

Meccanismi di regolazione redox nel cloroplasto

I. REGOLAZIONE REDOX

I primi meccanismi di regolazione cellulare basati sulla variazione dello stato redox di gruppi tiolici in specifiche proteine sono stati scoperti nell'ambito del processo fotosintetico (Schurmann e Jacquot, 2000), ma attualmente è nota la loro diffusione ubiquitaria in molti ambiti della biologia. Questo tipo di regolazione si è sviluppato in tutti gli organismi con metabolismo aerobio, dove l'adattamento alle condizioni ossidanti che si possono generare all'interno della cellula dipende da processi metabolici capaci di ripristinare le condizioni riducenti necessarie alla vita. Evidenze sperimentali hanno suggerito come nelle piante la regolazione redox svolga un ruolo fondamentale nella risposta allo stress ossidativo modulando processi cellulari quali la trascrizione, la traduzione e diverse vie metaboliche (Buchanan e Balmer, 2005). Il meccanismo d'azione alla base di questo tipo di regolazione prevede una variazione dello stato redox di alcune cisteine proteiche, le quali possono oscillare tra la forma ossidata e quella ridotta (*i.e.* interscambio disolfuro/ditiolo, $S-S \leftrightarrow SH$). Il diverso stato di ossidazione o di riduzione di queste cisteine comporta modificazioni conformazionali che possono influenzare sia la regolazione che le capacità catalitiche degli enzimi bersaglio.

2. NATURA DEGLI AMINOACIDI COINVOLTI E TIPI DI LEGAMI POSSIBILI

Il ruolo fondamentale dello zolfo, in campo biologico, è determinato dalle

* *Laboratorio di Biologia redox dei sistemi vegetali, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (Fa-Bit), Università di Bologna*

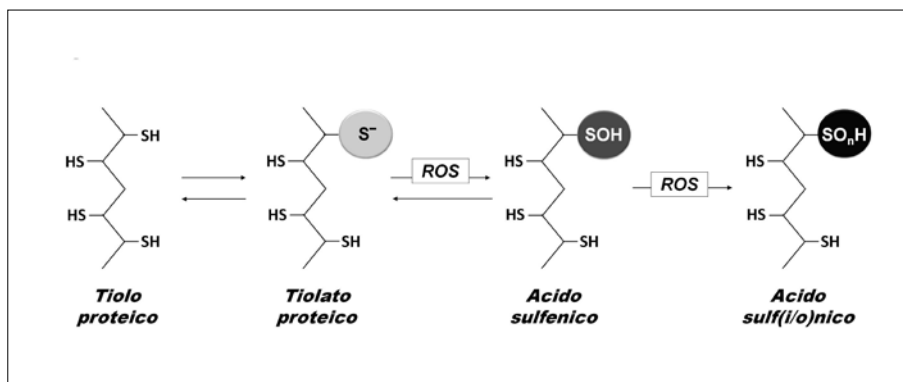


Fig. 1 *I diversi stati di ossidazione delle cisteine proteiche*

sue caratteristiche chimico-fisiche che gli conferiscono particolari capacità redox e catalitiche. Lo zolfo, anche nei sistemi biologici, esiste in diversi stati di ossidazione, con numeri di ossidazione che vanno da -2 nei gruppi tiolici ($R-SH$), a $+4$ nei solfonati anionici ($R-SO_3^-$) e $+6$ nel solfato (SO_4^{2-}). Negli aminoacidi, lo zolfo è presente sia nei residui di metionina (Met) che di cisteina (Cys). Nelle proteine, la Met si trova in due forme principali: la più abbondante dove lo zolfo risulta ridotto ($R-S-CH_3$) e una forma più rara in cui lo zolfo è ossidato (metionina sulfossido, $R-SO-CH_3$). La Cys è più versatile perché nello stato ridotto ($-SH$) può subire deprotonazione acquisendo lo stato tiolato ($-S^-$) oppure ossidarsi generando ponti disolfuro ($-S-S-$) o altri stati di ossidazione quali l'acido sulfenico ($R-SOH$), l'acido sulfonico ($R-SO_2H$) e l'acido sulfonico ($R-SO_3H$) (Jacob et al., 2006; Zaffagnini et al., 2012a, 2012b) (fig. 1). A differenza dei ponti disolfuro e dell'acido sulfenico, che sono modificazioni proteiche considerate reversibili nei sistemi biologici, le ultime due sono modificazioni irreversibili e possono condurre ad alterazioni della struttura proteica generalmente accompagnate da una perdita di funzione e aumento alla suscettibilità alle proteasi o alla denaturazione (Montrichard et al., 2009). I diversi stati di ossidazione delle Cys sono dipendenti dallo stato redox intracellulare, il quale può subire variazioni in seguito a condizioni di stress (Noctor e Foyer, 2005). In condizioni fisiologiche ottimali (*i.e.* riducenti) è favorito il mantenimento dello stato ridotto delle Cys, mentre, in condizioni di stress, un aumento della formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) può portare all'ossidazione di questi residui. La probabilità di subire modificazioni ossidative dipende dalla reattività dei tioli, che può essere molto variabile nei diversi casi (Winterbourn e Hampton, 2008). La reattività

