibiscono il flusso elettronico legandosi al posto normalmente occupato dal chinone secondario Q_B .

Il PSII dei cianobatteri differisce da quello delle piante soprattutto per l'antenna, in essi costituita dai ficobilisomi (figura 1.11). Questi sono complessi extramembranali di ficobiliproteine ed altre proteine; la loro distribuzione rispecchia quella dei fotosistemi, cioè omogenea nella membrana. Le ficobilinoproteine, una famiglia di proteine solubili in acqua che legano covalentemente catene di tetrapirroli aperti, le ficobiline, sono coinvolte

direttamente nell'assorbimento della luce e nel trasferimento dell'energia ai centri di reazione. Oltre alle ficobiliproteine gli altri polipeptidi che compongono i ficobilisomi possono essere distinti in polipeptidi di giunzione e proteine associate ai ficobilisomi (per es: ferredoxina-NADP ossidoreduttasi). La composizione in polipeptidi dei ficobilisomi varia enormemente tra le varie specie di cianobatteri come pure la forma stessa dei complessi antenna.

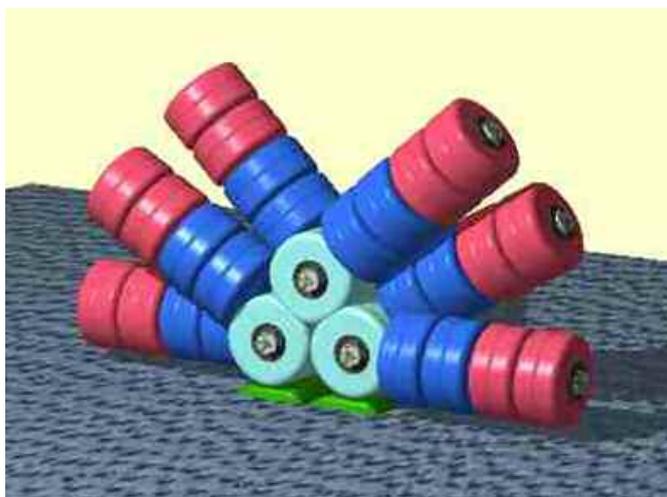


Figura 1.11 Modello della struttura tridimensionale dei complessi di cattura della luce nei cianobatteri: i ficobilisomi. In azzurro è rappresentata l'alloficcocianina, in blu la ficocianina ed in rosa la ficoeritrina.

1.3.3 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp.6803 è stato depositato nella *Pasteur Culture Collection* (PCC) nel 1968. Intorno al 1980 è stato scoperto che il ceppo è facilmente trasformabile da DNA esogeno. Infatti, accoppiato ad un naturale meccanismo di “*uptake*”, che permette di integrare acidi nucleici dall'esterno, esiste un sistema di ricombinazione omologa che consente una rapida e stabile integrazione nel genoma del DNA esogeno acquisito.

Un'altra caratteristica importante è il fatto che *Synechocystis* sp. PCC 6803 è il primo organismo fotosintetico il cui genoma sia stato interamente sequenziato (Kaneko 1996).

Un ulteriore vantaggio è la capacità di sopravvivere e crescere in una ampia tipologia di condizioni. Per esempio, può crescere in assenza di attività fotosintetica o in condizioni di fotoeterotrofia se fornito di una fonte di carbonio “fissabile”, come il glucosio. Questa diversificazione metabolica e la conoscenza dell'intera sequenza del suo genoma ha permesso la generazione di organismi con mutazioni a carico di componenti dell'apparato fotosintetico, il cui effetto non sarebbe altrimenti esaminabile.

1.3.4 La teoria endosimbiontica

Con il nome plastidi si indicano tutti quelli organelli fotosintetici ed i loro “derivati” non fotosintetici propri delle piante e delle alghe. Hanno molti nomi, dovuti al colore o alla funzione ed includono i cloroplasti, i cromoplasti, i

leucoplasti e nonostante le differenze funzionali, hanno strutture omologhe provenienti da un unico progenitore. E' unitamente accettato, infatti, che i plastidi siano derivati da una relazione endosimbiontica tra una cellula eucariotica ed un cianobatterio. Forti evidenze a sostegno di tale teoria risiedono proprio negli stessi plastidi, dove la morfologia, la biochimica, l'organizzazione genomica e la filogenesi molecolare di numerosi RNA e proteine plastidiali confermano una origine comune (Keeling 2004). Tutti i plastidi contengono un piccolo genoma, il quale codifica parecchi geni aventi una stretta relazione con i geni dei cianobatteri (Archibald 2002). Inoltre, gli RNA delle subunità dei ribosomi del cloroplasto mostrano maggiori somiglianze con gli RNA dei cianobatteri che degli eucarioti. Nel nucleo, per esempio, i geni per gli rRNA 18S e 28S sono separati dal gene per l'rRNA 5S, ma nei procarioti e nella maggior parte dei plastidi, i tre geni si trovano in un unico cluster.

Secondo il modello oggi ritenuto più plausibile, un eucariote eterotrofico fagocitò un cianobatterio senza "digerirlo". Le due cellule, quindi, si integrarono gradualmente ed il cianobatterio perse molti dei suoi geni e trasferì degli altri nel nucleo della cellula ospite, diventando l'organello che oggi noi conosciamo (Gray 1996). I plastidi originati direttamente da questo evento sono chiamati "plastidi primari" (figure 1.12 e 1.13). Questi organelli sono formati da due membrane che sembrano omologhe alla membrana interna ed esterna del cianobatterio endosimbionte (Jarvis 2001).

Da questo primo evento di endosimbiosi si sono originati i cloroplasti delle alghe rosse, delle alghe verdi (e di conseguenza delle piante superiori) e delle glaucofite (alghe unicellulari). Queste ultime, diversificatesi evolutivamente in un momento precedente, hanno mantenuto il peptidoglicano dei cianobatteri tra le due membrane del cloroplasto. Questa è la prima prova a sostegno dell'origine simbiogenica del cloroplasto.

Due indipendenti "endosimbiosi secondarie" (figure 1.12 e 1.13), riguardanti le alghe verdi, hanno prodotto le *Euglenids* e le *Chlorarachniophytes*, mentre un singolo evento di endosimbiosi secondaria nelle alghe rosse ha dato origine a tutte le Cromoalveolate.

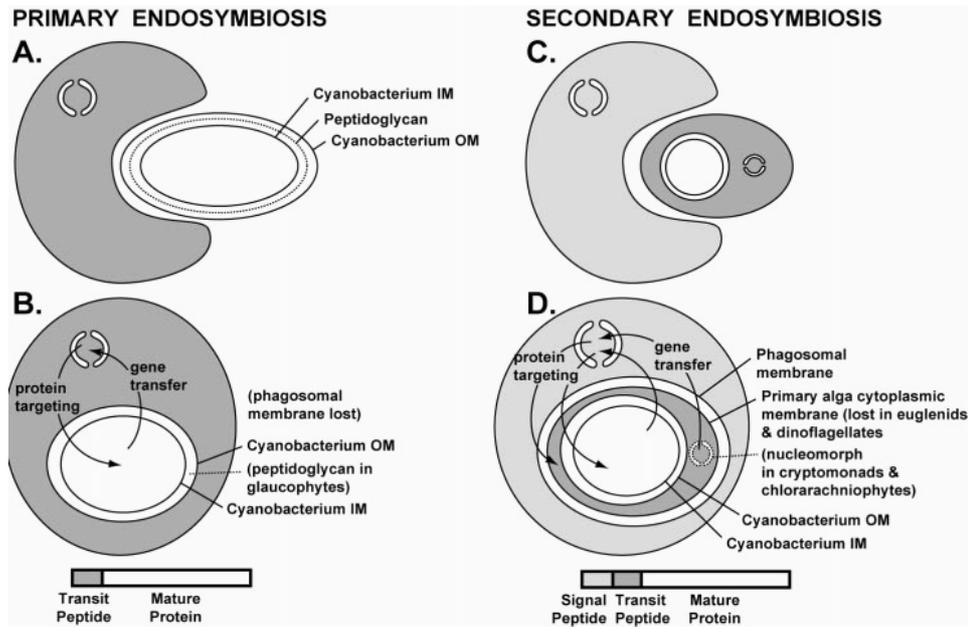


Figura 1.12 Endosimbiosi primaria (A-B) e secondaria (C-D) (Keeling, 2004).

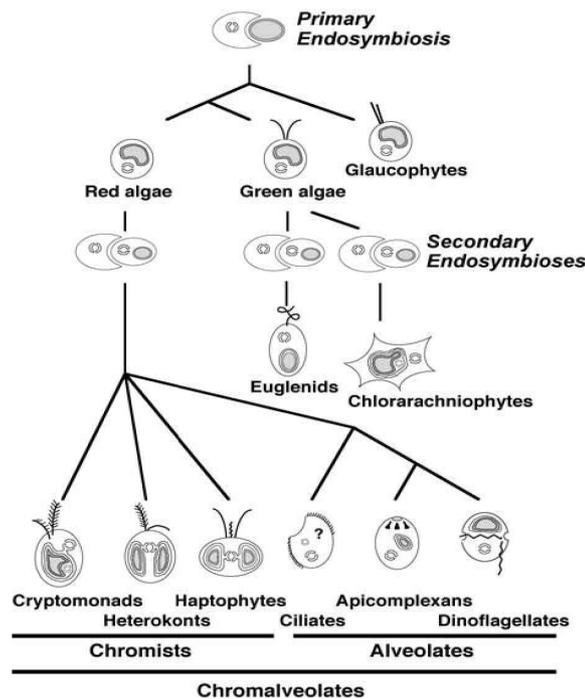


Figura 1.13 Un diagramma schematico dell'evoluzione dei plastidi. L'endosimbiosi primaria avvenne una singola volta e generò le glaucofite, le alghe rosse e le alghe verdi e i loro omologhi nelle piante. L'endosimbiosi secondaria, che coinvolge le alghe verdi avvenne due volte, una per generare le Euglenoidi ed una per generare le Cloraracniofite. L'endosimbiosi secondaria che coinvolge le alghe verdi avvenne una singola volta per generare molti gruppi, ora chiamati genericamente Cromoalveolate (Keeling 2004,A).

Il processo che trasformò il cianobatterio simbiote negli attuali plastidi coinvolse due fenomeni importanti: l'eredità di alcuni processi e di alcuni

componenti e la nascita di strutture del tutto nuove. L'eredità include la fotosintesi, i ribosomi 70S, le proteine responsabili della divisione cellulare e, in qualche plastidio primitivo, la parete di peptidoglicano. Importanti nuove strutture invece includono il macchinario di importazione delle proteine, che permette al plastidio di importare proteine codificate nel nucleo.

Il genoma dei cloroplasti attualmente codifica per 60-200 proteine dimostrando quindi di aver subito una profonda riduzione nel corso dell'endosimbiosi. I cianobatteri infatti codificano per molte migliaia di proteine. Nonostante sia accettato che il trasferimento dei geni al nucleo sia avvenuto durante l'evoluzione del plastidio, non è mai stata quantificata la portata del trasferimento. Alcune stime suggerivano che nel genoma di *Arabidopsis thaliana*, delle 24.990 proteine codificate dal genoma intero, dalle 800 alle 2000 provenissero dal cianobatterio. Uno studio recente ha dimostrato che la portata del trasferimento è maggiore: le proteine provenienti dal cianobatterio sarebbero 4.500 (il 18% del genoma intero). Queste proteine, inoltre, appartengono a varie classi e molte sono localizzate in compartimenti diversi dal cloroplasto (Martin 2002).

Due costituenti universali della cellula non si formano mai *de novo*: i cromosomi e le membrane. Proprio come la replicazione del DNA necessita di informazioni da uno stampo di DNA pre-esistente, la crescita di nuova membrana ha bisogno di informazioni (la loro polarità, il tipo e la localizzazione topologica relativa ad altre membrane) provenienti da membrane pre-esistenti. Alcune membrane, come quelle della membrana del nucleo, del reticolo endoplasmatico o quelle del mitocondrio, sono chiamate "membrane genetiche", in quanto derivano da membrane dello stesso tipo, per cui mostrano una continuità genetica ed evolutiva.

La differenza chiave fra un simbionte intracellulare obbligato e gli organelli è la presenza di uno specifico meccanismo di importazione delle proteine. L'attuale teoria dell'origine della membrana esterna del plastidi delle piante (ed anche del mitocondrio) prevede che le proteine abbiano una doppia origine, dell'ospite e del simbionte.

Considerando che il lavoro descritto in questa tesi riguarda proteine canale localizzate in compartimenti cellulari specifici, le membrane tilacoidali, in cui avviene il processo fotosintetico, si ritiene importante parlare prima di come le cellule si occupano dello smistamento delle proteine all'interno della cellula dopo la traduzione e successivamente del ruolo dei canali ionici nella regolazione del processo fotosintetico.

1.4 Il traffico intracellulare delle proteine

1.4.1 Traslocazione post-traduzionale delle proteine

Le proteine iniziano ad essere sintetizzate sui ribosomi citosolici e del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e il loro destino successivo dipende dalla loro sequenza che può contenere segnali di smistamento. Dipendentemente dal segnale esse vengono dirette al nucleo, al reticolo endoplasmatico (ER), ai mitocondri, ai plastidi, ai perossisomi, dove ci sono dei recettori proteici e dei macchinari che assistono il loro importo nei vari organelli. Segnali di smistamento possono anche dirigere il trasporto di proteine dall'ER ad altre destinazioni nella cellula, come la membrana plasmatica (figura 1.14).

Esistono tre modi fondamentali in cui le proteine si possono muovere da un compartimento ad un altro: 1) il trasporto regolato, che è coinvolto nel traffico fra il citosol e il nucleo; 2) il trasporto trans-membrana, che è coinvolto nel passaggio dal citosol al lume dell'ER o ai mitocondri o ai plastidi. Questo tipo di trasporto avviene grazie a proteine traslocatrici della membrana da attraversare, che trasportano direttamente le proteine dal citosol al lume dell'organello; 3) il trasporto vescicolare, nel quale vescicole di trasporto portano le proteine da un compartimento ad un altro. Le vescicole si caricano di molecole derivate dal lume di un compartimento, quando gemmano dalla sua membrana, e le scaricano in un secondo compartimento fondendosi poi con la membrana. Questo è il tipo di trasporto coinvolto nella via esocitotica dal ER al Golgi e dal Golgi alla membrana plasmatica e nella via endocitotica dalla membrana verso il Golgi e poi verso l'ER (figure 1.14 e 1.15).

Ciascuna molecola proteica che si muove lungo la via biosintetica-secretoria passa attraverso compartimenti diversi dove può essere modificata attraverso una serie di passaggi controllati (oligomerizzazione, formazione di ponti di solfuro, aggiunta di oligosaccaridi all'N-terminale nel ER e glicosilazione nel Golgi). Alla fine le molecole vengono inviate sulla superficie esterna tramite un processo chiamato esocitosi. Ciascuna vescicola di trasporto che gemma da un compartimento deve contenere solo proteine selezionate e deve fondersi soltanto con la membrana bersaglio appropriata.

Esistono tre tipi di vescicole rivestite. Le vescicole rivestite di clatrina che mediano il trasporto di recettori transmembrana dal Golgi e dalla membrana plasmatica. Le vescicole rivestite di coatamero che mediano il trasporto non selettivo dall'ER e dal Golgi. Le vescicole rivestite di caveolina che derivano per gemmazione da invaginazioni morfologicamente e biochimicamente distinte chiamate caveolae che si trovano sulla membrana plasmatica (figura 1.16). Secondo numerosi autori le caveolae e i rafts potrebbero essere coinvolti

nella regolazione dell'attività di canali di potassio Kv della famiglia *Shaker*, della quale alcuni membri sono localizzati nei rafts (figura 1.17).

Ci sono almeno due tipi di segnali di smistamento sulle proteine. Un tipo si trova in un tratto continuo di amminoacidi, lungo in genere da 15 a 60 amminoacidi. Questo peptide segnale è spesso rimosso dalla proteina da una peptidasi segnale specializzata, una volta che è stato completato lo smistamento.

L'altro tipo di segnale per lo smistamento delle proteine nella cellula consiste in una disposizione tridimensionale specifica di amminoacidi sulla superficie della proteina che si forma quando la proteina si ripiega. Gli amminoacidi che compongono la zona segnale possono essere distanti l'uno dall'altro nella sequenza lineare e in genere non vengono modificati durante il trasporto.

La corretta localizzazione delle proteine nella cellula, però non dipende esclusivamente da questi due tipi di segnale. È di fondamentale importanza anche il corretto ripiegamento della catena amminoacidica a dare la struttura quaternaria. In particolare il corretto ripiegamento delle proteine canale voltaggio-dipendenti selettive per il potassio dipende da tre diverse regioni: la regione C-terminale, la regione del poro, la regione N-terminale (Zhu 2001). Queste regioni sono importanti anche per l'oligomerizzazione della proteina.

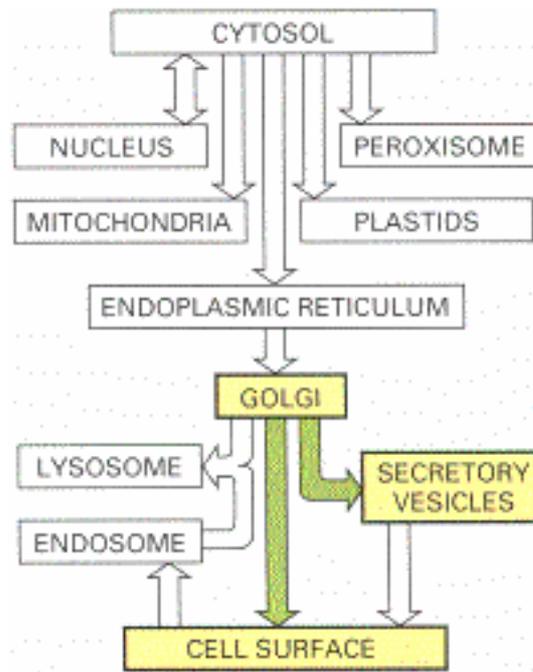


Figura 1.14 Riassunto schematico dei principali trasporti intracellulari delle proteine. In giallo e verde è mostrato il trasporto coinvolto nell'indirizzamento delle proteine alla membrana. (Alberts, terza edizione)

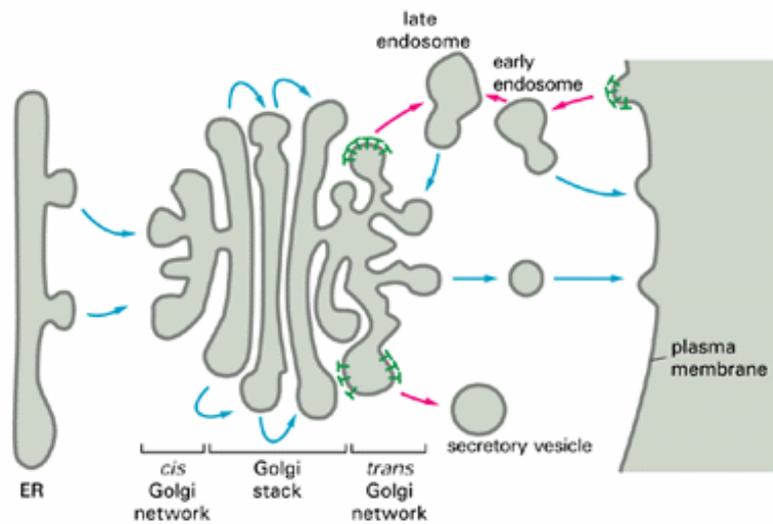


Figura 1.15 Vie secretorie-esocitotiche e vie endocitotiche coinvolte nel trasporto dal ER al Golgi e dal Golgi alla membrana plasmatica e dalla membrana plasmatica al Golgi. (Alberts, terza edizione)

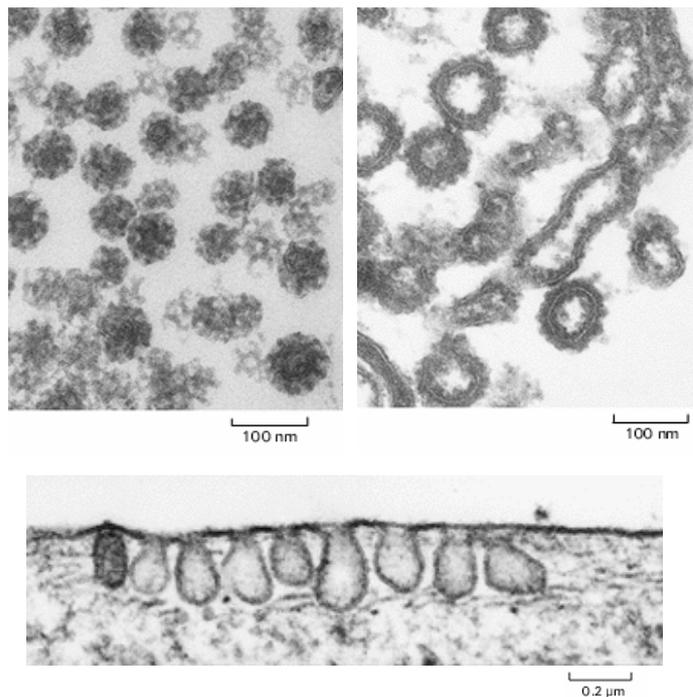


Figura 1.16 Immagini al microscopio elettronico di vescicole rivestite. In alto a sinistra: vescicole rivestite di clatrina; in alto a destra: vescicole rivestite di coatamero; in basso: caveolae. (Alberts, terza edizione)

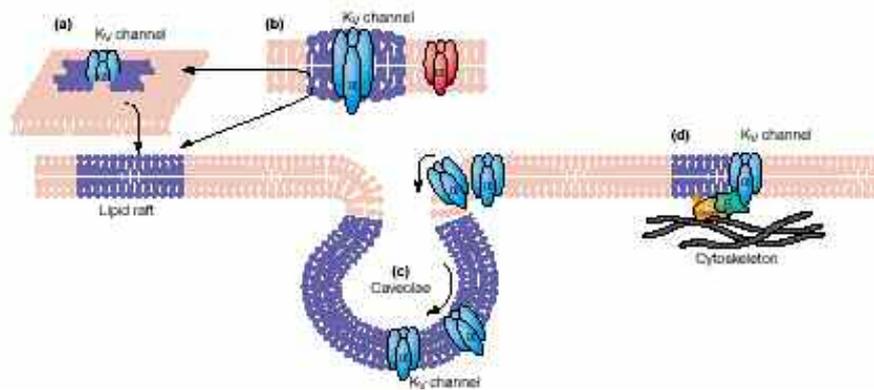


Figura 1.17 Localizzazione di proteine di membrana (canale Kv della famiglia *Shaker*) nei rafts lipidici e formazione delle caveolae. a) la proteina rappresentata in blu è un canale del potassio voltaggio-dipendente che si localizza nei microdomini lipidici. b) il canale in rosso è un tipo di proteina transmembrana che non si trova nei rafts. c) rappresentazione schematica di una caveolae che contiene alcuni canali del potassio. d) a volte le proteine transmembrana presenti nei rafts si associano a proteine citosoliche le quali sono ancorate al citoscheletro. (Martens, 2004)

1.4.2 L'import di proteine al cloroplasto

Il genoma del cloroplasto non presenta geni che codificano per canali ionici e più del 95% delle proteine di questo organello (Soll 2004) vengono importate da citosol. I canali ionici non fanno eccezione: vengono codificati dal genoma nucleare, sintetizzati nel citosol e successivamente importati ed inseriti nelle membrane del cloroplasto.

I cloroplasti sono organelli altamente strutturati: le tre membrane plastidiali (esterna, interna, tilacoidale) delimitano anche tre ambienti acquosi (spazio intermembrana, stroma, lumen tilacoidale). Per questo motivo, il meccanismo di import e targeting nei diversi compartimenti del cloroplasto richiede segnali specifici e meccanismi differenti per la corretta localizzazione di ogni proteina. La maggior parte delle proteine del cloroplasto vengono sintetizzate come proteine precursore nel citosol e importate dopo la traduzione. Quasi tutte le proteine indirizzate alla membrana tiacoidale, alla membrana interna e allo stroma contengono una presequenza ammino-terminale (detta anche peptide segnale) che viene poi rimossa, tramite proteolisi, dopo l'import attraverso complessi della membrana esterna e interna (TOC e TIC rispettivamente (Figura 1.18) (Soll 2004)); una volta importate, queste proteine perdono il peptide segnale e la proteina matura risulta avere un peso molecolare leggermente inferiore a quello della proteina precursore.

