

Espressione differenziale di alfa e beta tubulina come marker dello sviluppo in *Vitis vinifera* L.

INTRODUZIONE

Il citoscheletro delle cellule vegetali è una combinazione di differenti proteine che, interagendo specificatamente tra loro, servono al mantenimento della posizione e della dinamica di varie strutture endocellulari. Questa rete proteica è necessaria alla stabilità strutturale del citoplasma, all'ancoraggio di proteine e altre macromolecole, partecipa all'assemblaggio del fuso mitotico durante la separazione dei cromosomi, mantiene un preciso ordine interno alla cellula e contribuisce alla sintesi e alla struttura della parete cellulare nelle piante (Nick, 2007). I microtubuli sono polimeri eterodimerici di proteine globulari (α - e β -tubulina); queste ultime si allineano testa-coda a formare protofilamenti di lunghezza variabile. Generalmente, 13 protofilamenti formano un cilindro con diametro di circa 25 nm, il microtubulo. La caratteristica dei microtubuli è di essere dinamici, essendo capaci di assemblarsi e disassemblarsi rapidamente in risposta a fattori molto diversi e capaci di determinare la lunghezza e la stabilità dei microtubuli stessi.

La tubulina è il componente principale del citoscheletro microtubulare ed esiste come due subunità distinte molto simili in sequenza e struttura (α e β). Le due proteine sono codificate da famiglie multigeniche, il cui numero varia da specie a specie. Generalmente, l'isoforma α è codificata da un numero minore di geni (da 4 a 6) rispetto all'isoforma β (che è invece codificata da 7-9 geni). Queste famiglie geniche sono state caratterizzate in poche specie vegetali. In *Arabidopsis*, sono presenti 6 geni per la α -tubulina (Kopczak et al., 1992) e 9 geni per la β -tubulina (Snustad et al., 1992). Questi geni non

* Università di Siena, Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti"

sono espressi in maniera uniforme nella pianta, ma mostrano un differente schema di espressione in rapporto ai vari tessuti. La forma $\alpha 1$ è presente solo nei fiori, mentre le forme $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$ sono espresse in maniera uniforme nelle radici, nelle foglie e nei fiori. La forma $\alpha 5$ è soprattutto espressa nei fiori, mentre la forma $\alpha 6$ è espressa a deboli livelli nei vari tessuti. La stessa variabilità si riscontra per le forme β . La $\beta 1$ è espressa soprattutto nelle radici, come la $\beta 5$; al contrario, la forma $\beta 2$ si trova principalmente nelle radici e nei fiori così come la forma $\beta 3$; la $\beta 5$ è prevalente nei fiori, la $\beta 6$ invece si trova nelle foglie, così come $\beta 8$ e $\beta 9$. Durante lo sviluppo delle foglie di orzo, i geni TuA2 (codificante per una tubulina $\alpha 3$) e TuA4 sono principalmente espressi nei meristemi mentre il gene TuA3 è espresso durante il processo di morfogenesi cellulare e i geni TuA5 e TuA1 sono espressi nelle cellule post-mitotiche (Schroder et al., 2001). Un altro esempio ben conosciuto è rappresentato dal riso. Il gene TubA1 (codificante per la tubulina $\alpha 1$ in questa specie) si accumula prima della fioritura così come il gene TubA2, mentre il gene TubA3 è molto abbondante durante il processo di antesi. È stato anche dimostrato che l'espressione delle varie isoforme di α -tubulina è regolata dagli ormoni: le forme TubA1 e TubA2 non sono regolate dall'ormone auxina, mentre i livelli della forma TubA3 sono molto stimolati nei coleottili trattati con auxina (Qin et al., 1997). Un tratto abbastanza comune alle analisi genetiche condotte in piante differenti è la presenza di un gene codificante per una α -tubulina specificatamente espressa negli stadi tardivi dello sviluppo florale (solitamente nel polline); questo è stato dimostrato in *Camellia sinensis* (Fang et al., 2006) e in *Arabidopsis* (Carpenter et al., 1992). Anche se la somiglianza tra le sequenze geniche delle tubuline di una specie è notevole, ogni pianta generalmente utilizza diversi set di tubuline durante il proprio sviluppo. Il motivo di tale scelta è poco nota, ma sicuramente importante. Infatti, uno sviluppo alterato delle piante è spesso caratterizzato da disturbi nel bilanciamento della quantità e tipo dei monomeri o dimeri di tubulina. Inoltre, la riduzione dell'espressione di specifici geni della tubulina può causare notevoli alterazioni nella morfologia delle radici e nella direzionalità della loro crescita (Mathur & Hülskamp, 2002). Inoltre, geni specifici della tubulina β sono sicuramente coinvolti nel determinare l'orientamento delle fibrille di cellulosa nelle pareti cellulari; di conseguenza, l'angolo delle microfibrille di cellulosa è fortemente correlato con l'espressione specifica di geni della tubulina (Spokevicius et al., 2007). Nei casi in cui l'analisi genetica non sia possibile a causa della mancanza di sequenze, l'analisi della distribuzione d'isotipi nei vari tessuti è stata eseguita utilizzando anticorpi specifici diretti contro le subunità α e β . Per esempio, nel cotone sono state identificate 9 isoforme di α -tubulina e

7 isoforme di β -tubulina mediante immunoblot dopo elettroforesi 2-D (Dixon et al., 1994). Questi pochi ma significativi dati dimostrano l'importanza dell'espressione di geni specifici della tubulina nel mantenere il corretto sviluppo morfogenetico delle piante.

La vite (*Vitis vinifera* L.) è una pianta arbustiva rampicante della famiglia delle Vitacee che, per crescere, si attacca a dei sostegni (tutori) mediante i viticci o pampini; si tratta di una pianta perenne a fusto legnoso che produce uno dei frutti più economicamente importanti al mondo, l'uva, utilizzata sia per l'alimentazione sia principalmente per la produzione di vino. Alla luce della sua importanza economica, il genoma della vite è stato recentemente sequenziato (Jaillon et al., 2007). Lo sviluppo del fiore rappresenta un aspetto fondamentale nel ciclo vitale delle piante, e ovviamente anche nella vite rappresenta un punto critico poiché l'ovario si trasformerà nel frutto (il prodotto maggiormente importante da un punto di vista economico commerciale). La specie *Vitis Vinifera* è responsabile della produzione di uva e la resa in termini di frutti può essere molto variabile da anno ad anno, in dipendenza di diversi fattori (climatici, ambientali, ecc.). Risulta quindi evidente e importante comprendere il processo di fioritura della vite allo scopo di ottimizzare la produzione dei frutti. Il modello di fioritura studiato in *Arabidopsis* potrebbe non applicarsi correttamente alla vite (Quesada et al., 2005). È pertanto necessario descrivere correttamente il processo di sviluppo del fiore direttamente nella vite (Boss et al., 2003). Da un punto di vista morfologico, lo sviluppo del fiore della vite è caratterizzato dalla presenza di strutture meristematiche riproduttive e vegetative sullo stesso pezzo di fusto. Questa è una differenza fondamentale rispetto, per esempio, ad *Arabidopsis* nel quale i meristemi vegetativi sono dirottati verso una fase riproduttiva in seguito a stimoli ambientali.

Una gemma cresce producendo un primordio fogliare laterale che quindi si sviluppa in una foglia. Questo processo si ripete normalmente per almeno tre volte, dopo di che il meristema apicale ha la capacità di produrre due tipi di primordi: un successivo primordio fogliare e un primordio indifferenziato che potrà avere due destini differenti. Secondo le condizioni ambientali e la posizione del ramo nel corpo della pianta, il primordio indifferenziato potrà evolvere formando un fiore oppure un viticcio. I primordi indifferenziati sono strutture essenziali per lo sviluppo dell'infiorescenza e per l'architettura complessiva della pianta stessa (fig. 1).

