

MATTEO BALLOTTARI\*, ALESSANDRA SCALA\*, LINDA BIANCO\*\*,  
CARMINE MANCONE\*\*\*, MARCO TRIPODI\*\*\*, GIOVANNI GIULIANO\*\*\*\*,  
GAETANO PERROTTA\*\*, ROBERTO BASSI\*

## Analisi proteomica della cromoplastogenesi nella bacca di *Solanum lycopersicon*

### INTRODUZIONE

La transizione cloroplasto-cromoplasto, anche detta cromoplastogenesi, è un evento che contraddistingue la formazione e la maturazione dei frutti.

Tutti i frutti carnosi possono essere raggruppati in due tipologie di forme ovvero la drupa e la bacca. La drupa racchiude un unico seme, avvolto da tessuti sclerificati derivanti dall'endocarpo: il cosiddetto nocciolo. La bacca, invece, ha al suo interno numerosi semi, ciascuno dei quali protetto da un tegumento. Oltre a queste classi principali di frutti, esistono anche i falsi frutti: ne sono un esempio i frutti delle *Rosaceae* e la fragola, definiti così in quanto derivano dal rigonfiamento del ricettacolo, porzione terminale del fusto, su cui si inserisce il fiore, ma che non fa parte di questo.

La maturazione dei frutti carnosi prevede delle modifiche fisico-chimiche mirate, che portano il frutto a diventare edule e attraente, come strategia per la dispersione dei semi contenuti al suo interno. Una di queste modifiche è il cosiddetto *softening* ovvero l'ammorbidimento del tessuto del pericarpo, il quale è costituito principalmente da cellule parenchimatiche, racchiuse da uno strato di microfibrille di cellulosa, sospese in una matrice di glicoproteine, acqua, pectine ed emicellulose. In particolare, le emicellulose rappresentano il 90% della parete cellulare. Il *softening* è determinato da espansione cellulare e dalla digestione di parte della parete e della lamella mediana presente tra le cellule, la cui degradazione in

\* Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

\*\* ENEA-Trisaia Research Center, Rotondella (Matera)

\*\*\* National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani", IRCCS, Roma

\*\*\*\* ENEA-Casaccia Research Centre, Roma

particolare porta alla perdita di adesione tra di esse (Smith et al., 1988; Giovannoni et al., 1989).

Il contenuto in carboidrati dei frutti carnosì dipende principalmente da due fattori: le condizioni ambientali presenti durante il processo di sviluppo e di maturazione e la cultivar analizzata. In pomodoro, i carboidrati maggiormente presenti sono saccarosio, glucosio e fruttosio con un grande accumulo di esosi, caratteristica conseguente al processo di domesticazione. Evidenze sperimentali dimostrano come il metabolismo degli zuccheri, abbia un ruolo centrale nel processo di maturazione in quanto un cambiamento nella loro composizione influenza anche la dimensione del frutto (Klann et al., 1996; D'Aoust et al., 1999).

Un altro studio, approntato per stabilire il profilo metabolico del frutto in questione, ha permesso di caratterizzare da un punto di vista metabolico tre stadi di sviluppo della maturazione (verde, arancio, rosso) monitorando il livello di più di 70 metaboliti primari (Roessner-Tunali et al., 2003). Le differenze maggiori sono state riscontrate tra il pomodoro verde e quello rosso in cui vi è un aumento di glucosio, fruttosio e degli esosi principali, dei componenti della parete, degli aminoacidi aromatici, di aspartato, lisina, metionina e cisteina e di tutti i pigmenti eccetto la clorofilla. Al contrario, è stata registrata una diminuzione degli acidi tricarbossilici (TCA), del saccarosio, degli esosi fosfati e della maggior parte dei polialcoli. Si può quindi affermare che i differenti stadi di maturazione possano essere distinti sulla base della composizione dei metaboliti primari e che, progredendo nello sviluppo, la fosforilazione degli zuccheri esosi diminuisca radicalmente.

Il metabolismo dei fotosintati nel frutto è stato studiato tramite l'inibizione di una fruttosio bisfosfatasi plastidiale (Obiadalla-Ali et al., 2004), enzima coinvolto nell'utilizzo metabolico dei triosi fosfati prodotti durante la fotosintesi. Il fenotipo ottenuto nelle linee transgeniche ha mostrato una diminuzione delle dimensioni del frutto, suggerendo che il metabolismo degli zuccheri nel frutto sia fondamentale, non solo per le caratteristiche organolettiche, ma anche per la formazione e lo sviluppo completo di questo organo. Per quanto concerne la regolazione della glicolisi e la trasformazione degli esosi fosfati in acidi organici nel frutto di pomodoro, i dati presenti in letteratura sono scarsi così come quelli sulla regolazione del ciclo dei TCA.

È stato stimato che il frutto di pomodoro contenga almeno 400 diversi composti volatili. In questo vasto gruppo di metaboliti, gli esteri, sintetizzati dall'enzima alcohol acetiltrasferasi, sono la classe più comunemente rilevata e la loro eterogeneità è dovuta alla variabilità dei precursori disponibili come substrato. La fonte maggiore di questi precursori è il metabolismo del piruvato, con la sua conversione in acetil-Coa per opera della piruvato deidrogenasi,

in acetaldeide grazie alla piruvato decarbossilasi, oppure in etanolo per azione della alcohol deidrogenasi.

I pigmenti che conferiscono ai frutti la colorazione che li rende allettanti, sono principalmente carotenoidi e flavonoli. Essi derivano dal metabolismo dell'acetil CoA e dal piruvato.

In pomodoro sono presenti vari carotenoidi tra cui più abbondante è il licopene, seguito dal fitoene, fitofluene,  $\zeta$ -carotene,  $\gamma$ - carotene,  $\beta$ -carotene, neurosporene e luteina (Khachik et al., 2002), contenuti principalmente nei plastidi.

I plastidi sono organelli subcellulari presenti nelle piante e nelle alghe che rappresentano una delle principali caratteristiche che contraddistinguono la cellula vegetale dalla cellula animale.

Sono responsabili della fotosintesi, dello stoccaggio di un'ampia gamma di prodotti, e sono coinvolti nella sintesi di molecole implicate nell'architettura e nel funzionamento delle cellule vegetali. Come i mitocondri, i plastidi sono organelli semiautonmi, racchiusi da una doppia membrana, contenenti un proprio patrimonio genetico e un sistema di espressione genica.

I cloroplasti sono plastidi verdi fotosintetici, responsabili della cattura della luce e della sua conversione in energia chimica. Hanno una struttura emisferica o a forma di lente con un diametro di circa 5-10  $\mu\text{m}$  e uno spessore di 3-4  $\mu\text{m}$  (fig. 1). I cloroplasti si trovano in tutti i tessuti verdi, principalmente nelle cellule del mesofillo fogliare, in numero variabile da poche decine a qualche centinaia per singola cellula. Il loro numero varia a seconda della specie, del tessuto, delle condizioni di crescita e dello stadio di sviluppo delle cellule in cui sono presenti. Ad esempio, una cellula del mesofillo di *Arabidopsis thaliana* contiene all'incirca 120 cloroplasti.

I cromoplasti contengono livelli elevati di caroteni e xantofille che conferiscono le colorazioni rosso, arancio e giallo a fiori, frutti, radici e foglie senescenti. Di norma, questi organelli si sviluppano da proplastidi, come ad esempio nella radice di carota, oppure da una ulteriore differenziazione dei cloroplasti, presenti nei tessuti dei frutti carnosì durante la maturazione. In entrambi i casi si ha la formazione di strutture per l'accumulo dei carotenoidi che si differenziano in strutture plastoglobulari, cristalline, a fibrille, tubolari definiti plastoglobuli (Camara et al., 1995). Lo sviluppo dei cromoplasti è accompagnato dalla massiccia induzione degli enzimi della via di biosintesi dei carotenoidi.

I cromoplasti vengono solitamente descritti come organelli fotosinteticamente inattivi, contenenti carotenoidi che conferiscono a fiori e frutti la caratteristica colorazione gialla, arancione o rossa e vengono considerati come l'ultima fase del ciclo di sviluppo dei plastidi (Ljubesic et al., 1991).

Similmente ai cloroplasti, i cromoplasti contengono alcune copie di DNA circolare e sono in grado di duplicarsi nelle prime fasi della loro maturazione. Durante questo processo di sviluppo, i ribosomi del macchinario di traduzione plastidio-specifico vengono gradualmente smantellati di modo che gli enzimi per la sintesi dei carotenoidi vengono codificati dal genoma nucleare, tradotti dai ribosomi citoplasmatici e successivamente importati. Il più importante cambiamento strutturale che avviene durante la cromoplastogenesi consiste nella degradazione dell'apparato fotosintetico presenti nei cloroplasti che si differenziano in cromoplasti. Esistono varie tipologie di smantellamento, la più diffusa delle quali è caratterizzata, da una tappa iniziale di *unstacking*, processo per cui i tilacoidi perdono la loro struttura impilata, tipica dei grana.

Nel pepo (*Cucurbita pepo*) in maturazione, i tilacoidi dei grana perdono il loro lumen e formano agglomerati al cui interno sono presenti particelle isometriche di circa 8nm di diametro, distanziate da 12-13nm e disposte in un pattern esagonale (Ljubecic et al., 1991). Queste particelle scompaiono con il progredire della maturazione. Un comportamento simile è osservabile anche dopo il trattamento con l'erbicida aminotriazolo, il quale blocca la ciclizzazione dei caroteni, impedendo così la formazione delle xantofille, pigmenti essenziali per i meccanismi di protezione della cellula vegetale dalla luce assorbita in eccesso. La mancanza di xantofille causa la foto-ossidazione delle clorofilla, con conseguente inattivazione e degradazione dei centri di reazione, mentre le proteine antenna si appressano con un pattern esagonale. Lo stress ossidativo è dunque una componente fondamentale che scatena quella che è la transizione del cloroplasto in cromoplasto.