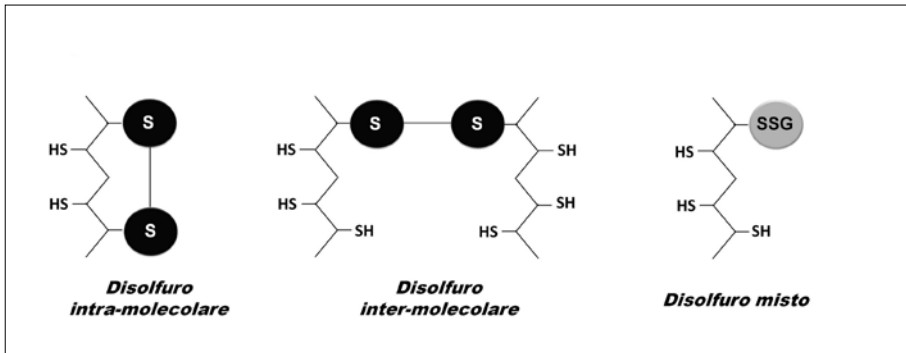


Fig. 2 Tipologie di legame disolfuro: intra-molecolare, inter-molecolare e misto

dipende dal pK_a specifico di ogni tiolo che determina il suo stato di protonazione ($-SH$)/deprotonazione ($-S^-$) in relazione all'intorno molecolare (es. interazione con aminoacidi basici che favoriscono la deprotonazione del tiolo). La maggiorparte delle Cys proteiche presenta un pK_a maggiore di 8 e quindi, al pH fisiologico dei principali compartimenti intracellulari (valori compresi tra 7 e 8), tali residui si trovano in forma protonata ($-SH$) e sono conseguentemente poco reattivi nei confronti delle ROS (Dalle-Donne et al., 2007). Al contrario, alcune Cys vengono definite reattive perché hanno valori di pK_a intorno a 6 o inferiori (Zaffagnini et al., 2012b). Tali Cys reattive si troveranno quindi in forma tiolata ($-S^-$) a pH fisiologici e saranno suscettibili all'attacco da parte delle ROS (Dalle-Donne et al., 2007). L'interazione delle ROS con i tioli proteici può portare, se presente una seconda Cys a distanza opportuna, alla formazione di un ponte disolfuro che può proteggere le Cys reattive da un'eventuale ossidazione irreversibile. Infatti, i legami disolfuro sono piuttosto stabili e inerti, e possono rappresentare una strategia di difesa per ovviare all'inattivazione e alla degradazione proteica. Inoltre, i ponti disolfuro possono costituire un meccanismo di regolazione dell'attività della proteina. Da questo punto di vista vengono generalmente catalogati in tre gruppi: intramolecolari, intermolecolari e disolfuri misti (fig. 2). I legami intramolecolari sono molto comuni e coinvolgono due Cys presenti sullo stesso polipeptide. Nella struttura primaria questi residui possono essere localizzati vicini e distanti. Nel secondo caso, le due Cys coinvolte sono sufficientemente vicine nel folding nativo della proteina da permettere la formazione del ponte disolfuro. Per quel che concerne i legami intermolecolari, questi si formano tra Cys localizzate in polipeptidi (e.g. subunità) diversi. Il terzo tipo di legame, consiste in un disolfuro misto e

prevede il legame di una Cys proteica con la cisteina di una molecola di glutatione (GSH).