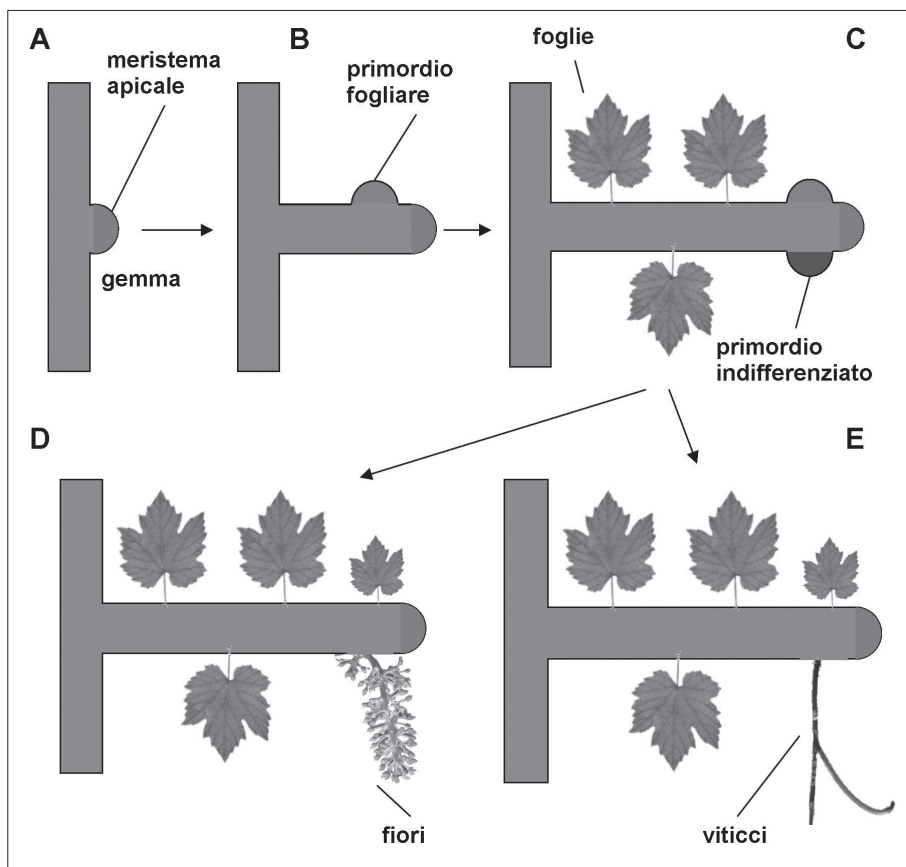


Fig. 1 Schema della formazione di fiori, foglie e viticci nella vite. Nel disegno è riportata la gemma iniziale con il meristema apicale (A), il primordio fogliare (che origina le foglie) (B), il primordio indifferenziato (C), che a sua volta può produrre fiori (D) oppure i viticci (E). I vari elementi non sono stati disegnati in scala

Allo scopo di monitorare i cambiamenti nell'espressione delle isoforme di tubulina durante lo sviluppo delle gemme nelle strutture vegetative o riproduttive nella vite, abbiamo utilizzato un approccio di tipo proteomico, basato su estrazione standardizzata di proteine da differenti organi, seguito dalla separazione delle proteine in elettroforesi bidimensionale in combinazione con lo screening mediante anticorpi commerciali, per identificare le varie isoforme di tubulina in determinati organi della vite. Oltre a un approccio proteomico, abbiamo anche utilizzato un approccio genetico, fondato sull'annotazione bioinformatica dei geni di α - e β - tubulina allo scopo di identificare i geni putativi presenti nel genoma della vite. L'annotazione bioinformatica

ha lo scopo di ottenere le sequenze dei geni da confrontare successivamente con quelle ottenute dal sequenziamento degli spot proteici ottenuti con l'approccio proteomico.

APPROCCIO SPERIMENTALE

Gli anticorpi rivolti contro la α tubulina usati nel lavoro sono i seguenti: **B-5-1-2** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:5,000), **Yol 1/34** (monoclonale di ratto, Chemicon Int., diluito 1:500-1000), **TU-01** (monoclonale di topo, ZYMED Laboratories, diluito 1:250-500), **aN-18** (policlonale di capra, SantaCruz Biotechnology, diluito 1:500-1000), **TUB-1A2** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:500-1000) **6-11B-1** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:2000), **DM-1A** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:500-1000), **ATN-02** (policlonale di pecora, Cytoskeleton, diluito 1:500-1000). Gli anticorpi utilizzati per la isoforma β sono: **aE-14** (policlonale di capra, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:500), **TU-06** (monoclonale di topo, Monosan, diluito 1:300), **TUB 2.1** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:450), **aN-18** (policlonale di capra, SantaCruz Biotechnology, diluito 1:100-1000), **D66** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:250), **TU-13** (monoclonale di topo, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:100), **aC-18** (policlonale di capra, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:250), **aF-14** (policlonale di pecora, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:250), **T3526** (intero siero, Sigma-Aldrich, diluito 1:500). Gli anticorpi secondari, coniugati con perossidasi di "horseradish" (*Amoracia rusticana*) (HRP) e utilizzati in immunoblotting per l'analisi delle α - e β -tubuline sono: **Anti-topo** dalla GE HealthCare (B-5-1-2, DM1A, 6-11-B-1, TU01, TUB-1A2) utilizzato alla diluizione di 1:5000, **Anti-topo** prodotto dalla ZYMED (D66, Tu-13, TUB 2.1, Tu-06) alla diluizione di 1:5000, **Anti-ratto** prodotto dalla Chemicon International (Yol 1/34) utilizzato alla diluizione di 1:5000, **Anti-pecora** dalla Cytoskeleton (ATN-02) diluito 1:10000, **Anti-capra** dalla SantaCruz Biotechnology (aN-18, aE-14, aC-18, aF-14) con una diluizione di 1:5000, **Anti-coniglio** prodotto dalla GE HealthCare (T-3526) usato alla diluizione di 1:3000.

Allo scopo di ottenere un estratto proteico quantitativamente e qualitativamente idoneo alle successive analisi elettroforetiche sia in monodimensionale sia in bidimensionale, il materiale vegetale è stato processato utilizzando diversi protocolli, schematizzati in figura 2.

Il metodo alla fine scelto e utilizzato per il lavoro è il "METODO FE-

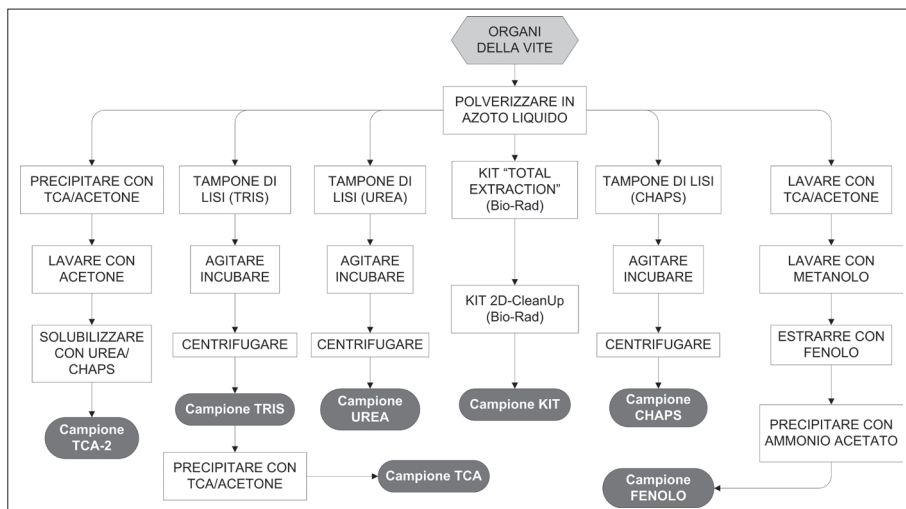


Fig. 2 Schema riassuntivo dei vari processi utilizzati per l'estrazione di proteine da tessuti e organi della vite. Sono riportati schematicamente i punti fondamentali dei protocolli testati per ottimizzare l'estrazione delle proteine dai vari campioni e tessuti presi in considerazione