Durante la cromoplastogenesi, contemporaneamente alla degradazione del sistema tilacoidale, viene avviata la sintesi de novo di carotenoidi all'interno di varie strutture specializzate che iniziano a formarsi in questa fase di transizione, tra cui i plastoglobuli, i quali si presentano come piccole gocce lipidiche (da 0.1  $\mu\text{m}$  fino a qualche  $\mu\text{m}$ ). Nei plastoglobuli oltre ai lipidi, soprattutto triacilgliceroli, possono essere contenuti anche vari caroteni e xantofille. Negli stadi finali della differenziazione dei cromoplasti i carotenoidi si possono accumulare in strutture differenti, come cristalli o fibrille. In alcuni casi, ad esempio nei petali, si sviluppano all'interno dei cromoplasti particolari membrane chiamate CIMs (*Chromoplast Internal Membranes*) che si dispongono in strati concentrici a ridosso dell'envelope. Infatti le CIMs si originano da invaginazioni della membrana più interna di quest'ultima e non dalla degradazione dei tilacoidi fotosintetici, come è stato dimostrato da saggi di marcatura con diaminobenzidina (Wrischer, 1989). In questo tipo di

membrane sono stati individuati enzimi della sintesi dei carotenoidi (Kreuz et al, 1982). In alcuni cromoplasti, come quelli di zucca, sono state osservate anche membrane che derivano dalla degradazione dei tilacoidi, seppur non contenenti clorofilla. Queste strutture scompaiono progressivamente con il progredire della maturazione. Un'altra tipologia di membrane che si può trovare è il *reticolo cromoplastico*, consistente di una rete di strutture tubulari ramificate di circa 30nm di diametro, originate dalla membrana più interna dell'envelope. Come nelle altre tipologie di plastidio, questa membrana ha una doppia funzione: trasporto in entrambe le direzioni di metaboliti, principalmente carotenoidi, e sito di sintesi delle strutture membranali. Durante la maturazione dei cromoplasti, la sintesi di carotenoidi può raggiungere livelli tali da portare la cristallizzazione dei prodotti. Un esempio di questo fenomeno è stato riscontrato nei petali di *Narcissus pseudonarcissus* e nei frutti di *Solanum lycopersicon* che accumulano, rispettivamente,  $\beta$ -carotene e licopene. I cristalli si formano nel lumen tilacoidale, durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto e rimangono invaginati in una membrana quando i tilacoidi sono completamente degradati (Hlousek et Ljubescic, 1988; Bathgate et al, 1985). I tubuli o fibrille sono altre strutture, cromoplasto-specifiche, che contengono carotenoidi e che si configurano come cilindri molto lunghi (10  $\mu\text{m}$ ) e sottili (20-40nm) spesso in contatto con i plastoglobuli. I tubuli, inoltre, non contengono solamente carotenoidi, ma anche galattolipidi e proteine specifiche dei cromoplasti (Sitte et al, 1980).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato analizzare la transizione da cloroplasto a cromoplasto, la cosiddetta cromoplastogenesi, tramite un approccio di tipo proteomico e fisiologico nella bacca di *Solanum lycopersicum*.

È stato scelto il frutto di questa solanacea in quanto il pomodoro è considerata la pianta modello per studiare la maturazione dei frutti carnosì ed è appunto durante questo processo di sviluppo che nel frutto i cloroplasti, fotosinteticamente attivi, si trasformano in cromoplasti, che accumulano carotenoidi, lipidi e una serie di composti secondari a vario grado di volatilità che conferiscono gusto e aroma al frutto. La conoscenza di quali messaggeri e di quali prodotti genici vengano accumulati e di quali metaboliti vengano prodotti durante la maturazione, potrà permettere, tramite la correlazione di questi parametri con l'evoluzione strutturale e organolettica della bacca, il miglioramento biotecnologico del prodotto "pomodoro".

Al momento la conoscenza del frutto di *S. lycopersicum* è molto frammentaria ed è stata condotta soprattutto sull'intero frutto con risultati in termine di prodotti genici riscontrati, identificati e quantificati durante lo sviluppo. Questi risultati insoddisfacenti ci hanno suggerito di concentrare il nostro lavoro su uno specifico organello: il plastidio. Infatti, pur non esaurendo tutti i fenomeni della maturazione, questo organello è sede del metabolismo dei lipidi e degli isoprenoidi, che sono i principali responsabili dei cambiamenti organolettici del frutto.

È il caso di sottolineare che questo studio, pur di una certa complessità, è ancora in una fase iniziale, in cui ci siamo focalizzati sul confronto delle tecniche potenzialmente impiegabili e sulla verifica dei risultati da esse ottenuti. In particolare sono state confrontate due strategie alternative: la MudPIT e la più classica 2D-PAGE/MS.

#### *Caratterizzazione preliminare*

Allo scopo di identificare i cambiamenti strutturali macroscopici presenti all'interno del plastidio durante la cromoplastogenesi, frutto di pomodoro a diversi stadi di maturazione sono stati analizzati al microscopio elettronico. Sono state quindi analizzate al microscopio elettronico sezioni del pericarpo di pomodori agli stadi estremi della maturazione, ovvero verde piccolo, caratterizzato dalla presenza di cloroplasti, e rosso maturo, caratterizzato invece dalla presenza di cromoplasti (fig. 1).

Come si può osservare in figura 1 nel cloroplasto sono presenti i grana connessi dalle stroma lamelle e alcuni plastoglobuli di ridotte dimensioni. Nel cromoplasto maturo, invece, il sistema interno di tilacoidi del cloroplasto viene perso a favore della formazione di strutture preposte all'accumulo dei carotenoidi: plastoglobuli, tubuli e le CIMs (Chromoplast Internal Membranes). Le tecniche di analisi proteomica devono essere condotte su campioni prelevati da pool omogenei degli "oggetti biologici" che si vogliono confrontare. Lo sviluppo della pianta e dei frutti in serra è un fenomeno dipendente dalle condizioni colturali. Per poter quindi integrare vari esperimenti, effettuati sul materiale ottenuto da raccolti effettuati in tempi diversi, è stato approntato un sistema di campionamento delle bacche, scegliendo diversi stadi di maturazione, tramite la valutazione di particolari caratteristiche quali l'analisi colorimetrica e fenotipica (fig. 2):

- *Pomodori verdi piccoli (VP)* sono caratterizzati da dimensioni ridotte (altezza dell'asse maggiore del frutto di ~ 3.4 cm, volume ~13cm<sup>3</sup>), il colo-

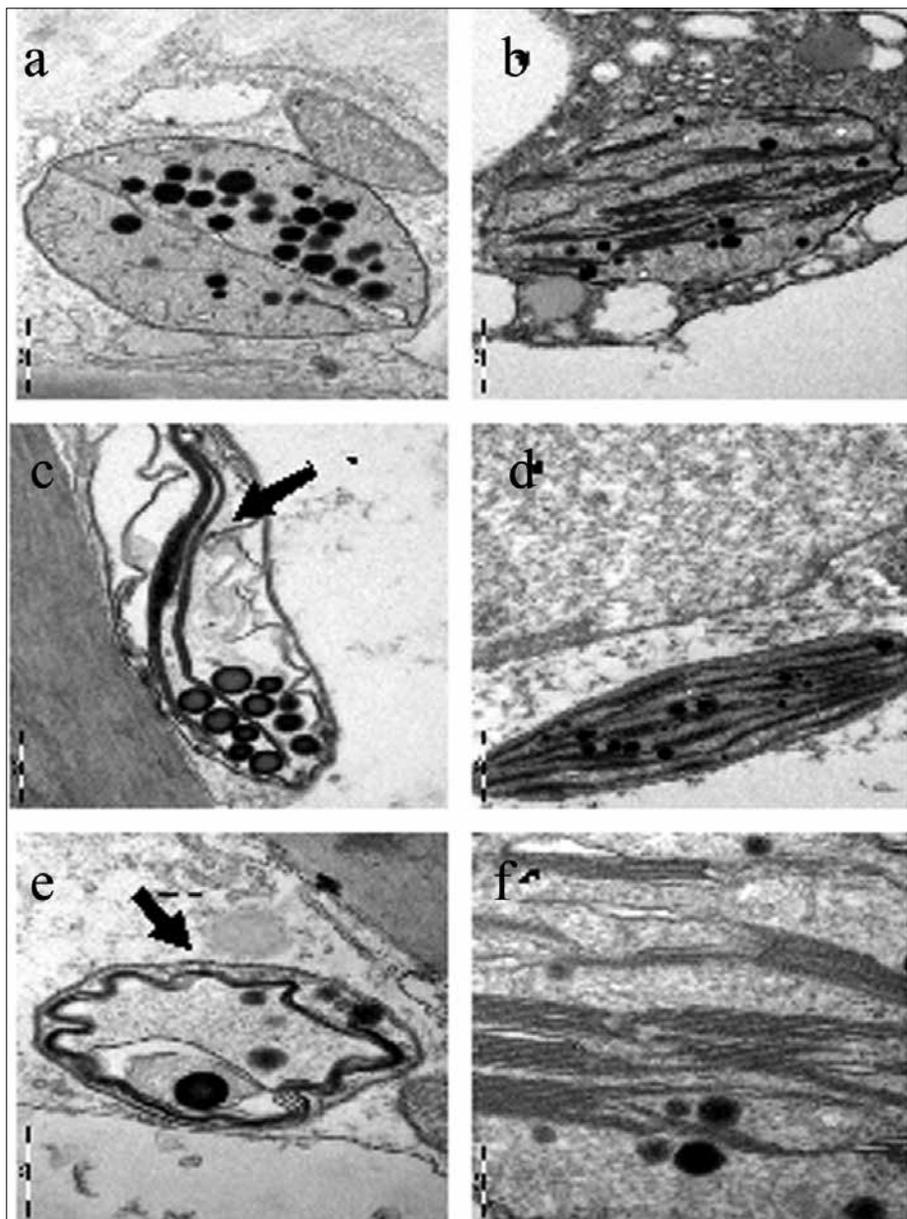


Fig. 1 sezioni di tessuti di pomodoro al microscopio elettronico. In b, d e f cloroplasti da frutto VP; in a, c ed e cromoplasti da frutto R

re ha un picco di assorbimento nella regione del rosso a 677nm dovuto alla presenza di clorofille la cui quantità è leggermente inferiore a quella