3. REGOLAZIONE ENZIMATICA LUCE-DIPENDENTE

I carboidrati, nella cellula vegetale, costituiscono la fonte principale di energia per il metabolismo cellulare. La trasformazione di acqua e CO_2 in carboidrati è un processo che avviene nello stroma del cloroplasto ed è strettamente dipendente dalla luce solare, una fonte di energia che per sua natura è di intensità variabile nel corso della giornata e assente di notte. Gli organismi fotosintetici hanno sviluppato complicati meccanismi regolativi per ottimizzare il metabolismo cellulare in funzione della disponibilità di energia solare. Alla luce gli enzimi coinvolti nell'assimilazione del carbonio sono attivi, mentre gli enzimi coinvolti nella degradazione dei prodotti di riserva della fotosintesi vengono inattivati o comunque sottoposti a una forte inibizione. Al buio invece, sono attivati gli enzimi necessari al catabolismo di parte dei fotosintati accumulati durante il giorno, per provvedere alla formazione dell'energia metabolica (Schurmann, 2003). La luce, captata dai pigmenti fotosintetici dei complessi delle membrane tilacoidali, svolge in modo indiretto un'azione di controllo sul metabolismo attraverso il sistema redox ferredossina/tioredoossina. Tale sistema permette l'attivazione o l'inattivazione di specifici enzimi bersaglio mediante reazioni di interscambio ditiolo/disolfuro (Buchanan e Balmer, 2005). Il sistema agisce trasformando il segnale elettronico, proveniente dal fotosistema I, in un segnale biochimico che coinvolge, in prima istanza, tre proteine: la ferredossina (Fd), la ferredossina tioredoossina riduttasi (FTR) e la tioredoossina (Trx). Oltre alla regolazione mediata dal sistema Fd/Trx, l'attività di questi enzimi è modulata anche da altri fattori cellulari dipendenti dalla luce, quali il pH e la concentrazione dei metaboliti (Scheibe et al., 1991).

3.1 *Il sistema ferredossina/tioredoossina*

Il sistema Fd/Trx è composto da tre proteine solubili: la Fd, l'FTR e la Trx (Schurmann, 2003) (fig. 3). Alla luce, la Fd è ridotta dagli elettroni proveniente dal fotosistema I e trasferisce elettroni a diversi enzimi tra i quali l'FTR. Quest'ultima gioca un ruolo centrale nel sistema Fd/Trx, in quanto permette il trasferimento degli elettroni dalla Fd alla Trx e di conseguenza agli

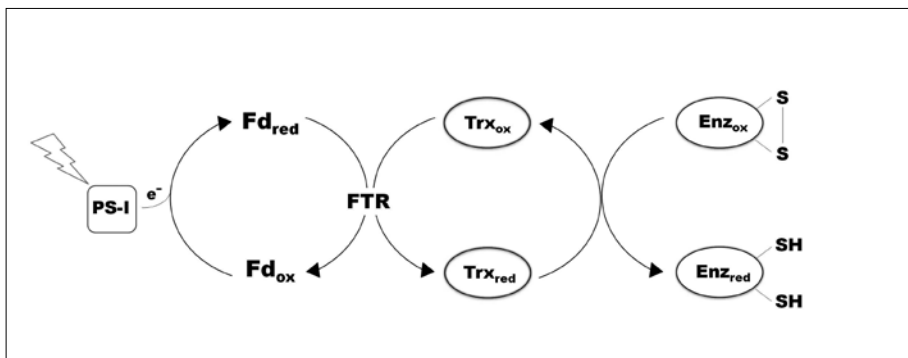


Fig. 3 Schema del sistema ferredossina/tioredoxina. Abbreviazioni: PS-I, fotosistema I; Fd, ferredossina; FTR, tioredossina ferredossina riduttasi; Trx, tioredossina; Enz, enzima bersaglio; red, ridotto; ox, ossidato

enzimi bersaglio mediante reazioni di scambio ditiolo/disolfuro (Buchanan e Balmer, 2005).