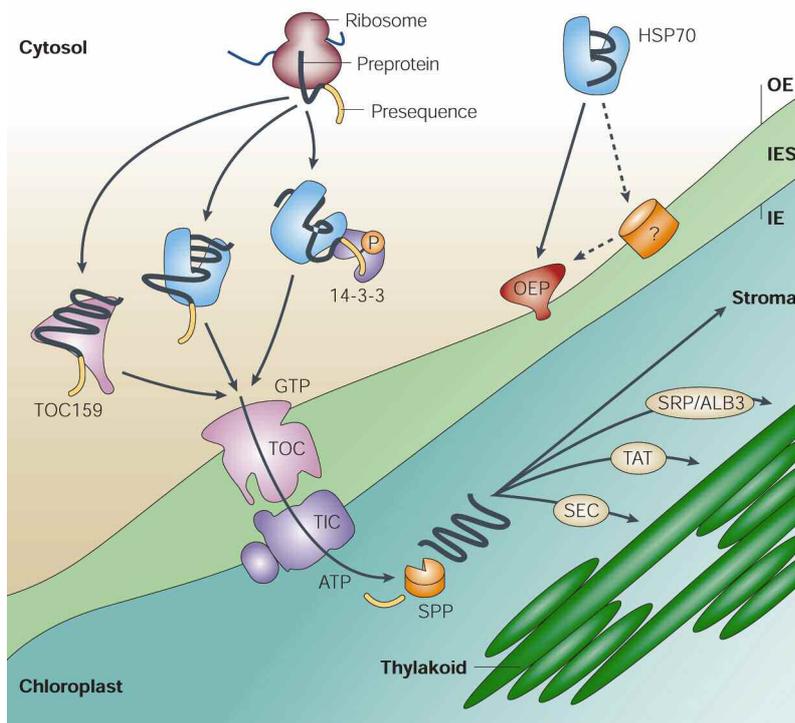


Figura 1.18 Vie di import delle proteine nei cloroplasti. Le proteine precursore, prodotte nel citosol, vengono importate nel cloroplasto attraverso i complessi di import (TOC e TIC) e nei tilacoidi attraverso differenti vie. Le proteine della membrana esterna seguono un pathway differente per il loro inserimento. OE, IE: membrana esterna ed interna; IES: spazio intermembrana; SPP: stromal processing peptidase. (Soll, 2004).

Un motivo comune della presequenza non è ancora stato trovato: ha una lunghezza compresa tra i 20 e i 150 aminoacidi e contiene generalmente cariche positive e residui di serina e treonina (aminoacidi idrossiati). Per le proteine lumenali, il peptide segnale è bipartito: oltre alla sequenza aminotermine, presentano una porzione vicina al carbossi-terminale che funziona come dominio di trasferimento nei tilacoidi (Keegstra 1999, Bauer 2001, Soll 2002).

Altre proteine vengono invece sintetizzate nel citosol come proteine precursore senza la presequenza amminotermine, ma con informazioni per il corretto targeting già presenti nella proteina matura: a questo gruppo appartengono la maggior parte delle proteine della membrana esterna (Bruce 2001) e solo una proteina della membrana interna (Miras 2002). Allo stato attuale, non è chiaro in che modo queste proteine siano indirizzate e importate alla membrana esterna, benchè siano stati ipotizzati numerosi e differenti meccanismi di import (Hofmann 2005). In ogni caso, a differenza delle proteine importate all'interno del cloroplasto, le proteine della membrana esterna non subiscono alcun taglio proteolitico dopo il loro inserimento.

1.5 Ruolo dei canali ionici nella regolazione della fotosintesi

Prima di procedere con la descrizione della proteina oggetto di studio, si rende necessario accennare al ruolo che i canali ionici, non solo quelli selettivi per il potassio, rivestono nella regolazione del processo fotosintetico.

Negli anni '70 sono stati effettuati alcuni studi per capire l'importanza dei canali ionici nella regolazione della fotosintesi. Purtroppo a quell'epoca la farmacologia e la genetica dei canali erano ancora ad uno stato iniziale, e ciò ha reso impossibile l'utilizzo di farmaci, inibitori o attivatori specifici dei canali. Inoltre l'identità molecolare dei canali vegetali era, e per certi aspetti è ancora, piuttosto oscura in quanto, a parte pochissime eccezioni (Krieger 1995; Schulenburg 1992), l'uso di inibitori più specifici non è stato preso in considerazione che dopo gli anni 70-80. Ciò nonostante, vi sono lavori di vecchia data (Hind 1974; Robinson 1984; Deamer 1969) dai quali emerge l'esistenza di canali per il cloruro e di canali cationici selettivi per il potassio e per il magnesio i quali rivestono un ruolo importante nella regolazione della fotosintesi. In particolare era stato ipotizzato, ed oggi è un'ipotesi ancora oggetto di discussione, che questi canali fossero coinvolti nel controbilancio elettrico. Durante la fotosintesi, infatti, nella membrana tilacoidale si instaura solo un delta pH con un eccesso di protoni sul lato lumenale ma non un potenziale di membrana; l'entrata di protoni, cioè di cariche positive nel lumen, deve essere quindi controbilanciata o dall'entrata contemporanea di anioni, o dall'uscita contemporanea di cationi. Se ciò non avvenisse si svilupperebbe un potenziale di membrana, come in effetti succede nel caso della membrana mitocondriale, dove la permeabilità effettiva ai vari cationi e anioni è minore rispetto a quello che si trova nella membrana tilacoidale.

Anche la regolazione dei livelli di calcio nel cloroplasto ha assunto maggiore importanza in quanto è stato proposto che il calcio possa regolare l'attività degli enzimi chiave nell'assimilazione della CO² e l'attività del complesso evolvente ossigeno. (Kreimer 1998, Brand 1984, Grove 1998, Loll 2005)

1.6 Il canale del potassio SynK

Precedentemente al mio ingresso nel gruppo presso il quale ho svolto la mia tesi di laurea e il mio dottorato, è stata identificata, nel proteoma di *Synechocystis sp.* PCC6803, utilizzando programmi bioinformatici (algoritmo BLAST), una sequenza di 234 aminoacidi che sembra codificare per un canale del potassio voltaggio-dipendente, assomigliante ai membri della famiglia *Shaker*. L'allineamento è stato fatto tra il motivo TMTTVGYGD, caratteristico del filtro di selettività dei canali del potassio contro tutto il proteoma di *Synechocystis* (figura 1.19). È stata, così, identificata una sequenza (*slr* 0498) che è risultata di particolare interesse in quanto viene indicata come una proteina ancora sconosciuta e, secondo il programma bioinformatico Hierarchical Neural Network (HNN) (figura 1.20), è costituita da sei segmenti transmembrana (da S1 a S6) e da una regione del poro (P tra S5 e S6). La regione del poro contiene il motivo LTTLGYGD, che è caratteristico del filtro di selettività dei canali del potassio (valina e leucina sono aminoacidi simili).

TMTTVGYGD



[gi|16331771|ref|NP_442499.1](#) unknown protein [*Synechocystis sp.* PCC 6803]

[gi|1001732|dbj|BAA10569.1](#) slr0498 [*Synechocystis sp.* PCC 6803]Length=234

Score = 24.4 bits (50), Expect = 0.44 Identities = 7/9 (77%), Positives = 9/9 (100%)

Query: 1	TMTTVGYGD	9
	T +TT+GYGD	
Sbjct: 175	T LTTLGYGD	183

Figura 1.19 Output della ricerca bioinformatica, attraverso l'algoritmo BLAST, del motivo tipico del filtro di selettività dei canali del potassio, nel proteoma di *Synechocystis*.

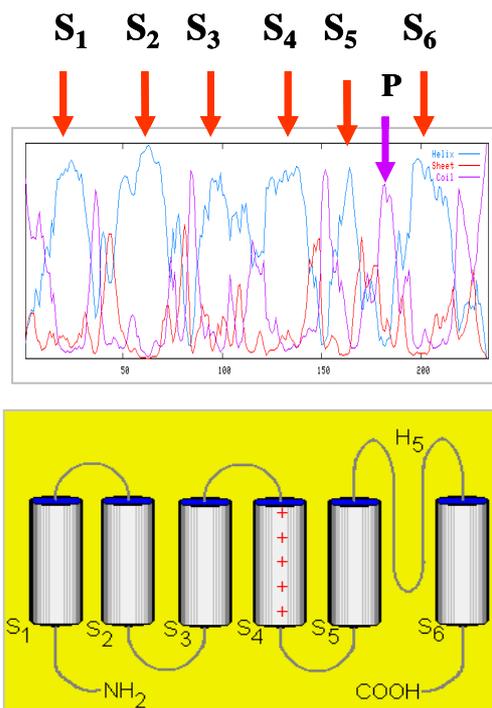


Figura 1.20 Output della predizione della struttura secondaria della proteina SynK, secondo il programma bioinformatico HNN (Hierarchical Neural Network)

Le predizioni sulla struttura tridimensionale della proteina (figura 1.21) e gli allineamenti (figura 1.22) tra le sequenze aminoacidiche mostrano una elevata somiglianza del canale SynK con il canale del potassio KvAP di *Aeropyrum pernix* di cui è nota la struttura tridimensionale (ottenuta tramite cristallografia e analisi ai raggi X) e la funzionalità *in vitro* (ottenuta utilizzando la tecnica del bilayer lipidico) (Jiang 2003, Ruta, 2003). Sulla base di questa somiglianza tra i due canali si è proposto che anche il canale di *Synechocystis* sia costituito da 4 monomeri uguali che formano la cavità centrale, che comprende il filtro di selettività per il potassio.

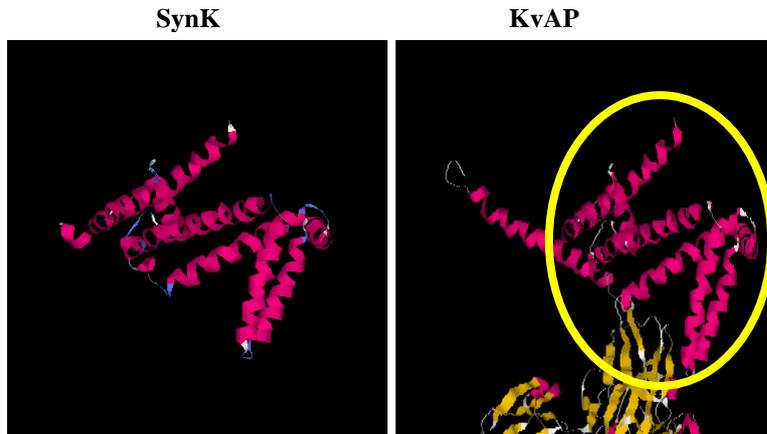


Figura 1.21 Predizione della struttura tridimensionale della proteina SynK mediante il programma bioinformatico mGenThreader

KvAp	1	MSVERWVPPGCS	VMARPRRGLSD	LGGRVRNIGDV	MEHPLVELGVS	YAALLSVIV	54	
SynK	1	-----	MFGKYRQKNLD	-----	NWH-----	YRNLFWSIV	23	
cons	1		***:*		*	* *: **	54	
KvAp	55	VVVEYTMQLS---	GEYLVRLYLVDLILVII	LWADYAYRAYKSG	GDPAGYVKKTLY		105	
SynK	24	LLLFPTMFVKTRM	GGTITSILFTVTILVMV	-----	KNMAISSLWKTEL		66	
cons	55	::: :*	* :. : .	***:*	. . . : **:		108	
KvAp	106	EIPALVPAG---	LLALIEGHLAGLGLFRL	LVRLRLRFLRILLI	ISR---	GSKFLSA	153	
SynK	67	RGLVAIALGCDL	LTLNISNPTISQRLFT	WADIVYAVFP	GAAVITISQ	QLNKVQK	120	
cons	109	. . . : *	* **..	. **	. : : : : :	: : .	162	
KvAp	154	IADAA--	DKIRFYHLFGAVMLT	VLYGAF	AIYIVEYDPNSSIK	SVFDALWVAVV	205	
SynK	121	VDQNALL	GAISVYLLIGVFVFL	LYRISY	IIISPTNF	ELOS	GINNFILLYFSPT	174
cons	163	: : *	. * . * * : .	: : .	: * : : : : *	. * * : : .	216	
KvAp	206	TATTVGYGDVVEAT	PIGKVI	GIAMVLTG	SALTLTIGTVSNM	FQKILVGEPEPS	259	
SynK	175	TLTTLGYGDITPT	DSIAMGLSN	MEAI	VGQMYSVIFVARLV	SL-----	YTTDLN	222
cons	217	* ** : * * * : * : .	* .	. : *	. : : . : . : .	. : .	270	
KvAp	260	CS	PAKLAEMVSSMSEEF	EEFVRTL	KNLRRL	ENSMK	295	
SynK	223	CH	-----	-----	SQIREEQES	-D	234	
cons	271	*			. : * . : : *	.	306	

Figura 1.22 Allineamento tra la sequenza amminoacidica della proteina SynK e quella del canale del potassio procariotico, di tipo Shaker, KvAP di *A. pernix*

Allo scopo di determinare la funzionalità *in vitro* della proteina SynK, durante il mio internato di laurea, mi sono occupata della sua espressione in sistema eterologo e del suo studio utilizzando le tecniche elettrofisiologiche. In particolare si è scelto di esprimere la proteina in cellule di mammifero (CHO-K1) in quanto la sua espressione in *E. coli* si è dimostrata impraticabile a causa

della tossicità della proteina SynK per i batteri. Il sistema di espressione utilizzato, quindi, è stata la trasfezione transiente in cellule CHO-K1, effettuata con il sistema dei lipidi cationici. La proteina espressa era il prodotto di fusione SynK-EGFP. La presenza della proteina fluorescente GFP al carbossi-terminale della proteina canale ci ha permesso di monitorare l'espressione e la localizzazione della proteina ricombinante. Le immagini ottenute con la microscopia a fluorescenza mostrano che una parte del prodotto di fusione si localizza a livello della membrana plasmatica delle cellule CHO-K1. (figura 1.23) Gli esperimenti di immunoblot con l'anticorpo anti-GFP, effettuati su lisati totali di cellule trasfettate, mostrano che una parte della proteina viene espressa con il peso molecolare, predetto per la proteina di fusione, di 54 kDa (26 kDa per SynK e 28 kDa per la forma enhance della proteina GFP). (figura 1.24) Le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo a pesi molecolari inferiori sono probabilmente dovuti a prodotti di degradazione della proteina di fusione. La localizzazione a livello della membrana plasmatica delle cellule di mammifero del prodotto di fusione SynK-EGFP era una condizione necessaria per poter effettuare i successivi studi elettrofisiologici con la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell. In questo modo è stato possibile determinare l'attività della proteina canale *in vitro*. I dati ottenuti mostrano che la proteina, in questo sistema, media l'efflusso di ioni potassio dalla cellula verso l'esterno (corrente positiva secondo la convenzione e illustrata come corrente upward) quando potenziali positivi, depolarizzanti, vengono applicati attraverso la membrana e le concentrazioni intra- ed extra- cellulari di potassio sono 140 e 5 mM, rispettivamente. (figura 1.25)

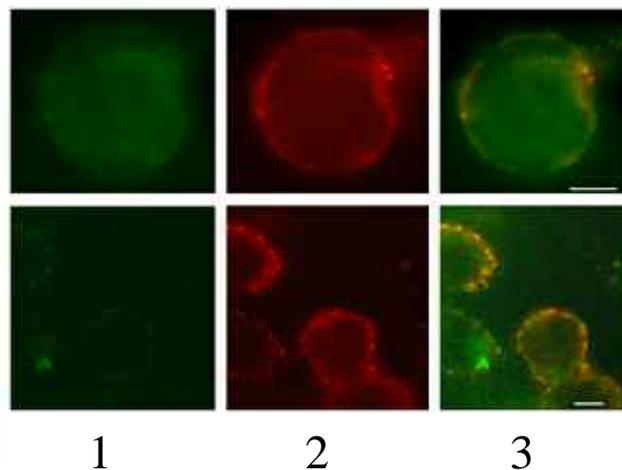
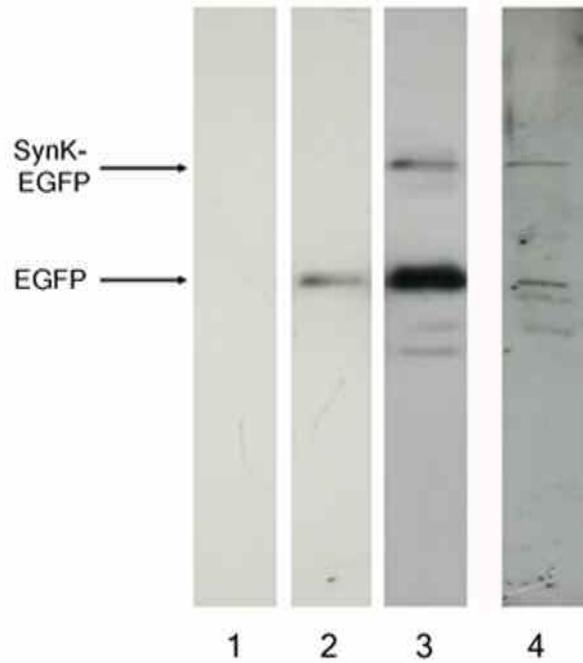


Figura 1.23 Analisi mediante microscopia a fluorescenza della proteina di fusione SynK-EGFP espressa in cellule di mammifero. 1. visualizzazione della fluorescenza emessa dalla proteina SynK-EGFP 2. colorante specifico per la membrana plasmatica. 3. merge. (barra: 10 μm) (Zanetti, 2004)



1.24 Immunoblot di lisati cellulari di CHO-K1 che esprimono la proteina SynK-EGFP. 1. controllo, cellule non trasfettate. 2. cellule che esprimono solo la proteina EGFP. 3 cellule che esprimono la proteina SynK-EGFP. 4. cellule che esprimono la proteina SynK-EGFP. Dalla 1 alla 3: anti-EGFP, 4: anticorpo anti-SynK. (Zanetti, 2004)

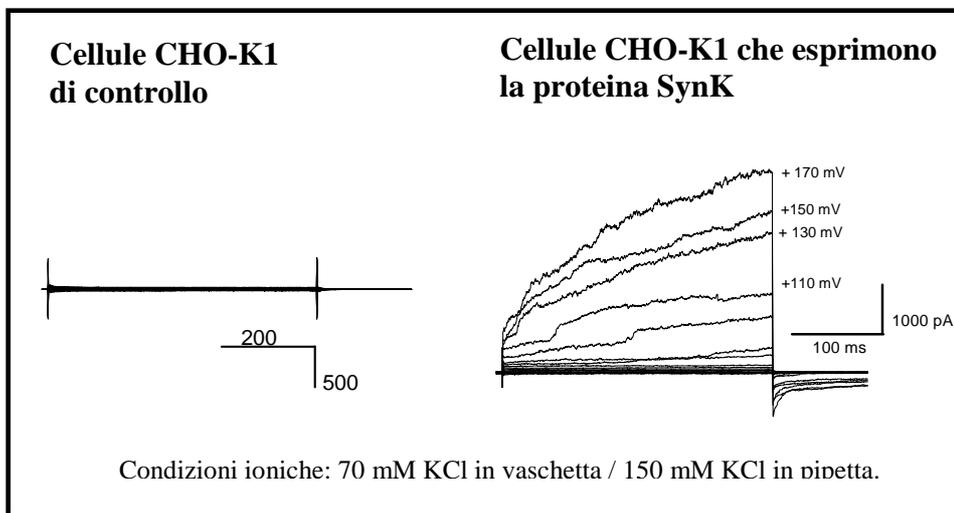


Figura 1.25 Analisi funzionali della proteina SynK espressa in cellule di mammifero ottenute mediante l'utilizzo della tecnica del patch-clamp. (Zanetti, 2004)

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

2.1.1 I plasmidi

2.1.1.1 Il plasmide pSynK-EGFP

Il plasmide pSynK-EGFP (figura 2.1) origina dal vettore pEGFP-N1 (Clontech) nel quale è stata clonata la sequenza codificante per il canale del potassio di *Synechocystis sp.* PCC6803. Questo plasmide è stato utilizzato per l'espressione della proteina di fusione SynK-EGFP in cellule di mammifero.

Il vettore pEGFP-N1 presenta le seguenti caratteristiche:

- ✓ pUC ori: origine di replicazione procariotica
- ✓ P_{SV40}: promotore eucariotico
- ✓ HSV TK polyA: terminatore procariotico e sito di poliadenilazione
- ✓ Kan^r: resistenza all'antibiotico kanamicina per la selezione nei batteri
- ✓ SV40 ori: origine di replicazione eucariotica
- ✓ P_{CMV}: promotore eucariotico (CMV: citomegalovirus)
- ✓ SV40 polyA: terminatore eucariotico e sito di poliadenilazione per stabilizzare l'mRNA.
- ✓ Neo^r: resistenza all'antibiotico neomicina per la selezione negli eucarioti
- ✓ EGFP: gene che codifica per l'enhanced GFP.
- ✓ MCS: sito di policlonaggio.
- ✓ f1ori: origine di replicazione per la produzione di DNA a singolo filamento in batteri

La sequenza è stata clonata usando i siti di restrizione EcoRI e BamHII presenti nel sito di policlonaggio e introdotti mediante PCR nella sequenza per SynK.

Questo vettore contiene la sequenza codificante la proteina EGFP a valle del sito di policlonaggio. In questo modo il vettore permette la sintesi di una proteina di fusione SynK-EGFP.

Questo plasmide è stato utilizzato per isolare il gene del canale SynK (intero o parziale) da inserire nei plasmidi descritti di seguito.

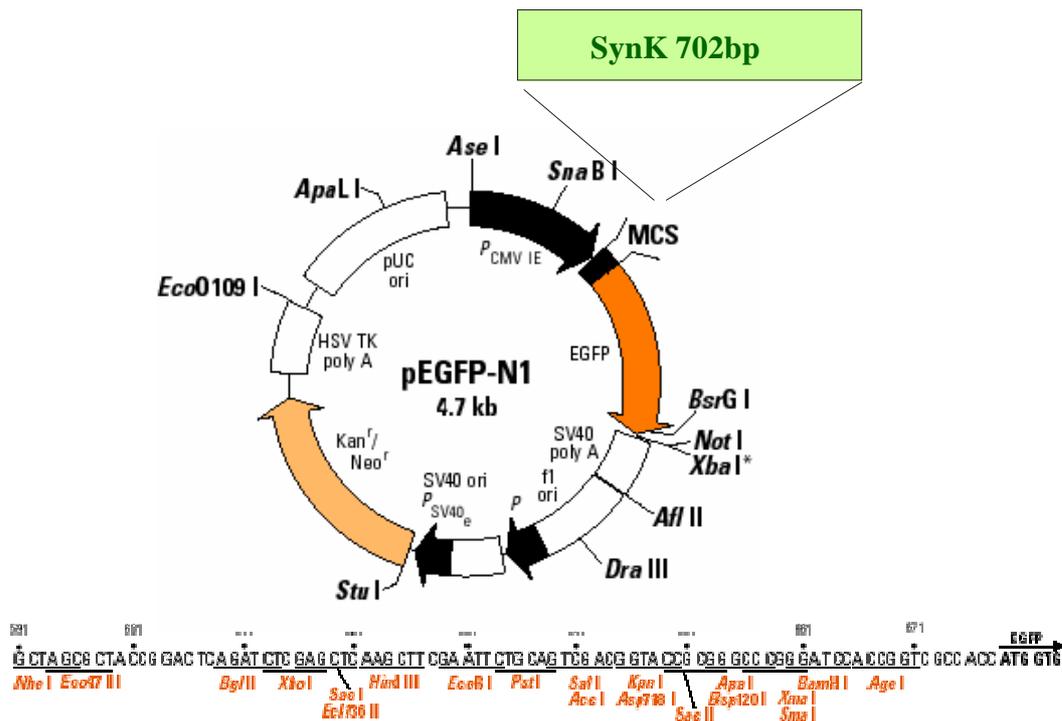


Figura 2.1 Sopra: mappa del vettore pEGFP-N1 e visione schematica del suo inserto. Sotto: sequenza nucleotidica del sito di policlonaggio.

2.1.1.2 Il plasmide pN-tKCh

Il plasmide pN-tKCh (figura 2.2) è stato utilizzato per la parte di lavoro che riguarda la produzione e la purificazione di un frammento (corrispondente ai primi 4 segmenti transmembrana) di SynK, allo scopo di produrre l'anticorpo.

Il plasmide pN-tKCh è stato creato inserendo (con l'utilizzo degli enzimi di restrizione NcoI e XhoI) un frammento del canale SynK, che comprende i primi 4 segmenti transmembrana (432 nucleotidi a partire dall'A₁TG), nel vettore di espressione per cellule batteriche pET-28b(+) (Clontech).

Le caratteristiche del plasmide pET-28b(+) sono:

- ✓ promotore T7, che in seguito all'aggiunta di IPTG regola il livello di espressione della proteina in cellule batteriche.
- ✓ inizio di trascrizione T7
- ✓ sequenza codificante His-tag al 3'
- ✓ sequenza codificante un sito di taglio per l'enzima proteolitico trombina a valle dell'His-tag, che consente l'eventuale eliminazione della coda di istidine
- ✓ sito di policlonaggio
- ✓ sequenza codificante His-tag al 5'

Per la clonazione di plasmidi in *E. coli* è stato utilizzato il ceppo InvaF', che presenta il genotipo: [F', *endA1*, *hsdR17*(*r_K*-, *m_K*+), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Φ 80*lacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*, *deoR*].

2.1.2.2 Il ceppo batterico *E. coli* BZ37

L'enzima di restrizione BstXI è sensibile alla metilazione in Adenina/Citosina, non è quindi in grado di effettuare il taglio se sono presenti nucleotidi metilati. Per questa ragione si è reso necessario l'utilizzo di un ceppo batterico che non fosse in grado di effettuare la metilazione. A questo scopo è stato utilizzato il ceppo BZ37, il cui genotipo risulta essere anche *dam*- *dcm*-

2.1.2.3 Il ceppo batterico *E. coli* C41(DE3)

Per l'espressione delle proteine ricombinanti è stato utilizzato il ceppo C41(DE3) gentilmente fornitoci dal Prof. Walzer (Miroux 1996), di cui non è noto il genotipo. I ceppi di *E. coli* sono stati fatti crescere a 37°C in terreno liquido LB (Luria-Bertani) liquido (1% bactotryptone 0.5% bacto-yeast extract 0.5% NaCl pH 7.5 con NaOH) o solido per l'aggiunta di agar all'1.5%. Per il mantenimento de plasmidi è stata aggiunta kanamicina al terreno di coltura ad una concentrazione di 25µg/ml.