NOLO", ripreso da un protocollo già pubblicato (Wang et al., 2006). Il primo passaggio nella procedura di estrazione consiste nel congelare i tessuti in azoto liquido e poi nella macinazione dei tessuti (utilizzando mortaio e pestello) fino ad avere una polvere finissima. La polvere è trasferita in tubi da centrifuga a cui sono aggiunti 20 ml di 10% TCA, 50 mM DTT in acetone freddo; dopo agitazione con vortex, il campione è centrifugato a 16000 g per 3 minuti a 4°C e il sopranatante è scartato. Il pellet è quindi lavato con 20 ml di 80% acetone (freddo) contenente 50 mM DTT, (agitando al vortex) e poi centrifugato a 16000 g per 3 minuti a 4°C. Il sopranatante è scartato e il pellet fatto asciugare all'aria per 30 minuti. A questo punto si aggiunge fenolo (pH 8) e il "tampone SDS" (2% SDS, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 5% 2-mercaptoetanolo, 30% saccarosio) in parti uguali (solitamente 6+6 ml). Dopo aver agitato vigorosamente con il vortex, il campione è incubato per 10 minuti. Dopo una successiva centrifugazione a 16000 g per 3 minuti, la parte fenolica superiore (circa 5 ml) è trasferita in un nuovo tubo a cui si aggiunge 25 ml di 0,1 M ammonio acetato in 80% metanolo. Dopo agitazione con vortex, il campione è incubato a -20°C per almeno 2 ore, quindi centrifugato a 16000 g per 5 minuti a 4°C, scartando il sopranatante. Il pellet è lavato con 20 ml di 100% metanolo e quindi con 80% acetone + 50 mM DTT, centrifugando dopo ogni passaggio a 16000 g per 3 minuti. Il pellet finale (denominato FENOLO) è lasciato asciugare all'aria, quindi dissolto nel tampone di reidra-

tazione/solubilizzazione per 2-D oppure nel tampone per l'elettroforesi 1-D.

Il calcolo della concentrazione proteica dei campioni estratti è stato eseguito tramite l'uso di un kit commerciale (*2-D Quant Kit* della GE Healthcare) e con l'ausilio di uno spettrofotometro.

La separazione delle proteine per mezzo di elettroforesi 1-D è stata effettuata su gel di poliacrilammide come descritto da Laemmli (1970). Il "separation gel" è stato allestito utilizzando una cella Mini PROTEAN II della Bio-Rad con spaziatori da 0,75 mm oppure da 1 mm (per gel 2-D), utilizzando pettini da 10 pozzetti oppure con un pozzetto unico (gel a tutto "slab"); i gel sono stati preparati alla concentrazione del 10%.

L'elettroforesi bidimensionale delle proteine è stata effettuata con il seguente protocollo. Le IPG strip (Immobiline Dry Strip della GE Healthcare) con gradiente di pH 4-7, 11 cm di lunghezza, sono state fatte reidrattare in una soluzione contenente il tampone di reidratazione/solubilizzazione (40 mM Tris, 8 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, bromofenolo blu in tracce), cui sono stati aggiunti 18 mM DTT e IPG Buffer pH 4-7 (20 µl/ml). Il tampone di reidratazione/solubilizzazione conteneva anche i campioni proteici da analizzare, la cui concentrazione era stata aggiustata a 1,5 mg/ml in modo da poter caricare 300 µg di proteine nelle strip. Le strip sono state reidratate overnight in un apposito contenitore (Immobiline Dry Strip Reswelling Tray della GE) e sono state ricoperte con il PlusOne Dry Strip Cover Fluid. Dopo la reidratazione, la corsa della prima dimensione è stata effettuata su una piastra raffreddata (Multiphor II della GE), tramite l'utilizzo dell'alimentatore EPS 3500 XL (della GE), usando il seguente schema: 1 minuto a 300 V, 1 ora e 30 minuti con un gradiente lineare da 300 a 3500 V e infine 3 ore e 30 minuti a 3500 V costanti. Al termine della corsa le strip sono state prelevate e conservate a -80°C. Per la seconda dimensione dell'elettroforesi 2-D, le strip sono state equilibrate per 15 minuti nel "equilibration buffer" (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerolo, 2% SDS, bromofenolo blu in tracce, 10 mg/ml DTT). Sono stati utilizzati gel "precast" (Criterion Tris-HCl Pre-Cast Gel, 10%, 11 cm, Bio-Rad), su cui sono state poggiate le strip ottenute dalla prima dimensione, bloccandole nella corretta posizione con agarosio. La corsa elettroforetica è stata eseguita con la Criterion Cell (Bio-Rad) a 200 V costanti.

I gel sono stati colorati con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) e le loro immagini sono state acquisite con il Fluor-S. In alternativa, le proteine nei gel sono state trasferite su nitrocellulosa utilizzando la Mini Trans-Blot Cell e la Criterion Blotter della Bio-Rad. Il tampone di trasferimento è stato preparato secondo il protocollo di Towbin et al. (1979), usando membrane di nitro-

cellulosa della Bio-Rad oppure della GE Healthcare. Il trasferimento delle proteine è stato eseguito a 100 V costanti, 350 mA, 200 W per 1 ora, usando l'alimentatore EPS 601 della GE Healthcare. La qualità del trasferimento proteico è stata valutata sia colorando le membrane con Ponceau S sia verificando il trasferimento corretto di standard precolorati Precision (Bio-Rad). Le membrane sono state in seguito bloccate per tutta una notte nella soluzione di bloccaggio costituita da 5% ECL Blocking agent della GE in TBS (20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl) e 0,1% Tween-20. Dopo un breve lavaggio in TBS, la membrana è stata incubata per un'ora con gli anticorpi primari (vedi elenco relativo), diluiti in una soluzione di TBS-T (TBS contenente 0,1% Tween-20). Dopo avere eseguito 3 lavaggi con 20 ml di TBS, la membrana è stata posta a incubare per un'ora con gli anticorpi secondari (vedi elenco relativo). Al termine dell'incubazione, abbiamo sottoposto la membrana a una nuova serie di lavaggi e quindi è stata aggiunta la miscela "ECL Plus Western Blotting Detection Reagents" (GE Healthcare) incubando la membrana per 5 minuti. Il segnale è stato quindi rilevato tramite il Fluor-S Multi-Imager della Bio-Rad, utilizzando il software Quantity One.

I gel e i blot sono stati acquisiti e analizzati tramite lo strumento Fluor-S (Bio-Rad) controllato dai software Quantity One e PDQuest (Bio-Rad). L'acquisizione delle immagini è stata ottenuta con il software Quantity One.