3.1.1 La ferredossina

Nelle piante, la ferredossina (Fd) è una piccola proteina solubile di circa 12 kDa, che presenta un *cluster* $[2Fe-2S]$ con potenziale redox che si aggira intorno a -400 mV. La Fd viene fisiologicamente ridotta dal fotosistema I alla luce, e costituisce il primo trasportatore elettronico che si può staccare dal fotosistema I e diffondere nello stroma. Le strutture tridimensionali di Fd di specie diverse presentano una forte similarità (Dai et al., 2000). Tali strutture presentano lo stesso tipo di *folding* ed espongono due tasche con cariche negative dalla stessa parte del *cluster* Fe-S, le quali sono essenziali per l'interazione con altre proteine (Schurmann e Jacquot, 2000). Mediante un legame ad alta affinità, la Fd forma con l'FTR un complesso elettrostaticamente stabile con stechiometria 1:1 che favorisce il trasferimento elettronico dalla prima proteina alla seconda (Hirasawa, 1998).

3.1.2 La ferredossina tioredossina riduttasi

La ferredossina tioredossina riduttasi (FTR) è un enzima presente esclusivamente negli organismi fotosintetici (Dai et al., 2000). Questa proteina

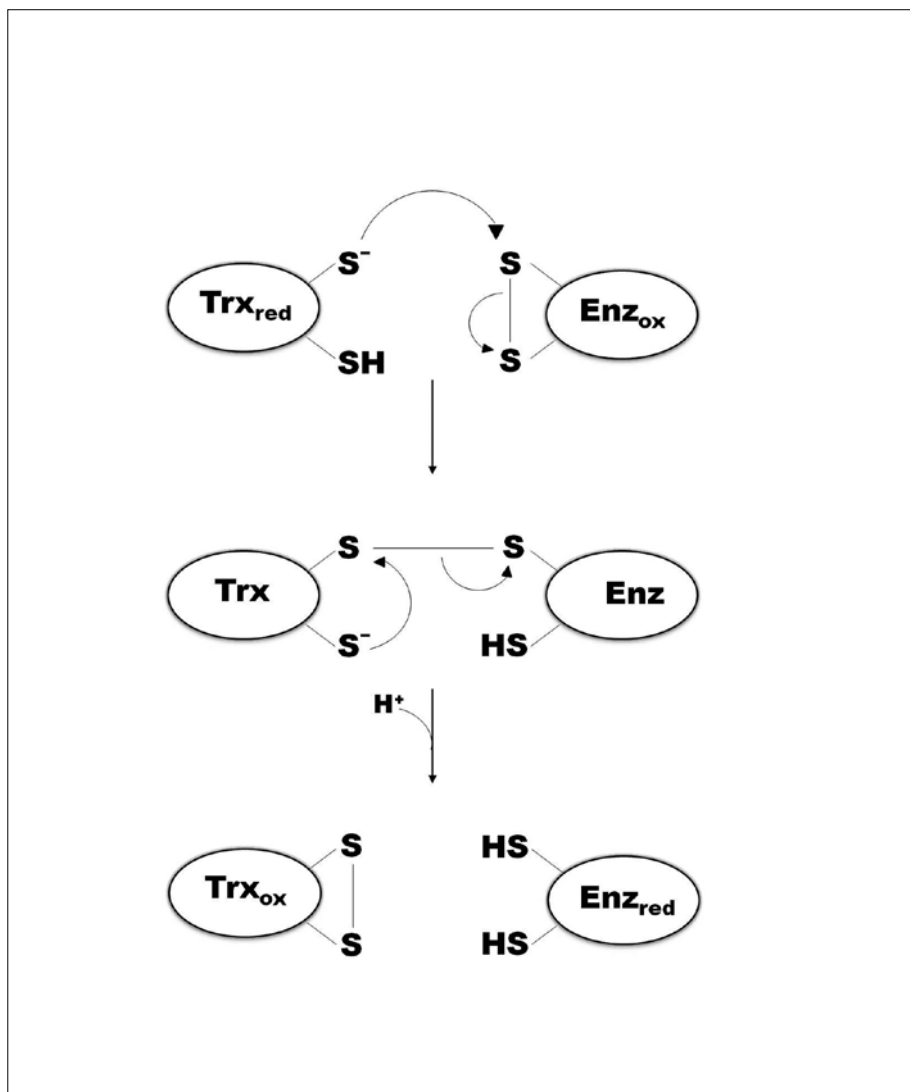


Fig. 4 *Meccanismo di azione delle Trx*

ha un peso molecolare di circa 20-25 kDa ed è composta da una subunità catalitica e una variabile, entrambe codificate dal genoma nucleare. La subunità variabile sembra avere una mera funzione strutturale (Dai et al., 2000) e il suo nome dipende dalla porzione N-terminale che è di lunghezza variabile nelle diverse specie. La subunità catalitica, responsabile del colore giallo-bruno della proteina, contiene un unico *cluster* [4Fe-4S] e presenta

una sequenza primaria conservata che comprende sette cisteine, quattro delle quali coinvolte nel legame con il ferro e 2 coinvolte nella formazione del ponte disolfuro (Schurmann e Jacquot, 2000). La struttura cristallografica della FTR del cianobatterio *Synechocystis sp. PCC 6803* è stata ottenuta con una risoluzione di 1.6 Å (Dai et al., 2000) e ha permesso di individuare una prevalenza di filamenti β nella subunità variabile e di α -eliche in quella catalitica. Le due subunità si dispongono una sopra l'altra così da