2.1.2.4 Il ceppo batterico *Synechocystis* sp. PCC6803

In tutti gli esperimenti è stato usato il ceppo *Synechocystis* 6803-G, glucosio tollerante (Williams 1988).

Questo ceppo, in presenza di luce e di glucosio, è in grado di crescere fotoeterotroficamente. I batteri sono fatti crescere, in coltura liquida, in BG11 addizionato di glucosio 5 mM (o 10 mM quando indicato) irradiati con una luce continua di intensità 5-15 µmoli di fotoni m⁻²s⁻¹ (se non indicato diversamente), a 30°C. i batteri sono mantenti su piastre contenenti terreno solido, ottenuto aggiungendo 1.5% agar e 12 mM Na₂S₂O₃ al BG11 liquido. Le linee mutanti vengono fatte crescere in terreno addizionato con kanamicina 5µg/ml.

Le condizioni di totale eterotrofia sono caratterizzate dalla crescita dei batteri al buio in presenza di 15 mM glucosio.

BG11: 17.65 mM NaNO₃, 0.30 mM MgSO₄·7H₂O, 0.25 mM CaCl₂·2H₂O, 0.19 mM Na₂CO₃, 0.003 mM Na-EDTA, 0.029 mM acido citrico, 0.030 mM ammonio citrato ferrico, 46 µM H₃BO₃, 0.17 µM Co(NO₃)₂·2H₂O, 0.32 µM CuSO₄·5H₂O, 9.2 µM MnCl₂·4H₂O, 1.6 µM Na₂MoO₄·2H₂O, 0.77 µM

ZnSO₄·7H₂O, 0.19 mM Na₂CO₃, 0.17 mM K₂HPO₄·3H₂O e 10 mM HEPES-NaOH pH 8.2.

2.1.3 L'anticorpo anti-KPORE

L'anticorpo anti-KPORE è stato fornito dalla ditta SIGMA. Tale anticorpo è stato prodotto contro la sequenza amminoacidica TMTTVGYGD, sequenza conservata a livello del filtro di selettività di quasi tutti i canali del potassio (solamente in posizione di M e V l'amminoacido può non essere conservato). L'anticorpo è stato generato immunizzando due conigli adulti, siglati rispettivamente SG3587 ed SG3588. L'immunizzazione è stata eseguita attraverso iniezioni di peptidi coniugati alla emocianina ogni 14 giorni.

La diluizione e il tempo di incubazione di utilizzo dell'anticorpo sono stati determinati testandolo su organismi in cui la presenza di canali del potassio è stata dimostrata (figura 2.4).

Tutte le membrane di PVDF, riportate nella tesi, sono state incubate con il siero (prelievo n°1, coniglio numero 2) diluito 1:10000 in 2,5 % latte TTBS per un ora e mezza, in quanto questa condizione è risultata la migliore per la visualizzazione delle bande.

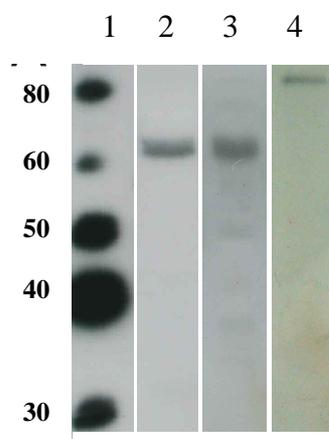


Figura 2.4 Caratterizzazione dell'anticorpo anti-KPORE(sviluppo con anti KPORE(prelievo n°1, coniglio numero 2) diluito 1:10000 in 2,5 % latte TTBS per un ora e mezza).

1) marker dei pesi molecolari; 2) e 3) cellule Jurkat; 4) proteina di fusione Kv1.3-GST purificata.

Le bande visualizzate in 2 e 3 corrispondono al canale Kv1.3, in 4 al canale Kv1.3 in fusione con la proteina GST.

2.2 Metodi

2.2.1 Tecniche di biologia molecolare

2.2.1.1 Digestione di DNA mediante enzimi di restrizione

Le digestioni sono state effettuate utilizzando quantità variabili di unità di enzima per μg di DNA (generalmente da 2 a 5 unità per le digestioni analitiche e da 5 a 10 per le digestioni preparative). Come tamponi di reazione sono stati utilizzati quelli consigliati dalla ditta produttrice dell'enzima; il volume di reazione totale è stato mantenuto entro i 15 μl per le digestioni analitiche ed entro i 30 μl per quelle preparative. La temperatura e i tempi di digestione usati è stata quelli consigliati dalla ditta fornitrice per ogni enzima.

2.2.1.2 Ligazione

Dopo che il frammento di DNA desiderato è stato amplificato e digerito, esso deve venire legato ad un vettore tramite una reazione di ligazione. Per effettuare questa reazione viene utilizzato un enzima specifico, la T4 DNA ligasi, la quale catalizza la formazione di ponti fosfodiesterici fra due estremità (l'OH in 3' e il gruppo fosfato in 5') dei due pezzi di DNA che si vogliono legare. La reazione dipende dalla presenza di ATP e MgCl_2 e può avvenire sia in presenza di estremità piatte che adesive. Si usa un tampone specifico per massimizzare l'attività catalitica dell'enzima, costituito dai seguenti componenti:

- Tris-HCl 20 mM (pH 7.6);
- MgCl_2 1mM;
- DTT (1,4-ditiotreitolo) 5 mM;
- BSA 50 $\mu\text{g/ml}$;
- ATP 1 mM.

La ligazione può essere condotta per 16-20 ore a 16°C oppure per almeno 3 ore a 25°C. Il rapporto tra inserto e vettore è generalmente 5:1, in quanto si vuole favorire l'introduzione dell'inserto nel vettore. La reazione di ligazione viene fortemente inibita da residui di agarosio nel campione, che limitano l'attività catalitica dell'enzima ligasi.

2.2.1.3 Preparazione di batteri *E. coli* competenti e trasformazione

Il trattamento di competenza ha lo scopo di rendere la membrana delle cellule batteriche temporaneamente permeabile per permettere l'introduzione di DNA esogeno. A tale scopo è stato seguito il seguente protocollo.

Si inoculano 60 ml di LB liquido con 600 µl di una pre-coltura batterica fresca in fase stazionaria. Questa coltura viene fatta crescere fino a un valore di O.D._{600nm} adeguato, generalmente caratteristico per ogni ceppo. Raggiunto il valore di densità ottica opportuno, si arresta la crescita ponendo la coltura in ghiaccio per 10 minuti. Si centrifuga a 4°C a 2500 g per 5 minuti. Il pellet viene risospeso in 30 ml di CaCl₂ 0.1 M e lasciato in ghiaccio per 30 minuti. Si centrifuga nuovamente come prima e si risospende il pellet in 1.2 ml di CaCl₂ 0.1 M. Si lascia in ghiaccio da 1 a 12 ore. Per quanto riguarda la trasformazione che segue al trattamento di competenza, sono stati eseguiti i seguenti passaggi. Si uniscono 50-100 µl di cellule competenti con 1-5 ng (nel caso delle cellule C41(DE3) sono stati utilizzati 30 ng per la trasformazione) di DNA plasmidico integro e si lasciano, dopo aver mescolato delicatamente, 30 minuti in ghiaccio. Si provoca un *shock* termico ponendo la miscela di cellule e DNA a 42°C per 90 secondi e si riabbassa la temperatura passando in ghiaccio per 2 minuti. Si aggiungono 900 µl di LB e si pongono le cellule a 37°C per 1 ora in agitazione. Le cellule vengono infine piastrate in capsule Petri contenenti LB con aggiunta di 1.5% agar e l'opportuno antibiotico (kanamicina 25 µg/ml) e incubate a 37°C per circa 12 ore.

2.2.1.4 Estrazione di plasmidi da batteri

Per la preparazione di quantità ridotte di DNA plasmidico si fanno crescere 2 ml di coltura batterica fino a fase stazionaria a 37°C, in agitazione.

Il metodo, usato per l'analisi rapida dei plasmidi ricombinanti, si basa sulla lisi alcalina. Si prelevano 1.5 ml della coltura e si centrifugano 1 minuto a 2500 g per sedimentare le cellule batteriche. Si risospende il pellet in 100 µl di una soluzione contenente: 50mM glucosio, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH 8 e si lascia agire il tampone per 5 minuti a temperatura ambiente. Si Aggiungono 200 µl di una soluzione per la lisi alcalina (0.2 mM NaOH, 1% SDS), si mescola delicatamente e si lascia agire 5 minuti in ghiaccio. Si aggiungono poi 150 µl di soluzione neutralizzante (3 M acetato di potassio, 11.5% acido acetico glaciale), si mescola al vortex per 10 secondi e si lascia in ghiaccio per qualche minuto per favorire la precipitazione delle proteine. Si centrifuga quindi a 10000 g per 5 minuti e si recupera il surnatante. Mediante l'aggiunta di una quantità pari al volume del campione di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1), si eliminano per ripartizione la maggior parte delle proteine solubili e si estraggono gli acidi nucleici nella fase acquosa. Dopo aver recuperato quest'ultima si aggiungono 2.5 volumi di etanolo assoluto per far precipitare il DNA; per favorire la precipitazione si incuba il campione per 5 minuti a temperatura ambiente. Si centrifuga a 2500 g per 5 minuti, si lava il pellet con etanolo 70% e si centrifuga ulteriormente. Il pellet viene fatto

asciugare e successivamente lo si risospende in 20-50 μ l di tampone TE (10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA pH 8) con l'aggiunta eventuale di 0.1-0.2 μ l di RNAsi (10 mg/ml).

La purificazione con le colonnine è stata eseguita per poter procedere al sequenziamento o ad una digestione preparativa del DNA. La quantificazione del DNA plasmidico è stata effettuata mediante due tecniche: su gel di agarosio mediante la comparazione con quantità note di plasmidi di controllo; allo spettrofotometro, misurando l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm di diluizione note di campione; la lettura a 260 nm ci fornisce una misura della concentrazione del DNA (una concentrazione di DNA pari a 50 μ g/ml corrisponde ad una $A_{260nm} = 1$). Il rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm rispecchia il grado di purezza del DNA nei confronti di contaminazioni da parte di proteine; in una buona preparazione questo rapporto ha un valore di circa 2.

2.2.1.5 Preparazioni di DNA plasmidico (mini - midiprep)

Per estrarre i plasmidi dai batteri in grande quantità si usa il sistema della MIDI-PREP (per questi esperimenti è stato usato il kit della Promega Wizard Plus Midipreps DNA Purification System). Si prepara una pre-coltura contenente 2 ml di mezzo LB (Luria-Bertani 1% bactotryptone 0.5% bacto-yeast extract 0.5% NaCl pH 7.5 con NaOH) al quale vanno aggiunti 50 μ g/ml di antibiotico kanamicina. Si prelevano con un ansa sterile un po' di batteri da una pre-coltura precedente o da una piastra di terreno solido (LB con aggiunta di 1.5% agar) in cui sono stati messi a crescere i batteri il giorno prima. Si mescola bene e si fanno crescere a 37°C per una notte in agitazione. Si prelevano 100 μ l di pre-coltura satura e si mettono a crescere in 100 ml di mezzo con 50 μ g/ml di kanamicina per una notte a 37°C. A questo punto si centrifuga la coltura così ottenuta a 10000 g per 10 minuti a 4°C. Si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 3 ml di Cell Resuspension Solution. Si aggiungono 3 ml di Cell Lysis Solution e si mescola invertendo il tubo 4 volte. Si aggiungono 3 ml di Neutralization Solution e si mescola invertendo il tubo 4 volte. Ora si deve centrifugare a 14000 g per 15 minuti a 4°C. Si recupera delicatamente il surnatante. A questo punto si devono aggiungere 10 ml di Wizard Midipreps DNA Purification Resin risospesa alla soluzione di DNA ottenuta precedentemente e si rotea per mescolare. Per ogni Midiprep, si usa una Midicolonna inserita in un sistema che crei il vuoto. Si trasferisce la mistura DNA/resina nella Midicolonna e si applica il vuoto in modo che la resina depositi sul fondo della colonna portando con sé il campione. Quando tutto il campione è passato attraverso la Midicolonna, si deve interrompere il vuoto e aggiungere 15 ml di Column Wash Solution nella Midicolonna e

quindi riapplicare il vuoto per lavare la soluzione attraverso la colonna. La procedura di lavaggio va ripetuta nuovamente ma questa volta lasciando asciugare la resina per 30 secondi. Si può rimuovere la colonna dalla beuta a vuoto e separare la parte della colonna che contiene la resina tagliandola con un bisturi. Fatto questo si trasferisce la colonna in un tubo da 1.5ml e si centrifuga per 2 minuti a 10000 g per rimuovere tutti i residui di Column Wash Solution. Infine si deve trasferire la colonna in un nuovo tubo e aggiungere 300 µl di acqua mQ sterile nella colonna, quindi aspettare 5 min. In seguito si eluisce il DNA centrifugando la colonna a 10000 g per 20 secondi. Una volta rimossa la colonna si centrifuga il tubo per 5 minuti a 10000 g per precipitare i residui di resina, si toglie il surnatante e lo trasferisce in un tubo pulito. La concentrazione di DNA a doppia elica nel campione viene misurata allo spettrofotometro diluendo 5 µl di campione in 1 ml di acqua mQ e misurando l'assorbanza a 260 nm allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico può essere conservato a questo punto a -20°C.

2.2.1.6 Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi dei prodotti della PCR è stata eseguita tramite elettroforesi su gel di agarosio (1% agarosio; TAE 1X (0.04 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8); 0.25 ng/ml di bromuro d'etidio), seguita da esposizione alla luce UV.

Prima della corsa su gel, viene aggiunto un tampone di caricamento (in proporzione 1:5 v/v) ai campioni da analizzare (loading buffer: 0.25% blu di bromofenolo, 0.25% xylene cyanol FF, 30% Ficoll Type 400 PHARMACIA). Questo tampone favorisce il depositarsi del DNA nei pozzetti e consente di visualizzare la reazione durante la corsa.

I marcatori dei pesi molecolari utilizzati sono 1 Kb o 100 bp *ladder* della Promega.

2.2.1.7 Sequenziamento

I plasmidi sono stati sequenziati per confermare la correttezza dell'inserito clonato. Il sequenziamento è stato eseguito presso il *Sequencing Service* del C.R.I.B.I. (Centro Ricerche Interdipartimentale Biotecnologie Innovative) dell'Università di Padova. Il metodo usato è basato sulla tecnica Sanger, la quale prevede la sintesi enzimatica del DNA ad opera della DNA polimerasi in presenza sia di deossinucleotidi, che di dideossinucleotidi che fungono da terminatori della polimerizzazione poiché presentano nella posizione 3' un gruppo -H invece di un gruppo -OH. I quattro dideossinucleotidi sono marcati ognuno con diverso fluorocromoforo che ne permette l'identificazione. Per il sequenziamento sono necessari anche dei *primers*, che sono gli stessi usati per

la reazione di PCR. I campioni vengono preparati dal robot ABI Turbo-Catalyst e vengono poi sequenziati automaticamente da due sequenziatori (ABI 373 e ABI 377).

2.2.1.8 Induzione dell'espressione

Per l'espressione della proteina N-tKCh grazie al vettore pN-tKCh, sono stati utilizzati batteri *E. coli* appartenenti al ceppo C41(DE3) adatto all'espressione di proteine ricombinanti. È stata preparata una precoltura liquida in LB con kanamicina (25 µg/ml) ed è stata incubata a 37°C *overnight*. Il giorno seguente è stato inoculato 1 ml di coltura stazionaria in 24 ml di terreno LB. Le prove di espressione sono state condotte allestendo due precolture. La prima in 20 ml di LB con kanamicina (25 µg/ml), partendo da una singola colonia di C41(DE3), trasformate con il plasmide pN-tKCh (30 ng) in una beuta da 250 ml. La seconda in 3 ml di LB con kanamicina (25 µg/ml), partendo da una singola colonia di C41(DE3), trasformate con il plasmide pET28b(+) (come controllo). Entrambe le colture sono state fatte crescere *overnight* in agitazione a 28°C. Il giorno seguente sono stati inoculati 2.5 ml di precoltura di C41(DE3) trasformate con il plasmide pET28b(+) in 50 ml di LB. Con la pre-coltura di C41(DE3) trasformate con il plasmide pN-tKCh, invece, sono state inoculate due colture, ognuna di 50 ml di terreno LB, per testare l'efficacia dell'IPTG nell'indurre l'espressione. Le colture sono state fatte crescere a 28°C, in agitazione, fino a quando non è stato raggiunto un valore di O.D._{600nm} pari a 1. Giunti a tale valore si è proceduto all'induzione (secondo quanto suggerito nella linea guida gentilmente inviataci insieme al ceppo di C41(DE3) dal Prof. Walker) secondo il seguente schema:

- pET28b(+) indotto con 0.7 mM IPTG come controllo
- pN-tKCh non indotto come controllo
- pN-tKCh indotto con 0.7 mM IPTG

L'andamento della crescita è stato rilevato mediante 4 prelievi effettuati a intervalli di tempo di 30 minuti dopo l'induzione. Tali prelievi sono stati analizzati allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 600 nm, per misurarne la densità ottica. Su tali campioni sono stati condotti anche studi mediante SDS-PAGE per verificare la presenza della proteina e la sua concentrazione. I campioni per l'analisi proteica sono stati preparati così: tutti i campioni prelevati vengono centrifugati a 14000 g per 2 minuti e il pellet viene solubilizzato in 100 µl di tampone di caricamento Laemmli (SB: 3% SDS, 7% glicerolo, 42 mM Tris pH 6.8, 33 mM DTT, blu di bromofenolo). La corsa elettroforetica viene fatta nello stesso modo descritto al punto 2.2.2.5, la colorazione con il Comassie Brilliant Blue viene eseguita come descritto al punto 2.2.2.8, il trasferimento delle proteine viene fatto su membrane di

nitrocellulosa come descritto al punto 2.2.2.6. Per lo sviluppo viene utilizzato un anticorpo in grado di riconoscere la coda di istidine al C-terminale della proteina ricombinante. L'anticorpo viene utilizzato con una diluizione 1:2000 per un'ora e mezza. Lo sviluppo viene eseguito nello stesso modo descritto al punto 2.2.2.7. La procedura di induzione dell'espressione proteica descritta sopra è stata utilizzata anche per il plasmide pSynK-His_tag ma con l'aggiunta di 10 mM BaCl₂ in ogni passaggio. Le colture di C41(DE3) trasformate con il plasmide pSynK-His_tag sono state indotte con 0.5 mM IPTG e i prelievi di controllo sono stati fatti ai tempi: 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore, 6 ore e *overnight*.

2.2.1.9 Purificazione mediante cromatografia su colonna

La purificazione su colonna di affinità consente di separare la proteina di interesse dalle altre presenti nel lisato cellulare e ottenere così una frazione priva di contaminanti. La purificazione del frammento proteico di nostro interesse è stata fatta mediante cromatografia su colonna di affinità (QIAGEN) in ambiente denaturante (8 M urea). Per tale operazione è stata sfruttata l'elevata affinità di legame degli ioni nichel (Ni⁺⁺), presenti nella resina, per la coda di 6 istidine (His_tag) legata al C-terminale del frammento proteico di SynK. La prima parte prevede l'incubazione del campione proteico con la resina (in *batch*) allo scopo di favorire il legame tra loro. In seguito il tutto viene posto in una colonna sulla quale avverranno i successivi passaggi di purificazione. A tale scopo le cellule indotte sono state centrifugate ed il surnatante è stato rimosso. Quindi le cellule sono state risospese con il tampone PBS (150 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄), centrifugate nuovamente e congelate a -80°C. Il protocollo utilizzato per la purificazione è quello fornito dalla ditta QIAGEN ed è di seguito illustrato. Le cellule vengono scongelate lasciandole in ghiaccio 15 minuti, raccolte per centrifugazione e poi risospese in 5 ml di buffer denaturante per grammo di cellule. Il buffer è così composto: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8. Si lasciano le cellule in agitazione e in ghiaccio per 60 minuti. Il lisato viene centrifugato per 15 minuti a 15000g a 4°C e si recupera il surnatante. A questo punto si aggiunge 1 ml di 50% Ni-NTA ogni 4 ml di lisato cellulare e si mescola per 60 minuti ad una velocità di rotazione di 200 rpm circa. La mistura Ni-NTA-lisato viene trasferita in una colonna e il *flow-through* contenente le proteine che non si sono legate viene recuperato. I successivi lavaggi della colonna avvengono con tamponi a pH decrescente e hanno lo scopo di rimuovere tutte le proteine che si sono legate in modo aspecifico alla resina e nell'ultimo passaggio di diminuire l'affinità di legame dell'His-tag per gli ioni nichel, promuovendo così il distacco della proteina di interesse. I primi due lavaggi della colonna, da 4 ml ciascuno, vengono fatti con il seguente tampone: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8

M urea, pH 6.3. La proteina di interesse viene quindi eluita utilizzando prima 2 ml (in 4 passaggi successivi) di tampone di eluizione 1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 5.9) e poi utilizzando 2 ml di tampone di eluizione 2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4.5) in 4 passaggi. A tutti i tamponi è stato aggiunto l'inibitore delle proteasi PMSF in concentrazione finale 0.5 mM allo scopo di minimizzare la degradazione delle proteine durante i passaggi di purificazione. Tutte le frazioni raccolte vengono conservate e analizzate tramite elettroforesi. La frazione contenente la proteina SynK viene ulteriormente purificata mediante elettroeluizione (vedi par. ccc) e iniettata in coniglio secondo il protocollo descritto nel par.CCCCC.

2.2.1.10 Trasformazione di *Synechocystis* mediante elettroporazione (modificato da Thiel, 1989)

I cianobatteri vengono inoculati in 100 ml di coltura liquida e si lasciano crescere fino ad un valore di densità ottica (OD_{730nm}) compreso fra 0.2-0.5, tenendo conto che il ceppo selvatico di *Synechocystis* ha un ciclo replicativo di 8 ore circa.

Si centrifuga a 6000 g per 10 minuti a 4°C, si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 15 ml di acqua fredda (4°C). Il passaggio viene ripetuto per eliminare i residui di mezzo di coltura e poi si risospende il pellet in 7 ml di acqua (i batteri vanno tenuti in ghiaccio durante tutta la preparazione). Dopo un'ultima centrifugazione, il pellet viene risospeso in acqua con 10% glicerolo, alla concentrazione di 10⁹ cellule/ml (Williams, 1988). Infine si mescolano 40 µl di questa preparazione con 2 µg di vettore in una cuvetta da elettroporazione, vengono, quindi, incubati in ghiaccio per 3 minuti ed elettroporati a 1800 mV, 21 µF. I campioni poi si lasciano crescere per 24 ore a 30°C in 10 ml di BG11 con aggiunta di 5 mM glucosio, per consentire l'espressione della resistenza introdotta e infine seminati su piastre contenenti sia glucosio che kanamicina (5 µg/µl) per la selezione dei trasformanti.

2.2.1.11 Isolamento di DNA genomico da *Synechocystis* (modificato da Xu and McFadden, 1997)

I cianobatteri vengono inoculati in 2 l di coltura liquida e si lasciano crescere fino ad un valore di densità ottica (OD_{730nm}) uguale a 1. Si centrifuga a 6000 g per 10 minuti a 4°C, si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 10 ml di NaI saturo e lo si incuba a 37°C per 30 min in agitazione. successivamente si effettuano 2 lavaggi dei batteri con acqua sterile e li si congela a -80°C per 2 ore. Dopo lo scongelamento si risospendono in 10 ml di tampone di lisi (50 mM glucosio, 50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA), si aggiunge lisozima alla

concentrazione finale di 15 mg/ml, si mescola dolcemente e si incuba a 37°C per 1 ora, in agitazione. A questo punto si aggiungono 20 ml di una soluzione 0.2% NaOH – 1 % SDS e si pone in ghiaccio per 10 minuti. Questa sospensione viene poi neutralizzata aggiungendo 5 ml di sodio acetato 3 M e mantenuta in ghiaccio per 30 minuti. Si centrifuga a 12000 g per 10 minuti e poi si aggiunge un pari volume di una miscela di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), si mescola e si centrifuga l'emulsione per 2 minuti a 14000 g. Si raccoglie la soluzione acquosa e si aggiungono un decimo del volume di sodio acetato 3 M e 2.5 volumi di etanolo. Si pone il campione a -20°C per tutta la notte, quindi si centrifuga a 16000 g per 30 minuti e si effettuano 2 lavaggi con etanolo 70%. alla fine si risospende il DNA così ottenuto in 2 ml di acqua con l'aggiunta di 0.1-0.2 µl di RNAsi (10 mg/ml) e si lascia agire per 30 minuti a 37°C.

2.2.1.12 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Introduzione

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è probabilmente l'invenzione metodologica più importante nella storia della biologia molecolare. Dalla sua introduzione a metà degli anni '80, è diventata rapidamente una procedura di routine in ogni laboratorio di biologia molecolare, per identificare, sequenziare, mutagenizzare, per la ricerca di diagnostica e l'analisi genetica. Nell'era post-genomica, la PCR è divenuta un metodo per clonare geni già esistenti e generare un'ampia rete di nuovi geni attraverso la mutagenesi o la ricombinazione all'interno dei geni di interesse. La facile e semplice disponibilità di tali geni è essenziale per lo studio della genomica funzionale, dell'espressione genica e della relazione tra struttura e funzione nelle proteine.