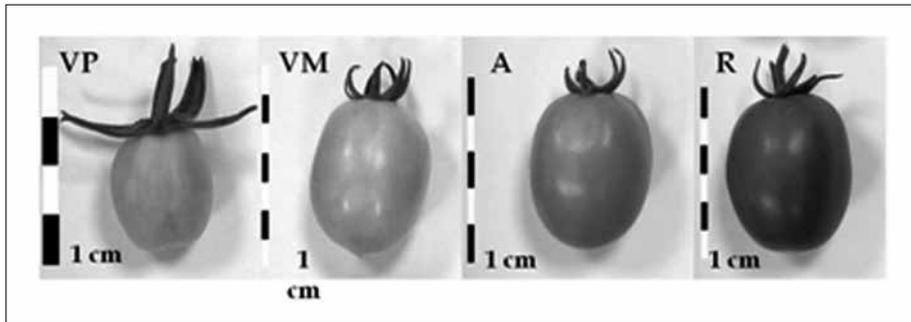


Fig. 2 Stadi maturazione della bacca di pomodoro da cui sono stati purificati i plastidi anaizzati in questo lavoro (VP, verde piccolo; VM, verde maturo, A, arancione; R, rosso)

ricontrata nella foglia. A livello microscopico si osserva la caratteristica organizzazione strutturale delle membrane all'interno del cloroplasto. Per quanto riguarda i pigmenti, la composizione in xantofille è simile a quella della foglia, eccezione fatta per la luteina che diminuisce. Il  $\beta$ -carotene aumenta rispetto alla quantità presente nella foglia, mentre le clorofille diminuiscono leggermente (tab. 1).

- *Pomodori verdi maturi (VM)* sono caratterizzati dal raggiungimento delle seguenti dimensioni: altezza dell'asse maggiore del frutto  $\sim 4.3\text{cm}$ , volume  $\sim 26\text{cm}^3$ , il colore ha un picco di assorbimento nella regione del rosso a  $677\text{nm}$  dovuto alla presenza di clorofille in quantità praticamente uguale a quella dei pomodori verdi piccoli. Il licopene inizia ad accumularsi in questo stadio ed è visibile come un picco a  $545\text{nm}$  nello spettro di riflettanza. Rispetto allo stadio precedente si riscontra un lieve aumento della violaxantina (tab. 1).
- *Pomodori arancio (A)* sono caratterizzati dal quasi completo raggiungimento delle dimensioni finali (altezza dell'asse maggiore del frutto  $\sim 4.2\text{cm}$ , volume  $\sim 28\text{cm}^3$ ), ha un picco di assorbimento nella regione blu dello spettro a  $545\text{nm}$  dovuto alla degradazione della maggior parte delle clorofille e all'accumulo di licopene. Questo dato rispecchia la composizione dei pigmenti con le clorofille totali che diminuiscono di  $\sim 60$  volte e il licopene che aumenta di  $\sim 8$  volte rispetto al frutto verde maturo (tab. 1).
- *Pomodoro rosso (R)* è caratterizzato dal completo raggiungimento delle dimensioni finali (altezza dell'asse maggiore del frutto  $\sim 4.3\text{cm}$ , volume  $\sim 29\text{cm}^3$ ), dall'aver completato il processo di maturazione, il colore ha un picco di assorbimento, maggiore di quello del campione arancio, nella regione blu dello spettro a  $565$  dovuto al massiccio accumulo di

licopene. A livello microscopico i cromoplasti hanno perso le strutture interne caratteristiche dei cloroplasti, hanno un numero maggiore di plastoglobuli e presentano formazioni di membrane che accumulano i carotenoidi, principalmente il licopene, come risulta dalla composizione in pigmenti (tab. 1).

La maturazione del frutto quindi comporta profondi cambiamenti strutturali a carico dei plastidi, con forte riduzione di clorofilla e aumento dei carotenoidi. Si osserva la formazione di strutture atte alla loro compartimentalizzazione come plastoglobuli, tubuli e CIMs (cfr. introduzione) visibili nel campione rosso.

#### *Purificazione dei plastidi e separazione in frazione solubile e di membrana*

Dopo aver caratterizzato i 4 stadi di sviluppo da un punto di vista fenotipico, sono stati raccolti frutti che presentassero uno stadio di maturazione uniforme tra i quattro scelti. Da tali frutti sono stati quindi utilizzati per l'isolamento di plastidi intatti grazie a omogeneizzazione dei tessuti freschi in un apposito buffer e centrifugazione in gradiente. I plastidi integri vanno dunque a collocarsi nel gradiente di Percoll tra le due soluzioni a densità diversa: le membrane plastidiali, liberatesi invece a seguito dell'eventuale rottura di parte di plasmidi integri, formano una banda all'interno della soluzione meno densa e distinguibile da quella dei plastidi intatti. Gli altri costituenti cellulari contaminanti vanno a formare un pellet sul fondo del gradiente.

#### *Analisi dei pigmenti*

La composizione in pigmenti dei plastidi intatti purificati è stata valutata andando a estrarre con acetone o dietilere queste molecole dalla frazione di membrana di ogni stadio di maturazione. Questi solventi non sono risultati abbastanza idrofobici per estrarre in modo completo il licopene, il cui progressivo accumulo inizia durante la transizione cloroplasto-cromoplasto. È stata utilizzata, per ovviare a questo problema, una miscela di esano, etanolo e acetone. La composizione in pigmenti della foglia, usata come controllo, e dei pomodori nei diversi stadi di sviluppo è riportata in tabella 1. Durante il passaggio dallo stadio verde maturo, VM, a quello arancio, A, ovvero in concomitanza con la transizione cloroplasto-cromoplasto vi è una forte diminuzione non solo della clorofilla a e b, quindi delle clorofille totali, ma anche

CAMPIONE	NEO	VIOLA	ANTERA	LUTE	ZEA	LICOPENE	B CAR2	CHLA	CHLB	CHLA/B	TOT CAR	TOT CHL	NEO/ B CAR
FOGLIA	1,55	4,76	0,00	45,74	0,00	0,00	46,40	465,11	173,56	2,68	100,00	638,67	0,034
<i>errore</i>	0,32	0,48		1,17			2,28	63,36	22,03	0,03		85,38	0,008
VP	1,01	4,12	0,00	22,53	0,00	0,00	71,98	322,90	81,94	4,19	100,00	404,84	0,015
<i>errore</i>	0,80	2,70		9,34			12,71	130,12	47,74	0,85		177,86	0,014
VM	1,38	5,44	0,00	21,04	0,00	11,25	59,70	393,20	91,89	4,28	100,00	485,09	0,023
<i>errore</i>	0,10	1,54		3,11		1,51	3,19	19,40	4,40	0,01		23,81	0,000
A	0,00	0,03	0,07	0,37	0,04	91,49	8,00	3,63	4,07	1,37	100,00	7,71	0,001
<i>errore</i>	0,01	0,00	0,05	0,47	0,06	1,04	0,46	0,15	3,45	1,12		3,60	0,001
R	0,00	0,00	0,00	0,03	0,26	89,17	10,54	4,52	4,26	1,01	100,00	8,77	0,000
<i>errore</i>				0,04	0,22	3,61	3,44	4,03	0,55	0,82		4,57	

Tab. 1 Analisi HPLC dei pigmenti contenuti nei plastidi purificati dai quattro stadi di sviluppo del frutto analizzati comparati con i pigmenti contenuti nei cloroplasti nelle foglie di pomodori

delle xantofille neoxantina, violaxantina e luteina. Inoltre per quanto riguarda il licopene, il suo accumulo aumenta fortemente nei campioni A e R, sebbene in piccola quantità, questo carotenoide sia rilevabile anche nello stadio VM.

#### *Analisi proteomica: 2D-PAGE/MS*

Il metodo che viene utilizzato maggiormente per lo studio dei proteomi complessi è la 2D-PAGE in quanto il potere di risoluzione delle singole proteine è molto alto. Durante la 2D-PAGE la miscela proteica viene separata in prima dimensione per isoelettrofocalizzazione (IEF) in base alla carica, più precisamente in base al punto isoelettrico, e in seconda dimensione per SDS-PAGE, in base alla massa di ciascuna proteina. Queste due caratteristiche infatti sono completamente ortogonali e permettono di ottenere una elevata risoluzione. Inoltre la 2D-PAGE prevede che per ogni campione siano fatte più repliche, il che conferisce al metodo rilevanza dal punto di vista statistico ed elevata riproducibilità. Infine, grazie allo specifico software PDQuest, è possibile seguire i livelli di espressione di specifiche proteine nelle mappe dei campioni analizzati. I diversi campioni ottenuti da frutti di pomodoro con un diverso stadio di maturazione sono separati su mappe bidimensionali, in cui la prima dimensione è costituita da isoelettrofocalizzazione su IPG in un intervallo di pH 3-8, mentre la seconda dimensione è costituita da un gel denaturante SDS-PAGE. Ogni stadio di sviluppo della bacca di pomodoro è stato analizzato tramite separazione bidimensionale eseguita in tre repliche simultanee, in modo da mediare eventuali variazioni sperimentali (fig. 3).