formare una struttura di forma lenticolare. Lo spessore della porzione centrale del disco è di circa 10 Å ed è qui che sono localizzate le strutture funzionalmente importanti: il *cluster* Fe-S e, adiacente a esso, il ponte disolfuro attivo. Il *cluster* Fe-S risulta accessibile solo da un lato, ossia quello di legame con la Fd, mentre il ponte disolfuro è accessibile dalla parte opposta, nel sito di legame della Trx. Questa particolare struttura rende possibile il legame contemporaneo dell'FTR con la Fd, che dona l'elettrone, e con la Trx, che lo accetta. Queste interazioni sono favorite dalla presenza nel sito di legame della Fd di quattro residui carichi positivamente e di residui idrofobici nel sito di legame della Trx (Schurmann, 2000).

3.1.3 La tioredossina

Le tioredossine (Trx) sono piccole ossidoreduttasi di circa 12 kDa presenti in tutti gli organismi viventi, eccetto alcuni patogeni umani (Buchanan e Balmer, 2005). Le Trx sono caratterizzate da un motivo strutturale, denominato *Trx-fold*, costituito da 4 α -eliche che circondano 5 filamenti β . Il ruolo prevalente svolto dalle Trx consiste nella modulazione enzimatica, attuata mediante la riduzione dei ponti disolfuro presenti su proteine bersaglio. Tale funzione è da attribuire alla presenza di due Cys reattive nel sito attivo dell'enzima (all'interno della sequenza WC[G/P]PC) che possono formare un ponte disolfuro cataliticamente attivo. Il meccanismo di riduzione dei disolfuri in proteine bersaglio, consiste in un attacco nucleofilo da parte della Cys N-terminale del sito attivo della Trx sul ponte disolfuro della proteina bersaglio con conseguente formazione di un eterodisolfuro transitorio. L'attacco della Cys C-terminale della Trx sull'eterodisolfuro porta alla liberazione della proteina target in forma ridotta (*i.e.* ditiolica) e alla formazione di un disolfuro nella Trx (*i.e.* Trx ossidata) (Collet e Messens, 2010) (fig. 4). La forma ridotta della Trx viene rigenerata mediante donatori di elettroni diversi a seconda del comparto cellulare in questione. Nei tessuti fotosintetici, le Trx sono ridotte dalla FTR, con elettroni proveniente dalla Fd foto-ridotta dal fotosistema I,