Processo

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una amplificazione enzimatica, mediata da *primers*, di specifiche sequenze di DNA. Come correntemente viene praticata, la PCR richiede dei componenti base:

1. Un DNA template, che contiene la regione da amplificare. Questa può essere di decine di migliaia di nucleotidi, ma i risultati migliori si ottengono per lunghezze fino a 2-3 kb.
2. Una coppia di *primers*, necessari all'enzima per iniziare la polimerizzazione, i quali determinano l'inizio e la fine della regione da amplificare. Sono corti oligodeossiribonucleotidi, di solito lunghi 15-25 nucleotidi e con il 50-60% di G+C.

3. Una DNA polimerasi termoresistente, che dopo aver legato il *primer*, estende un filamento di DNA copiando il template. La polimerasi più usata è la *Taq* DNA polimerasi in quanto ha una buona termostabilità e processività (il numero dei nucleotidi replicati prima che l'enzima si dissocia dal DNA template). E' stata inizialmente purificata dal batterio Gram-negativo termofilo *Thermos aquaticus* e viene oggi prodotta in forma ricombinante in *Escherichia coli*. Tale *Taq* polimerasi manca della attività esonucleasica 3'→5' per cui non può rimuovere i nucleotidi scorretti. In questo modo compie 1 errore ogni 10.000 nucleotidi duplicati.
4. Deossinucleotidi trifosfato (dNTPs), a partire dai quali la DNA polimerasi costruisce il nuovo filamento di DNA.
5. Un tampone salino, che dipende dalla polimerasi in uso. Per una PCR con la *Taq* polimerasi il tampone è 50mM KCl e 10mM Tris-HCl, pH 8.3, a temperatura ambiente. Questo tampone fornisce la forza ionica e la capacità di tamponamento necessaria durante la reazione.
6. ioni Mg^{2+} , in forma di magnesio cloruro, che sono essenziali cofattori per la *Taq* polimerasi.

Il processo consiste solitamente in una serie di tre fasi, ognuna ad una specifica temperatura, che definiscono un ciclo di PCR:

1. La denaturazione del DNA template a doppio filamento, indotta portando la temperatura a 94-96°C .
2. L'*annealing* (appaiamento) dei due oligonucleotidi *primers* al DNA template a singolo filamento, indotta abbassando la temperatura sotto il valore della temperatura di *melting*, o T_m , di solito di circa 5°C. Per temperatura di *melting* di un *primer* si intende la temperatura alla quale metà dei siti di *binding* dei *primers* sono occupati. Di solito è tra i 45 ed i 65 °C.
3. L'estensione enzimatica dei *primers*, per produrre copie di DNA che verranno in seguito usate come template nei cicli successivi. La temperatura di allungamento dipende dalla polimerasi, per la *Taq* polimerasi l'allungamento ottimale si ha a 72°C e di solito dura 1 minuto per la polimerizzazione di 1000 paia di basi.

Sfortunatamente, non c'è un singolo set di condizioni che sia ottimale per ogni PCR. Perciò ogni PCR richiede una specifica ottimizzazione per ogni abbinamento fra template e coppia di *primers* scelti. Inoltre è possibile aggiungere degli additivi alla soluzione di reazione allo scopo di migliorare l'efficienza di questa procedura.

Condizioni utilizzate

Per amplificare frammenti di DNA da inserire nei plasmidi sono stati utilizzati i seguenti primers e condizioni di reazione:

- per plasmide pN-tKCh:

Primers che hanno permesso l'introduzione dei siti di restrizione NcoI e XhoI:

NtK-Nco_for 5'-TTCGAATCCATGGTTGGCAAATATCGACAG-3'

NtK-Xho_rev 5'-

ATAGGATATCCGCTCGAGTAAAAACCAAAGAC-3'

La soluzione di reazione (volume finale 100 µl) è così composta:

DNA template (20 ng)

Primers (0.25 µM)

MgCl₂ (0.75 mM)

dNTPs (200 µM)

PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH8.3)

DNA polymerase (0.1 U)

Il termociclatore è stato programmato come segue:

94°C per 5 minuti

94°C per 30 secondi (denaturazione)

56°C per 30 secondi (*annealing*)

72°C per 1 minuto (allungamento)

72°C per 5 minuti

4°C

35 cicli

- per plasmide pSynK-His_tag:

Primers che hanno permesso l'introduzione dei siti di restrizione NdeI e NotI:

NtK-Nde_for 5'-TTCGAACATATGTTTGGCAAATATCGACAG-3'

NtK-Not_rev 5'-GTTCGCGCCGCTGCAGTCTAATCCGATTC-3'

La soluzione di reazione (volume finale 50 µl) è così composta:

DNA template (20 ng)

Primers (0.25 µM)

MgCl₂ (2 mM)

dNTPs (200 µM)

PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH8.3)

DNA polymerase (0.1 U)

Il termociclatore è stato programmato come segue:

94°C per 5 minuti

94°C per 30 secondi (denaturazione)

55°C per 30 secondi (*annealing*)

68°C per 1 minuto (allungamento)

72°C per 5 minuti

4°C

25 cicli

- per confermare la corretta inserzione della cassetta di resistenza alla Kanamicina nel mutante ΔSyn , sono stati utilizzati i seguenti *primers* e condizioni di reazione:

Primers:

kanam_02c	5'-TCGCGAGCCCATTTATAC-3'
kanam_03w	5'-AACTTTTGCTGAGTTGAAGG-3'
K+G-for	5'-AACCATGCTCAAAGATGCG-3'
K+H-rev	5'-ATGCTCAGTAATCGCTGTC-3'

La soluzione di reazione (volume finale 50 μ l) è così composta:

DNA genomico (50 ng)
 Primers (0.5 μ M)
 MgCl₂ (1.5 mM)
 dNTPs (200 μ M)
 PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH8.3)
 DNA polymerase (0.5 U)

Per ottimizzare la reazione è stato aggiunto 0,5 % Tween-20, il quale è ritenuto uno stabilizzante della *Taq* polimerasi.

Il termociclatore è stato programmato come segue:

94°C per 5 minuti
 94°C per 30 secondi (denaturazione)
 54°C per 30 secondi (*annealing*)
 72°C per 1 minuto e 30 secondi (allungamento)
 72°C per 2 minuti
 4°C
 35 cicli

2.2.2 Tecniche di biochimica

2.2.2.1 Determinazione della concentrazione proteica

Per determinare la concentrazione delle proteine presenti nel lisato proteico si utilizza il metodo BCA (acido bicinconinico) (PIERCE). Questo è un metodo colorimetrico che prevede l'utilizzo del reattivo BCA e del solfato di rame. Si fanno reagire le proteine contenute nel campione con questi due reagenti e si lasciano incubati per 30 minuti a 37°C. Successivamente si leggono i valori di assorbanza a 562 nm allo spettrofotometro. La concentrazione proteica viene determinata in base a una retta di taratura fatta con lo stesso metodo con la proteina albumina a concentrazioni note.

2.2.2.2 Misura della concentrazione di clorofilla nelle piante

Per misurare la concentrazione di clorofilla, il campione viene diluito in una soluzione di 80% acetone (v/v), che estrae la clorofilla e precipita le proteine, consentendo così, dopo aver centrifugato per 2 minuti a 14000g, di misurare l'assorbanza allo spettrofotometro, secondo quanto proposto da Arnon *et. al* (Arnon, 1949), alle lunghezze d'onda di 645nm, 663nm e 720nm. Si usa poi la seguente formula per calcolare la concentrazione totale di clorofilla:

$$\text{Chl}(a+b) = 20.2 (A_{645\text{nm}} - A_{720\text{nm}}) + 8.02 (A_{663\text{nm}} - A_{720\text{nm}})$$

La concentrazione così ottenuta è espressa in µg/ml.

2.2.2.3 Determinazione concentrazione clorofilla nei cianobatteri

La clorofilla viene estratta dal campione come descritto sopra, diluendo però in metanolo puro. Nei cianobatteri è presente solo clorofilla a e la sua concentrazione (in µg/ml) viene determinata secondo la seguente formula:

$$\text{Chl} = (A_{666\text{nm}} - A_{730\text{nm}}) \times 12.6$$

dove 12.6 è il coefficiente di Mac Kinney (Mac Kinney, 1941).

2.2.2.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)

Le proteine derivate dalla lisi cellulare sono state separate mediante elettroforesi secondo Laemmli *et al.* (Laemmli, 1970) modificato da Gounaris *et al.* (Gounaris, 1988). L'apparecchiatura utilizzata per l'elettroforesi è della ditta Amersham. Il gel di separazione è così composto:

- 12% acrilamide
- 6 M urea
- 0,8 M Tris-HCl pH8.8
- 0,005% TEMED
- 0,05% APS (10% p/v)

Il gel spaziatore è così composto:

- 5% acrilamide
- 125 mM Tris-HCl pH6.8
- 0,01% TEMED
- 0,1% APS (10% p/v)

Il tampone di corsa è composto da 25 mM Tris, 192 mM glicina e 0.1% SDS. I campioni vengono preparati per la corsa aggiungendo un tampone di solubilizzazione (SB) contenente 3% SDS, 7% glicerolo, 42 mM Tris pH 6.8, 33 mM DTT, blu di bromofenolo. Nel caso di tamponi di solubilizzazione o ricette dei gel diversi, la composizione viene specificata nel testo o nella legenda delle figure

La separazione nel gel avviene in 4 ore con una corrente di 40 mA.

2.2.2.5 Trasferimento delle proteine su membrane di PVDF

Le proteine dopo essere state separate con SDS-PAGE vengono trasferite su una membrana di PVDF (polivinil-difluoruro). L'apparecchiatura usata è della ditta Amersham. Il tampone di trasferimento è così composto: 0.01 M NaHCO₃, 0.003 M NaCO₃, 10% metanolo (Dunn, 1986).

Innanzitutto la membrana di PVDF viene immersa in metanolo e poi in acqua. Poi si passa all'assemblaggio del "sandwich". Si mettono nell'ordine: spugna, carta assorbente per Western-blot, membrana di PVDF, gel di acrilammide, carta assorbente, spugna. Quindi si chiude il tutto dentro una teca e lo si pone in una apposita vaschetta contenente il tampone di trasferimento. Il trasferimento viene fatto *overnight* a 4°C utilizzando una corrente di trasferimento di 100 mA.

2.2.2.6 Sviluppo della membrana di PVDF

Prima della reazione con l'anticorpo la membrana viene saturata per un'ora con 10% (p/v) latte in TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4). Quindi viene rimosso il latte con lavaggi in TBS e aggiunto l'anticorpo diluito in TTBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7.4) e lasciato agire per 2 ore. Quindi vengono fatti una serie di lavaggi con TTBS e poi si mette l'anticorpo secondario (anti-rabbit coniugato con l'enzima perossidasi, diluizione 1:20000). Dopo i lavaggi dell'anticorpo con TTBS si aggiunge alla membrana una miscela 1:1 di due soluzioni fornite dalla ditta PIERCE, che contengono luminolo e perossido di idrogeno. Lo sviluppo della membrana viene fatto sfruttando la capacità della perossidasi legata all'anticorpo secondario di reagire con il luminolo e con il perossido di idrogeno, emettendo luce che viene sfruttata per impressionare lastre fotografiche.

2.2.2.7 Colorazione con Blue Comassie

Dopo la corsa elettroforetica le proteine possono essere visualizzate sul gel attraverso la colorazione con il colorante Comassie Brilliant Blue. Questo colorante ha la caratteristica di legarsi in maniera specifica alle proteine. Alla fine della corsa il gel viene posto per 2 ore in una soluzione colorante contenente 0.1% Blue Comassie, 50% metanolo e 10% acido acetico ed infine decolorato con una soluzione decolorante contenente 7.5% acido acetico e 10% metanolo in acqua mQ.

2.2.2.8 Calcolo del peso molecolare

Per la determinazione dei pesi molecolari delle proteine analizzate mediante SDS-PAGE, sono stati utilizzati i marcatori dei pesi molecolari della ditta Pharmacia “Low Molecular Weight” (intervallo 97-14.4 kDa). Questi pesi vengono caricati nel gel e poi colorati con Coomassie o con nitrato di argento. In alternativa, se trasferiti su PVDF, vengono colorati con un colorante specifico (Gel Code Blue Stain Reagent della PIERCE) e decolorati con una soluzione di 50% metanolo, 1% acido acetico. Dopo la colorazione è possibile costruire la retta di taratura riferita alla migrazione dei marcatori e calcolare così il peso delle proteine di interesse.

2.2.2.9 Preparazione dei tilacoidi di pianta (secondo il metodo Bassi *et al.*, 1985)

Inizialmente i tessuti fogliari (nel caso del mais viene eliminata la prima foglia) vengono omogeneizzati nel tampone T1 (0.4 M sorbitolo, 0.1 M tricina, pH 7.8), con un omogenizzatore a lame intercambiabili (per il mais) o mediante mortaio e pestello (per *Arabidopsis*). L'omogenato viene poi filtrato attraverso una garza di nylon con pori di 20 μm , centrifugato per 10 minuti a 1400 g. Il sedimento ottenuto è costituito da cloroplasti che vengono risospesi nel tampone ipotonico T2 (25 mM HEPES/KOH pH 7.5, 10 mM EDTA) che inducendo uno shock osmotico, rompe l'*envelope* dei plastidi. Tramite centrifugazione a 10000 g per 10 minuti si ottiene un sedimento costituito dalle membrane tilacoidali. Tale sedimento viene risospeso nel tampone di conservazione T3 (50% v/v di glicerolo, 10 mM HEPES/KOH pH 7.5, 5 mM EDTA). Tutta la preparazione si esegue in camera fredda o in ghiaccio ed al buio.

2.2.2.10 Cromatografia di immunoaffinità

Solubilizzazione dei tilacoidi

I tilacoidi, ottenuti con la preparazione descritta in precedenza, sono stati solubilizzati con diversi detergenti, in modo da determinare le migliori condizioni di solubilizzazione:

1. L- α -LysoPhosphatidylCholine (LysoPC) 1 e 2 % w/v,
2. Dodecyl- β -D-Maltoside (β -DM) 1 e 2 % w/v,

Se non specificato altrimenti nel testo, i tilacoidi vengono portati alla concentrazione di 0,5 mg/ml di clorofilla.

In seguito all'aggiunta del detergente, la soluzione tilacoidale viene incubata per 30 minuti, in agitazione, al buio, a 4°C. Vengono infine centrifugati alla velocità di 10000 g per 5 minuti e recuperato il surnatante.

Immunopurificazione mediante *beads* coniugati alla proteina A

Con la cromatografia di immunoaffinità si possono ottenere campioni puri della proteina di interesse, sfruttando la specificità del legame antigene-anticorpo. Sostanzialmente, si divide in tre fasi: il legame dell'anticorpo ai *beads* con proteina A (*coupling*); il legame della proteina specifica all'anticorpo (*binding*); il distacco della proteina dall'anticorpo (eluizione).

Coupling: tutte le fasi del *coupling* vengono svolte a temperatura ambiente. Si procede mettendo ad incubare 0.5 ml di siero per ogni ml di *beads* per 2 ore e 30 minuti sotto agitazione. Dopo aver fatto precipitare i *beads*, viene recuperato il surnatante (per poter valutare l'efficienza del *coupling* mediante analisi successive), i *beads* vengono quindi lavati due volte in 10 volumi di una soluzione 0.2 M sodio borato pH 9.0 e risospesi in 10 volumi di sodio borato. Vengono prelevati 10 µl di *beads* (in modo da poter valutare l'efficienza del *coupling*) e aggiunto dimethylpimelidate in modo da raggiungere una concentrazione finale pari a 50 mM. Si lascia in agitazione per 2 ore allo scopo di rendere covalente il legame fra l'anticorpo e la proteina A. Al termine dell'incubazione vengono prelevati 10 µl di *beads* (per analisi successive). Si lavano i *beads* una volta in 10 volumi di 0.2 M etanolamina pH 8.0 e poi si incubano per 2 ore in agitazione. Dopo un veloce lavaggio in etanolamina, si risospendono i *beads* in PBS con 0.01% di sodio azide allo scopo di garantirne la conservazione fino al momento dell'uso.

Binding: si mettono ad incubare i *beads* con i tilacoidi solubilizzati (0.4 ml di *beads* per 0.5 ml di tilacoidi) *over-night* a 4°C ed in agitazione.

Eluizione: al termine del periodo di incubazione e dopo aver fatto precipitare i *beads*, si recupera il surnatante e si effettuano 3-4 lavaggi in 10 volumi di PBS con 0.1% TWEEN 20. Si prelevano 50 µl di *beads* (per valutare la quantità di proteina legata). Poi vengono lavati con 1 ml di 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 250 mM NaCl per staccare eventuali proteine legatesi in maniera aspecifica. L'eluizione viene effettuata aggiungendo 1 ml di 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2M NaCl e raccolto il surnatante. L'eluizione viene ripetuta per 3 volte. I *beads* coniugati all'anticorpo vengono riequilibrati con 2 lavaggi in PBS e conservati in PBS con 0.01% sodio azide.

2.2.2.11 Elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale viene eseguita utilizzando l'IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham-Pharmacia): nella prima dimensione, le proteine vengono separate in base al loro punto isoelettrico sfruttando gradienti di pH immobilizzati su un supporto di plastica (IPG strip).

Le proteine vengono prima di tutto precipitate diluendo i campioni di interesse in 4 volumi di acetone 100 % e lasciandole over-night a -20° C. Il giorno dopo, i campioni vengono centrifugati 5' alla massima velocità (su centrifuga da banco): le proteine vengono quindi risospese nel tampone di reidratazione, contenente 9 M Urea, 2 M tiourea, 2 % CHAPS w/v, 2 % ASB-14 w/v, 0.5 % IPG buffer v/v, tracce di Blu di bromofenolo e 2.8 % DTT w/v. Una volta risospese, le proteine vengono caricate su un supporto per le IPG strip secondo le indicazioni della casa produttrice. Questo supporto viene poi posizionato nell'IPGphor per iniziare l'isoelettrofocalizzazione secondo il seguente programma (impostato nell'apparecchio):

- 1 ora senza corrente per la reidratazione;
- 13 ore a 30 V per la reidratazione;
- 1 ora a 200 V;
- 10' a 300 V;
- Gradiente di corrente da 300 a 3500 V in 30';
- 3 ore a 3500 V;
- Gradiente di corrente da 3500 a 8000 V in 30';
- 4 ore a 8000 V.

Al termine di questo ciclo, le strip vengono lavate e incubate prima con una soluzione 6 M Urea, 30 % glicerolo v/v, 2 % SDS w/v, 50 mM Tris/HCl pH = 8.8 e 2 % DTT w/v per 12', poi altri 5' con la stessa soluzione di prima ma contenete 2.5 % w/v Iodoacetammide al posto del DTT. Questo trattamento serve per denaturare, ridurre e alchilare completamente le proteine. Successivamente le strip vengono posizionate sopra il gel di separazione di un SDS-PAGE (10 % acrilammide) per far correre la seconda dimensione in base al peso molecolare delle proteine.

2.2.2.12 Colorazione con argento per analisi di spettrometria di massa

Per la colorazione con sali di Argento, è stato utilizzato un Kit (SilverQuest™ Silver Staining Kit Ditta Invitrogen, n° LC6070) compatibile con la spettrometria di massa. Le normali colorazione all'argento infatti non rendono possibile la successiva digestione triptica e analisi con spettrometria di massa. La procedura seguita è quella riportata dalla ditta che produce questo kit.

Una volta terminata la colorazione, le bande di interesse vengono tagliate dal gel, messe in *ependorf* e decolorate aggiungendo una miscela di soluzioni

“Destainer” (fornite nel kit) per 15' e poi lavando abbondantemente con H₂O mQ fino a farle diventare trasparenti.

2.2.2.13 Digestione triptica ed estrazione dei peptidi

Questa procedura deriva da un lavoro di Shevchenko *et al.* (Shevchenko, 1996) con qualche modificazione. Tre sono i passaggi importanti (riduzione ed alchilazione delle proteine, digestione *in-gel* con tripsina ed estrazione dei peptidi) che vengono applicati sulle bande tagliate da gel di acrilammide (colorati o con la colorazione all'argento compatibile con la massa o con il Coomassie colloidale). Tutta la procedura viene effettuata in *ependorf*; i volumi di ciascuna soluzione possono variare in funzione delle dimensioni della banda che si sta trattando.

Riduzione ed alchilazione: lavare le bande del gel con H₂O mQ e poi incubarle con 50 µl di acetonitrile per 15'. Il gel raggrinzisce: togliere l'acetonitrile e tirare a secco le bande su una centrifuga a vuoto. Aggiungere 50 µl di 10 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ e incubare le bande per 1 ora a 56° C. Centrifugare brevemente, rimuovere il liquido e aggiungere 50 µl di acetonitrile. Dopo 15', togliere l'acetonitrile e incubare le bande con 55 mM iodoacetammide in 50 mM NH₄HCO₃ per 45' a temperatura ambiente e al buio. Rimuovere il liquido e lavare 15' con 50 mM NH₄HCO₃. Rimuovere e incubare con 50 µl di acetonitrile per 15'. Rimuovere bene tutto il liquido e tirare a secco le bande.

Digestione *in-gel*: reidratare le bande in 20 µl di tampone di digestione (40 ng/µl di tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, n° V5111) in 50 mM NH₄HCO₃) per 45' in ghiaccio. Rimuovere bene tutto il tampone in eccesso e aggiungere 50 µl dello stesso tampone senza tripsina (50 mM NH₄HCO₃). Incubare le bande *over-night* a 37° C.

Estrazione dei peptidi: dopo l'incubazione *over-night*, centrifugare brevemente le *ependorf* e trasferire tutto il liquido in una *ependorf* pulita (contiene i peptidi in soluzione). Aggiungere 20 µl di 25 mM NH₄HCO₃ e incubare per 15' a 37° C agitando a mano ogni tanto. Centrifugare brevemente e aggiungere 60 µl di acetonitrile e rimettere a 37° C per altri 15'. Centrifugare brevemente e recuperare tutto il liquido da aggiungere a quello recuperato in precedenza. Incubare le bande con 40 µl di 5 % acido formico v/v a 37° C “vortexando” ogni tanto. Centrifugare brevemente e aggiungere 60 µl di acetonitrile e rimettere a 37° C per altri 15'. Recuperare tutto il liquido da mettere insieme ai precedenti: vengono così estratti i peptidi in soluzione che vengono tirati a secco. Questi campioni sono poi analizzati dalla Dr.ssa Polverino De Laureto con Micro Mass Q-Tof spettrometro e i dati ottenuti vengono interpretati con programma MASCOT (www.matrix-science.com).

2.2.3 Tecniche fluorimetriche

2.2.3.1 Misure di fluorescenza dell'Acridine Orange mediante fluorimetro PAM

I batteri sono stati fatti crescere fino ad avere una concentrazione di clorofilla di 1.2 µg/ml, sono stati centrifugati per 10 minuti a 5000g e sono stati risospesi in tricina 50 M, per le misure, ad una concentrazione di clorofilla di 20 µM. Alla sospensione batterica è stata aggiunta Acridine Orange 5 µM e incubati al buio per 20 minuti. Le cinetiche di fluorescenza sono state ottenute utilizzando un fluorimetro a luce di ampiezza modulata (PAM 101, Waltz), due lampade, una per fornire un'illuminazione attinica (PAM 102) una lampada per ottenere luce saturante (Xenon lamp, XST103) e un set di filtri (GFP set filter) (eccitazione a 480 nm, cut-off < 505 nm; emissione con long-pass filter 515 nm, cut-off 575 nm). Secondo quanto determinato nel lavoro di Teuber *et al.* (Teuber, 2001), il pH citoplasmatico aumenta di circa 0.5 unità mentre il pH lumenale diminuisce della stessa quantità, quando le cellule sono illuminate ad un pH esterno pari a 8.

2.2.4 Tecniche di microscopia

2.2.4.1 Preparazione dei campioni per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione

Le cellule di *Synechocystis* utilizzate per l'osservazione al microscopio elettronico sono state cresciute nelle condizioni di crescita descritte nella sezione 2.1.2.4. Si è determinata la densità ottica a 730 nm si è aggiustato il volume con BG11 fino ad arrivare alla densità ottica di 1.5. I campioni vengono precipitati mediante centrifugazione per 3 minuti a 600 g.

I campioni sono stati fissati in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato per 24 ore, al buio e a 4°C. Successivamente, è stata eseguita una post-fissazione in OsO₄ in tampone cacodilato per 2 ore, al buio e a 4°C.

Alla fissazione succede la disidratazione in soluzioni acquose di alcool etilico a concentrazione crescente (ad ogni passaggio si compie una centrifugata a 1000 rpm con centrifuga da tavolo (600 x g) per 3 minuti):

- alcool 25% 3 cambi in 15'
- alcool 50% 3 cambi in 15'
- alcool 75% 2 cambi in 10'
- alcool 100% 2 cambi in 45'.

Infine, i campioni vengono nuovamente aliquotati in *eppendorf* da 250 µl e l'alcool viene sostituito con ossido di propilene eseguendo due cambi in 30'.

L'inclusione finale è stata effettuata in araldite. La resina è stata preparata mescolando i reattivi nelle seguenti proporzioni:

27 ml araldite/AM

23 ml anidride dodecil-succinica (DDSA)

0.75 ml acceleratore.