#### *Analisi delle mappe bidimensionali*

Le mappe bidimensionali così prodotte sono state confrontate tra loro in modo da individuare quegli spot presenti in maniera differenziale nei diversi campioni. In particolare, all'interno della complessità delle diverse proteine espresse, è stato eseguito il confronto tra ogni stadio di maturazione, verde piccolo VP, arancio A e rosso R, con il campione verde maturo VM considerato come campione di riferimento. Il numero di spot individuato per ogni campione, ottenuto calcolando la media del numero delle macchie proteiche presenti in ognuna delle 3 repliche, per i campioni VP, A e R e nelle 9 repliche del campione VM è stato rispettivamente di  $126 \pm 18$ ,  $252 \pm 4$ ,  $395 \pm 5$  e  $242 \pm 19$ . Una volta identificati tutte le macchie proteiche di ogni gel, le repliche di un campione sono virtualmente sovrapposte e confrontate con quelle di un campione differente: solo

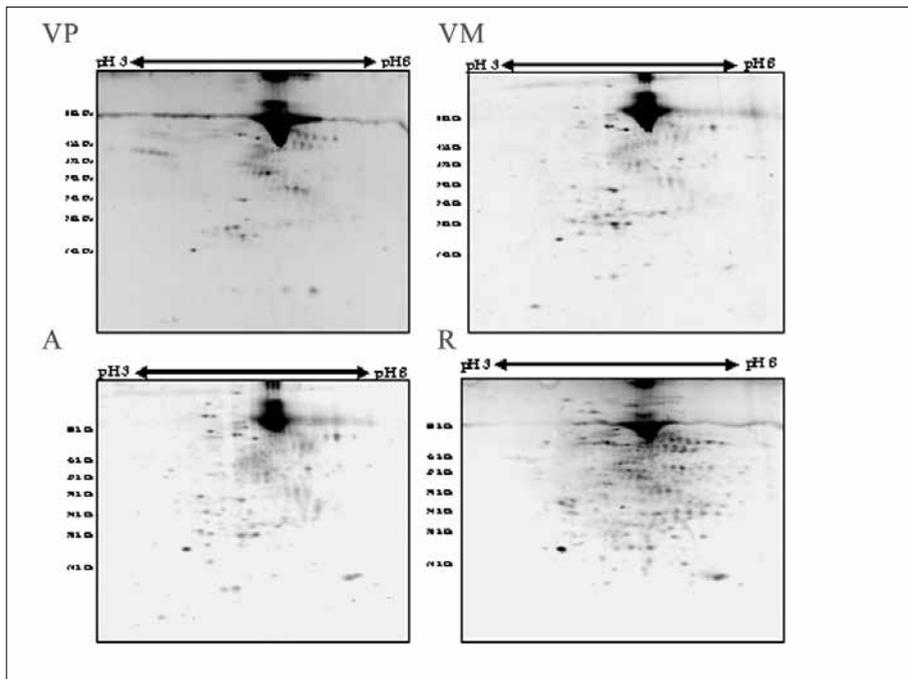


Fig. 3 Stadi maturazione della bacca di pomodoro da cui sono stati purificati i plastidi analizzati in questo lavoro (VP, verde piccolo; VM, verde maturo, A, arancione; R, rosso)

quegli spot che hanno lo stesso comportamento in tutte le repliche possono essere considerati validati per le analisi seguenti. Al termine del lavoro, si ottiene un'immagine virtuale in cui sono indicati tutti gli spot individuati tra le varie mappe bidimensionali: il cosiddetto Mastergel (fig. 4). Questa procedura permette di svolgere l'analisi qualitativa e di evidenziare spot appartenenti ai diversi stadi di maturazione in maniera specifica o conservativa. L'analisi 2D SDS-PAGE permette inoltre di valutare da un punto di vista quantitativo l'abbondanza nei diversi campioni degli spot individuati. Analisi tramite spettrometria di massa delle macchie proteiche identificate dalle mappe bidimensionali delle bacche di pomodoro nei diversi stadi di sviluppo, ha portato all'identificazione di 81 diverse proteine, visualizzate sul Mastergel.

#### *Analisi delle mappe bidimensionali 2D-PAGE*

Dall'analisi dei matchset, sono state individuate 459 proteine espresse nei vari stadi di maturazione in modo qualitativamente differenziale come rappresen-

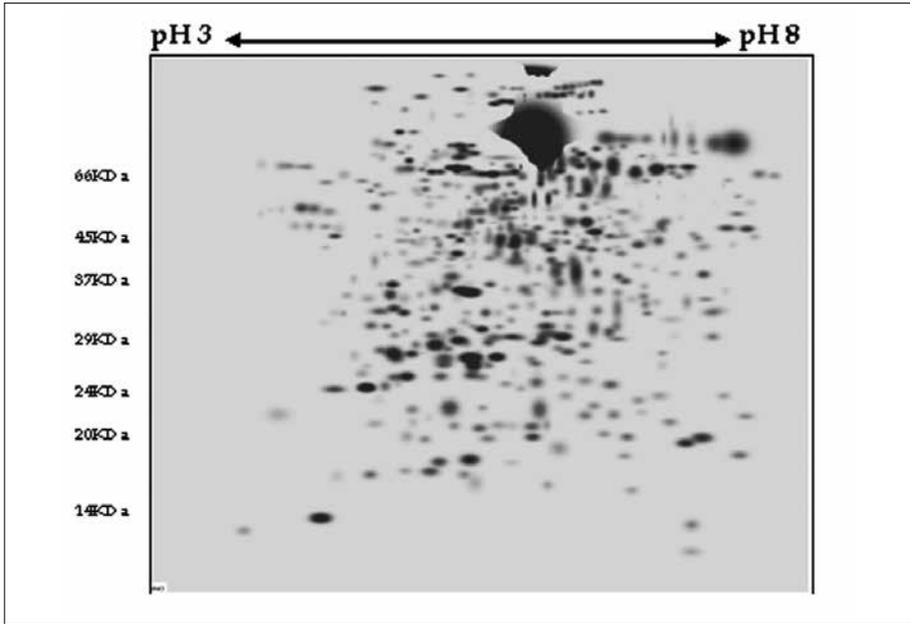


Fig. 4 Mappa Mastergel ottenuta dalla analisi tramite software PDquest delle mappe dei diversi stadi di sviluppo del frutto rappresentate in figura 3

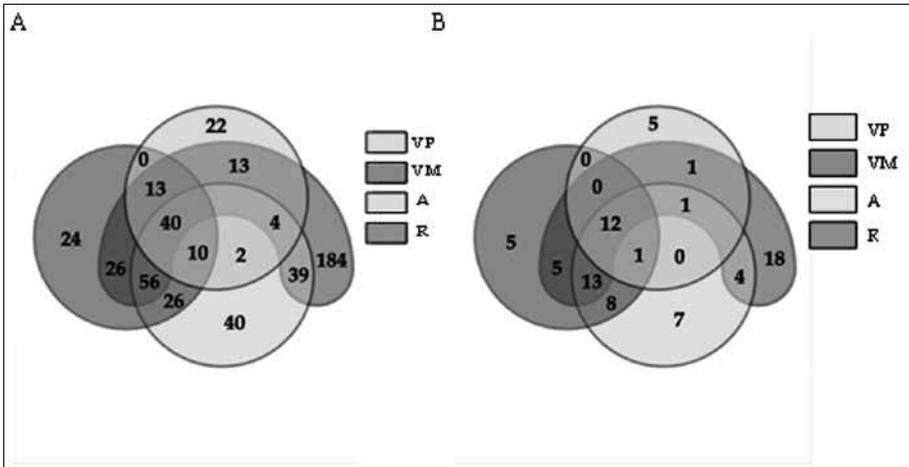


Fig. 5 A) Diagramma di Euler-Venn che rappresenta il numero di proteine identificate per MS presenti solo in uno, solo in due, solo in tre stadi di sviluppo o in tutti gli stadi di sviluppo. B) Diagramma di Euler-Venn che rappresenta il numero di proteine individuate con analisi PDQuest presenti solo in uno, solo in due, solo in tre stadi di sviluppo o in tutti gli stadi di sviluppo

tato in figura 5A. Solamente 40 spot sono risultati conservati nei matchset dei quattro stadi di maturazione. Questo significa che all'interno del plastidio vi sono enormi modificazioni a livello proteico durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto, che portano ad avere numero molto basso di proteine comuni riferibili a funzioni "housekeeping" plastidiali come sintesi proteica, biosintesi dei lipidi e metabolismo energetico.

Le 81 proteine identificate dopo analisi MS rappresentano il 16 % degli spot individuati dopo l'analisi delle immagini delle mappe al PDQuest.

In particolare la suddivisione delle proteine identificate nei diversi stadi di sviluppo è rappresentata nella figura 5B.

Successivamente è stata valutata la sequenza degli spot identificati; tramite l'ausilio del software TargetP, è stato possibile identificare quali proteine avessero la pre-sequenza per la localizzazione nel plastidio e quali ne fossero prive. Il recupero in banca dati del trascritto non processato ha permesso di confermare o meno la localizzazione plastidiale e quindi di eliminare dalla successiva analisi i polipeptidi extra-plastidiali (38%). Le proteine plastidiali identificate con certezza nei diversi stadi di sviluppo sono riportate di seguito:

- *Verde piccolo (VP)*: RubisCO (subunità Large e Small), catalasi, superossido dismutasi, aldolasi, subunità alfa della ATPasi, ATP sintasi, ATP sintasi (subunità beta), PSII 23kDa, CP29, ferredossina-NADPH riduttasi, plastocianina, OEC (Oxygen Evolving Complex), PAP (Plastid lipid Associated Protein), Chaperonina 21
- *Verde maturo (VM)*: RubisCO, subunità small della RubisCO, Rubisco Binding Protein (chaperonina), superossido dismutasi, amido fosforilasi, piruvato difosfato dichinasi (PPDK) (Parsley et al., 2006 nelle piante C3 fornisce PEP per gluconeogenesi), putative thiazole biosynthetic protein, fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi, fruttochinasi 3, fosforibulochinasi, subunità alfa della ATPasi, PSII 23kDa, subunità beta della ATP sintasi, CP29, ferredossina-NADPH riduttasi, subunità delta e epsilon della ATP sintasi, subunità epsilon della ATPasi, plastocianina, Oxygen Evolving Complex (OEC), cisteina sintasi, PAP (Plastid lipid Associated Protein), chaperonina 21, chaperonina 10, ribonucleoproteina 33kDa (processamento e splicing dell'mRNA nei cloroplasti Li Y et al., 1993)
- *Arancio (A)*: RubisCO, RubisCO Binding Protein, Subunità Large della RubisCO, superossido dismutasi, chloroplast elongation factor, amido fosforilasi, piruvato difosfato dichinasi (PPDK), thiazole biosynthetic protein, fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi, fruttochinasi 3, subunità alfa della ATPase, PSII 23kDa, subunità beta della ATP sintasi, CP29, ferredossina NADPH riduttasi, subunità epsilon della ATP sintasi, subunità epsilon

della ATPasi, subunità delta della ATP sintasi, plastocianina, Oxygen evolvine Complex (OEC), PAP (Plastid lipid Associated Protein), chaperonina 60, chaperonina 21, small HSP, chaperonina 10 (gruppo 20), proteasi Clp ATP dipendente, ribonucleoproteina

- *Rosso (R)*: RubisCO, RubisCO binding protein, subunità Large della Rubisco, superossido dismutasi, lipossigenasi B, amido fosforilasi, piruvato di fosfato dichinasi (PPDK), thiazole biosintetic protein, fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi, gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi, subunità alfa della ATPase, subunità delta della ATP sintasi, PSII 23kDa, subunità beta della ATP sintasi, CP29, ferrodossina NADPH riduttasi, subunità epsilon della ATP sintasi, Oxygen evolvine Complex (OEC), cisteina sintasi, PAP (Plastid lipid Associated Protein), chaperonina 21, endopeptidasi Clp, ribonucleoproteina.