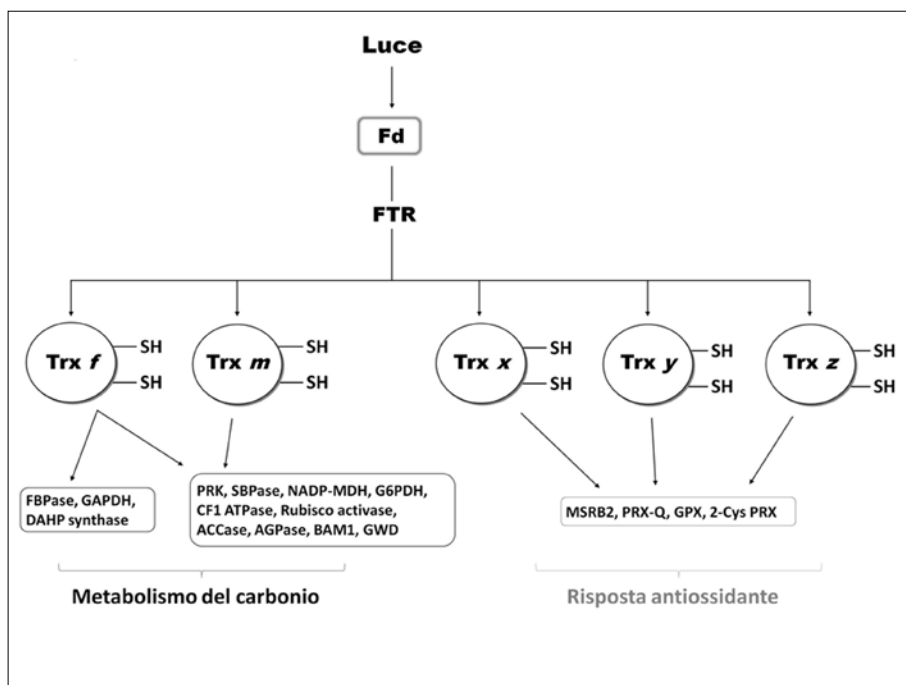


Fig. 5 Rappresentazione delle diverse classi di Trx cloroplastiche e della loro specificità sulla base delle informazioni note. Le Trx della classe f e m sono specifiche per il metabolismo del carbonio mentre le Trx x, y e z risultano specifiche per la risposta antiossidante

mentre nei tessuti non fotosintetici, le Trx ridotte sono rigenerate grazie al NADPH attraverso la NADPH tioredossina reductasi (NTR).

Inizialmente, nelle piante furono identificate due sole isoforme cloroplastiche di Trx, la m e la f, le quali sembravano avere un ruolo limitato alla regolazione redox di pochi enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio (Schurmann e Jacquot, 2000). Studi più recenti hanno dimostrato come, nelle piante superiori, le Trx siano presenti anche nel citosol, nei mitocondri, nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico (Buchanan e Balmer, 2005). Nel genoma di due organismi fotosintetici modello, l'angiosperma *Arabidopsis thaliana* e l'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, sono stati identificati geni che codificano rispettivamente per 20 e 6 differenti Trx, le quali possono essere raggruppate in diverse classi (Buchanan e Balmer, 2005). Il raggruppamento delle Trx in classi è basato principalmente sulle differenze di identità di sequenza. Le diverse classi di Trx, e di conseguenza le diverse isoforme, presentano una caratteristica localizzazione intracellulare. Le Trx di tipo h, che sono le più numerose, sono distribuite in

diversi compartimenti quali il citosol, il nucleo, il reticolo endoplasmatico e i mitocondri; le Trx di tipo *o* sono anch'esse presenti nei mitocondri. Nei cloroplasti invece, oltre alle classi *f* e *m*, sono presenti le classi *x*, *y* e *z* (Lemaire et al., 2003; Chibani et al., 2012) (fig. 5).