Con questa resina sono state ottenute tre diluizioni in ossido di propilene a concentrazioni crescenti di resina. I campioni sono stati quindi posti in successione nelle seguenti miscele:

resina/ossido di propilene 1:3, per 60' a 30-35°C

resina/ossido di propilene 1:1, per 60' a 30-35°C

resina/ossido di propilene 3:1, per tutta la notte in stufa a 35°C.

Il giorno seguente, dopo aver trasferito per due ore i campioni in resina pura in stufa a 35°C con le provette aperte, per favorire l'evaporazione dell'ossido di propilene, si è provveduto all'inclusione in resina pura mantenendo i campioni nelle *ependorf* da 250 µl in cui erano stati effettuati i precedenti passaggi. Queste sono state poste in stufa per la polimerizzazione della resina per 24 ore a 40°C, quindi per tre giorni a 60°C.

L'utilizzo di *ependorf* per il processo di inclusione al posto delle apposite cellette solitamente utilizzate, si è reso necessario per evitare l'alterazione della struttura dei cloroplasti che si sarebbe potuta verificare durante le fasi di trasferimento del campione. Questa tecnica, messa a punto dalla Dott.ssa Nicoletta La Rocca con cui ho eseguito la preparazione dei campioni, ha semplificato anche le fasi successive di taglio delle sezioni.

Sono state quindi eseguite sezioni di 90-95 nm di spessore dei diversi campioni, utilizzando un ultramicrotomo (Ultracut Reichert Jung) e una lama di diamante. Queste sono state raccolte su retini di rame, ricoperti da una pellicola di collodio e da uno strato sottile di carbonio.

I campioni così posizionati sono stati trattati con una soluzione satura di acetato di uranile in acqua per 30' al buio. Le sezioni, una volta lavate con acqua, sono state contrastate con citrato di piombo per 45', lavate e fatte asciugare.

L'osservazione delle sezioni è stata compiuta con un microscopio elettronico a trasmissione (Hitachi H300) operante a 75 kV.

2.2.4.2 Immunogold labelling

Le cellule di *Synechocystis* sono state fissate per 2 ore in 4% paraformaldeide e 0.25% glutaraldeide in una soluzione 0.1 M NaH₂PO₄ pH 7.2, quindi vengono incubate per 1 ora in 1% OsO₄ nello stesso buffer e successivamente vengono disidratate in etanolo (15%, 35%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%, uno o due cambi ogni 10 minuti). Al termine della disidratazione i campioni vengono

inclusi nella resina London Resin White (LRW). Sono state quindi eseguite sezioni di 90-95 nm di spessore dei diversi campioni, utilizzando un ultramicrotomo (Ultracut Reichert Jung) e una lama di diamante. Queste sono state raccolte su griglie di oro, sono state trattate con sodio metaperiodato, lavate con PBS 0.01M (pH 7.2), incubate per 20 minuti con 1% BSA e trattate con l'anticorpo primario anti-SynK. dopo lavaggio con PBS le sezioni vengono incubate con le particelle d'oro colloidale (15 nm) coniugate all'anticorpo secondario anti-rabbit. I campioni infine sono stati trattati con una soluzione satura di acetato di uranile in acqua per 30' al buio. Le sezioni, una volta lavate con acqua, sono state contrastate con citrato di piombo per 45', lavate e fatte asciugare.

L'osservazione delle sezioni è stata compiuta con un microscopio elettronico a trasmissione (Hitachi H300) operante a 75 kV.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato costruito un ceppo mutante di *Synechocystis* sp. PCC 6803 in cui il gene *synK* è stato sostituito con una cassetta di resistenza per l'antibiotico kanamicina (kan^R). Lo scopo è quello di determinare *in vivo* la funzione fisiologica di questa proteina canale, verificando se la delezione possa essere tollerata e quali cambiamenti comporti nella fisiologia del ceppo batterico, in particolare nel processo fotosintetico. Allo scopo di rendere più semplice l'analisi del fenotipo del ceppo mutante (ΔsynK) è stato prodotto un anticorpo policlonale, in grado di riconoscere in modo altamente specifico la proteina oggetto di studio. Infine è stato ricercato il presunto omologo della proteina SynK nel cloroplasto delle piante superiori, utilizzando tecniche biochimiche, quali l'immunopurificazione e l'elettroforesi bidimensionale, e analisi bioinformatiche.

3.1 Produzione di un anticorpo policlonale diretto contro la proteina SynK

Nel tentativo di acquisire utili strumenti per lo studio del canale del potassio SynK, è stata pianificata la produzione di una porzione della proteina in forma ricombinante da usare come antigene per ottenere anticorpi specifici per il canale.

L'espressione della proteina è ottenuta trasformando cellule di *E. coli* C41(DE3) con un plasmide (denominato pN-tKCh) contenente la sequenza nucleotidica codificante per i 144 aminoacidi amminoterminali del canale in fusione ad una coda di 6 istidine. Questo His_tag al terminale carbossilico facilita la purificazione della proteina ricombinante mediante una colonna cromatografica contenente ioni nichel. Le istidine infatti hanno una grande affinità per gli ioni nichel e questo ci permette di purificare la proteina.

Il plasmide pN-tKCh è stato ottenuto a partire dal plasmide pEt28b(+), digerito utilizzando NcoI e XhoI, all'interno del quale è stato inserito il frammento di DNA corrispondente ai primi 432 nucleotidi del gene *synK*. Il frammento di DNA utilizzato in questa ligazione è stato ottenuto dalla digestione con gli enzimi di restrizione NcoI e XhoI dell'amplificato ottenuto per PCR con i primers NtK-Nco_for e NtK-Xho_rev (che introducono per mutagenesi i siti NcoI e XhoI) del plasmide pSynK-EGFP_14 (per le caratteristiche del vettore si veda sez 2.1.1.1 del capitolo "Materiali e metodi") utilizzato per l'espressione della proteina canale in cellule di mammifero (vedi sezione 1.6 del capitolo "Introduzione").

La procedura per la produzione della proteina ricombinante da utilizzare come antigene per l'immunizzazione di un piccolo animale da laboratorio prevede, come prima cosa, la trasformazione di una coltura batterica competente con il plasmide di espressione. Dopo la trasformazione le cellule vengono piastrate su terreno solido e lasciate crescere overnight. Il giorno successivo si prepara una precoltura liquida prelevando una singola colonia dalla piastra. Si lascia crescere overnight a 28°C (anche se non viene specificato altrove questa temperatura viene utilizzata sempre per la crescita in coltura liquida delle cellule di *E. coli* C41(DE3)) e, a partire da questa, si preparano delle colture liquide che devono essere lasciate crescere fino a che non raggiungono un valore di densità ottica a 600 nm di 1. Quindi si procede con l'induzione delle colture. Si aggiunge ad ogni coltura la quantità di IPTG (induttore dell'espressione) stabilita (0.7 mM). Si lascia procedere la crescita e si fanno una serie di prelievi. I prelievi sono fatti a 30 minuti, un ora, un ora e mezza, due ore dall'induzione. Dopo aver misurato la densità ottica, i campioni prelevati vengono preparati per essere analizzati tramite SDS-PAGE. Per fare questo si centrifugano le cellule prelevate dalla coltura a 14000g per 2 minuti e

si risospende il pellet in 50 μ l di tampone di solubilizzazione (SB 2X) (vedi sez. 2.2.2.5). A questo punto sono pronti per la corsa elettroforetica su un gel di poliacrilammide al 15%. I campioni sono stati caricati seguendo l'ordine dei prelievi e la quantità di proteina caricata per corsia è uguale in tutti i campioni. Alla fine della corsa il gel è stato colorato con il metodo di colorazione delle proteine che prevede l'utilizzo del colorante Comassie Brilliant Blue. Se la proteina viene espressa dalle cellule batteriche dovrebbe essere evidente una banda del peso atteso (circa 16 kDa) che aumenta in intensità (quindi in quantità di proteina) nel tempo. La banda non era visibile in quanto erano presenti numerose proteine (le proteine totali del lisato di cellule batteriche) che rendevano il gel di difficile interpretazione (dato non mostrato). È stato deciso quindi di cercare di rivelare la proteina utilizzando gli anticorpi specifici per la coda di istidine, attraverso la tecnica dell'immunoblot. Dopo la corsa elettroforetica le proteine vengono trasferite su una membrana di PVDF che viene sviluppata con l'anticorpo anti-istidine. I risultati ottenuti sono mostrati in figura 3.1.

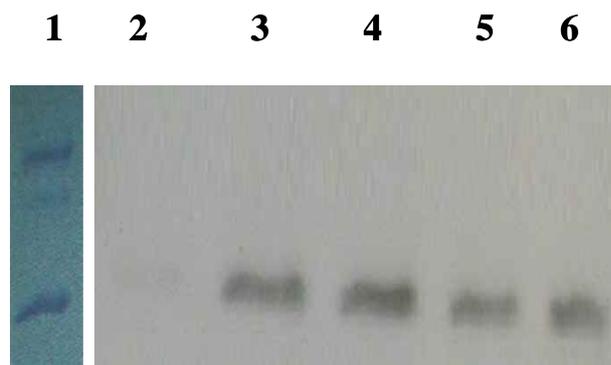


Figura 3.1 Immunoblot sviluppato con anti-His_tag (diluizione 1:2000). 1) marker dei pesi molecolari; 2) E.coli trasformato con il plasmide pN-tKCh non indotto; 3-6) E.coli trasformato con il plasmide pN-tKCh indotto con 0.7 mM iptg (tempi: 30 minuti, 1 ora, 1 ora e mezza, 2ore)

È possibile notare la presenza di una banda in ogni corsia in cui sono stati caricati i campioni di interesse. Le bande hanno un peso di 30 kDa circa (calcolato in base ad una retta di taratura fatta utilizzando i marker dei pesi molecolari) abbastanza in accordo con il peso predetto della forma dimerica del frammento (32 kDa). La presenza della forma dimerica anziché di quella monomerica non stupisce in quanto il frammento prodotto corrisponde alla regione deputata alla oligomerizzazione delle proteine canale, che *in vivo*, è noto, funzionano in forma tetramerica. La presenza della proteina ricombinante nella corsia in cui si trova il campione di cellule trasformate ma non indotte con IPTG, non è sorprendente. È stato notato infatti che il sistema di espressione proteica in *E. coli* C41(DE3) attraverso l'uso del plasmide

pET28b(+) non è perfettamente controllabile, in quanto una quantità notevole di proteina viene prodotta anche senza l'aggiunta di induttore. A dimostrazione di questo fatto è interessante citare che durante i primi tentativi di clonaggio dell'intero gene di questo canale le cellule batteriche morivano. Questo si è scoperto essere dovuto alla produzione di una certa quantità di proteina che, seppur minima, siccome conteneva la regione del poro, risultava essere tossica per le cellule.

Dopo aver condotto una serie di prove con diverse concentrazioni di IPTG, si è deciso di adottare, per l'espressione su larga scala, la concentrazione di induttore (IPTG) 0,7 mM per 2 ore (la concentrazione e il tempo a cui si otteneva una buona produzione di proteina ricombinante, circa 200 µg di proteina per litro di coltura)

Il frammento proteico espresso in larga scala in cellule di *E. coli* viene sottoposto al processo di purificazione tramite cromatografia di affinità al nichel. La qualità della purificazione è verificata tramite elettroforesi in gel di poliacrilammide al 15% e successiva colorazione con il colorante Comassie Brilliant Blue. Il profilo elettroforetico ottenuto mostra la presenza di contaminazione da parte di altre proteine e per questo si è deciso di purificare ulteriormente la proteina utilizzando la tecnica dell'elettroeluzione da gel di acrilammide. Questa procedura prevede l'escissione del frammento di gel di poliacrilammide corrispondente alla proteina di interesse e il suo caricamento su un'altro strato di gel di poliacrilammide. Viene quindi eliminata la poliacrilammide tramite il passaggio delle proteine, indotto dal potenziale applicato (circa 100 volts), sfruttando la loro carica negativa dovuta alla presenza dell'SDS, dal gel originario attraverso il nuovo strato di gel recuperandole infine su di una membrana da dialisi (cut-off 5000 Da)in una soluzione acquosa.

Dopo la misura della concentrazione proteica con il metodo del BCA, la proteina ottenuta viene complessata con l'adiuvante all'immunizzazione polyA-polyU. Il frammento viene quindi iniettato (0.20 µg di proteina) in due conigli allo scopo di indurre la produzione di anticorpi specifici contro la proteina SynK. Sono state effettuate 3 iniezioni sottocutanee ogni 14 giorni. I prelievi (6 per ogni coniglio) sono stati iniziati dopo 20 giorni dalla prima iniezione ed effettuati ogni 20 giorni. Il siero ottenuto dopo ogni prelievo è stato incubato a 37°C per un'ora, posto a 4°C per una notte e quindi centrifugato a 10000 g per 10 minuti. Al surnatante ottenuto è stata aggiunta sodio azide per preservare il siero da contaminazioni.

Gli anticorpi di entrambi i conigli sono stati testati, per controllare la capacità di riconoscere in modo specifico la proteina di interesse, attraverso saggio immunologico dopo corsa elettroforetica su gel di acrilammide e successivo trasferimento delle proteine su membrane di PVDF. I risultati ottenuti indicano

il riconoscimento sia della proteina antigene (frammento di SynK-His_tag) che della proteina canale (in lisati di cianobatteri), in maniera specifica. Per ottenere risultati soddisfacenti il siero viene utilizzato con diluizione 1:2500 in presenza di 1% latte (tale diluizione viene utilizzata in tutti gli esperimenti descritti in seguito). (figura 3.2) Tutti i prelievi effettuati sono stati testati e i risultati ottenuti sono molto simili (dato non mostrato). Tutti gli esperimenti mostrati nell'elaborato sono ottenuti con il secondo prelievo del coniglio siglato con il numero 2.

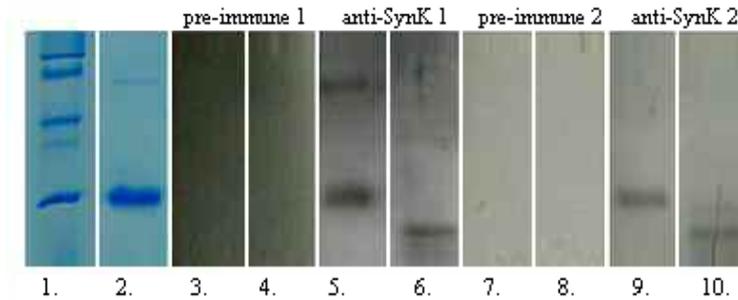


Figura 3.2 Caratterizzazione dell'anticorpo anti-SynK. 1) marker dei pesi molecolari; 2-3-5-7-9) frammento proteico utilizzato per l'immunizzazione N-tKch-His_tag; 4-6-8-10) lisato totale di *Synechocystis*. 3-4) immunoblot sviluppato con il siero pre-immune del coniglio 1; 5-6) immunoblot sviluppato con il siero (secondo prelievo) del coniglio 1; 7-8) immunoblot sviluppato con il siero pre-immune del coniglio 2; 9-10) immunoblot sviluppato con il siero (secondo prelievo) del coniglio 2

3.2 Procedura di costruzione del ceppo mutante

La strategia del “gene replacement”, nei cianobatteri, consente di sostituire un gene endogeno con uno esogeno introducendo nei batteri il DNA (corrispondente all’*open reading frame* del canale SynK) fiancheggiato da delle regioni omologhe a quelle presenti all’estremità del gene da sostituire. Il DNA esogeno può apparirsi a livello delle regioni omologhe e il gene inserirsi nel genoma batterico, nel sito specifico, tramite un meccanismo di doppia ricombinazione a livello delle regioni appaiate. La delezione del gene *synK* è stata ottenuta inserendo una cassetta di resistenza all’antibiotico kanamicina (Kan^R) nel genoma di *Synechocystis*, all’interno del gene *synK* allo scopo di eliminare la parte centrale del gene (dal nucleotide 209 al nucleotide 581). L’inserito (Kan^R) è stato ottenuto dalla digestione del plasmide pUC4K con l’enzima PstI e il frammento ottenuto è stato inserito nel vettore pSynK-EGFP_14. Questo vettore precedentemente era stato digerito con gli enzimi SpeI e BstXI allo scopo di eliminare la regione centrale del gene *synK* (372 bp). Il vettore poi, era stato richiuso con l’inserimento di un breve frammento di DNA sintetico, ottenuto dall’appaiamento dei due adattatori SBP e Pst (SBP: 5’- CTAGTCTGCAGATCTGCC -3’, Pst: 5’- GATCTGCAGA -3’), allo scopo di creare il sito di restrizione PstI, quindi è stato nuovamente digerito (con l’enzima PstI) e richiuso permettendo l’inserimento della cassetta Kan^R. Infine il frammento (1580 bp) utile alla trasformazione dei cianobatteri è stato ottenuto dopo digestione di questo ultimo plasmide con gli enzimi EcoRI e BamHI.

Synechocystis è stato trasformato, tramite elettroporazione, con il frammento così ottenuto (0.5 µg di DNA) e cresciuto su terreno solido contenente kanamicina al fine di selezionare le cellule trasformate. Allo scopo di ottenere la completa eliminazione delle copie di genoma selvatico (*Synechocystis* contiene circa una dozzina copie di genoma) dalle cellule dei cloni ricombinanti, i batteri sono stati sottoposti ad una serie di subclonaggi successivi in terreno selettivo contenente concentrazioni crescenti di kanamicina (da 1 a 5 µg/ml). Non è stato possibile ottenere cloni resistenti a concentrazioni maggiori di kanamicina.

Per tutti gli esperimenti descritti nel capitolo “Risultati e discussione” è stato utilizzato un ceppo di *Synechocystis* di controllo, chiamato 233K. Questo ceppo presenta un genotipo *wild-type* ma è stato sottoposto alle stesse manipolazioni del mutante Δ *synK* e presenta la cassetta di resistenza alla kanamicina inserita in una regione non codificante del genoma. (Chiaromonte, 1999). Nel testo non viene specificato ogni volta che il ceppo *wild-type* utilizzato è in realtà il ceppo 233K.

3.2.1 Controllo della corretta mutagenesi

Allo scopo di verificare che le sostituzioni geniche fossero avvenute correttamente, che la ricombinazione genica non avesse alterato la trascrizione dei geni fiancheggiati la regione di mutagenesi e che fosse avvenuta la completa segregazione dei genomi ricombinanti, è stata utilizzata la tecnica della reazione a catena della polimerasi.

La strategia adottata ha previsto l'amplificazione della cassetta di resistenza Kan^R dal DNA genomico del ceppo $\Delta synK$, in modo da valutarne il corretto inserimento all'interno del gene *synK*. Inoltre alcuni degli oligonucleotidi utilizzati hanno permesso l'amplificazione di ampie porzioni di genoma fiancheggiati la regione di ricombinazione. Nella figura 3.3, che mostra schematicamente la strategia utilizzata per la costruzione del mutante, sono riportati i *primers* specifici utilizzati per la verifica del corretto inserimento del DNA esogeno nel genoma. Nella figura sono riportate anche le taglie attese per gli amplificati che si ottengono utilizzando ogni coppia di *primers* indicata.

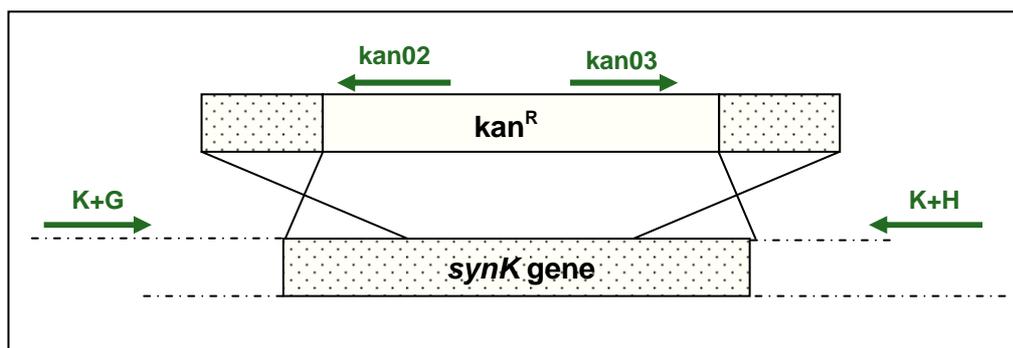


Fig 3.3. Rappresentazione schematica della costruzione del mutante $\Delta SynK$ e *primers* usati durante la PCR per amplificare la regione mutata. La delezione del gene *SynK* è stata ottenuta inserendo la cassetta di resistenza alla kanamicina (kan^R) all'interno della porzione del gene *SynK* nel genoma di *Synechocystis*. Le regioni utilizzate per l'evento di doppia ricombinazione omologa (indicato dalle linee incrociate) sono indicate dai puntini.

K+G / K+H (wt)= 1170 bp
K+G / K+H (mutante)= 1930 bp
K+G / Kan02 = 860 bp
Kan03 / K+H = 630 bp

In Figura 3.4 sono mostrati i risultati ottenuti per l'amplificazione effettuata con la coppia di *primers* K+G e K+H. Nella corsia corrispondente all'amplificato ottenuto con il ceppo mutante sono evidenti 2 bande, una di circa 1170 bp e l'altra di 1930 bp. Le taglie delle bande sono compatibili con

quelle attese per l'amplificato corrispondente al gene selvatico *synK* e al frammento ricombinante contenete la cassetta di resistenza all'antibiotico. I dati ottenuti mettono in evidenza che nel DNA genomico del ceppo mutante sono presenti copie di gene *wild-type* e copie di gene ricombinante. Non si è potuto ottenere un clone batterico in cui fossero presenti esclusivamente copie di gene mutato.

Allo scopo di determinare se la ricombinazione genica fosse avvenuta in maniera corretta sono state utilizzate le coppie di *primers* K+G / Kan_02c e K+H / Kan_03w. In questo modo è stato possibile ottenere l'amplificazione delle regioni (al 5' e al 3') in cui è avvenuto l'evento di ricombinazione omologa. Gli amplificati ottenuti sono mostrati in figura 3.5. Sono state amplificate anche le regioni a monte e a valle del gene sostituito allo scopo di amplificare i geni fiancheggianti il gene *synK*. I risultati (dato non mostrato) mettono in luce come la ricombinazione non abbia alterato i geni presenti nelle regioni limitrofe alla regione di ricombinazione.

Dagli esperimenti appena descritti è possibile concludere che il ceppo mutante ottenuto è un ceppo eteroplasmico in cui sono presenti copie di gene selvatico e copie di gene mutato.

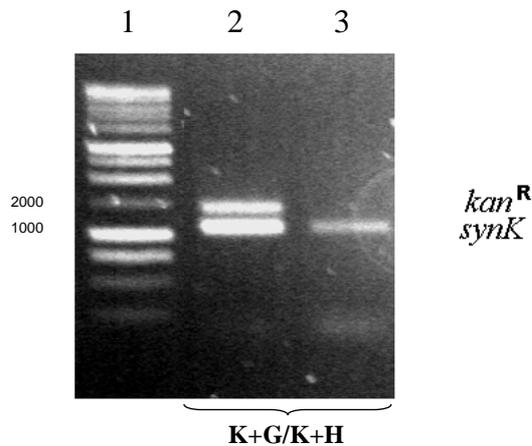


Fig 3.4. Conferma tramite PCR della corretta inserzione della cassetta di resistenza alla Kanamicina nel genoma di *Synechocystis* sp. PCC 6803. Viene mostrato il risultato della corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% inTAE. Sono stati caricati 5μl per ogni prodotto amplificato.

1. marker dei pesi molecolari
2. Genoma di Δ SynK amplificato con K+G e K+H
3. Genoma wild-type amplificato con K+G e K+H

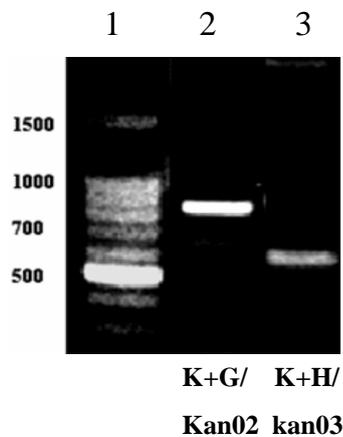


Fig 3.5. Conferma tramite PCR della corretta inserzione della cassetta di resistenza alla Kanamicina nel genoma di *Synechocystis* sp. PCC 6803. Viene mostrato il risultato della corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% inTAE. Sono stati caricati 5μl per ogni prodotto amplificato

1. marker dei pesi molecolari
2. Genoma di Δ SynK amplificato con K+G e Kan_02
3. Genoma di Δ SynK amplificato con K+H e Kan_03

3.3 Analisi del fenotipo

Nonostante l'impossibilità di ottenere un ceppo mutato omoplasmico, si è comunque proceduto con l'analisi del fenotipo dei batteri ricombinanti.

I dati funzionali ottenuti derivano dall'esame del tasso di crescita, dall'analisi del contenuto in pigmenti, dalle indagini effettuate con la microscopia elettronica, dalle misure di formazione del gradiente protonico transtilacoidale, dalle analisi dell'espressione proteica in diverse condizioni di irradiazione e in presenza o meno di inibitori del trasferimento elettronico. Queste analisi mostrano che il ceppo mutante presenta un fenotipo anomalo, in particolare per quanto riguarda la regolazione del processo fotosintetico.