L'annotazione bioinformatica dei geni della tubulina è stata eseguita grazie anche alla collaborazione esistente con il centro di ricerca IGA (Istituto di Genomica Applicata) di Udine, uno dei principali attori nel progetto di sequenziamento. Il lavoro è consistito nell'individuare e annotare i probabili geni della tubulina presenti nella vite, prendendo come riferimento i geni di α e β tubulina presenti nella banca dati del genoma di *Arabidopsis thaliana*, in modo da verificare gli allineamenti che mostravano elevati gradi di omologia con i dati del genoma 12X di vite. L'annotazione bioinformatica dei geni di α e β tubulina consiste in una comparazione delle sequenze FASTA delle tubuline presenti nella banca dati di una specie modello (*Arabidopsis thaliana*) con il database del genoma della vite tramite Gbrowse (un software che fa parte del progetto GMOD, Generic Model Organism Database, una collezione di software open source per creare e gestire banche dati biologiche di genomi di diverse dimensioni; GBrowse è stato creato per facilitare l'utilizzo degli strumenti di bioinformatica Gmod con l'utilità di navigare, scaricare ed eseguire ricerche sui dati genomici annotati, http://gmod.org/wiki/Main_Page). La prima operazione è stata di scaricare le sequenze delle tubuline di *Arabidopsis* (6 sequenze di α e 9 sequenze di β); dopo tale operazione è stato effettuato un *tblastn* (Basic Local Alignment Search Tool; *tblastn* identifica la

ricerca nel database di nucleotidi tradotti usando una query proteica) sul genoma 12X di vite. Ciò ha permesso di identificare circa 120 allineamenti possibili di sequenza, segnando il comando di Low complexity. Gli allineamenti ritrovati sono stati analizzati riportando su GBrowse (Vitis 12X Annotation FINAL) le coordinate cromosomiche corrispondenti ai singoli allineamenti e verificando la presenza di geni predetti tramite GAZE GENE PREDICTIONS (Howe et al., 2002). Dopo aver identificato i geni presenti negli allineamenti migliori, è stata scaricata la sequenza genomica dei geni ritrovati ed effettuato un *blastx* (ricerca in database proteici usando una query di nucleotide tradotto) sui database proteici disponibili online su NCBI, in modo da verificare se gli allineamenti identificati potessero corrispondere a tubuline già annotate su altre specie di piante. Gli allineamenti sono stati scelti in base a 3 parametri fondamentali: valore di E-value; superiore in negativo a un valore soglia di $E \cdot 10^{-60}$, % di identità, numero di amminoacidi allineati. Prendendo in considerazione gli allineamenti che avevano prodotto un risultato adeguato, in base ai criteri sopraindicati, è stata verificata la presenza di geni annotati in Gbrowse. A questo punto è stata effettuata un'analisi di *Multiblast* con tutte le sequenze di α e β tubulina tramite Multi-Lagan (<http://genome.lbl.gov/vista/lagan/submit.shtml>), un software che consente un allineamento di sequenze intere. Un ulteriore controllo è consistito nell'analisi di predizione genica *ex novo* dei geni di α e β tubulina, tramite Genescan e Softberry; le sequenze amminoacidiche ottenute con Genescan e Softberry sono state poi "blastate" su NCBI e in modo da verificare se tali sequenze corrispondessero effettivamente a tubuline.

RISULTATI

Allo scopo di ottimizzare l'estrazione delle proteine dai diversi organi e tessuti della vite in termini di qualità, quantità e riproducibilità abbiamo testato differenti protocolli. La vite è una specie vegetale non semplice da utilizzare come sorgente di proteine. L'alto contenuto in molecole contaminanti (soprattutto in polifenoli) genera, come conseguenza, difficoltà tecniche che limitano la quantità e la qualità delle proteine estratte. Pertanto il primo passaggio è consistito nell'ottimizzazione del protocollo estrattivo, cercando di ottenere una metodica che fosse al tempo stesso qualitativamente e quantitativamente valida e riproducibile sui diversi campioni che sarebbero stati poi analizzati. Sono stati quindi testati sette metodi diversi, alcuni molto semplici, altri lievemente più complessi.

Il primo metodo testato è stato quello definito come “UREA”. Tale metodo si basa su un protocollo pubblicato (Castro et al., 2005), già utilizzato per l’analisi di proteine di vite mediante elettroforesi 2-D. Anche se i dati pubblicati evidenziavano un buon livello di estrazione, nel nostro caso tale metodo non ha fornito risultati soddisfacenti. Il secondo metodo utilizzato è quello definito come “TCA”. In tal caso, i tessuti sono stati inizialmente estratti mediante un tampone solubile e poi la componente proteica è stata precipitata mediante aggiunta di TCA. Anche in questo caso, l’elettroforesi 1-D non ha evidenziato risultati soddisfacenti. Anche il corrispondente immunoblotting con l’anticorpo policlonale non ha dato risultati. Il terzo metodo testato è quello definito come “KIT”. Tale metodo fa uso di due specifici kit commerciali: il primo kit serve per l’estrazione delle proteine, il secondo per la pulizia del campione. La combinazione dei due kit ha permesso di ottenere un campione giudicato di buona qualità, anche se ancora contaminato da sostanze interferenti. Purtroppo l’immunoblotting con l’anticorpo policlonale non ha dato esiti particolarmente positivi. In seguito abbiamo testato il metodo “FENOLO”, descritto in letteratura (Wang et al., 2006). Questo protocollo è stato il migliore tra quelli analizzati. Il campione sembra abbastanza privo d’interferenti. Inoltre, l’analisi per immunoblotting ha fornito risultati positivi, con una banda evidente sotto lo standard di 50 kD. Anche se i dati ottenuti evidenziavano la possibilità di avere un buon metodo, abbiamo continuato la ricerca testando altri tre metodi supplementari. Il primo è il metodo “TRIS”, che fa uso esclusivamente di un tampone solubile ed è abbastanza simile a protocolli commerciali. Questo protocollo si è però rivelato il peggiore in assoluto. Il metodo CHAPS è sostanzialmente simile a quello precedente ma il tampone include anche il detergente CHAPS. La presenza del detergente ha l’effetto di migliorare la capacità estrattiva, ma è assente la banda principale a 50 kD. Il terzo metodo testato è stato denominato TCA-2. In questo protocollo, la polvere ottenuta dopo azoto liquido è stata subito aggiunta a una miscela di TCA e acetone. La resa qualitativa del protocollo sembra buona, quasi paragonabile a quella del metodo “FENOLO”. Anche se il metodo è tecnicamente più semplice, non è stato convincente come il metodo “FENOLO”, soprattutto in termini di riproducibilità e di resa quantitativa. Per questa serie di motivi, il metodo “FENOLO” è stato il migliore tra quelli testati. Il metodo è stato quindi utilizzato per estrarre proteine dai vari campioni di vite. Le modifiche apportate al metodo originale sono consistite soprattutto nell’aggiunta di DTT in alcuni dei tamponi utilizzati. Il protocollo “KIT”, anche se adeguato e riproducibile, è stato considerato troppo costoso perché potesse essere utilizzato su un numero elevato di campioni (Parrotta et al., 2010, fig. 1).

Per identificare le varie isoforme di α - e β -tubulina, sono stati testati diversi anticorpi commerciali. In letteratura (almeno per quanto è conosciuto) non ci sono per adesso dati sull'utilizzo di anticorpi anti-tubulina contro estratti di vite. Gli anticorpi sono stati inizialmente testati contro un estratto di cervello bovino, considerato come standard poiché la maggior parte degli anticorpi disponibili in commercio è prodotta contro tubuline di origine animale. Gli anticorpi contro la α -tubulina sono stati in seguito testati su un estratto di foglie di tabacco, considerato come pianta di controllo perché in letteratura sono riportati diversi dati sulle isoforme di tubulina α e β in tabacco. Solo tre anticorpi per la α -tubulina hanno mostrato un'adeguata cross-reattività: B-5-1-2, aN-18 e l'anticorpo policlonale ATN-02. Per quanto riguarda la α -tubulina, solo l'anticorpo B-5-1-2 ha cross-reagito contro le proteine estratte da foglie di vite.