3.2 *TioredoSSine cloroplastiche: bersagli e specificità*

3.2.1 I bersagli delle Trx: la situazione fino agli inizi del millennio

Durante il decennio 1990-2000 si è molto indagato sulla regolazione Trx-dipendente di diversi enzimi bersaglio e sull'identificazione delle Cys coinvolte in tale regolazione. Le prime evidenze sperimentali avevano dimostrato come i principali enzimi coinvolti nella regolazione redox mediata da Cys fossero alcuni enzimi del Ciclo di Calvin-Benson, ma non era noto se tale regolazione fosse estendibile ad altri enzimi cloroplastici (Lemaire et al., 2007). Per tali informazioni, rese possibili solo grazie all'avvento di nuove metodiche basate sull'approccio proteomico, si dovrà aspettare almeno un altro decennio (vedi paragrafo 3.2.2). Come descritto in precedenza, le prime Trx scoperte, e a lungo ritenute le uniche dei cloroplasti, sono state quelle di tipo *f* e *m*, chiamate così perché originariamente individuate come Trx rispettivamente specifiche nel riattivare la fruttosio-1,6-bifosfato fosfatasi (FBPasi) e la malato deidrogenasi NADPH-dipendente (NADP-MDH) (Schurmann e Jacquot, 2000), enzimi entrambi coinvolti nel metabolismo del carbonio nei cloroplasti stessi. Oltre alla FBPasi, anche altri enzimi del Ciclo di Calvin-Benson vengono regolati specificamente o preferenzialmente dalla Trx *f*, tra questi la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH), la sedoeptulosio-1,7-bifosfato fosfatasi (SBPasi), la fosforibulochinasi (PRK) e la Rubisco attivasi (Schurmann e Jacquot, 2000) (fig. 6). La Rubisco attivasi non partecipa direttamente al Ciclo di Calvin-Benson, ma ne influenza profondamente l'attività regolando lo stato di attivazione della Rubisco. Analisi comparative tra le sequenze degli enzimi cloroplastici regolati dalle Trx e le corrispondenti isoforme localizzate nel citosol hanno dimostrato come la sequenza che permette la regolazione da tioredossine delle isoforme cloroplastiche sia stata acquisita nel corso dell'evoluzione (Ruelland e Miginiac-Maslow, 1999). Nel caso della NADP-MDH, le sequenze contenenti le Cys regolative costituiscono delle estensioni N- e C-terminali, tipiche dell'isoforma cloroplastica, ma assenti nell'isoforma citosolica. Anche nell'isoforma più abbondante della GAPDH dei cloroplasti (A_2B_2), si ritrova un'estensione C-terminale regolativa nelle subunità di tipo B ma non nelle subunità di tipo