Tra le proteine individuate come contaminanti molte sono di origine mitocondriale, altre fanno parte del pool dell'ER e dell'apparato di Golgi, altre ancora del citoscheletro e del citoplasma. Nel caso dei compartimenti cellulari, questi hanno caratteristiche di sedimentazione simili a quelle dei plastidi e, probabilmente, a causa di ciò sono andati a collocarsi nella stessa posizione, durante la separazione in gradiente. Sarà pertanto necessario procedere a un'analisi diretta per microscopia elettronica della banda recuperata da gradiente per confermare questa ipotesi. Per quanto riguarda invece le proteine citoplasmatiche e del citoscheletro, si può supporre che si trovassero adese sulla superficie del plastidio durante la purificazione. È comunque possibile che l'attribuzione di una parte cospicua del proteoma, individuato come "non plastidiale", sia frutto di eccessiva prudenza in quanto il genoma di *Solanum lycopersicum* non è stato ancora completamente sequenziato, ed è quindi possibile che sia avvenuta l'identificazione di un frammento conservato con una proteina omologa con localizzazione non plastidiale. Infatti i peptidi di import, sulla cui presenza vengono fatte le attribuzioni, vengono eliminati dopo il raggiungimento del sito finale di localizzazione delle proteine plastidiali.

Pur su un numero basso di dati, si può notare la comparsa e l'accumulo di chaperonine e di PAP (Plastid lipid Associated Proteins) durante lo sviluppo del cromoplasto, cosa che è in accordo con i dati pubblicati da Pozueta-Romero (Romero et al., 1997) da cui risulta che il gene codificante per la una PAP di *C. annuum*, sebbene sia espresso a bassi livelli nell'intera pianta, venga trascritto massicciamente solo durante le ultime fasi dello sviluppo del frutto.

Inoltre, è molto strano notare la presenza di CP29 anche nei campioni arancione e rosso quando la degradazione del fotosistema II è ormai completa. Ciò fa pensare che CP29, oltre al suo ruolo di antenna, abbia anche altre funzioni, al momento sconosciute.

Nonostante i vantaggi della 2D-PAGE, questo metodo ha mostrato alcuni svantaggi per quanto riguarda la rappresentatività delle mappe con rispetto al campione analizzato. Nonostante lavori precedenti del laboratorio avessero mostrato la possibilità di ottenere buone mappe della frazione proteica membranale (Caffarri et al., 2005; Frigerio et al., 2007) la scelta fatta nel nostro studio di analizzare il proteoma del cloroplasto, contenente sia proteine solubili che di membrana, ha portato a mappe che contengono soprattutto proteine solubili o subunità estrinseche di proteine di membrana, mentre le proteine intrinseche di membrana appaiono poco rappresentate, nonostante tutti i dati in nostro possesso indichino che, almeno nei campioni VP e VM, le proteine dell'apparato fotosintetico (di membrana) siano presenti in grandi quantità e siano pienamente funzionali. In linea di principio sarebbe stato possibile effettuare il pre-frazionamento, andando a separare la frazione solubile e di membrana, prima della 2D-PAGE, ma tale schema sperimentale avrebbe portato al raddoppio del numero dei gel e un aumento sostanziale delle spot da analizzare individualmente. Tale carico di lavoro renderebbe la ricerca onerosa e difficilmente effettuabile in tempi e costi ragionevoli. Concludiamo che il metodo di analisi 2D-PAGE/MS produce dati rappresentativi del proteoma plastidiale solo dopo pre-frazionamento della frazione solubile e di quella di membrana, mentre quando entrambe sono separate nella stessa mappa bidimensionale, si ottiene una forte selezione quantitativa contro le proteine di membrana, anche se condizioni di solubilizzazione e separazione sono ottimizzate per l'analisi di questa classe di polipeptidi (Caffarri et al., 2005; Frigerio et al., 2007). Le tappe che appaiono particolarmente soggette a questa selezione sono la solubilizzazione e l'adsorbimento sul gel IEF. A ciò si aggiunge il fatto che, all'interno del proteoma, esistono gruppi di proteine la cui abbondanza è molto bassa, altri che sono caratterizzati dall'aver un pI estremo e quindi difficilmente focalizzabili in prima dimensione, altri gruppi presentano masse molecolari molto grandi o molto piccole la cui risoluzione nelle mappe non risulta sufficientemente alta. Un'altra problematica correlata alla 2D-PAGE è che i gel sono facilmente contaminabili da cheratina, la quale va a inficiare l'identificazione successiva, producendo una bassa efficienza di identificazione delle macchie proteiche tagliate dai gel rispetto alla quantità di lavoro necessaria all'analisi stessa. Concludiamo che la tecnica di 2D-PAGE/MS, pur essendo in linea di principio quella in grado di dare una visione complessiva e accurata del proteoma, risulta applicabile con buoni risultati solo se le risorse disponibili per l'analisi sono grandi e il tempo poco limitante.

### *Analisi MudPIT*

L'utilizzo della MudPIT permette di eliminare buona parte di questi svantaggi, è applicabile a tutte le tipologie di proteine suddette e permette di identificarne un numero maggiore rispetto alla 2D-PAGE, anche se in modo semi-quantitativo. Infatti, nella *shotgun proteomic*, complesse miscele di proteine vengono digerite in peptidi che sono analizzati da vari tipologie di spettrometria di massa e infine particolari algoritmi permettono di determinare il contenuto della miscela iniziale.

Dopo il passaggio di digestione della miscela di proteine, estratte dal campione biologico d'interesse, i peptidi sono separati grazie a tecniche di cromatografia multidimensionale prima di essere sottoposti ad analisi di massa o di massa/ massa.

In questo studio vengono analizzati con *shotgun proteomic* solamente i campioni provenienti dagli stadi estremi della maturazione, ovvero VP e R, che mostrano differenze più marcate.

Nella frazione di membrana sono state individuate 286 proteine così ripartite:

- 120 plastidiali (42%) di cui 86 nel VP, 22 nel R, 12 sia nel VP che nel R
- 166 di altra localizzazione (58%) di cui 47 nel VP, 101 nel R, 18 sia nel VP che nel R

Nella frazione solubile sono state individuate 189 proteine solubili con le seguenti ripartizioni:

- 82 plastidiali (43.4%) di cui 58 nel VP, 13 nel R, 11 sia nel VP che nel R
- 107 di altra localizzazione (56.6%) di cui 24 nel VP, 79 nel R e 4 sia nel VP che nel R.

Si può notare che la maggior incidenza di contaminanti è stata riscontrata nel campione rosso. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i cromoplasti sono meno stabili dei cloroplasti e durante l'omogenizzazione del pericarpo si associano più facilmente ad altri componenti cellulari.

Sia le proteine di membrana che quelle della frazione solubile sono state suddivise in classi funzionali sulla base della via metabolica di appartenenza e/o della funzione svolta (fig. 6).

Dalla figura 6 è possibile notare come nei campioni A e R vi sia una forte diminuzione dei geni che codificano per le proteine che costituiscono l'apparato fotosintetico (settima colonna), mentre aumenti l'espressione di chaperonine e di heat shock protein (terza colonna) come e di proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi (decima colonna). È possibile notare come, durante la maturazione all'interno dei plastidi vi è una diminuzione delle attività del metabolismo



minante. In generale si può vedere una diminuzione della RubisCO con la maturazione. In particolare la subunità Small si ritrova solo nel campione VP e VM. Per l'analisi MudPIT, la RubisCO subunità Large è stata eliminata tramite pre-frazionamento per SDS PAGE. In ogni caso è possibile trovare questa proteina anche nella frazione solubile di VP e R, in quantità chiaramente maggiore nel campione verde rispetto a quella presente nel campione rosso. In particolare la RubisCO attivasi, determinante per la funzione della RubisCO si ritrova solo nel campione VP. La RubisCO attivasi mantiene il sito catalitico della Rubisco libero ed è influenzata dal rapporto ATP/ADP (Parry et al., 2008).

Gli altri enzimi del ciclo di Calvin sono stati individuati principalmente tramite MudPIT e sono presenti solo nello stadio VP, tranne la fosfoglicerato kinasi (presente sia in VP che R) e la fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi (dati 2D-PAGE/MS). Quest'ultima, tuttavia, ha un ruolo anche nella glicolisi che, come descritto in seguito, aumenta nello stadio R. La fase oscura della fotosintesi sembra, quindi, non essere più attiva a seguito della transizione cloroplasto-cromoplasto.

#### Fase luminosa della fotosintesi

Per quanto riguarda le proteine facenti parte dell'apparato fotosintetico, dai dati di 2D-PAGE/MS, la ferredossina-NADP reduttasi è presente in tutti gli stadi, la plastocianina in tutti eccetto nel R, la subunità C del PSI nel VM e l'ATP sintasi viene ritrovata in tutti gli stadi. In particolare l'ATP sintasi aumenta con l'avanzare della maturazione come viene riportato in letteratura (Asim Siddique et al., 2006). Altre proteine operanti durante la fase luminosa sono l'Oxygen Evolving Complex (OEC) e in particolare la subunità di 33Kda, ritrovata sia in pomodoro rosso che in peperone rosso (Faurobert, 2007; Summer et al., 1999). Dai nostri dati di 2D-PAGE/MS, l'OEC è presente in tutti gli stadi, con un picco nel VM.