In maniera del tutto simile alle α -tubuline, anche gli anticorpi commerciali contro le β -tubuline hanno mostrato un cross-reattività debole con i campioni di vite. Come successo per le α -tubuline, un solo anticorpo è stato positivo; l'aE-14 della Santa Cruz Biotechnology. Nelle nostre ricerche l'anticorpo aE-14 ha cross-reagito anche contro le tubuline di tabacco. I vari anticorpi utilizzati hanno talvolta fornito esiti positivi ma spesso si è trattato di risultati molto deboli e di difficile interpretazione (Parrotta et al., 2010, fig. 2, C,D,E,F). Una volta terminata la selezione degli anticorpi, si è proceduto alla standardizzazione delle procedure di elettroforesi 2-D e del successivo immunoblotting usando i gel 10% Criterion Tris-HCl (Bio-Rad). Questo tipo di gel commerciali garantisce la possibilità di usare strip più lunghe per la prima dimensione e inoltre si tratta di gel di cui il venditore assicura l'alta riproducibilità in termini di risultati.

Lo scopo principale di questo lavoro era la caratterizzazione delle isoforme di α - e di β -tubulina espresse durante lo sviluppo delle gemme verso le foglie, i fiori e i viticci in *Vitis vinifera*. Si tratta di organi chiaramente differenti, caratterizzati da cellule e tessuti con struttura e funzioni molto diverse. I suddetti stadi sono stati quindi considerati come punti terminali della linea di sviluppo della pianta. Poiché i suddetti organi contengono cellule diverse, a loro volta caratterizzate da apparati microtubulari differenti, era possibile attendersi una diversità nella composizione in tubuline. Era anche chiaro che organi differenti potessero contenere livelli disuguali di tubulina; quindi per standardizzare le analisi è stato deciso di tenere costante la quantità proteica globale dei diversi campioni. Come hanno mostrato le analisi dei blot, le subunità di α - e β -tubulina hanno un punto isoelettrico intorno a 4.8-5, con una media di peso molecolare molto prossima a 50 kD. Le isoforme α migra-

no più velocemente durante la seconda dimensione dell'elettroforesi (SDS-PAGE) e sono leggermente meno acide nella prima dimensione (IEF) rispetto alle isoforme β . Sia le isoforme α sia quelle β sono focalizzate in singoli cluster distinti durante la focalizzazione isoelettrica.

Abbiamo identificato un massimo di otto isoforme di α -tubulina nei tessuti esaminati, che sono state numerate in base alla loro posizione (dallo spot più acido a quello più basico). Le isoforme α della tubulina mostrano un accumulo differente nei diversi stadi di sviluppo. Le isoforme 3-7 sono presenti durante tutti gli stadi di sviluppo, sebbene con differenti proporzioni. Al contrario, le isoforme 1 e 2 sono difficilmente rilevabili nelle gemme piccole, ma sono presenti in tutti gli altri stadi presi in considerazione; l'isoforma 8 è stata trovata negli stadi iniziali di sviluppo (da gemme piccole a gemme parzialmente aperte), a volte anche nelle foglie, ma non in viticci e fiori. Le isoforme 4 e 5 sono le più abbondanti nelle fasi iniziali di sviluppo e nelle foglie. Al contrario, viticci e fiori mostrano una differente proporzione delle isoforme; le isoforme più basiche (da 4 a 7) sono usate abbondantemente nei viticci e nei fiori mentre le isoforme acide (da 1 a 3) sono usate meno frequentemente. Quando abbiamo confrontato gli stadi iniziali, le gemme piccole erano caratterizzate da un basso numero d'isoforme (principalmente 3-5); altre isoforme erano assenti (come le isoforme 1-2) oppure erano espresse a bassi livelli (isoforme 6-8). Il range delle isoforme utilizzate aumenta durante il periodo di transizione da gemme piccole a grandi o parzialmente aperte, dove tutte le isoforme sono rappresentate. La variazione d'intensità tra isoforme in ogni campione era meno evidente. I successivi stadi di sviluppo presentano un evidente cambiamento nella composizione delle isoforme. Lo stadio di sviluppo delle foglie è caratterizzato da un uso prevalente d'isoforme acide (2-4) con le altre isoforme espresse a livelli più bassi. Viticci e fiori mostrano una peculiare composizione d'isoforme, con quelle basiche (5-7) maggiormente abbondanti mentre le isoforme acide (1-3) sono rilevabili solo a bassi livelli. Come tendenza generale, lo stadio delle gemme è caratterizzato dalla progressiva comparsa di tutte le isoforme di α -tubulina mentre gli stadi finali di sviluppo sono caratterizzati dalla presenza delle isoforme 1-7, con quelle acide usate prevalentemente nelle foglie e quelle basiche usate abbondantemente in viticci e fiori. Le isoforme acide (1-3) non sono mai usate in grandi quantità, mentre le isoforme centrali e quelle basiche sono usate in quantità maggiori (Parrotta et al., 2010, fig. 5).

Per quanto riguarda le isoforme β della tubulina abbiamo trovato un massimo di sette isoforme nei campioni analizzati e, come già fatto per le isoforme α , abbiamo numerato gli spot da quello più acido a quello più basico. La comparazione tra le isoforme β della tubulina da gemme piccole a foglie/fiori/

viticci ha indicato che le β -tubuline hanno una differente espressione durante le fasi di sviluppo. L'isoforma 1 è difficilmente riscontrata in tutti i campioni, essendo un debole segnale rilevato solo nelle gemme grandi; la presenza di questa isoforma in altri campioni è rara e difficile da apprezzare. Un comportamento simile all'isoforma 1 si riscontra anche per l'isoforma più basica, la numero 7, la quale è difficilmente rilevabile, tranne nelle foglie dove pertanto rappresenta un marcatore specifico per quest'organo. Le isoforme 2 e 3 sono state trovate costantemente nelle prime fasi di sviluppo (gemme piccole) e, data la loro abbondanza in quest'organo, sono state considerate specifiche per la fase iniziale di sviluppo delle gemme. La transizione da gemme piccole a gemme grandi è contrassegnata dalla progressiva diminuzione dell'isoforma 2 e dalla concomitante comparsa delle isoforme 4 e 5, che rappresentano le isoforme più abbondanti nei restanti campioni. L'isoforma 3 aumenta in modo specifico nelle gemme grandi, anche se si ritrova nelle foglie, mentre è difficilmente rilevabile in gemme parzialmente aperte, fiori e viticci. L'isoforma 4 è stata ritrovata in tutti i campioni, leggermente in gemme piccole e in gemme parzialmente aperte, ma abbondantemente in gemme grandi, foglie, fiori e viticci. Data quest'abbondante presenza in fiori e viticci, l'isoforma 4 può essere considerata come un prezioso marcatore per questi due organi. In maniera del tutto simile all'isoforma 4, la isoforma 5 è poco concentrata in gemme piccole, ma molto abbondante in tutti gli altri campioni; molto interessante risulta essere la diminuzione della concentrazione della isoforma 5 che, altamente espressa in gemme parzialmente aperte, diminuisce con lo sviluppo verso le fasi finali (foglie, fiori e viticci). In una più evidente contrapposizione, l'isoforma 6 è usata in tutti i campioni esaminati a livelli veramente bassi. Sebbene tale isoforma sia presente nelle fasi iniziali (gemme piccole e gemme grandi), non è stata trovata nelle gemme aperte; anche se raramente può essere presente nelle foglie, essa non è mai stata trovata in viticci e fiori e, di conseguenza, l'isoforma 6 denota le iniziali fasi di sviluppo delle gemme. L'isoforma 7 è stata trovata in maniera più consistente solo nelle foglie, suggerendo che essa possa essere un marcatore specifico per questa fase dello sviluppo. Pertanto, le isoforme 4 e 5 sono le uniche presenti in tutti gli stadi di sviluppo presi in considerazione. Le gemme piccole sono caratterizzate da una composizione unica in isoforme, mentre le gemme grandi e le foglie sono molto simili nel pattern di espressione delle β -tubuline. Viceversa, le gemme aperte, viticci e fiori sembravano usare distinti pattern di espressione delle isoforme di β -tubulina (4 e 5), anche se con una diversa concentrazione relativa. Le gemme parzialmente aperte sono contrassegnate da un utilizzo consistente dell'isoforma 5, mentre i viticci e i fiori usano prevalentemente la

