

Titolo:

Caratterizzazione di una proteina ABC-transporter di *P. x euroamericana* clone I-214 sottoposto a stress da zinco: possibile ruolo nel sequestro intracellulare e nella tolleranza.

Riassunto analitico:

Lo zinco (Zn) è un microelemento essenziale per tutti gli organismi, comprese le piante. Svolge importanti funzioni nel metabolismo cellulare in quanto cofattore di enzimi e componente di proteine come i fattori di trascrizione a dominio Zn-finger. Un eccesso di questo metallo porta a sintomi da tossicità nelle piante, che, quindi, hanno evoluto meccanismi di tolleranza per affrontare lo stress derivante dall'eccesso di zinco nei suoli. Il genere *Populus* viene utilizzato come modello di piante arboree per la fitoestrazione di metalli pesanti dai suoli inquinati. Il ruolo dei trasportatori è fondamentale per consentire l'omeostasi dei metalli essenziali ed escludere dal citosol i quelli pesanti. Nelle piante sono state identificate diverse famiglie geniche codificanti numerosi trasportatori di membrana e tra questi ci sono anche gli ABC-transporter.

Gli ABC-transporter sono una classe di trasportatori molto ampia, in grado di svolgere svariate funzioni in tutti gli organismi. Sono pompe per il trasporto attivo, modulano l'attività di canali ionici, sono proteine canale oppure sono coinvolti in attività diverse dal trasporto, come la trasduzione del segnale. Sono in grado di trasportare un'ampia varietà di substrati come ioni, acidi inorganici, peptidi, zuccheri, polisaccaridi, lipidi e complessi formati da metalli pesanti legati da agenti chelanti come il glutatione. Prendono parte a processi biologici diversi, come la detossificazione cellulare, la crescita e lo sviluppo delle piante, il movimento degli stomi e la tolleranza ai metalli pesanti.

Il lavoro sperimentale svolto ha riguardato lo studio funzionale di un gene di *P. x euroamericana* clone I-214 codificante un putativo ABC-transporter da noi chiamato *dr19* che, da studi preliminari, risulta differenzialmente espresso a dosi sub letali di Zn (1 mM). Per indagare il possibile coinvolgimento di questo gene nei meccanismi di tolleranza in risposta a un eccesso di Zn e, in particolare, al sequestro intracellulare di questo metallo, ne è stato eseguito il clonaggio da cDNA *P. x euroamericana* clone I-214 e *P. alba* clone Villafranca e la sua caratterizzazione. È stata effettuata l'analisi dei livelli di espressione del gene *dr19* tramite Real Time qPCR in foglie vecchie e giovani di *P. x euroamericana* clone I-214 in condizioni di controllo e in presenza di 1 mM di Zn, da cui si notano delle differenze nei livelli di espressione nelle foglie vecchie nelle condizioni di trattamento, rispetto al controllo. È stata studiata la localizzazione subcellulare tramite espressione transiente in protoplasti di *A. thaliana* in condizioni di controllo e in presenza di 200 μ M di Zn, dove la proteina sembra localizzarsi a livello citoplasmatico e, in presenza di Zn, le cellule non manifestano sintomi di sofferenza. Gli studi di caratterizzazione sono proseguiti su *P. alba* clone Villafranca trattato *in vitro* con 500 e 1000 μ M di Zn e ortovanadato (inibitore degli ABC-transporter): l'analisi dei parametri fisiologici ha evidenziato un aumento generale di biomassa e dello Zn assorbito e una diminuzione della biomassa nei trattamenti con ortovanadato. È stata effettuata, infine, l'analisi dei livelli di espressione del gene *dr19* tramite Real Time qPCR in foglie di *P. alba* clone Villafranca da cui non si notano delle differenze tra i trattamenti. L'assenza di stress nei protoplasti trattati con 200 μ M di Zn indica un possibile coinvolgimento del gene *dr19* nei processi di esclusione e/o omeostasi dello Zn nel pioppo. L'osservazione che nel *P. alba* fino a 1 mM di Zn (concentrazione in cui non si manifestano effetti di stress) l'espressione di *dr19* non cambia, suggerisce il suo coinvolgimento nei processi di omeostasi alle concentrazioni di Zn utilizzate in quanto non compaiono sintomi di tossicità. Nel clone I-214, invece, trattato con 1 mM di Zn (dose subletale) il gene *dr19* risulta sovra espresso, e questo sembra indicare un suo

coinvolgimento nei processi di detossificazione in presenza di concentrazioni di Zn tali da indurre stress.