3.3.1 Curve di crescita

Al fine di valutare il ruolo fisiologico della proteina SynK, sono state determinate le curve di crescita del ceppo *wild-type* e del ceppo mutante in differenti condizioni di crescita. (figura 3.6)

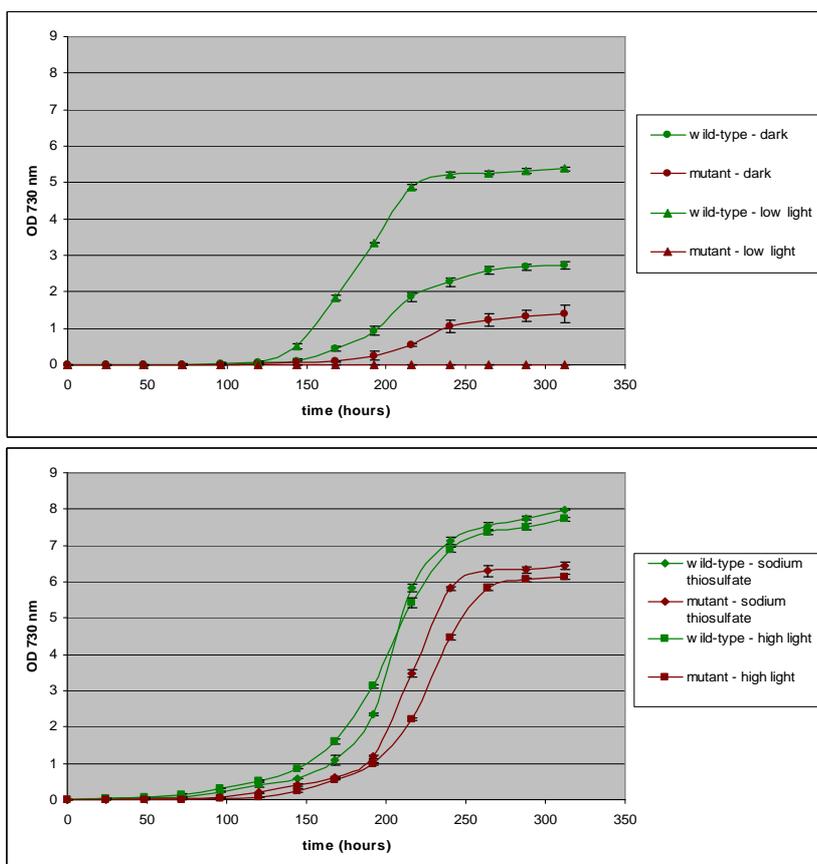


Fig 3.6. Curve di crescita nelle diverse condizioni. Per ogni punto delle curve di crescita sono riportati i valori media \pm deviazione standard (n=3).

I ceppi sono stati fatti crescere secondo i metodi descritti nella sezione 2.1.2.4 del capitolo “Materiali e metodi” ed è stata misurata la loro densità ottica a 730 nm allo spettrofotometro per determinare la concentrazione di batteri nella coltura. Sono state determinate anche le curve di crescita che riportano i valori di concentrazione di clorofilla in funzione del tempo. I dati ottenuti (non mostrati) sono in accordo con le curve mostrate in figura 3.6 in cui viene messa in relazione, con il tempo, la densità ottica.

Synechocystis è in grado di crescere in condizioni di fotoeterotrofia. I risultati ottenuti dall’analisi delle curve di crescita mostrano che, al contrario del ceppo *wild-type*, in coltura liquida il ceppo $\Delta synK$ non è in grado di crescere nelle condizioni fotoeterotrofe standard, ovvero, irradiato con luce bianca (5-15 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ed in presenza di glucosio 10 mM. Se il ceppo viene mantenuto in coltura su piastra la crescita non subisce alterazioni molto evidenti rispetto a quella del *wild-type*. Nella figura 3.7A è riportata l’immagine delle colture liquida dei due ceppi. Questo dato suggerisce che, nelle condizioni di coltura liquida standard, l’espressione del canale risulta vitale.

Si sono indagate, quindi, le condizioni in cui il mutante fosse in grado di ripristinare in qualche modo la crescita. In primo luogo, sapendo che *Synechocystis* era in grado di crescere, seppur lentamente, in assenza totale di attività fotosintetica, i ceppi sono stati fatti crescere in condizioni esclusivamente eterotrofe. Le prove sono state condotte con diverse concentrazioni di glucosio ed è stato messo in evidenza che, in presenza di glucosio 10 mM, la crescita del ceppo $\Delta synK$ viene ripristinata. Inoltre l’aggiunta di 15 mM glucosio porta livelli di crescita molto vicini a quelli determinati per il ceppo *wild-type*. Questo dato porta a supporre che il canale non sia direttamente coinvolto con il processo respiratorio, unico processo che sostiene il metabolismo di questi batteri in condizioni di eterotrofia.

Questa però non è l’unica condizione, in cui la crescita viene ripristinata. Dal punto di vista dell’indagine sul ruolo fisiologico, risultano molto più interessanti le altre due condizioni individuate.

Alcuni protocolli di crescita standard di *Synechocystis* prevedono l’utilizzo del sodio tiosolfato nel mezzo di coltura solido ma non in quello liquido. Avendo stabilito che nel mezzo di coltura solido la crescita veniva mantenuta in tutte le condizioni, mentre questo non accadeva se i batteri erano mantenuti nel mezzo di coltura liquido (tramite il quale vengono determinati i valori delle curve di crescita) si è pensato di aggiungere il sodio tiosolfato anche nel mezzo liquido. Il risultato è un incremento della crescita del ceppo *wild-type* e la ripresa totale della crescita per il ceppo mutante (figura 3.7B).



Figura 3.7A Immagine del ceppo *wild type* (1) e del mutante (2) al termine della fase esponenziale di crescita. I batteri sono stati cresciuti in condizioni fotoeterotrofiche *standard*



Figura 3.7B Immagine del ceppo *wild type* (1) e del mutante (2) al termine della fase esponenziale di crescita. I batteri sono stati cresciuti in condizioni eterotrofiche con l'aggiunta di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Questi dati possono essere interpretati alla luce del lavoro di Utkilen (Utkilen, 1976), secondo il quale il sodio tiosolfato nei cianobatteri fungerebbe da donatore di elettroni durante il processo fotosintetico, incrementando la crescita anche in condizioni in cui l'attività fotosintetica è ridotta. I dati sulla crescita dei batteri ΔsynK ottenuti in queste condizioni sono un buon indizio per ipotizzare un ruolo fisiologico del canale SynK. Secondo la nostra ipotesi, infatti, il mutante, in mancanza di un canale in grado di equilibrare i gradienti ionici nei tilacoidi, non è in grado di trasferire gli elettroni attraverso i complessi fotosintetici con il normale processo di fotosintesi. La presenza del

sodio tiosolfato, quindi, è in grado di incrementare il trasferimento di elettroni in questi batteri.

A sostegno di tale ipotesi contribuisce la risposta del ceppo mutante alle condizioni di crescita che prevedono l'irradiazione dei batteri con intensità di luce superiori a $15 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. In queste condizioni, infatti, i batteri del ceppo *ΔsynK* crescono a livelli comparabili con quelli del ceppo *wild-type* e con quelli ottenuti in presenza di sodio tiosolfato. (figura 3.6)

Il risultato ottenuto conferma l'ipotesi che la mancanza del canale compromette in qualche modo l'attività fotosintetica. Nel ceppo mutante l'efficienza del processo fotosintetico viene incrementata dall'aumentata presenza della fonte elettronica disponibile (sodio tiosolfato o luce) al punto di riuscire a sopprimere la parziale delezione della proteina SynK e quindi della sua ridotta attività.

A questo punto risulta interessante determinare la localizzazione della proteina canale in *Synechocystis* e verificare come i livelli di espressione proteica varino in risposta alle condizioni di crescita precedentemente descritte.

3.3.2 Microscopia elettronica

Gli anticorpi prodotti sono stati utilizzati per indagare la localizzazione della proteina nelle membrane di *Synechocystis* mediante la tecnica di localizzazione in microscopia elettronica, tramite la marcatura immunogold, abbiamo evidenziato la presenza della proteina di interesse a livello delle membrane tilacoidali dei cianobatteri. (figura 3.8) È possibile notare che una parte della proteina canale è stata visualizzata anche a livello della membrana plasmatica. Questo dato non è sorprendente in quanto è stato dimostrato che nei cianobatteri la separazione tra le diverse membrane non è assoluta. Vi sono evidenze (Westphal, 2001, Keren, 2005) che la membrana plasmatica e quella tilacoidale siano in comunicazione tra loro e che alcune proteine (per esempio alcune proteine del centro di reazione del PSII) vengano traslocate nei tilacoidi dopo essere state sintetizzate e incorporate nella membrana plasmatica. figura 3.9.

Le tecniche di microscopia elettronica, inoltre, ci hanno permesso di mostrare che le anomalie descritte nei paragrafi precedenti non sono imputabili ad alterazioni macroscopiche nelle strutture delle membrane tilacoidali.

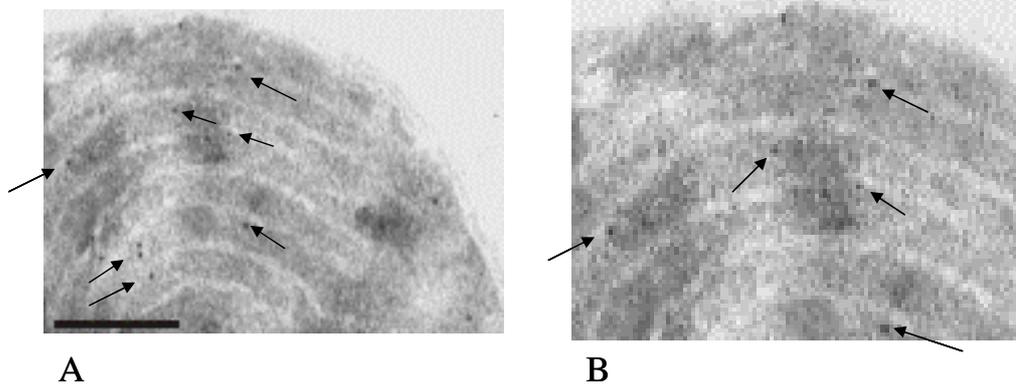


Figura 3.8 Immunolocalizzazione di SynK nelle membrane di *Synechocystis* utilizzando l'anticorpo anti-SynK.

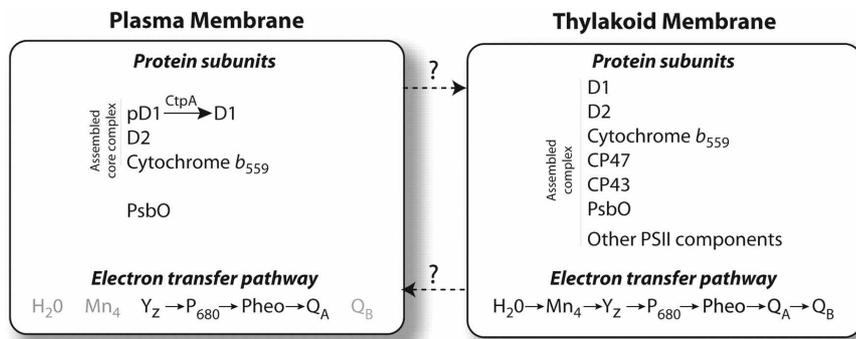


Figura 3.9 Rappresentazione schematica della localizzazione di alcune proteine dei complessi fotosintetici nelle membrane di *Synechocystis*. (Keren,)

3.3.3 Analisi dei pigmenti

Allo scopo di dimostrare che le differenze riscontrate nei tassi di crescita dei mutanti non fossero da imputare a differenze nella quantità di pigmenti deputati alla cattura della luce nei cianobatteri, è stato analizzato il contenuto totale di questi pigmenti. Per fare ciò, una uguale quantità di batteri (uguale densità ottica a 730 nm) è stata lisata in metanolo e i pigmenti liberati sono stati analizzati allo spettrofotometro (spettro totale tra 300 nm e 800 nm). Come è possibile vedere in figura 3.10 non vi sono differenze significative tra gli spettri ottenuti (linea blu ceppo selvatico, linea rossa ceppo mutante).

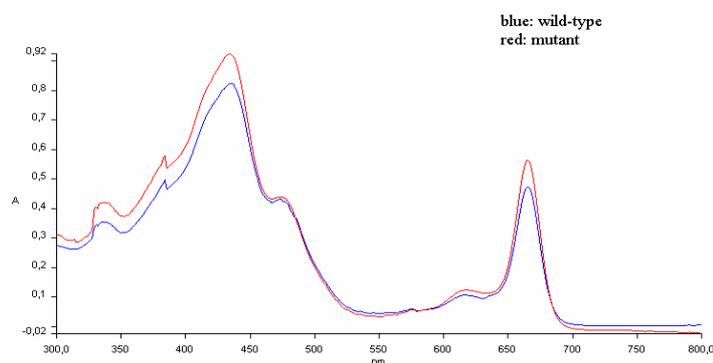


Figura 3.10 Analisi allo spettrofotometro dello spettro di emissione di lisatitotali di *Synechocystis*. Linea blu: wild-type, linea rossa: mutante

3.3.4 Analisi tramite WB dell'espressione del canale

Allo scopo di correlare i livelli di espressione della proteina SynK all'efficienza dell'attività fotosintetica in *Synechocystis*, sono stati condotti degli esperimenti su lisati totali di cianobatteri cresciuti nelle diverse condizioni, utilizzando le tecniche SDS-PAGE e Western-blot.

Prima di procedere con la descrizione dei risultati ottenuti si rende necessario specificare le condizioni di preparazione dei gel di acrilammide utilizzati per questi esperimenti. Dati di letteratura (Krishan 2005) indicano che è molto difficile riuscire a trovare le condizioni ideali di solubilizzazione dei campioni per elettroforesi in quanto i canali possono presentarsi in 4 diverse forme, quella monomerica, dimerica, trimerica e tetramerica. A questo scopo sono state provate differenti condizioni al fine di stabilire quale fosse quella più adatta allo scopo di ogni singolo esperimento. Le membrane di PVDF dei Western-blot sono state decorate con i due diversi anticorpi: anti-KPORE (per una descrizione dettagliata vedi Materiali e Metodi sez. 2.1.3) e anti-SynK. L'anticorpo anti-KPORE viene utilizzato con diluizione 1:10000 in 1% latte e in tutta la trattazione non viene ulteriormente specificato.

Entrambi gli anticorpi sono in grado di riconoscere in modo specifico la forma monomerica (peso molecolare predetto di circa 26 kDa) della proteina SynK in lisati totali di cianobatteri. I due anticorpi sono anche in grado di riconoscere alcune delle forme multimeriche del canale (per esempio entrambi gli anticorpi riconoscono in maniera altamente specifica il dimerico di 52 kDa e anti-SynK inoltre riconosce il trimero di 78 kDa e il tetramero di 114 kDa).

È interessante notare che l'anticorpo anti-KPORE ha messo in evidenza alcune altre proteine che potrebbero essere altri canali del potassio presenti nei cianobatteri.

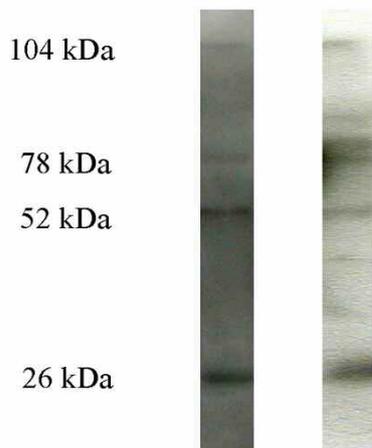


Figura 3.11 Immunoblot del lisato totale di *Synechocystis*. E' stato caricato il lisato totale di *Synechocystis* ottenuto da $5,6 \times 10^8$ cellule (corrispondente a OD 0,2) Il gel è al 10% di acrilammide e 0.1% SDS. I pesi indicati a lato indicano la taglia delle bande

Una volta determinate le condizioni per la migliore solubilizzazione e risoluzione attraverso le tecniche di SDS-PAGE e Western-blot, si è provveduto ad analizzare i livelli di espressione della proteina di interesse nelle diverse condizioni di crescita. Sono stati analizzati i lisati totali di cianobatteri *wild-type* e mutante provenienti da colture cresciute per 72 ore al buio, in presenza di 10 mM glucosio e poste nelle seguenti condizioni per le successive 48 ore: al buio con aggiunta di 5 mM glucosio, in presenza di sodio tiosolfato 12 mM, irradiate da intensità di luce di circa $50 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$. (figura 3.12)

In condizioni eterotrofe, quindi al buio, il ceppo *wild-type* esprime livelli di proteina SynK inferiori rispetto a quelli espressi in condizione di luce. Il ceppo ΔsynK mostra un andamento simile in quanto, al buio, i suoi livelli di espressione sono nulli o quantomeno non rilevabili tramite Western-blot, mentre in condizioni di fotoeterotrofia l'espressione della proteina risulta incrementata. L'incremento dell'espressione proteica, nel ceppo selvatico, avviene dopo 30 minuti di irradiazione ed è totale dopo 12 ore. Nel ceppo mutante l'espressione della proteina viene incrementata dopo 12 ore dall'irradiazione e risulta totale solamente dopo 24 ore.

Questo dato fornisce due importanti informazioni; per prima cosa conferma i dati ottenuti con la tecnica della PCR sul genotipo di questo ceppo: delezione del gene *synK* e mancanza di omoplasma (sono mantenute delle copie di

genoma con genotipo *wild-type*). In secondo luogo è interessante notare come l'andamento dell'espressione proteica sia dipendente dall'intensità della luce irradiante. L'aumento del livello di espressione della proteina SynK all'aumentare dell'intensità della luce sostiene l'ipotesi formulata in precedenza che prevede un coinvolgimento del canale nell'efficienza del processo fotosintetico.

Negli organismi fotosintetici è noto che l'espressione di alcune proteine, che svolgono ruoli chiave nel metabolismo dell'organismo, è regolata dalla luce. Alcuni esempi sono il gene *psbA*, codificante la proteina D1, e i geni *cab*, codificanti le diverse subunità componenti l'antenna, la cui trascrizione viene regolata dalla luce e percepita attraverso variazioni dello stato redox del pool di plastochinoni. (Escoubas, 1995, Pfannschmidt, 1999)

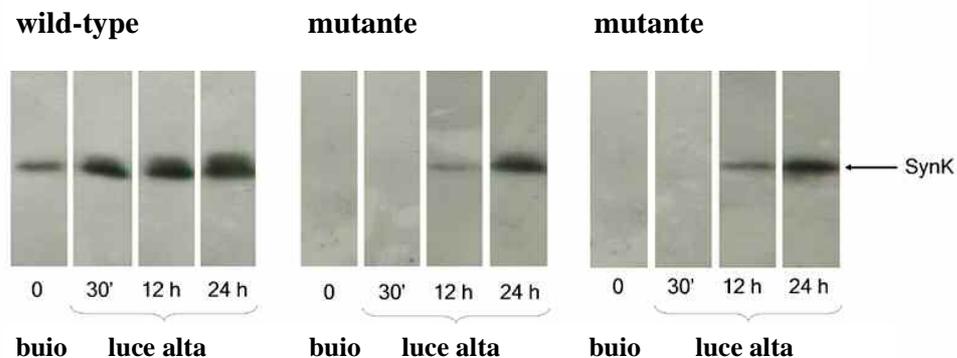


Fig 3.12. SynK viene differenzialmente espresso in diverse condizioni di luce.

Il gel è al 10 % di acrilammide e 6 M urea. Come anticorpo primario dell'immunoblot è stato utilizzato α -SynK (diluizione 1:2500). I batteri vengono cresciuti per 72 ore al buio e di seguito vengono trattati come specificato nella figura

Allo scopo di determinare se l'espressione della proteina SynK venisse regolata dallo stato redox del pool di plastochinoni, sono stati condotti alcuni esperimenti che prevedono l'utilizzo di specifici inibitori del trasporto elettronico lungo la catena fotosintetica. In particolare sono stati utilizzati: 20 μ M DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), che legandosi al sito Q_B , è noto essere in grado di inibire la riduzione del pool di plastochinoni da parte del PSII, 0.3 mM methyl viologeno (MV), un accettore degli elettroni del PSI che inibisce la catena di trasporto di elettroni sia ciclica che lineare e 5 μ M DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone), che è noto essere un inibitore del trasporto elettronico tra PSI e PSII e che impedisce quindi l'ossidazione del pool di plastochinoni. DCMU e MV sono stati utilizzati insieme allo scopo di impedire totalmente la riduzione del pool di plastochinoni.

I cianobatteri *wild-type* sono stati cresciuti per 72 ore nelle condizioni fotoeterotrofe standard e sono stati poi incubati con gli inibitori dello stato redox per 3 ore. I campioni sono stati prelevati dopo 1 ora e dopo 3 ore, lisati con tampone di solubilizzazione (SB 2X) e analizzati mediante immunoblot dopo gel elettroforesi. I dati ottenuti sono mostrati in figura 3.11. È possibile notare come l'espressione della proteina dopo 3 ore sia leggermente incrementata in condizioni in cui il pool di plastochinoni si trova nello stato ridotto e sia invece diminuita quando questo si trova nello stato ossidato. (figura 3.13) Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti in precedenza, in quanto un aumento dell'intensità luminosa di irradiazione causa la riduzione del pool di plastochinoni e di conseguenza un aumento dell'espressione proteica.

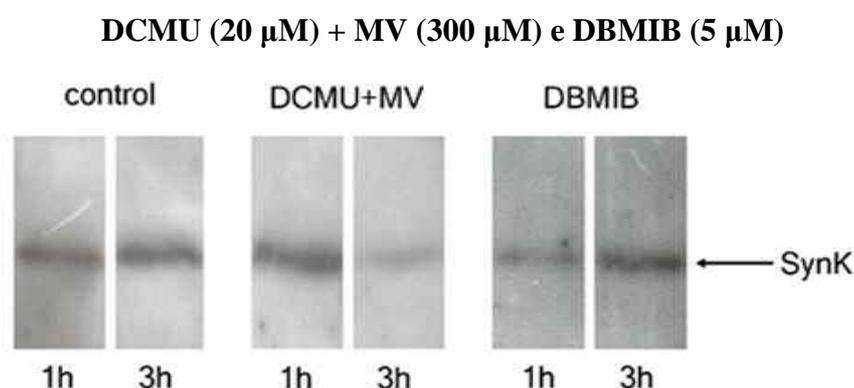


Figura 3.13 SynK viene differenzialmente espresso nelle diverse condizioni riduzione del pool di plastochinoni. Il gel è al 10 % di acrilammide e 6 M urea. Come anticorpo primario dell'immunoblot è stato utilizzato α -SynK (diluizione 1:2500).

I batteri vengono cresciuti per 72 ore al buio e di seguito vengono trattati come specificato nella figura.

3.3.5 Misure di Δ pH con il fluorimetro PAM

Durante il processo fotosintetico il trasporto elettronico lungo i componenti della catena fotosintetica è accompagnato da un flusso di protoni che dal lato stromale delle membrane tilacoidali si muove verso il lato lumenale. Questo flusso di protoni dovrebbe causare, sia un aumento di cariche positive nel lumen dei tilacoidi che l'acidificazione dello stesso. In realtà è stato dimostrato che si ha un'evidente variazione del pH lumenale ma non viene riscontrata una formazione sostanziale di un potenziale elettrico attraverso le membrane tilacoidali. Alcuni lavori recenti (Hihara, 2003) hanno evidenziato che, almeno in certi casi, si ha la presenza di un potenziale elettrico basale ed è stata ipotizzata la formazione, durante la fase iniziale del processo fotosintetico, di

un potenziale elettrico attraverso le membrane di circa +70 mV (positivo verso il lato lumenale). Questo potenziale decade rapidamente durante le fasi successive del processo a circa 15-30 mV, valore al quale rimane stabile. Questo decadimento rapido potrebbe essere dovuto ad un fenomeno di controbilancio delle cariche causato o dall'uscita di cationi dal lumen o dall'ingresso di anioni dallo stroma.

Allo scopo di determinare se e in quale modo il canale SynK fosse coinvolto in questi meccanismi di controbilancio delle cariche nei tilacoidi, sono stati condotti una serie di esperimenti atti a misurare la variazione della concentrazione protonica nei cianobatteri durante la fotosintesi. Sono attualmente noti dei sistemi di misura della variazione del pH lumenale e stromale che sfruttano l'utilizzo di coloranti fluorescenti (Teuber, 2001). Le variazioni nella fluorescenza emessa da questi coloranti vengono monitorate con i fluorimetri. In questo lavoro abbiamo utilizzato il colorante fluorescente Acridine Orange il quale viene eccitato alla lunghezza d'onda di 480 nm ed emette fluorescenza alla lunghezza d'onda di 575 nm (luce verde). Attraverso uno speciale filtro (GFP) presente nel fluorimetro PAM, è possibile misurare la fluorescenza emessa da questo colorante che si trova nelle cellule, dopo incubazione al buio, dello stesso con una sospensione di cianobatteri. Dopo illuminazione, durante il processo fotochimico quindi, si ha la formazione di un gradiente protonico attraverso i tilacoidi con conseguente acidificazione lumenale. Il colorante acridina che si localizza nel lumen dei tilacoidi si trova in presenza, quindi, di una elevata concentrazione di protoni con i quali è in grado di complessarsi dando origine ad un composto (acridina protonata) che emette fluorescenza alla lunghezza d'onda di circa 600 nm (luce arancione). Questa fluorescenza non può essere misurata con il filtro presente nello strumento PAM e viene quindi evidenziata come una perdita della fluorescenza misurabile (fenomeno definito quenching). L'intensità del quenching misurato può essere messa in relazione con l'abbassamento del valore di pH nel lumen dei tilacoidi. Gli esperimenti sono stati condotti in parallelo sul ceppo *wild-type* e sul ceppo mutante entrambi cresciuti per 72 ore nelle seguenti condizioni: a) in presenza di sodio tiosolfato e irradiati con luce $15 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$, b) al buio, in presenza di 15 mM glucosio. I cianobatteri, prima dell'analisi, sono incubati con 5 μM Acridine Orange per 20 minuti in una soluzione di Tricina pH 8 al buio. I risultati ottenuti sono mostrati in figura 3.14. È interessante notare che la variazione nell'emissione della fluorescenza nel ceppo mutante è, in tutti i casi, inferiore a quella riscontrabile nel ceppo selvatico. Di maggiore interesse è il fatto che nei ceppi cresciuti in assenza di fotosintesi (con minore espressione della proteina SynK, vedi paragrafi precedenti) la differenza tra la traccia *wild-type* e mutante è decisamente maggiore rispetto a quella dei ceppi cresciuti in condizioni in cui la proteina canale è espressa a livelli maggiori

(con sodio tiosolfato). Un terzo punto di notevole interesse è evidenziato dalla traccia ottenuta sul ceppo selvatico, in presenza del disaccoppiante FCCP (linea verde figura 3.14 A), il quale è in grado di dissipare il gradiente protonico che si forma attraverso i tilacoidi, nella quale risulta evidente un quenching confrontabile con quello del ceppo mutato.