NUM.	GENE	CROMOSOMA	POSIZIONE
1	GSVIVT00025462001	chr 6	chr6:667793..670977
2	GSVIVT00009258001	chr 18	chr18:6747258..6749654
3	GSVIVT00011382001	chr 14	chr14:29211247..29212827
4	GSVIVT00006470001	chr Un	chrUn:26252366..26255269
5	GSVIVT00033415001	chr 8	chr8:20881505..20884053
6	GSVIVT00037046001	chr 3	chr3:8412114..8414458
7	GSVIVT00004414001	chrUn	chrUn: 38530310..38532380

Tab. 1

NUM.	GENE	CROMOSOMA	POSIZIONE
1	GSVIVT00008426001	chr 17	chr17:2199755..2201874
2	GSVIVT00019775001	chr 2	chr2:3205706..3208737
3	GSVIVT00021707001	chr 10	chr10:9832350..9836904
4	GSVIVT00037405001	chr 6	chr6:14279802..14282041
5	GSVIVT00028941001	chr 16	chr16:17206674..17208766
6	GSVIVT00009913001	chr 18	chr18:12336995..12339223
7	GSVIVT00024825001	chr 6	chr6:6589718..6591552
8	GSVIVT00025778001	chr 8	chr8:11972941..11975961
9	GSVIVT00019758001	chr 2	chr2:3047617..3049167

Tab. 2

isoforma 4 in ampie proporzioni. L'esposizione prolungata dei blot di viticci e fiori hanno confermato la bassa abbondanza dell'isoforma 3 in viticci, mentre nessun'altra isoforma è presente nei fiori oltre alle isoforme 4 e 5, suggerendo che, se esistono ulteriori isoforme di tubulina, sono espresse in maniera molto bassa in viticci e fiori (Parrotta et al., 2010, fig. 6).

Il processo di annotazione bioinformatica ci ha permesso di identificare una serie di geni ipoteticamente presenti nel genoma della vite. Tramite comparazione con i geni di α - e β tubulina di *Arabidopsis thaliana*, abbiamo identificato nella tabella 1 i geni per le isoforme α .

Nella tabella 2 è riportata la lista dei geni per la β -tubulina.

L'identificazione dei geni tramite analisi bioinformatica ci ha confortato sul numero dei possibili geni per le tubuline α e β ma ha messo in evidenza la necessità di sequenziare gli spot proteici identificati negli anni precedenti tramite approcci proteomici, allo scopo di determinare esattamente l'identità di tali isoforme e per comprendere quali isoforme derivino dall'espressione di geni specifici e quali invece siano il risultato di modificazioni post-traduzionali.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

A differenza delle cellule animali, l'estrazione di proteine da tessuti vegetali non è tecnicamente semplice. Barriere fisiche (parete cellulare) e molecole interferenti (polifenoli, terpeni, acidi organici, pectine, pigmenti, cere, ...) costituiscono un ostacolo sia alla capacità estrattiva sia alla corretta analisi delle proteine mediante elettroforesi 2-D. Per ovviare a questo inconveniente, si è reso quindi necessario ottimizzare il protocollo di estrazione in modo tale da avere a disposizione un metodo che permettesse di ottenere un adeguato quantitativo proteico da tessuti differenti e di qualità appropriata per una buona analisi proteomica. Dopo aver testato differenti protocolli di estrazione, solo uno ha fornito risultati soddisfacenti (metodo FENOLO). Il metodo si basa sulla rimozione preliminare dei contaminanti mediante lavaggi con solventi organici e nella successiva estrazione delle proteine con fenolo (Wang et al., 2006). Questo protocollo è stato utilizzato con ottimi risultati anche in diverse piante "difficili", tra cui l'olivo (Wang et al., 2003). Il pellet proteico finale è stato risospeso in un tampone di reidratazione/solubilizzazione standard; altri autori hanno ottenuto risultati soddisfacenti utilizzando tamponi diversi, arricchiti in detergenti e agenti caotropici (Mechin et al., 2003). Il protocollo FENOLO è stato utilizzato con successo anche per estrarre proteine da foglie di tabacco e di *Arabidopsis* (usati come controllo nella presente tesi) e anche per estrarre proteine da licheni (Nicolardi et al., 2007). Se paragonato con altri metodi utilizzati per l'estrazione di proteine da tessuti della vite (Castro et al., 2005; Vincent et al., 2007), questo metodo sembra garantire rese paragonabili, una maggiore riproducibilità e "semplicità" tecnica.

Per identificare le varie isoforme di α - e β -tubulina abbiamo provveduto alla selezione di diversi anticorpi dalle principali aziende commerciali, diretti sia contro la subunità α sia contro quella β . Per quanto riguarda la α -tubulina, solo un anticorpo (B-5-1-2) ha cross-reagito contro le proteine estratte da foglie di vite. Quest'anticorpo riconosce la tubulina in organismi evolutivamente divergenti, come bue, tabacco e *Arabidopsis*. In accordo con le istruzioni tecniche allegate, l'anticorpo B-5-1-2 è diretto contro i filamenti sarkosil-resistenti di riccio di mare; in particolare l'anticorpo riconosce un epitopo localizzato nella porzione carbossi-terminale della α -tubulina. Tale anticorpo è già stato utilizzato con successo per localizzare le isoforme di tubulina in *Arabidopsis* (Kopczak et al., 1992) ed è stato giudicato capace di riconoscere tutte le varie isoforme presenti (per lo meno in *Arabidopsis*). Lo stesso anticorpo ha fornito risultati molto importanti anche in segale (Kerr & Carter 1990). È difficile comprendere perché soltanto l'anticorpo B-5-1-2 è stato positivo nell'analisi di estratti

proteici da vite. Possiamo ipotizzare qualche modificazione nella sequenza delle α -tubuline di vite che le rende diverse rispetto alle altre piante. Anche gli anticorpi commerciali contro le β -tubuline hanno mostrato un cross-reattività debole con i campioni di vite. Come successo per le α -tubuline, un solo anticorpo è stato positivo; l'aE-14 della Santa Cruz Biotechnology. In accordo con le informazioni tecniche, l'anticorpo cross-reagisce contro un epitopo situato nella porzione N-terminale della β -tubulina di *Arabidopsis thaliana*. Nelle nostre ricerche l'anticorpo aE-14 ha cross-reagito anche contro le tubuline di tabacco. Gli altri anticorpi anti β -tubulina hanno mostrato cross-reazioni deboli o in alcuni casi nessuna cross-reattività.