La proteina antenna CP29 è stata ritrovata in tutti gli stadi, anche se in quantità molto ridotta nel campione A e in quello R. Tuttavia, dai dati ottenuti con MudPIT, tutte le proteine coinvolte nella fase luminosa della fotosintesi sono presenti solo nel campione VP, fatta eccezione per l'ATP sintasi, presente anche nei cromoplasti. In particolare CP29 viene ritrovato in diversi picchi, ma sempre appartenenti al campione VP. Questo dato è stato verificato con Western blot e commentato in seguito. Anche la ferredossina NADP reduttasi e l'OEC non sono stati identificati nel campione R tramite 2D-LC/MS.

Durante la maturazione, oltre al ciclo di Calvin, anche la fase luminosa della fotosintesi sembra essere abolita: infatti sia componenti delle antenne periferiche (CP24, CP29, LHCI) che componenti dei core complex (CP43, CP47, D2, PSI-C), vengono ritrovati solo nei campioni verdi.

Il campione arancione rappresenta un caso interessante, in cui plastocianina e ferrodossina NADP-reduttasi, coinvolta nel trasporto ciclico (Shahak 1981 BBA), e PSI (da Western blot) sono presenti. La presenza contemporanea di queste proteine suggerisce una possibile attività del PSI tramite trasporto ciclico, come discusso più avanti. L'unico componente della fase luminosa a non essere toccato è l'ATP sintasi, un complesso proteico che agisce sia nella fotofosforilazione lineare che in quella ciclica.

Qual è il ruolo di questa ATP sintasi? Si può postulare che nel cromoplasto svolga un ruolo inverso, cioè idrolizzi ATP per produrre  $\Delta pH$ , con cui spingere l'import di proteine. Summer e Cline, nel lavoro del 1999, hanno dimostrato che la via di import tramite  $\Delta pH$  è attiva nei cromoplasti. Questa ipotesi è confermata dalla presenza di V-ATPasi nel campione rosso. È perciò possibile che nel cromoplasto si instauri un trasporto non-fotosintetico di protoni nel lumen al fine di permettere l'import di pre-proteine dal citoplasma. Questo fenomeno potrebbe anche spiegare l'alta percentuale di polipeptidi non plastidiali ritrovati sia con la 2D-PAGE, sia con la MudPIT.

#### Metabolismo primario: aumento della glicolisi nel cromoplasto

Nella transizione cloro-cromoplasto (e in particolare nei due stadi centrali VM e A) avviene una degradazione di amido (presenza del ssp 2901 del precursore dell'amido forssforilasi) e glicolisi (gliceraldeide 3-p- deidrogenasi, fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi) per produrre ATP e piruvato precursori di varie vie metaboliche secondarie (dati di 2D-PAGE/MS). Risultati, confermati anche da analisi MudPIT, che tuttavia mostrano la presenza di amido fosforilasi ( $\alpha$ -1,4 glucan phosphorylase L-1) nello stadio VP. Questo è spiegabile in quanto nel campione verde piccolo, infatti, essendo ridotto l'apparato fotosintetico, per produrre ATP il frutto ricorre alla degradazione dell'amido. Questo evento si verifica specialmente negli stadi VM e A, mentre diminuisce in quello R. La glicolisi, quindi, fornisce ATP, data la forte diminuzione delle proteine fotosintetiche e si accompagna, nello stadio A, alla produzione di ATP, probabilmente tramite il trasporto ciclico. Inoltre l'ATP può essere idrolizzato dalle ATPasi per produrre  $\Delta pH$  in modo da favorire il trasporto di proteine all'interno

del cromoplasto come descritto da Summer e Cline nel loro lavoro del 1999.

#### Enzimi biosintetici di clorofilla e carotenoidi

Tutti gli enzimi per la sintesi delle clorofille sono presenti solo nel campione VP, mentre gli enzimi per la sintesi dei carotenoidi aumentano nel campione R, in particolare fitoene sintasi e fitoene desaturasi che sono coinvolte nell'accumulo di carotenoidi, in particolare licopene (dati MudPIT). Quindi il proteoma rispecchia perfettamente i dati sui metaboliti isoprenoidi determinati negli stessi campioni (tab. 1).

#### Detossificazione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Dai dati ottenuti tramite 2D-PAGE/MS risulta che la catalasi (CAT), è presente solo nello stadio VP, mentre sono state identificate due superossido dismutasi (SOD): una espressa solo nello stadio R e in quello A (ssp5102), l'altra (ssp5101) invece risulta presente in tutti i campioni, ma con un picco nel campione A. La presenza di SOD sia nel cloroplasto che nel cromoplasto è confermata (dati MudPIT), mentre quella della ascorbato perossidasi è riscontrata solo nel campione VP, così come quella della tioredossina perossidasi e della perossiredossina Q.

Questo è in accordo con quanto dimostrato nel lavoro di Jimenez (Jimenez et al., 2002), in cui si riscontra il massimo di attività della CAT e della APX nel campione verde piccolo, mentre la SOD mostra un'attività costante durante tutta la maturazione.

Per quanto riguarda, invece, la SOD durante il processo di *ripening*, la sua presenza è riportata in maniera discordante in diversi lavori, precedenti a quello di Jimenez (Jimenez et al., 2002).

Dai nostri dati l'APX, la cui attività anche è stata rilevata anche nello stadio rosso (Faurobert et al., 2007), è presente nel plastidio solo nel primo stadio di sviluppo, cioè nel VP. Tuttavia, nello stadio R, aumenta l'ascorbato perossidasi citosolica, indicando una possibile diversa localizzazione di questa funzione.

Nella transizione cloroplasto-cromoplasto, quindi, vi è una diversa attività dei vari enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS.

La riduzione dell'attività e la diminuzione delle quantità di catalasi, asco-

bato perossidasi e tioredossina possono essere responsabili dell'accumulo di ROS e in particolare di perossido d'idrogeno durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto (Jimenez et al., 2002).

I ROS potrebbero avere un ruolo nel regolare l'espressione genica, in particolare è possibile che esercitino un controllo post-traduzionale di geni plastidiali: è noto infatti dalla letteratura (Shao et al., 2007) che questi geni sono controllati in maniera post-traduzionale da queste molecole.

### Metabolismo degli amminoacidi

Nel campione verde, e nel rosso, seppure in quantità trascurabile rispetto al verde, è stato individuato l'enzima per la sintesi di cisteina. Questo aminoacido è il precursore della biosintesi di metionina, glutatione e metaboliti secondari (Bonner et al., 2005), dalla SAM (S-adenosil-metionina) viene prodotto l'etilene (ciclo della metionina), fondamentale per scatenare i processi di *ripening* (cfr. introduzione). In genere abbiamo riscontrato, in accordo con il lavoro di Faurobert et al., 2007, una riduzione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi, eccezione fatta per l'aspartato amino transferasi coinvolta in molte vie metaboliche.

### Degradazione proteica

L'osservazione dei plastidi al microscopio elettronico mostra chiaramente che le strutture granali, tipiche del cloroplasto, sono distrutte e rimpiazzate da altri tipi di membrane con la caratteristica morfologia ondulata, come le CIMs e i tubuli. Inoltre rispetto ai cloroplasti aumentano di numero e dimensione i plastoglobuli, spesso connessi da strutture tubulari.

La endopeptidasi Clp (ATP binding subunit) è presente nello stadio A e in quello R (dati di 2D-PAGE/MS). Questo enzima viene ritrovato anche nel verde piccolo, integrando questi dati con quelli della MudPIT. Le Clp proteasi sono una grande famiglia di proteasi, ATP dipendenti, che nelle piante superiori si trovano localizzate nei cloroplasti. L'enzima solubile, probabilmente a più subunità, presente nello stroma, è codificato in parte dal nucleo (ClpC, subunità ATPasica regolatoria) in parte dal genoma plastidiale (ClpP, subunità proteolitica di tipo serin proteasi). È stata inoltre individuata in pomodoro un'ulteriore subunità proteolitica, codificata dal genoma nucleare, molto simile a ClpP (Schaller and Ryan, 1996). Questa proteasi Clp è coin-

volta nella degradazione di CAO ( clorofilla a ossigenasi), enzima finale della via di biosintesi di clorofilla b, che di conseguenza controlla il livello di Chl b e anche il livello di proteine antenna (Nakagawara et al., 2007), infatti senza clorofilla b, le proteine antenna non si ripiegano correttamente.

Altri enzimi proteolitici, la leucina aminopeptidase e due FtsH-like protein (ATP dipendente come Clp proteasi) sono presenti solo nel campione verde (dati MudPIT).

In particolare la FtsH è coinvolta nella degradazione di PSII da foto inibizione (Adam et al., 2001). Noi supponiamo che la proteasi FtsH, la leucina aminopeptidase e la proteasi Clp inizino la rimozione delle strutture fotosintetiche nel cloroplasto, mentre nel cromoplasto la proteasi Clp completa la loro demolizione, andando ad attaccare la clorofilla a ossigenasi (CAO), responsabile della sintesi di clorofilla b.

Per sostenere questa ipotesi ci basiamo sul fatto che in letteratura è riportata la degradazione di CAO da parte della proteasi Clp. Le proteine antenna, inoltre, sono le sole a legare clorofilla di tipo b. Ne consegue che la riduzione dell'ossigenasi riduce la quantità di clorofilla disponibile per il *fold*ing di queste proteine, senza la quale tale processo non avviene. L'attività della proteasi Clp, quindi, riduce l'abbondanza delle proteine antenna fotosintetiche. Un'ulteriore evidenza che supporta la suddetta ipotesi consiste nel fatto che la mutazione *chlorina* in orzo e *Arbidopsis*, in cui la funzione della clorofilla a ossigenasi è soppressa, provoca la scomparsa delle proteine antenna (Dall'Osto et al., Dati non pubblicati).

Infine le proteasi Clp e FtsH potrebbero avere un ruolo nella biogenesi dei plastidi: infatti, negli ezioplasti questi enzimi rappresentano la maggior parte delle proteine presenti, come è riportato in letteratura (Kanervo et al., 2008), e in particolare la proteasi Clp è ritrovata anche nei proplastidi (Asim Siddique et al., 2006), progenitori delle altre tipologie di questi organelli.