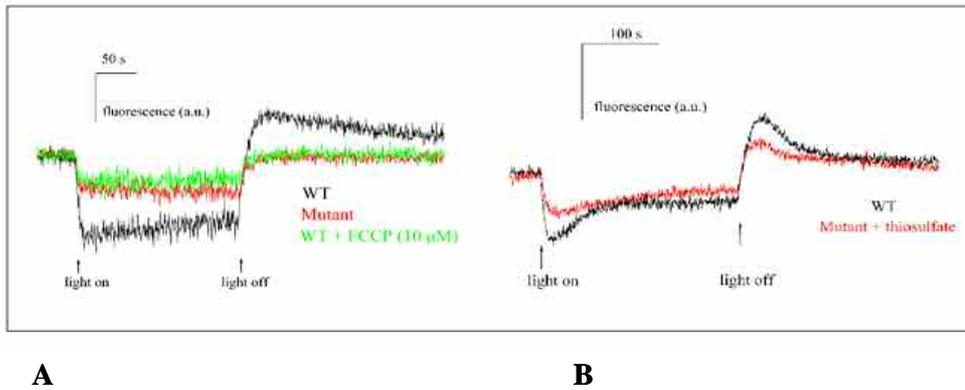


Figura 3.14 Analisi della formazione del gradiente protonico attraverso le membrane tilacoidali di *Synechocystis* seguendo la variazione di fluorescenza dell'Acridine Orange utilizzando il fluorimetro PAM. A) I batteri sono stati cresciuti al buoi per 72 ore. B) I batteri sono stati cresciuti in presenza di sodiotiosolfato per 72 ore.

I dati ottenuti ci hanno portato a supporre che la proteina SynK venga utilizzata dai batteri per controbilanciare l'aumento di carica dovuto all'ingresso dei protoni nel lumen durante la fotosintesi. Il canale dovrebbe quindi fungere da via di efflusso dello ione potassio dal lumen dei tilacoidi con conseguente diminuzione della carica positiva all'interno di essi. I dati di elettrofisiologia ottenuti con la tecnica del patch-clamp (vedi 1.6 del capitolo "Introduzione") sono perfettamente conciliabili con questa ipotesi in quanto mostrano che la proteina SynK è attiva ad un potenziale elettrico di +67 mV, potenziale comparabile con quello che si forma nei tilacoidi durante le prime fasi del processo di fotosintesi.

3.4 Ricerca dell'omologo in piante superiori

Gli anticorpi anti-SynK e anti-KPORE sono stati utilizzati per cercare un eventuale omologo del canale SynK nelle piante superiori. Abbiamo dimostrato, attraverso esperimenti di immunoblot, che gli anticorpi riconoscono in cloroplasti di diverse piante superiori (*Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea*, *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Daucus carota*) una proteina di circa 40 kDa (37 kDa in *Arabidopsis*). Anche nell'alga verde unicellulare *Chlamydomonas reinhardtii* gli anticorpi sono in grado di riconoscere in maniera altamente specifica una proteina di circa 37 kDa. (figura 3.15)

Abbiamo evidenziato inoltre che in cloroplasti di spinacio questa proteina si localizza esclusivamente nelle membrane tilacoidali e non è presente nella membrana interna ed esterna. (figura 3.16)

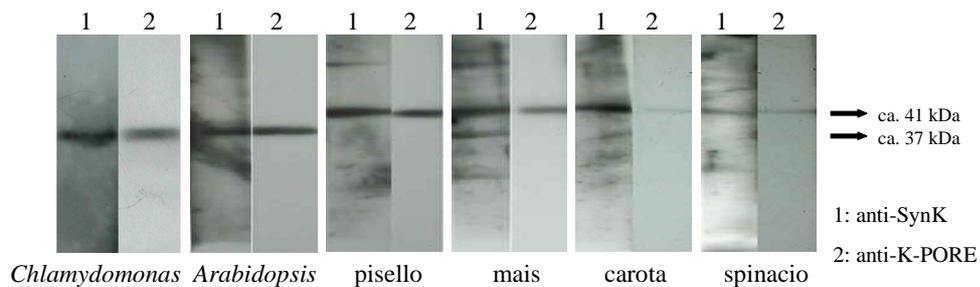


Figura 3.15 Immunoblot ottenuto con gli anticorpi anti-SynK (1) e anti-KPORE (2) sui cloroplasti di diverse specie di piante superiori (indicate in figura)



Figura 3.16 Immunoblot con l'anticorpo anti-KPORE su preparazioni pure di membrana interna (IE), membrana esterna (OE) e tilacoidi (TYL) di spinacio.

3.4.1 Analisi bioinformatica dei presunti omologhi

Attraverso una serie di programmi bioinformatici abbiamo iniziato l'analisi del genoma di *Arabidopsis* alla ricerca di una proteina che potesse essere considerata l'omologo della proteina SynK. I programmi utilizzati sono: "MW/pI" (Expasy) per il calcolo del peso molecolare e del punto isoelettrico,

“TargetP” e “ChloroP” (Expasy) per la predizione sulla localizzazione subcellulare della proteina, PSI-Blast (NCBI) per il grado di omologia con SynK. Nel genoma di *Arabidopsis* sono presenti 20 geni che codificano per canali del potassio (vedi sez. 1.1.6 del capitolo introduttivo). Questi geni sono stati analizzati con i programmi citati precedentemente. I risultati ottenuti non hanno portato all’identificazione certa della proteina di interesse, in ogni caso i candidati migliori sono riportati in tabella 3.1.

Nome canale	Organismo	MW (Da)	pI	Omologia di sequenza con SynK		Localizzazione predetta	
				Score (bits)	E value	targetP	chloroP
AKT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96989.68	6.92	33.5	0.18	0.639	0.444
AKT2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	91308.29	6.09	32.0	0.56	0.210	0.444
KCO2 (two-pore)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	49326.13	8.43	40.4	0.001	0.253	0.448
KCO6 (two-pore)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	48731.63	7.10	41.2	9e-04	0.232	0.441

Tabella 3.1 tabella riassuntiva dei migliori risultati ottenuti dall’analisi del genoma di *Arabidopsis*, mediante i programmi bioinformatici “MW/pI” (Expasy) per il calcolo del peso molecolare e del punto isoelettrico, “TargetP” e “ChloroP” (Expasy) per la predizione sulla localizzazione subcellulare della proteina, PSI-Blast (NCBI) per il grado di omologia con SynK.

3.4.2 Purificazione della proteina mediante immunopurificazione

Non essendo possibile stabilire con i metodi bioinformatici l’identità molecolare della proteina di interesse, abbiamo iniziato un protocollo di immunopurificazione da tilacoidi di *Arabidopsis thaliana* allo scopo di purificare la proteina e stabilire la sua identità molecolare utilizzando la spettrometria di massa.

Questo metodo permette di purificare una proteina d’interesse sfruttando la specificità del legame antigene-anticorpo. Allo scopo di ottenere un buon legame antigene-anticorpo è necessario porsi in una condizione in cui si abbia una buona esposizione dell’epitopo. Sono state quindi effettuate numerose prove di solubilizzazione delle membrane tilacoidali alla ricerca della migliore condizione per effettuare poi il legame. Dato che la proteina in questione è una proteina transmembrana bisogna utilizzare i detergenti, sostanze che sono in grado di solubilizzare il doppio strato lipidico e portare in soluzione le proteine

all'interno di strutture a micella. Allo stesso tempo però, queste condizioni di solubilizzazione non devono essere troppo forti in quanto è necessario non denaturare in maniera eccessiva le proteine, condizione che causerebbe la riduzione dell'efficienza della fase di legame. I campioni ottenuti da queste prove di solubilizzazione sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, in condizioni poco denaturanti (gel al 10% di acrilammide e 0,1% di SDS), e Western blot su membrana di PVDF (figura 3.17). In queste condizioni è stato possibile risolvere le proteine senza denurarle completamente e quindi capire se in queste condizioni gli epitopi sono esposti opportunamente così da poter essere riconosciuti dall'anticorpo. I tilacoidi sono stati, quindi, preparati secondo il metodo descritto nella sez. 2.2.2.9, sono stati portati alla concentrazione di 0,5 mg/ml di clorofilla (vedi 2.2.2.3) e solubilizzati con due diversi detergenti, LysoPC e Dodecyl- β -D-Maltoside (β -DM) (1 o 2% w/v). La condizione di solubilizzazione più opportuna per i nostri scopi è risultata essere quella con 1% β -DM. (figura 3.17)

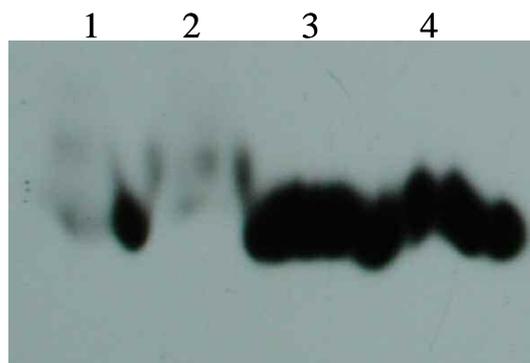


Figura 3.17 Prove di solubilizzazione con differenti detergenti dei tilacoidi di *Arabidopsis*. Sono stati caricati 100 μ g di proteina per campione.

L'anticorpo primario: α -SynK

- 1) Tilacoidi solubilizzati con LysoPC (L- α -LysoPhosphatidylCholine) 1% w/v;
- 2) Tilacoidi solubilizzati con LysoPC (L- α -LysoPhosphatidylCholine) 2% w/v;
- 3) Tilacoidi solubilizzati con β -DM (Dodecyl- β -D-Maltoside) 1% w/v;
- 4) Tilacoidi solubilizzati con β -DM (Dodecyl- β -D-Maltoside) 2% w/v.

Il primo passaggio del protocollo di immunopurificazione prevede il legame covalente dell'anticorpo alla proteina A. Si tratta di una proteina di 42 kDa che si lega alla porzione costante della catena pesante delle immunoglobuline. La proteina A viene, a sua volta, coniugata a delle palline di *Sepharose* (*beads*) che facilitano il recupero dell'antigene legatosi alle immunoglobuline. I *beads* prima della fase di eluizione vengono lavati con una soluzione 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 250mM NaCl per staccare eventuali proteine legatesi in maniera aspecifica. L'eluizione viene effettuata aggiungendo una soluzione 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2M NaCl.

I risultati ottenuti mostrano che la proteina si lega agli anticorpi coniugati *beads*. (figura 3.18) Il segnale osservato è costituito da due bande che differiscono di circa 2-3 kDa l'una dall'altra. È stato supposto che la differenza tra le due proteine sia da imputare ad una modificazione post-traduzionale del canale.

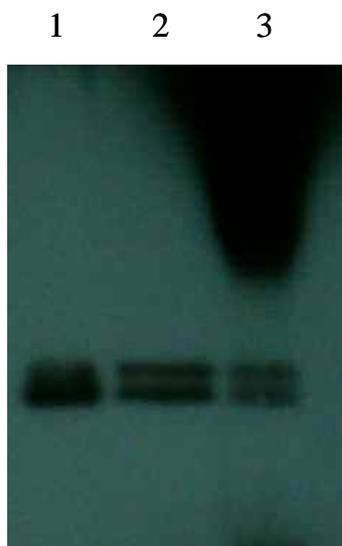


Figura 3.18 Immunopurificazione mediante beads da tilacoidi di *Arabidopsis*, utilizzando come anticorpo α -SynK.

L'anticorpo primario utilizzato nel Western blot è α -K-PORE.

1) Pellet ottenuto dalla centrifugazione post-solubilizzazione dei tilacoidi di *Arabidopsis*; 2) Surnatante raccolto al termine della fase di *binding*; 3) Surnatante della solubilizzazione in SB dei *beads* dopo la fase di *binding*.

Non è stato possibile proseguire nelle fasi di purificazione della proteina in quanto non sono state trovate delle condizioni che permettessero il distacco della proteina dagli anticorpi e il recupero della stessa. Le condizioni di eluizione provate non permettevano di recuperare la proteina di interesse priva di contaminazione da parte delle immunoglobuline. La presenza delle immunoglobuline rende, però, molto difficoltosa l'analisi dei risultati ottenuti con la spettrometria di massa.

3.4.3 Purificazione da gel e determinazione dell'identità molecolare tramite spettrometria di massa.

Un'ulteriore prova per purificare la proteina di interesse e determinarne quindi la sua identità è stata ottenuta attraverso elettroforesi bidimensionale seguita da spettrometria di massa. Le proteine tilacoidali (60 μ g di clorofilla) sono state separate in prima dimensione su strip, con un gradiente di pH lineare da 3 a 10, e su SDS-PAGE per la seconda. Sono state effettuate due elettroforesi

bidimensionali in parallelo: uno dei due gel è stato poi sottoposto a Western-blot e successivo saggio con l'anticorpo anti-SynK (figura 3.19 (1)), mentre l'altro è stato colorato con nitrato di argento (utilizzando un protocollo che permettesse una colorazione compatibile con la spettrometria di massa). Nell'elettroforesi bidimensionale, l'anticorpo anti-SynK (come pure l'anticorpo anti-KPORE) riconosce degli spot dal peso corrispondente a quello calcolato nei gel mono-dimensionali. Le proteine riconosciute hanno un punto isoelettrico calcolato di circa 8.5. (figura 3.19 (2))

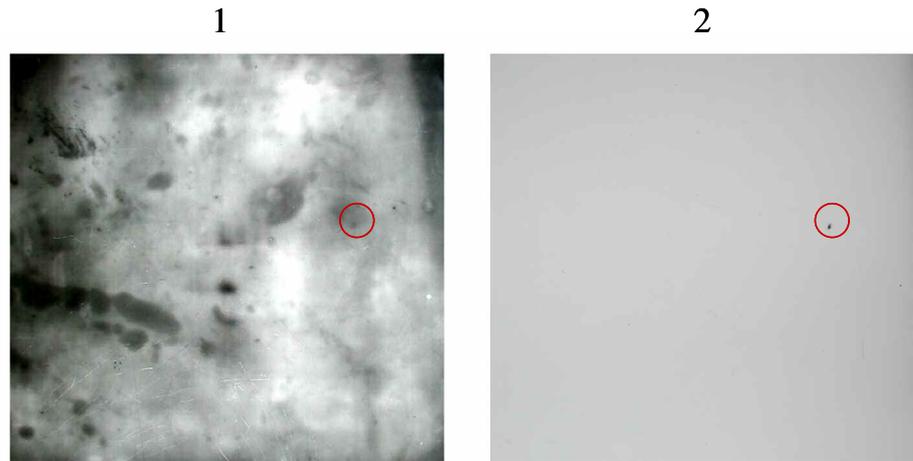


Figura 3.19 Analisi bidimensionale delle membrane tilacoidali di *Arabidopsis* .

Prima dimensione: isoelettrofocalizzazione pH 3-10; seconda dimensione: SDS-PAGE 12% acrilammide 6 M urea.

1) sviluppo con anti-SynK 2) sviluppo anti-KPORE

Dal gel fatto correre in parallelo e colorato con nitrato di argento (non mostrato) sono stati tagliati gli spot corrispondenti a quelli riconosciuti dall'anticorpo: questi spot sono stati sottoposti a digestione triptica per estrarre peptidi e successivamente analizzati tramite spettrometria di massa. Non è stato possibile determinare l'identità molecolare delle proteine analizzate in quanto la quantità di peptidi ottenuta è risultata insufficiente per condurre l'indagine. I prossimi tentativi di purificazione, quindi, verranno condotti utilizzando maggiori quantità di proteine tilacoidali totali. Inoltre verranno utilizzate, per la prima dimensione, strip con intervalli di pH da 6 a 10 per migliorare la separazione delle proteine.

3.5 Espressione della proteina SynK intera in *E.coli*.

Abbiamo inoltre iniziato un protocollo per la produzione, in *Escherichia coli*, della proteina ricombinante SynK-His_tag. Il plasmide utilizzato per l'espressione è stato ottenuto dalla digestione del plasmide pEt28b(+) con gli enzimi NdeI e NotI e successivo inserimento del frammento (702 bp) corrispondente al gene *synK* ottenuto per digestione con gli stessi enzimi del plasmide pSynK-EGFP_14 mutagenizzato per PCR come descritto nel paragrafo 2.2.1.12. In questo modo è possibile ottenere l'espressione della proteina SynK intera in fusione con una coda di 6 istidine al carbossi-terminale. La coda di istidine verrà in seguito sfruttata per la purificazione della proteina ricombinante con una colonna di affinità agli ioni nichel. L'espressione della proteina è stata ottenuta nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo 3.1

L'espressione, seppure in piccola quantità, della proteina ricombinante è risultata però tossica per i batteri, quindi tutte le fasi di clonaggio e trasformazione sono state effettuate aggiungendo un inibitore dei canali del potassio (BaCl_2 10 mM) nel mezzo di crescita (LB) di *E. coli*. (Ruta, 2003) In questo modo è stato possibile ottenere un ceppo batterico in grado di produrre la proteina ricombinante, la quale si visualizza in SDS-PAGE in tutte e 4 le forme (monomeriche e multimeriche). (figura 3.20) La proteina purificata potrà essere utilizzata per successive analisi strutturali e funzionali della proteina canale di interesse.

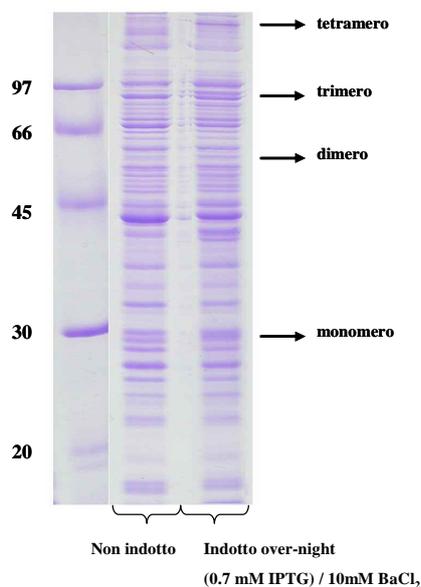


Figura 3.20 Analisi SDS-PAGE di lisati totali di *E. coli* trasformati con pSynK-His_tag.

Le cellule sono state indotte con 0.7 mM IPTG in presenza di 10 mM BaCl_2 . Le frecce indicano le proteine che mostrano un aumento di espressione dopo l'induzione

È stato inoltre messo in evidenza che la proteina così prodotta, nella sua forma monomerica, si localizza a livello dei corpi di inclusione di *E. coli*. Una piccola quantità di proteina, però, si presenta in forma tetrameric e non si trova nei corpi di inclusione ma nella restante frazione di lisato che si ottiene dopo la fase iniziale di rottura dei batteri. (figura 3.21) La nostra ipotesi è che il canale in forma tetrameric si localizzi sulla membrana plasmatica di *E. coli*.

La presenza, quindi, della proteina ricombinate, in forma tetrameric e presumibilmente funzionante, nella membrana plasmatica di *E. coli* trasformato ci permetterà di produrre sferoplasti di *E. coli* che potranno essere utilizzati per esperimenti di patch-clamp. In particolare siamo interessati a produrre una serie di ceppi batterici di *E. coli* che esprimono la proteina con diverse mutazioni puntiformi nelle regioni considerate coinvolte nella dipendenza dal voltaggio dell'attivazione di questi canali. Questi ceppi verranno utilizzati per produrre sferoplasti che verranno successivamente analizzati con la tecnica del patch-clamp.

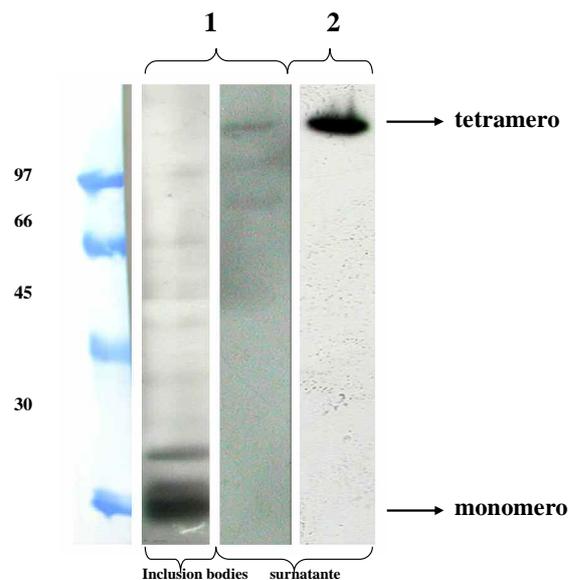


Figura 3.21 Immunoblot di lisati totali di *E. coli* trasformati con pSynK-His_tag. Le cellule sono state indotte con 0.7 mM IPTG in presenza di 10 mM BaCl₂. Per la preparazione dei campioni della frazione contenente i corpi di inclusione e la frazione corrispondente al surnatante si rimanda al testo 1) anti-SynK (diluizione 1:5000); 2) anti-His_tag (diluizione 1:2000)

4. CONCLUSIONI

I cianobatteri sono procarioti in grado di effettuare la fotosintesi in quanto sono dotati, oltre alla membrana plasmatica, di membrane tilacoidali nelle quali sono presenti i complessi necessari per effettuare la fotosintesi. Il loro apparato fotosintetico è molto simile a quello presente nelle piante superiori e di fatto sono considerati i progenitori dei cloroplasti.

Il ceppo *Synechocystis* sp. PCC 6803 è stato isolato dalle acque di un lago e depositato presso il *Pasteur Culture Collection* nel 1968. Questo ceppo risulta di rilevante interesse applicativo in quanto è in grado di acclimatarsi a diverse condizioni di crescita, il suo genoma è completamente sequenziato e ha la capacità di integrare spontaneamente DNA esogeno.

Il ceppo *Synechocystis* sp. PCC 6803, inoltre, è di particolare interesse in quanto è in grado di crescere in assenza di fotosintesi se nel mezzo di coltura è fornita una opportuna fonte di carbonio fissabile, come ad esempio il glucosio. *Synechocystis* sp. PCC 6803 infatti è dotato di tutti i complessi necessari per effettuare il processo respiratorio, che sono distribuiti in parte sulle membrane tilacoidali ed in parte sulla membrana plasmatica.

I canali ionici selettivi per il potassio sono proteine di membrana in grado di condurre ioni K^+ da un lato all'altro delle membrane biologiche secondo il gradiente elettrochimico del potassio. Sono stati identificati numerosi canali del potassio sia in procarioti che in piante e animali superiori. Le conoscenze attuali rivelano che questi canali derivano da una singola famiglia di proteine e che sono caratterizzati dalla presenza di una specifica sequenza aminoacidica (il motivo TL(oM)TTL(oV)GYGD definita filtro di selettività) nella regione del poro, che permette il passaggio selettivo degli ioni K^+ .

Attraverso programmi bioinformatici di allineamento di sequenza tra la sequenza del filtro di selettività e il genoma di *Synechocystis* sp. PCC 6803, è stata individuata una sequenza proteica (SynK) che potrebbe corrispondere ad un canale selettivo per il potassio.

La struttura secondaria di questa proteina, predetta utilizzando il programma bioinformatico Hierarchical Neural Network, mostra la presenza di 6 segmenti transmembrana (S1-S6) e di una regione del poro, tra l'elica S5 e S6, che contiene il motivo TLTTLGYGD, entrambe caratteristiche dei canali del potassio della famiglia *Shaker*.

I canali *Shaker*-like sono canali selettivi per il potassio e la maggior parte di loro si aprono in risposta a variazioni del potenziale di membrana.

L'elevata omologia di sequenza aminoacidica tra la proteina da noi individuata e la sequenza del canale KvAP (canale del potassio voltaggio-dipendente del batterio *Aeropyrum pernix*) suggerisce un'ipotetica struttura tridimensionale del canale di *Synechocystis* sp. PCC 6803.

KvAP è il primo canale del potassio voltaggio-dipendente procariotico di cui è nota la struttura e *in vitro* esso media il flusso di ioni potassio in maniera voltaggio-dipendente. È costituito da 4 monomeri che formano una cavità centrale che include il filtro di selettività. Le cariche positive presenti nell'elica S4 determinano l'apertura e la chiusura del canale in risposta a variazioni nel potenziale di membrana.