Gli immunoblot con l'anticorpo B-5-1-2 hanno mostrato che la quantità relativa di tubulina non cambia significativamente tra i differenti tessuti di vite quando il contenuto totale di proteine rimane costante. In altri lavori è stata presa in considerazione la variabilità dell'espressione delle tubuline nei differenti campioni così da normalizzare le differenze quantitative (Dixon et al., 1994), ma nel nostro caso abbiamo preferito tenere costante la quantità di proteina nei diversi campioni presi in considerazione per valutare un'eventuale variazione di quantità delle tubuline. Inoltre, l'alta quantità di tubulina suggerisce che anche le isoforme espresse debolmente sarebbero dovute essere rilevate. Riteniamo che la variabilità dell'espressione di tubuline non sia dipendente da fenomeni di degradazione proteica perché non abbiamo mai rilevato segnali in immunoblot con pesi molecolari più bassi di quello atteso. Inoltre, altri lavori riportano segnali completi di α -tubulina in campioni proteici estratti con le stesse procedure (Wang et al., 2003; Wang et al., 2004). Nel caso della vite, le α -tubuline sono raggruppate in un unico cluster con punto iso-elettrico di 4,8-5. Questo comportamento è diverso da quello osservato nelle fibre di cotone (Dixon et al., 1994) dove le isoforme di α -tubulina sono aggregate in due distinti cluster, tuttavia il comportamento osservato nella vite è simile a quello osservato in *Arabidopsis* (Kopczak et al., 1992) e nelle radici di segale (Kerr & Carter, 1990) dove le isoforme di α -tubulina sono aggregate in un cluster singolo. Per quanto riguarda il tabacco, la situazione è intermedia (Smertenko et al., 1997).

Durante lo sviluppo delle foglie, le isoforme più acide di α -tubulina aumentano in concentrazione relativa rispetto alle isoforme più basiche, suggerendo che le forme più acide sono espresse durante lo sviluppo delle foglie. Le foglie mature mostrano un'attività mitotica inferiore rispetto agli stadi giovanili, crescono a un ritmo minore e richiedono una composizione microtubulare specifica per mantenere la struttura cellulare. Da ciò si può ipotizzare che tubuline specifiche per l'apparato mitotico non sarebbero ulteriormente richieste

ma potrebbero invece essere necessarie tubuline utili per l'interazione con altre strutture cellulari. Al contrario, le gemme sono generalmente caratterizzate da un'intensa attività mitotica e richiedono microtubuli molto dinamici, probabilmente costituiti da tubuline diverse rispetto alle foglie. Un grande numero di α -tubuline è stato identificato nelle fibre del cotone, da 10 a 20 giorni dall'apertura delle antere (quando la crescita delle fibre è ormai rallentata) (Dixon et al., 1994). Un alto numero d'isoforme di tubulina nei tessuti con frequenti divisioni non è sorprendente perché le cellule con alti tassi di crescita e rapide divisioni hanno generalmente un alto numero d'isoforme di tubulina (Han et al., 1991).

In letteratura, non sono riportati dati sull'espressione proteica di tubulina nei viticci. Maggiori informazioni sono invece disponibili per i fiori, i quali sono spesso caratterizzati da una specifica isoforma di α -tubulina che si accumula durante lo sviluppo del gametofito maschile. Questa isoforma è probabilmente specifica per l'attività microtubulare dei tubetti pollinici (Carpenter et al., 1992; Evrard et al., 2002; Fang et al., 2006). Le analisi che abbiamo condotto sono state eseguite fino a stadi giovanili dello sviluppo dei fiori, quando il polline non è stato ancora prodotto; tuttavia, non abbiamo identificato isoforme specifiche di α -tubulina per i fiori. Confrontando foglie, fiori e viticci si osserva un uso prevalente delle isoforme di α -tubulina più basiche in fiori e viticci, con una prevalenza delle isoforme da 5-7 (al contrario, debolmente rilevate durante lo sviluppo delle gemme). Fiori e viticci sembrano usare anche lo stesso pattern di β -tubuline (isoforme 4 e 5). Questi dati suggeriscono che, sebbene fiori e viticci siano organi molto differenti, usano lo stesso pattern di tubuline α e β .

Le proteine citoscheletriche non cambiano in maniera considerevole i loro livelli di espressione in differenti cultivar della vite e la loro espressione non è condizionata da stress idrici o salini (Vincent et al., 2007); di conseguenza, le differenze tra la composizione in α - e β -tubuline dipende dall'uso differenziale delle proteine piuttosto che dalla risposta a cambiamenti ambientali.

I risultati del nostro lavoro sono in linea con i dati riportati in letteratura indicanti che isoforme specifiche di tubulina sono espresse preferenzialmente in diversi tessuti della pianta. Dato che l'espressione delle isoforme di tubulina è sotto controllo ormonale (Yoshikawa et al., 2003), i geni delle tubuline sarebbero differenzialmente regolati in linea con i programmi di sviluppo, così che le isoforme di tubulina abbiano una specifica funzione durante la crescita e lo sviluppo degli organi della pianta. La recente identificazione dei possibili geni per le tubuline α e β fornisce uno strumento potente per analizzare l'espressione differenziale dei geni nei vari tessuti della pianta e per determinare un collegamento tra espressione genica, accumulo di isoforme specifiche e modificazioni

post-traduzionali allo scopo di comprendere come la pianta utilizzi e moduli le varie isoforme di tubulina in rapporto al suo stadio di sviluppo.

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento spetta al Prof. Mario Pezzotti (Dipartimento di Scienze Tecnologie e Mercati della Vite e del Vino, Università di Verona), al Prof. Enrico Pè (Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa) e al Prof. Luca Bini (Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena) per i suggerimenti e le critiche ricevute durante la preparazione del lavoro. Un ringraziamento sentito va al Prof. Michele Morgante per la sua ospitalità presso i laboratori dell'IGA (Istituto di Genomica Applicata) per il lavoro di annotazione dei geni.

RIASSUNTO

I microtubuli svolgono un ruolo importante durante la crescita e la morfogenesi delle cellule vegetali. Differenti isoforme di α -e β -tubulina si accumulano nelle cellule di piante superiori e hanno origine mediante trascrizione di geni differenti o da modifiche post-traslazionali. L'uso di differenti isoforme di tubulina coinvolge il legame dei microtubuli a diverse proteine associate e genera quindi microtubuli con le organizzazioni e funzioni diverse. Isoforme di tubulina sono differenzialmente espresse in strutture vegetative e riproduttive secondo il programma di sviluppo della pianta. In vite (*Vitis vinifera* L.), strutture vegetative e riproduttive appaiono sulla stessa radice, facendo di questa specie vegetale un modello eccellente per studiare l'accumulo di isoforme di tubulina. Le proteine sono state estratte da campioni vite (gemme, foglie, fiori e viticci) utilizzando un protocollo di estrazione ottimizzato, separate da elettroforesi bidimensionale e analizzate mediante immunoblot con anticorpi anti-tubulina. Abbiamo identificato otto α -tubulina e sette isoforme β -tubulina con pI circa 4,8-5 che si raggruppano in cluster separati. Abbiamo analizzato il genoma della vite per identificare i geni putativi di tubulina, prendendo come riferimento i geni di α - e β -tubulina di *Arabidopsis thaliana*. Confrontando i geni di tubulina di *Arabidopsis* con il genoma della vite 12X, abbiamo identificato un certo numero di geni che corrisponde relativamente al numero di spot identificati da 2-DE.

ABSTRACT

Microtubules play important roles during growth and morphogenesis of plant cells. Multiple isoforms of α - and β -tubulin accumulate in higher plant cells and originate either by transcription of different genes or by post-translational modifications. The use of dif-

ferent tubulin isoforms involves the binding of microtubules to different associated proteins and therefore generates microtubules with different organizations and functions. Tubulin isoforms are differentially expressed in vegetative and reproductive structures according to the developmental program of plants. In grapevine (*Vitis vinifera* L.), vegetative and reproductive structures appear on the same stem, making this plant species an excellent model to study the accumulation of tubulin isoforms. Proteins were extracted from grapevine samples (buds, leaves, flowers and tendrils) using an optimized extraction protocol, separated by two-dimensional electrophoresis and analyzed by immunoblot with anti-tubulin antibodies. We identified eight α -tubulin and seven β -tubulin isoforms with pI around 4.8–5 that group into separate clusters. We have analyzed the genome of grapevine to identify putative tubulin genes, taking as reference the α - and β -tubulin genes of *Arabidopsis thaliana*. By comparing the *Arabidopsis* tubulin genes to the 12X grapevine genome, we identified a number of genes which corresponds comparatively to the number of spots identified by 2-DE.