#### Plastid lipid Associated proteins (PAP)

Dai dati derivanti dalla 2D-PAGE/MS si osserva un accumulo di PAP (Plastid lipid Associated Proteins) parallelo alla maturazione, mentre dai dati di shotgun proteomic vi è un sostanziale aumento di CHRC (famiglia delle PAP) nello stadio R. CHRC è coinvolta nella compartimentalizzazione dei carotenoidi nelle strutture plastoglobulari. Evidenze per questa ipotesi si trovano nel fatto che i livelli di trascritto e di proteina aumentano parallelamente all'accumulo di carotenoidi (Deruere et al., 1994) e che un omologo di

CHRC è stato identificato sulla superficie dei plastoglobuli. L'accumulo dei membri di questa famiglia di proteine è accelerato da vari stress: es. CDSP34 di *S. tuberosum* viene accumulato in condizioni di stress ossidativo (Monte et al., 1999). Inoltre noi abbiamo una plastid lipid associated protein 1 nello stadio verde piccolo e una lipid associated protein 3 in quello rosso. Questo potrebbe significare che esistono varie isoforme di queste proteine, specifiche per lo stadio di sviluppo in cui vengono espresse, che potrebbero avere addirittura con funzioni diverse: nei primi stadi di sviluppo potrebbero organizzare e immagazzinare i carotenoidi, mentre le isoforme degli stadi successivi potrebbero avere un ruolo nella protezione dallo stress ossidativo. Sarà interessante procedere a silenziare queste funzioni tramite *RNA interference* per verificare un possibile effetto nella organizzazione del licopene nei cromoplasti o nella fotosintesi.

### Metabolismo dei lipidi

Per quanto riguarda il metabolismo dei lipidi, si riscontra l'accumulo di lipossigenasi nel campione rosso, in linea con il dato riportato da Faurobert et al., 2004. La presenza di questi enzimi è determinante nella sintesi dell'acido jasmonico, un importante messaggero cellulare, coinvolto nella regolazione di molti processi come la risposta a stress biotici e abiotici, ad esempio il danno per eccesso di luce o lo stress idrico.

Oltre alla sintesi di questo ormone, la presenza di lipossigenasi e di altri enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico, potrebbe presupporre la presenza di una tappa di degradazione e modificazione delle membrane con la maturazione. Infatti nel campione rosso sparisce anche la carbossil trasferasi, coinvolta nella sintesi delle membrane, e aumentano altri enzimi degradativi, come le acido grasso idrossilasi, citocromo P450 dipendenti.

### Chaperonine e HSP

Le chaperonine e le HSP si accumulano principalmente nel campione A (dati 2D-PAGE/MS). In particolare la HSP 60 è presente solo nello stadio R, risultato contrastante con quelli precedentemente riportati in letteratura (Faurobert et al., 2004). Tuttavia, dai dati MudPIT, questa heat shock protein è presente anche nel campione VP. Sempre dai dati ottenuti da 2D-PAGE/MS la HSP 21 è presente in tutti gli stadi, in quantità maggiore

nel VM e nel A, come la HSP10 (sempre facente parte della famiglia delle small HSP).

In particolare, da quanto emerge dai risultati della MudPIT si accumula nel campione A e varie nel R, una small heat shock protein. A giudicare dal numero di sequenze appartenenti a chaperonine o a HSP, la loro funzione è indispensabile al processo di sviluppo del cromoplasto, anche se questo non è sottoposto a stress da calore (inteso come condizione di induzione quando queste classi di proteine furono scoperte) ma piuttosto di stress ossidativo.

La tesi che le HSP possano essere coinvolte in molti sistemi in sviluppo è già stata proposta (Christians et al., 2003). Il caso della bacca del pomodoro sembra una situazione estrema, con ben 16 tra HSP e chaperonine riscontrate. Anche qui sarà necessario ricorrere a RNA-i per verificare il ruolo delle HSP più espresse nella cromoplastogenesi.

In pomodoro, la HSP 70 è regolata in modo sviluppo specifico (Duck et al., 1989). Nel database TIGR EST la sua espressione è concomitante allo stadio di transizione da cloroplasto a cromoplasto ed è stata individuata anche in cromoplasti di peperone.

Il ruolo di queste proteine è probabilmente quello di prevenire l'aggregazione di proteine denaturate e/o di facilitare il corretto ripiegamento delle proteine aggregate durante lo stress ossidativo nel frutto. Questo stesso ruolo è stato suggerito per le HSP (Sun et al., 2002). Oltre a ciò Neta-Sharir (Neta-Sharir et al., 2005) ha dimostrato che la HSP 21 protegge il PSII da stress ossidativo-temperatura dipendente, ma anche promuove l'accumulo di carotenoidi durante lo sviluppo del frutto. Un'altra small HSP (*vis1*) è coinvolta nella de-polimerizzazione della pectina durante il ripening, determinando la particolare viscosità del frutto di pomodoro.

Un ruolo particolare potrebbe essere svolto dalla chaperonina DnaJ: il gene *Or* di cavolfiore, espresso in patata causa la differenziazione di cromoplasti (Li et Van Eck, 2007). Questa proteina ha in comune con DnaJ un motivo di tipo "Cys rich zinc finger" (Giuliano et Diretto, 2007). La proteina DnaJ potrebbe quindi essere coinvolta nella divisione dei cloro/cromoplasti durante lo sviluppo del frutto, come ipotizzato dal lavoro di G. Giuliano e G. Diretto.

### Proteine "unknown"

Nella frazione di membrana dell'analisi MudPIT sono presenti 22 proteine definite "unknown", di cui solamente 4 sono presenti nel campione R, men-

tre tra le proteine solubili, quelle con funzione sconosciuta sono così ripartite: 6 nel campione VP, 2 in quello R e 2 conservate in entrambi gli stadi di sviluppo.

Queste potrebbero rappresentare proteine con funzioni specifiche durante la cromoplastogenesi, ipotesi che verrà verificata in futuro con mutagenesi o RNA-interference.

I dati derivanti dalla *shotgun proteomic* mostrano dunque che tra le proteine di membrana, durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto, vi è una forte diminuzione delle proteine fotosintetiche, mentre vi è un aumento dell'espressione di HSP, chaperonine e di proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi (citocromo P450 idrossilasi e lipossigenasi). Tra le proteine solubili, durante la transizione tra cloroplasto e cromoplasto, vi è diminuzione delle attività del metabolismo primario, del ciclo di Calvin e del metabolismo degli aminoacidi, mentre aumentano le proteine PAP, associate ai lipidi e coinvolte nella formazione delle strutture che immagazzinano i carotenoidi, come, ad esempio, i plastoglobuli (Leitner-Dagan et al., 2006).

## CONCLUSIONI

In questo lavoro abbiamo studiato le modificazioni del plastidio associate alla maturazione della bacca di pomodoro attraverso misure proteomiche, fisiologiche e di specifici metaboliti. La cromoplasto genesi è associata alla degradazione progressiva dell'apparato foto sintetico e alla comparsa di "plastid lipid associated proteins". La funzione di queste proteine è sconosciuta ma diversi lavori le associano alla organizzazione dei pigmenti nei cromoplasti di petali e frutti. Le PAP, in virtù della loro aumentata espressione in diverse condizione di stress, potrebbero essere funzionalmente associate al gruppo delle "heat shock proteins" (Leitner-Dagan et al., 2006) L'accumulo di HSP durante tutto il processo della cromoplastogenesi è l'aspetto più sorprendente di questo lavoro in quanto sono stati trovate almeno 16 di questa famiglia solo nel proteoma plastidico e il loro accumulo è associato agli stadi arancione e rosso in cui il processo di sviluppo subisce una drastica accelerazione. Inoltre, anche nella frazione considerata "contaminante" la presenza di membri di questa famiglia è massiccia, con una trentina di proteine identificate. Non è da escludere che queste possano trovarsi associate alla membrana esterna del plastidio, come abbiamo precedentemente postulato. Noi proponiamo che le proteine HSP abbiano un ruolo importante nello sviluppo come già

ipotizzato nello sviluppo embrionale (Christians et al., 2003) e nello sviluppo del seme (Dafny-Yelin, 2008). L'analisi proteomica è risultata interessante per proporre ipotesi sul processo di maturazione. Nel proseguo del lavoro intendiamo procedere alla verifica di tali ipotesi, attraverso l'inibizione della sintesi di alcune delle proteine identificate per RNA-interference. Dal punto di vista metodologico, il confronto tra i due metodi impiegati, 2D-PAGE e shotgun proteomic, ha confermato che la seconda tecnica permette di ottenere dati più rappresentativi dello stato del proteoma in analisi e richiede un minore investimento rispetto alla prima.

#### RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato finanziato dal fondo FIRB RBLA0345SF002.

#### RIASSUNTO

La differenziazione dei plastidi dal cloroplasto al cromoplasto è stata studiata nei frutti di *Solanum lycopersicum*, applicando un approccio di analisi proteomica combinato. In particolare sono state applicate le tecniche proteomiche 2D-PAGE/MS e MudPIT LC / MS su plastidi isolati da quattro stadi diversi di maturazione della bacca di pomodoro, ottenendo l'identificazione di 556 proteine, tra cui 233 con localizzazione plastidiale. I nostri risultati permettono di chiarire la distribuzione durante la maturazione dei frutti di prodotti genici coinvolti in diverse funzioni metaboliche, come zuccheri, lipidi, aminoacidi, proteine, assimilazione di azoto e zolfo, biosintesi di tetrapirroli e carotenoidi, la fotosintesi e gli stress abiotici. In particolare le proteine fotosintetiche sono accumulate in tutte le fasi di maturazione, anche se fortemente ridotte nei frutti rossi maturi.