Le predizioni bioinformatiche e l'omologia di sequenza suggeriscono un funzionamento simile per la proteina SynK di *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Allo scopo di caratterizzare funzionalmente la proteina SynK, il gene che codifica per questa proteina è stato clonato tramite PCR ed è stata provata l'espressione della proteina ricombinante in *E. coli*. L'espressione, però, è risultata molto tossica per le cellule batteriche e si quindi è deciso di esprimere il canale in cellule di mammifero CHO-K1. In questo sistema il canale è stato espresso come proteina di fusione con la GFP, una proteina fluorescente che ci ha permesso di evidenziare la localizzazione della proteina a livello della membrana plasmatica di queste cellule.

In questo modo è stato possibile effettuare esperimenti elettrofisiologici, con la tecnica del patch-clamp, sulle cellule CHO-K1. I dati elettrofisiologici mostrano che la proteina funziona come canale voltaggio-dipendente selettivo per il potassio e che media il flusso di ioni K^+ dall'interno verso l'esterno della cellula quando vengono applicati potenziali positivi, a concentrazioni extracellulari di potassio inferiori rispetto alle concentrazioni intracellulari.

Non esistono dati che dimostrino il ruolo fisiologico dei canali *Shaker*-like in cellule batteriche. A questo scopo è stato costruito un ceppo mutante di *Synechocystis* sp. PCC 6803 delecto del gene *synk*.

Non è stato possibile ottenere la completa segregazione dei cromosomi ricombinati in quanto la parziale mancanza della proteina SynK inibiva la normale crescita cellulare. Sono state individuate delle condizioni di crescita nelle quali è stato possibile permettere la crescita del ceppo eteroplasmico (ceppo che contiene una mistura di cromosomi wild-type e di cromosomi delecti). In particolare, si è potuto osservare che il ceppo mutante ripristina una normale crescita se nel mezzo è fornito un donatore artificiale di elettroni (sodio tiosolfato) o se le cellule vengono irradiate con luce più alta rispetto a quella utilizzata per il ceppo wild-type. Questi dati ci hanno portato a concludere che la mancanza, pur non completa, del canale possa influire sulla normale attività fotosintetica delle cellule. Per testare questa ipotesi sono state effettuate delle misure con il fluorimetro PAM utilizzando uno specifico colorante fluorescente (Acrydine Orange) in grado di rilevare variazioni di pH lumenale e citoplasmatico in cellule di cianobatteri intatti. I risultati finora ottenuti indicano che l'acidificazione lumenale a seguito dell'illuminazione dei campioni batterici, avviene in maniera ridotta nel ceppo mutante rispetto al ceppo wild-type, portandoci a supporre che nel ceppo mutante si ottiene un gradiente di pH attraverso i tilacodi inferiore rispetto a quello del ceppo selvatico, durante il processo fotosintetico.

Per stabilire la localizzazione della proteina SynK a livello delle membrane, in cellule di *Synechocystis* sp. PCC 6803, abbiamo deciso di produrre un anticorpo che riconoscesse in maniera specifica il canale di nostro interesse. A questo scopo abbiamo espresso, in *E. coli*, un frammento della proteina SynK, che corrisponde alle prime 4 eliche transmembrana del monomero, in fusione con sei istidine. Abbiamo purificato il frammento proteico così ottenuto attraverso una cromatografia di affinità, sfruttando la capacità delle istidine di legare gli ioni nichel. Il frammento così purificato è stato iniettato in due

conigli allo scopo di produrre anticorpi specifici contro la proteina SynK. Gli anticorpi sono stati testati per controllare la capacità di riconoscere in modo specifico la proteina di interesse attraverso saggio immunologico dopo corsa elettroforetica su gel di acrilamide e successivo trasferimento delle proteine su membrane di PVDF (Western blot). I risultati ottenuti indicano il riconoscimento sia della proteina antigene (frammento di SynK-His tag) che della proteina canale (in lisati di cianobatteri), in maniera specifica.

Gli anticorpi prodotti sono stati quindi utilizzati per indagare la localizzazione della proteina nelle membrane di *Synechocystis* utilizzando la tecnica di localizzazione in microscopia elettronica, immunogold, mediante la quale abbiamo evidenziato la presenza della proteina di interesse a livello delle membrane tilacoidali dei cianobatteri.

Gli anticorpi prodotti sono stati anche utilizzati per analizzare i livelli di espressione della proteina di interesse, nei cianobatteri cresciuti nelle differenti condizioni testate (aggiunta di sodio tiosolfato al mezzo di coltura, luce irradiante di intensità elevata, assenza totale di luce) e i risultati hanno messo in evidenza che il canale viene espresso in maniera differenziale. In particolare è evidente un aumento dei livelli di espressione proteica in presenza di donatori di elettroni (sodio tiosolfato e luce) e una riduzione dei livelli di espressione in condizioni di buio.

Sono stati utilizzati, anche, alcuni inibitori del trasferimento elettronico lungo la catena fotosintetica allo scopo di evidenziare in quale modo, lo stato redox dei complessi fotosintetici, possa regolare l'espressione della proteina SynK. In particolare sono stati utilizzati: 1) DCMU, che impedisce la riduzione del pool di plastochinoni da parte del fotosistema II, in associazione con metil-viologeno che inibisce la catena di trasporto lineare e ciclica e 2) DBMIB che blocca il trasferimento elettronico tra PSII e PSI mantenendo il pool di plastochinoni in forma ridotta. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione dell'espressione proteica, nel primo caso, mentre si osserva un leggero aumento dell'espressione della proteina, nel secondo. Questi dati possono essere interpretati come una regolazione dell'espressione proteica dovuta allo stato ossido/riduttivo del pool di plastochinoni e nello specifico è possibile affermare che l'espressione della proteina viene diminuita quando il pool di plastochinoni si trova nello stato ossidato e leggermente aumentata quando si trova nello stato ridotto.

Infine questi anticorpi sono stati utilizzati per cercare un eventuale omologo del canale SynK nelle piante superiori. Abbiamo dimostrato, attraverso esperimenti di immunoblot, che sia questo anticorpo, che un anticorpo specifico per i canali del potassio (diretto contro la sequenza aminoacidica tipica del filtro di selettività dei canali del potassio), riconoscono in cloroplasti di *Chlamydomonas reinhardtii* e diverse piante superiori (per esempio *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea*, *Pisum sativum*, *Daucus carota*) una proteina di circa 40 kDa. Abbiamo evidenziato inoltre che in cloroplasti di spinacio questa proteina si localizza esclusivamente nelle membrane tilacoidali.

Abbiamo quindi iniziato un protocollo di immunopurificazione da tilacoidi di *Arabidopsis thaliana* allo scopo di purificare la proteina individuata e stabilire la sua identità molecolare utilizzando la spettrometria di massa. Si è reso necessario cambiare strategia di identificazione in quanto non siamo riusciti a trovare le condizioni sperimentali che permettessero il recupero della proteina di interesse dopo il legame con l'anticorpo.

La nuova strategia adottata prevedeva la separazione delle proteine tilacoidali utilizzando l'elettroforesi bidimensionale (prima dimensione: isoelettrofocalizzazione, seconda dimensione: SDS-PAGE) e l'analisi tramite la spettrometria di massa, dopo digestione triptica, della proteina individuata mediante immunoblot con gli anticorpi specifici. Allo stato attuale non è ancora stato possibile identificare la natura molecolare della proteina di interesse.

Abbiamo inoltre iniziato un protocollo per la produzione, in *Escherichia coli*, della proteina ricombinante SynK-His_tag. L'espressione, seppure in piccola quantità, della proteina ricombinante risulta però tossica per i batteri, quindi tutte le fasi di clonaggio e trasformazione sono state effettuate aggiungendo un inibitore dei canali del potassio ($BaCl_2$) nel mezzo di crescita di *E. coli*. In questo modo è stato possibile ottenere un ceppo batterico in grado di produrre la proteina ricombinante alla quale è legato un tag di istidine che permetterà la purificazione della stessa attraverso cromatografia di affinità.

La proteina purificata potrà essere utilizzata per successive analisi strutturali e funzionali della proteina canale di interesse.

La presenza inoltre della proteina ricombinante, in forma tetramericata e presumibilmente funzionante, nella membrana plasmatica di *E. coli* trasformato ci permetterà di produrre sferoplasti di *E. coli* che potranno essere utilizzati per esperimenti di patch-clamp. In particolare siamo interessati a produrre una serie di ceppi batterici di *E. coli* che esprimono la proteina con diverse mutazioni puntiformi nelle regioni considerate coinvolte nella dipendenza dal voltaggio dell'attivazione di questi canali. Questi ceppi verranno utilizzati per produrre sferoplasti che verranno successivamente analizzati con la tecnica del patch-clamp.

Ci proponiamo, infine, di definire il ruolo di questa proteina canale nei cianobatteri, di identificare la natura molecolare della proteina individuata nei tilacoidi di piante superiori e di stabilirne il ruolo fisiologico.

BIBLIOGRAFIA

- **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D.** (1994). *Molecular biology of the cell*. Third Edition.
- **Archibald J. M., and Keeling P. J.** (2002). *Recycled plastids: a “green movement” in eukaryotic evolution*. *TRENDS in Genetics*, 18, 577-584
- **Arnon D.J.** (1949). *Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-14.
- **Bakker, E.P.** (1993). *In: Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. CRC Press, Ann Arbor. Bakker, E.P., Ed., 205–224.
- **Bassi, R., Hinz, U., and Barbato, R.** (1985). *The role of the light harvesting complex and photosystem II in thylakoid stacking in the chlorina-f2 barley mutant*. *Carlsberg Res. Commun.*, 50, 347-367.
- **Bauer J., Hiltbrunner A. and Kessler F.** (2001). *Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting*. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 420-433.
- **Berry S, Esper B, Karandashova I, Teuber M, Elanskaya I, Rogner M, Hagemann M.** (2003). *Potassium uptake in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 mainly depends on a Ktr-like system encoded by slr1509 (ntpJ)*. *FEBS Lett.*, 548, 53-8.
- **Blount, P.** (2003). *Molecular mechanisms of mechanosensation: Big lessons from small cells*. *Neuron*, 37, 731–734.
- **Brand J.J. and Becker D.W.** (1984). *Evidence for direct roles of Ca²⁺ in photosynthesis*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 16, 239-249.
- **Bruce B. D.** (2001). *The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1541, 2-21.
- **Chérel** (2004). *Regulation of K⁺ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects*. *J Exp Bot.*, 55, 337-51.
- **Chiaromonte, S., Giacometti, G.M. and Bergantino, E.** (1999). *Construction and characterization of a functional mutant of Synechocystis 6803 harbouring a eukaryotic PSII-H subunit*. *Eur J Biochem.*, 260, 833-843.
- **Clarkson D.T. and Hanson J.B.** (1980) *The mineral nutrition of higher plants*. *Annual Review of plant Physiology*, 31, 239-298.
- **Deamer D.W. and Packer L.** (1969) *Light-dependent anion transport in isolated spinach chloroplasts*. *Biochim Biophys Acta.*, 172(3), 539-45.
- **Deeken R., Geiger D., Fromm J., Koroleva O., Ache P., Langenfeld-Heyser R., Sauer N., May S.T. and Hedrich R.** (2002). *Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis*. *Planta*, 216(2), 334-44.
- **Dennison K.L., Robertson W.R., Lewis B.D., Hirsch R.E., Sussman M.R and Spalding E.P.** (2001) *Functions of AKT1 and AKT2*

potassium channels determined by studies of single and double mutants of Arabidopsis. Plant Physiol., 127(3), 1012-9.

- **Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (1998). *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity.* Science, 280, 69–77.
- **Dunn S.D.** (1986). *Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of protein in gel on the recognition of protein on Western blots by monoclonal antibodies.* Anal. Biochem., 157, 144-153.
- **Epstein, W.** (2003). *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology.* Academic Press Inc., San Diego, 75, 293–320.
- **Escoubas J.M. Lomas M. La Roche J. and Falkowski P.G.** (1995). *Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of plastochinone pool.* Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 92, 10237-10241
- **Gounaris F., Chapman D. J. and Barber J.** (1988). *Reconstitution of plastoquinone in the isolated D1/D2 cytochrome b559 reaction center complex.* FEBS Lett., 143:143-14
- **Gray M.W. and Spencer D.F.** (1996). *Organellar evolution. In Evolution of Microbial Life* Cambridge University Press, 109-126.
- **Grove G.N. and Brudvig G.W.** (1998). *Calcium binding studies on photosystem II using a Ca²⁺-selective electrode.* Biochemistry, 37, 1532-1539.
- **Harold, F.M.** (1996). *In Escherichia coli and Salmonella* ASM Press, Washington, D.C. USA. Neidhardt, F.C., Ed., 1, 283–306.
- **Hihara, Y., Sonoike, K., Kanehisa, M. and Ikeuchi, M.** (2003.) *DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803.* J. of Bacteriology, 185, 1719-1725.
- **Hille, B.** (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes.* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, p. 814
- **Hind G., Nakatani H.Y. and Izawa S.** (1974). *Light-dependent redistribution of ions in suspensions of chloroplast thylakoid membranes.* Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 71(4), 1484-8.
- **Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P. and Sussman, M.R.** (1998). *A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition.* Science, 280, 918–921.
- **Hofmann N.R. and Theg S.M.** (2005). *Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion.* TRENDS in Plant Science, 10, 450-457.
- **Ivashikina N., Becker D., Ache P., Meyerhoff O., Felle H.H., Hedrich R., Dennison K.L., Robertson W.R., Lewis B.D., Hirsch R.E., Sussman M.R. and Spalding E.P.** (2001). *K(+) channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs.* FEBS Lett., 508(3), 463-9.

- **Jarvis P. and Soll J.** (2002). *TOC, TIC, and chloroplast protein import*. *Biochim Biophys Acta.*, 1590,177-89.
- **Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2002). *The open pore conformation of potassium channels*. *Nature*, 417, 523–526.
- **Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. and MacKinnon, R.** (2003). *The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel*. *Nature*, 423, 42–48.
- **Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M. and Tabata S.** (1996). *Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions*. *DNA Res.*, 3, 109-136.
- **Kang, M., Moroni, A., Gazzarrini, S., DiFrancesco, D., Thiel, G., Severino, M. and Van Etten, J.L.** (2004). *Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 101, 5318–5324.
- **Kashket, E.R.** (1982). *Stoichiometry of the H⁺-ATPase of growing and resting aerobic Escherichia coli*. *Biochemistry*, 21, 5534–5538.
- **Keegstra K. and Froehlich J.E.** (1999). *Protein import into chloroplasts*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 471-476.
- **Keeling P.** (2004). *A brief history of plastids and their hosts*. *Protist* 155, 3-7.
- **Keren N., Liberton M. and Pakrasi H. B.** (2005). *Photochemical Competence of Assembled Photosystem II Core Complex in Cyanobacterial Plasma Membrane*. *J. Biol. Chem.*, 280, 6548-6553
- **Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. and Goldstein, S.A.** (1995). *A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem*. *Nature*, 376, 690–695.
- **Kolodny N.H., Bauer D., Bryce K., Klucsevsek K., Lane A., Medeiros L., Mercer W., Moin S., Park D., Petersen J., Wright J., Yuen C., Wolfson A.J. And Allen M.M.** (2006). *Effect of nitrogen source on cyanophycin synthesis in Synechocystis sp. strain PCC 6308*. *J Bacteriol.*, 188, 934-40.
- **Kreimer G., Melkonian M., Holtum J.A.M. and Latzko E.** (1988). *Stromal free Ca²⁺ concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase*. *Plant Physiol.*, 86, 423-428.
- **Krieger A.** (1995). *Effect of the Ca²⁺ channel activator CGP 28392 on reactivation oxygen evolution of Ca²⁺ depleted photosystem II*. *FEBS Lett.*, 367, 173-176.
- **Krishnan M.N., Bingham J.P., Lee S.H., Trombley P. and Moczydlowski E.** (2005). *Functional role and affinity of inorganic*

cations in stabilizing the tetrameric structure of the KcSA K⁺ channel J. Gen. Physiol., 126, 271-283.

- **Kumanovics, A., Levin, G. and Blount, P.** (2002). *Family ties of gated pores: Evolution of the sensor module.* FASEB Journal, 16, 1623–1629.
- **Kuo M.M.C., Haynes W.J., Loukin S.H., Kung C. and Saimi Y.** (2005). *Prokaryotic K⁺ channels: From crystal structures to diversity.* FEMS Microbiology Reviews, 29 961–985
- **Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T. And Doyle, D.A.** (2003) *Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state.* Science, 300, 1922–1926.
- **Kuo, M.M.-C., Saimi, Y. and Kung, C.** (2003). *Gain-of-function mutations indicate that Escherichia coli Kch forms a functional K⁺ conduit in vivo.* EMBO Journal, 22, 4049–4058.
- **Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G. And Schroeder, J.I.** (2001). *Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward-rectifying K⁺ currents and light-induced stomatal opening in Arabidopsis.* Plant Physiology, 127, 473–485.
- **Laemmli U.K.** (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 227, 680-685.
- **Loll B., Gerold G., Slowik D., Voelter W., Jung C., Saenger W. and Irrgang H.D.** (2005). *Thermostability and Ca²⁺ binding properties of wild type and heterologously expressed PsbO protein from cyanobacterial photosystem II.* Biochemistry, 44, 4691-4698.
- **Mac Kinney G.** (1941). *Absorption of light by chlorophyll solutions.* J.Biol. Chem., 140, 315-322
- **Martens J.R., O’Connell K. and Tamkun M.** (2004). *Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of Kv channels to lipid rafts.* Trends. Pharmacol. Sci., 25, 16-20.
- **Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, and Penny D.** (2002) *Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus.* Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 99, 12246–12251.
- **Matsuda N. and Uozumi N.** (2006). *Ktr-mediated potassium transport, a major pathway for potassium uptake, is coupled to a proton gradient across the membrane in Synechocystis sp. PCC 6803.* Biosci Biotechnol Biochem., 70, 273-5.
- **Matsuda N., Kobayashi H., Katoh H., Ogawa T., Futatsugi L., Nakamura T., Bakker E.P. and Uozumi N.** (2004). *Na⁺-dependent K⁺ uptake Ktr system from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 and its role in the early phases of cell adaptation to hyperosmotic shock.* J Biol Chem., 279, 54952-62.

- **Milkman, R.** (1994). *An Escherichia coli homologue of eukaryotic potassium channel proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 3510–3514.
- **Miras S., Salvi D., Ferro M., Grunwald D., Garin J., Joyard J. and Rolland N.** (2002). *Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast*. J. Biol. Chem., 277, 47770-47778.
- **Miroux B. and Walker J.E.** (1996). *Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels*. J Mol Biol., 260(3), 289-98
- **Mouline K., Véry A.A., Gaymard F., Boucherez J., Pilot G., Devic M., Bouchez D., Thibaud J.B. and Sentenac H.** (2002) *Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in Arabidopsis*. Genes Dev., 16(3), 339-50
- **Nakamura R.L., McKendree W.L.Jr, Hirsch R.E., Sedbrook J.C., Gaber R.F. and Sussman M.R.** (1995) *Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells*. Plant Physiol., 109(2), 371-4.
- **Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1987). *Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila*. Science, 237, 749–753.
- **Patel, A.J., Lazdunski, M. and Honore, E.** (2001). *Lipid and mechano-gated 2P domain K⁺ channels*. Current Opinion in Cell Biology 13, 422–427.
- **Pfannschmidt T., Nilsson A., Tullberg A., Link G. and Allen J.F.** (1999). *Direct transcriptional control of the chloroplast genes psbA and psaAB adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants*. IUBMB Life., 48(3), 271-6
- **Pilot G., Lacombe B., Gaymard F., Cherel I., Boucherez J., Thibaud J.B., Sentenac H.** (2001). *Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2* J Biol Chem., 276(5), 3215-21.
- **Rascio, N., Cuccato, F., Dalla Vecchia, F., La Rocca, N. and Larcher, W.** (1999). *Structural and functional features of Ranunculus trichophyllus Chaix., a freshwater submerged macrophyte*. Plant Cell Environ., 22, 205-212.
- **Robinson S.P. and Downton W.J.** (1984). *Potassium, sodium, and chloride content of isolated intact chloroplasts in relation to ionic compartmentation in leaves*. Arch Biochem Biophys., 228(1),197-206.
- **Rossmann, M.G., Moras, D. and Olsen, K.W.** (1974). *Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein*. Nature, 250, 194–199.
- **Ruta V., Jiang Y., Lee A., Che J. and MacKinnon R.** (2003). *Functional analysis of an archeobacterial voltage-dependent K⁺ channel*. Nature, 422, 180185
- **Schachtman D.P.** (2000). *Molecular insights into the structure and function of plant K(+) transport mechanisms*. Biochim Biophys Acta., 1465, 127-39.

- **Scherer, S., H. Almon, and P. Böger.** (1988). *Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria.* Photosynth. Res., 15, 95-114.
- **Schönknecht G., Spormaker P., Steinmeyer R., Brüggeman L., Ache P., Dutta R., Reintanz B., Godde M., Hedrich R. and Palme K.** (2002) *KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel.* FEBS Lett., 511(1-3), 28-32.
- **Schulenburg P., Schwarz M. and Wagner R.** (1992). *Inhibition of chloroplast ATP-ase by the K⁺ channel blocker α -dendrotoxin.* Eur. J. Biochem., 210, 257-267.
- **Schultz, S.G. and Solomon, A.K.** (1961). *Cation transport in Escherichia coli I: Intracellular Na and K concentrations and cation movement.* Journal of General Physiology, 45, 355–369.
- **Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J.M., Gaymard F., Grignon C., Schönknecht G., Spormaker P., Steinmeyer R., Brüggeman L., Ache P., Dutta R., Reintanz B., Godde M., Hedrich R. and Palme K.** (1992). *Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system.* Science, 256(5057), 663-5.
- **Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D.M. and Bezanilla, F.** (1996). *Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel.* Neuron, 16, 1159–1167.
- **Sesti, F., Rajan, S., Gonzalez-Colaso, R., Nikolaeva, N. and Goldstein, S.A.** (2003). *Hyperpolarization moves S4 sensors inward to open MVP, a methanococcal voltage-gated potassium channel.* Nature Neuroscience, 6, 353–361.
- **Shevchenko A., Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., Sagliocco F., Wilm M., Vorm O., Mortensen P., Shevchenko A., Boucherie H. and Mann M.** (1996). *Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels.* Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 93, 14440-14445.
- **Soll J.** (2002). *Protein import into chloroplasts.* Curr. Opin. Plant Biol., 5, 529-535.
- **Soll J. and Schleiff E.** (2004). *Protein import into chloroplasts.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5, 198-208.
- **Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M. and Schrempf, H.** (2000). *Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from Streptomyces lividans.* FEBS Letters, 472, 83–87.
- **Szyroki A., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema M.R., Ache P., Reintanz B., Deeken R., Godde M., Felle H., Steinmeyer R., Palme K. and Hedrich R.** (2001). *KAT1 is not essential for stomatal opening.* Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 98(5), 2917-21.
- **Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1987) *Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of Drosophila.* Science, 237, 770–775.

- **Teuber, M., Rogner, M. and Berry, S.** (2001). *Fluorescent probes for non-invasive bioenergetic studies of whole cyanobacterial cells.* Biochim. Biophys. Acta, 1506, 31-46.
- **Thiel T.** (1996). *Isolation and characterization of the VnfEN genes of the cyanobacterium Anabaena variabilis.* J Bacteriol.;178(15),4493-9.
- **Trchounian, A. and Kobayashi, H.** (1999). *Kup is the major K⁺ uptake system in Escherichia coli upon hyper-osmotic stress at a low pH.* FEBS Letters, 447, 144–148.
- **Utkilen, H.C.** (1976). *Thiosulfate as electron donor in the blue-green alga Anacystis nidulans.* J. Gen. Microbiol., 95, 177-180.
- **Van den Hoek C., Mann D.G. and Jahns H.M.** (1995) *Algae.* Photosynthetica 35, 506-506.
- **Very A.A. and Sentenac H.** (2003). *Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants.* Annu Rev Plant Biol. 54, 575-603.
- **Very A.A., Sentenac H.** (2002). *Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane.* Trends Plant Sci., 7, 168-75.
- **Westphal, S., Heins, L., Soll, J. and Vothnecht, U.C.** (2001) *Vipp1 deletion mutant of Synechocystis: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis.* Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 98, 4234-4248.
- **Williams J.G.K.** (1988). *Costructions of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in Synechocystis 6803.* Methods in Enzymology., 16777. 777-778
- **Xu W. and McFadden B.A.** (1997). *Sequence analysis of plasmid pCC5.2 from cyanobacterium Synechocystis PCC 6803 that replicates by a rolling circle mechanism.* Plasmid.;37(2):95-104
- **Zanetti M.** (2004). *Espressione di due ipotetici canali ionici di organismi fotosintetici in sistema eterologo* Tesi di laurea
- **Zhou, X.L., Vaillant, B., Loukin, S.H., Kung, C. and Saimi, Y.** (1995). *YKCI encodes the depolarization-activated K⁺ channel in the plasma membrane of yeast.* FEBS Letters, 373, 170–176.
- **Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. and MacKinnon, R.** (2001). *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution.* Nature, 414, 43–48.
- **Zhu J., Watanabe I., Gomez B. and Thornhill W.B.** (2001). *Determinants involved in Kv1 potassium channel folding in the endoplasmic reticulum, glycosylation in the Golgi, and cell surface expression.* J. Biol. Chem., 276, 39419-39427.
- **Zimmermann and Sentenac H.** (1999). *Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions.* Curr Opin Plant Biol., 2,477-82.