CITAZIONI BIBLIOGRAFICHE

- BOSS P.K., BUCKERIDGE E.J., POOLE A., THOMAS M.R. (2003): *New insights into grapevine flowering*, «Functional Plant Biology», 30, pp. 593-606.
- CARPENTER J.L., PLOENSE S.E., SNUSTAD D.P., SILFLOW C.D. (1992): *Preferential expression of an α -tubulin gene of Arabidopsis in pollen*, «Plant Cell», 4, pp. 557-571.
- CASTRO A.J., CARAPITO C., ZORN N., MAGNE C., LEIZE E., VAN D.A., CLEMENT C. (2005): *Proteomic analysis of grapevine (Vitis vinifera L.) tissues subjected to herbicide stress*, «Journal Experimental Botany», 56, pp. 2783-2795.
- DIXON D.C., SEAGULL R.W., TRIPLETT B.A. (1994): *Changes in the accumulation of α - and β -tubulin isotypes during cotton fiber development*, «Plant Physiology», 105, pp. 1347-1353.
- EVRRARD J.L., NGUYEN I., BERGDOLL M., MUTTERER J., STEINMETZ A., LAMBERT A.M. (2002): *A novel pollen-specific alpha-tubulin in sunflower: structure and characterization*, «Plant Molecular Biology», 49, pp. 611-620.
- FANG W.P., JIANG C.J., YU M., YE A.H., WANG Z.X. (2006): *Differentially expression of *Tua 1*, a tubulin-encoding gene, during flowering of tea plant Camellia sinensis (L.) O. Kuntze using cDNA amplified fragment length polymorphism technique*, «Acta Biochim. Biophys. Sinica», 38, pp. 653-662.
- HAN I.S., JONGEWAARD I., FOSKET D.E. (1991): *Limited expression of a diverged beta-tubulin gene during soybean (Glycine max [L.] Merr.) development*, «Plant Molecular Biology», 16, pp. 225-234.
- HOWE K.L., CHOTHIA T., DURBIN R. (2002): *GAZE: a generic framework for the integration of gene prediction data by dynamic programming*, «Genome research», 12 (9), pp. 1418-1427.
- JAILLON O., AURY J.M., NOEL B., POLICRITI A., CLEPET C., CASAGRANDE A., CHOISNE N., AUBOURG S., VITULO N., JUBIN C., VEZZI A., LEGEAI F., HUGUENEY P., DASILVA C., HORNER D., MICA E., JUBLOT D., POULAIN J., BRUYERE C., BILLAULT A., SEGURENS B., GOUYVENOUX M., UGARTE E., CATTONARO F., ANTHOUARD V., VICO V., DEL F.C., ALAUX M., DI G.G., DUMAS V., FELICE N., PAILLARD S., JUMAN I., MOROLDO M., SCALABRIN S., CANAGUIER A., LE CLAINCHE I., MALACRIDA G., DURAND E.,

- PESOLE G., LAUCOU V., CHATELET P., MERDINOGLU D., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M., LECHARNY A., SCARPELLI C., ARTIGUENAVE F., PE M.E., VALLE G., MORGANTE M., CABOCHE M., ADAM-BLONDON A.F., WEISSENBAACH J., QUETIER F., WINCKER P. (2007): *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*, «Nature», 449, pp. 463-467.
- KERR G.P., CARTER J.V. (1990): *Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation*, «Plant Physiol.», 93, pp. 83-88.
- KOPCZAK S.D., HAAS N.A., HUSSEY P.J., SILFLOW C.D., SNUSTAD D.P. (1992): *The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed α -tubulin genes*, «Plant Cell», 4, pp. 539-547.
- LAEMMLI U.K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, «Nature», 227, pp. 680-685.
- MATHUR J., HULSKAMP M. (2002): *Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants*, «Curr Biol», 12, pp. 669-676.
- MECHIN V., CONSOLI L., LE G.M., DAMERVAL C. (2003): *An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients*, «Proteomics», 3, pp. 1299-1302.
- NICK P. (2007): *The plant cytoskeleton: new jobs for a versatile network*, «Protoplasma», 230, pp. 125-127.
- NICOLARDI V. (2007): *Use of higher plant leaves and Evernia prunastri lichens for indirect measure of Hg vapor in the air*, University of Siena. PhD Thesis.
- PARROTTA L., CAI G., CRESTI M. (2010): *Changes in the accumulation of α - and β -tubulin during bud development in Vitis vinifera L.*, «Planta», 231, pp. 277-291.
- QUESADA V., DEAN C., SIMPSON G.G. (2005): *Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering*, «Int. J. Dev. Biol.», 49, pp. 773-780.
- QIN X., GIANI S., BREVIARIO D. (1997): *Molecular cloning of three rice α -tubulin isotypes: differential expression in tissues and during flower development*, «Gene Structure and Expression», 1354, pp. 19-23.
- SCHRODER J., STENGER H., WERNICKE W. (2001): *Alpha-tubulin genes are differentially expressed during leaf cell development in barley (Hordeum vulgare L.)*, «Plant Molecular Biology», 45, pp. 723-730.
- SMERTENKO A., BLUME Y., VIKLICKY V., OPATRYN Z., DRABER P. (1997): *Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in Nicotiana tabacum L. cells*, «Planta» 201, pp. 349-358.
- SNUSTAD D.P., HAAS N.A., KOPCZAK S.D., SILFLOW C.D. (1992): *The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed beta-tubulin genes*, «Plant Cell» 4, pp. 549-556.
- SPOKEVICIUS A.V., SOUTHERTON S.G., MACMILLAN C.P., QIU D., GAN S., TIBBITS J.F.G., MORAN G.F., BOSSINGER G. (2007): *Beta-tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls*, «Plant J», 51, pp. 717-726.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J. (1979): *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 76, pp. 4350-4354.
- VINCENT D., ERGUL A., BOHLMAN M.C., TATTERSALL E.A., TILLET R.L., WHEATLEY M.D., WOOLSEY R., QUILICI D.R., JOETS J., SCHLAUCH K., SCHOOLEY D.A., CUSHMAN J.C., CRAMER G.R. (2007): *Proteomic analysis reveals differences between Vitis vinifera L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity*, «J. Exp. Bot.», 58, pp. 1873-1892.
- WANG W., SCALI M., VIGNANI R., SPADAFORA A., SENSI E., MAZZUCA S., CRESTI M. (2003): *Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue*

- containing high levels of interfering compounds*, «Electrophoresis», 24, pp. 2369-2375.
- WANG W., VIGNANI R., SCALI M., SENSI E., CRESTI M. (2004): *Post-translational modifications of α -tubulin in Zea mays L. are highly tissue specific*, «Planta», 218, pp. 460-465.
- WANG W., VIGNANI R., SCALI M., CRESTI M. (2006): *A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis*, «Electrophoresis», 27, pp. 2782-2786.
- WOOTTON J.C., FEDERHEN S. (1993): *Statistics of local complexity in amino acid sequences and sequence databases*, «Comput. Chem», 17, pp. 149-163.
- YOSHIKAWA M., YANG G., KAWAGUCHI K., KOMATSU S. (2003): *Expression analyses of beta-tubulin isotype genes in rice*, «Plant Cell Physiol.», 44, pp. 1202-1207.