#### ABSTRACT

Plastid differentiation from chloroplast to chromoplast has been studied in *Solanum lycopersicum* fruits, applying a combined proteomic approach. In particular 2D-PAGE/MS and MudPIT LC/MS proteomic analysis performed on plastids isolated from four different fruit ripening stages, allowed identifying 556 tomato proteins, among which 233 with plastid localization. Our results elucidate the distribution during fruit ripening of gene products involved in different metabolic functions as sugars, lipids, amino acids, protein, nitrogen and sulphur metabolism, tetrapyrroles and carotenoids biosynthesis, photosynthesis and abiotic stress. In particular photosynthetic proteins are accumulated in all ripening stages, even if strongly reduced in mature red fruits.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAM Z., OSTERSETZER O. (2001): *Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins*, «Biochemical Society Transactions», 29, pp. 427-430.
- ASIM SIDDIQUE M., GROSSMANN J., GRUISSEM W., BAGINSKY S. (2006): *Proteome analysis of bell pepper (Capsicum annuum L.) chromoplasts*, «Plant Cell Physiology», 47, 12, pp. 1663-1673.
- BALLOTTARI M., DALL'OSTO L., MOROSINOTTO T., BASSI R. (2007): *Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation*, «J. Biol. Chem.», 282, 12, pp. 8947-58.
- BOUVIER F., BACKHAUS R.A., CAMARA B. (1998): *Induction and control of chromoplast specific carotenoid genes by oxydative stress*, «The Journal of Biological Chemistry», 273, 46, pp. 30651-30659.
- CAFFARRI S., FRIGERIO S., OLIVIERI E., RIGHETTI P.G., BASSI R. (2005): *Differential accumulation of Lhcb gene products in thylakoid membranes of Zea mays plants grown under contrasting light and temperature conditions*, «Proteomics», 5, pp. 758-768.
- CAMARA B., HUGUENEY P., BOUVIER F., KUNZ M., MONEGER R. (1995): *Biochemistry and molecular biology of chromoplast development*, «International Review of Cytology», 163, pp. 175-247.
- CARRARI F., FERNIE A.R. (2006): *Metabolic regulation underlying tomato fruit development*, «Journal of Experimental Botany», 50, 9, pp. 1883-1897.
- CHASTAIN C.J., FRIES J.P., VOGEL J.A., RANDKLEV C.L., VOSSEN A.P., DITTMER S.K., WATKINS E.E., FIEDLER L.J., WACKER S.A., MEINHOVER K.C., SARATH G., CHOLLET R. (2002): *Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in Leaves and Chloroplasts of C3 Plants Undergoes Light/Dark-Induced Reversible Phosphorylation1*, «Plant Physiology», 128, pp. 1368-1378.
- CHRISTIANS E.S., ZHOU Q., RENARD J., BENJAMIN I.J. (2003): *Heat shock proteins in mammalian development*, «Semin. Cell. Dev. Biol.», 14, 5, pp. 283-90.
- CROCE R., CANINO G., ROS F., BASSI R. (2002): *Chromophore organization in the higher plant Photosystem II antenna protein CP26*, «Biochemistry», 41, pp. 7334-7343.
- DAFNY-YELIN M., TZFIRA T., VAINSTEIN A., ADAM Z. (2008): *Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in Arabidopsis*, «Plant Molecular Biology», 67, pp. 363-373.
- DEBASHISH BHATTACHARYA, LINDA MEDLIN (1998): *Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants*, «Plant. Physiol.», 116, pp. 9-15.
- FAUROBERT M., MIHR C., BERTIN N., PAWLOWSKI T., NEGRONI L., SOMMERER N., CAUSSE M. (2007): *Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening*, «Plant. Physiol.», 143, pp. 1327-1346.
- FRIGERIO S., CAMPOLI C., ZORZAN S., FANTONI L.I., CROSATTI C., DREPPER F., HAEHNEL W., CATTIVELLI L., MOROSINOTTO T., BASSI R. (2007): *Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level*, «J. Biol. Chem.», 282, 40, pp. 29457-69.
- GIANAZZA E., CHILLEMI F., DURANTI M., RIGHETTI P.G. (1983): *Analytical and preparative isoelectric focusing of peptides in immobilized pH gradients*, «J. Biochem. Biophys. Methods», 8, pp. 339-351.
- GIOVANNONI J.J. (2004): *Genetic regulation of fruit development and ripening*, «The Plant Cell», 16, pp. 170-180, Supplement 2004.
- GIULIANO G., DIRETTO G. (2007): *Of chromoplasts and chaperones*, «Trend in plant science», 12, 12, pp. 529-531.

- GORDON, J.A., JENCKS, W.P. (1963): *The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins*, «Biochemistry», 2, pp. 47-57.
- HAGEL P., GERDING J.J., FIEGGEN W., BLOEMENDAL H. (1971): *Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH*, «Biochim. Biophys. Acta», 243, pp. 366-373.
- HEBER U., WALKER D. (1992): *Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves*, «Plant Physiology», 100, pp. 1621-1626.
- HERBERT B.R., MOLLOY M.P., GOOLEY A.A., WALSH B.J., BRYSON W.G., WILLIAMS, K.L. (1998): *Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent*, «Electrophoresis», 19, pp. 845-851.
- JIMENEZ A., CREISSEN G., KULAR B., FIRMIN J., ROBINSON S., VERHOEYEN M., MUL-LINEAUX P. (2002): *Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening*, «Planta», 214, pp. 751-758.
- KANERVO E., SINGH M., SUORSA M., PAAKKARINEN V., ARO E., BATTCHIKOVA N., ARO EM. (2008): *Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etioplasts to chloroplasts in pea (Pisum sativum)* «Plant Cell Physiol.», 49, 3, pp. 396-410.
- KHACHIK F., CARVALHO L., BERNSTEIN P. S., MUIR G.J., DA-YOU ZHAO, KATZ N.B. (2002): *Chemistry, Distribution, and Metabolism of Tomato Carotenoids and Their Impact on Human Health*, «Experimental Biology and Medicine», 227, pp. 845-851.
- KOHLER R.H., CAO J., ZIPFEL W.R., WEBB W.W., HANSON M.R. (1997): *Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids*, «Science», 276, pp. 2039-2042.
- LEITNER-DAGAN Y., OVADIS M., SHKLARMAN E., ELAD Y., RAV DAVID D., VAINSTEIN A. (2006): *Expression and functional analyses of Plastid Lipid Associated Protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress*, «Plant Physiology», 142, pp. 233-244.
- LI L., VAN ECK J. (2007): *Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink*, «Transgenic Res. Oct», 16(5), pp. 581-5.
- LJUBESIC N., WRISCHER M., DEVIDE Z. (1991): *Chromoplasts - the last stages in plastid development*, «Int.I. Dev.Biol.», 35, pp. 251-258 .
- MOLLOY M.P., HERBERT B.R., WALSH B.J., TYLER M.I., TRAINI M., SANCHEZ J.C., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L., GOOLEY A.A. (1998): *Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis*, «Electrophoresis», 19, pp. 837-844.
- MUIR SR., COLLINS G.J., ROBINSON S., HUGHES S., BOVY A., DE VOS CHR., VAN TUNEN AJ., VERHOEYEN ME. (2001): *Over expression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols*, «Nature Biotechnology», 19, pp. 470-474.
- NÄGELE E., VOLLMER M., HÖRTH P., VAD C. (2004): *2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures*, «Expert Rev. Proteomics», 1(1), pp. 37-46 .
- NETA-SHARIR I., ISAACSON T., LURIE S., WEISS D. (2005): *Dual Role for Tomato Heat Shock Protein 21: Protecting Photosystem II from Oxidative Stress and Promoting Color Changes during Fruit Maturation*, «The Plant Cell», 17, pp. 1829-1838.
- NIYOGI K. K (1999): *Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches*, «Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.», 50, pp. 333-59.
- PARRY A.J., KEYS A.J., MADGWICK P.J., CARMO-SILVA A.E., ANDRALOJC P.J. (2008): *Rubisco regulation: a role for inhibitors*, «Journal of Experimental Botany», 59, 7, pp. 1569-1580.

- POZUETA-ROMERO J., RAFIA F., HOULNÉ C., CHENICLET C., CARDE J.P., SCHANTZ M.L., SCHANTZ R. (1997): *A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts*, «Plant Physiol», 115, pp. 1185-1194.
- RABILLOUD T., ADESSI C., GIRAUDEL A., LUNARDI J. (1997): *Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*, «Electrophoresis», 18, pp. 307-316.
- RAMAKRISHNA W., DENG Z., DING CK., HANDA AK., OZMINKOWSKI RH JR. (2003): *A novel small heat shock protein gene, vis1, contributes to pectin depolymerization and juice viscosity in tomato fruit*, «Plant Physiol.», 131(2), pp. 725-35.
- RIGHETTI P.G. (1990): *Recent developments in electrophoretic methods*, «J.Chromatogr.», 516, pp. 3-22.
- SCHALLER A., RYAN CA. (1996): *Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein*, «Plant Mol Biol», 31, pp. 1073-1077.
- SHAO N., KRIEGER-LISZKAY A., SCHRODA M., BECK CF. (2007): *A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced in vivo*, «Plant Journal», 50 (3), pp. 475-87.
- SOKOLENKO A., LERBS-MANCHE S., ALTSCHMIED L., HERRMANN R.G. (1998): *Clp protease and their diversity in chloroplast*, «Planta», 207, pp. 286-295.
- SUMMER E., CLINE K. (1999): *Red bell pepper chromoplast exhibit in vitro import competency and membrane targeting of passenger proteins from thylakoid Sec and ΔpH pathways but not signal recognition particle pathway*, «Plant physiology», 119, pp. 575-584.
- SUN W., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN, N. (2002): *Small heat shock proteins and stress tolerance in plants*, «Biochim. Biophys. Acta», 1577, pp. 1-9.
- SWANSON S.K. AND WASHBURN M.P. (2005): *The continuing evolution of shotgun proteomics*, «Drug Discovery Today», 10, n. 10, pp. 719-725.
- VALLON O., BULTE L., DAINESE P., OLIVE J., BASSI R., WOLLMAN FA. (1991): *Lateral redistribution of cytochrome b6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions* «Proc. Natl. Acad. Sci. U S A», 88(18), pp. 8262-6.
- VERHOEYEN M. E., BOVY A., COLLINS G., MUIR S., ROBINSON S., DE VOS C. H. R. AND COLLIVER S. (2002): *Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway*, «Journal of Experimental Botany», 53, 377, pp. 2099-2106.
- WILKINS M.R., GASTEIGER E., SANCHEZ J.C., BAIROCH A., HOCHSTRASSER D.F. (1998): *Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number*, «Electrophoresis», 19, pp. 1501-1505.