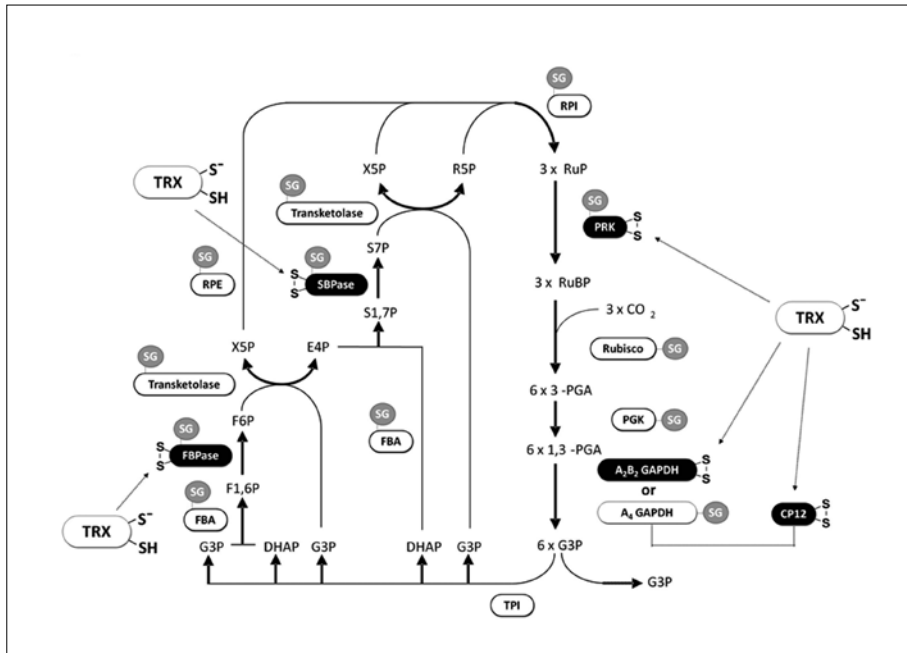


Fig. 6 *Regolazione redox degli enzimi del ciclo di Calvin-Benson. Tutti gli enzimi del ciclo sono stati identificati come bersagli potenziali della regolazione Trx-dipendente basata sull'interscambio ditiolo/disolfuro (bersagli conosciuti, riquadro nero e scritta bianca; bersagli potenziali, riquadro bianco con bordo nero e scritta nera) e/o della glutattonilazione (SG in riquadro grigio). FBA, fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi; FBPasi, fruttosio-1,6-bisfosfato fosfatasi; GAPDH, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi; PGK, fosfoglicerato chinasi; PRK, fosforibulochinasi; RPE, ribulosio fosfato-3-epimerasi; RPI, ribosio-5-fosfato isomerasi; Rubisco, ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi; SBPasi, sedoepitulosio-1,7-bisfosfato fosfatasi; TPI, trioso fosfato isomerasi; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; DHAP, diidrossiacetone fosfato; E4P, eritroso-4-fosfato; F1,6P, fruttosio-1,6-bisfosfato; F6P, fruttosio-6-fosfato; G3P, gliceraldeide-3-fosfato; R5P, ribosio-5-fosfato; RuBP, ribulosio-1,5-bisfosfato; RuP, ribulosio-5-fosfato; S1,7P, sedoepitulosio-1,7-bisfosfato; S7P, sedoepitulosio-7-fosfato; X5P, xilulosio-5-fosfato*

A, né nelle subunità di tipo C dell'isoforma citosolica (Fermani et al., 2007). Viceversa, nel caso della FBPasi, le Cys regolative sono inserite all'interno della sequenza e non si riconoscono delle vere e proprie sequenze aggiuntive.

3.2.2 I bersagli delle Trx: dal 2000 a oggi

Non si dispone, a tutt'oggi, di un quadro complessivo degli enzimi cloroplastici regolati dalle Trx e ciò comporta una forte limitazione nella comprensio-

ne della regolazione redox mediata da queste proteine. Tuttavia con l'avvento di metodologie proteomiche basate sull'utilizzo di cromatografia ad affinità e spettrometria di massa, sono stati identificati nell'ultimo decennio circa 400 potenziali proteine bersaglio coinvolte in numerosi processi metabolici (Montrichard et al., 2009; Buchanan e Balmer, 2005). I risultati ottenuti hanno permesso una maggiore comprensione del ruolo delle Trx, tanto nelle piante terrestri quanto nelle alghe e nei cianobatteri (Montrichard et al., 2009; Lemaire et al., 2007). Questi studi hanno identificato come potenziali bersagli della regolazione da parte delle Trx diversi enzimi coinvolti nella biosintesi degli isoprenoidi, dei tetrapirroli, delle vitamine (in particolare della tiamina o vitamina B1), nell'assemblaggio/folding proteico, nella degradazione dell'amido, nella glicolisi, nell'equilibrio bicarbonato/ CO_2 , nella degradazione proteica, nel metabolismo dello zolfo, nel ciclo ossidativo dei pentosi fosfati, nel metabolismo dell'azoto e nella replicazione del DNA. Inoltre, sono stati identificati anche tutti gli 11 enzimi del ciclo di Calvin-Benson, oltre a due proteine regolative a esso associate: la già citata Rubisco attivasi e il CP12 (piccola proteina destrutturata che regola l'attività di GAPDH e PRK, Trost et al., 2006) (fig. 6). Possiamo quindi prevedere che la regolazione redox possa potenzialmente controllare numerosi processi metabolici, anche molto diversi tra loro, non solo all'interno dei cloroplasti, ma in molti se non tutti i compartimenti della cellula vegetale.

3.2.3 La specificità delle Trx

La visione che si possedeva fino alla fine degli anni 1990 del ruolo delle Trx era relativamente semplice. Le sole Trx note appartenevano alle classi *h*, *m* e *f*. Mentre la prima comprende isoforme localizzate sia nel citosol che nei mitocondri, le ultime due sono esclusive del cloroplasto. Il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha svelato una situazione più complessa, soprattutto per quanto riguarda i plastidi. Infatti, oltre alle Trx *f* e *m*, sono state scoperte altre classi di Trx cloroplastiche denominate *x*, *y* e *z* (fig. 5). Inoltre, è stato anche evidenziato che ognuna di queste classi contiene una o più forme isoenzimatiche (2 per la *f*, 4 per la *m*, 1 per la *x*, 2 per la *y* e 1 per la *z*) (Collin et al., 2003, 2004; Chibani et al., 2012). Anche l'analisi del genoma di *Chlamydomonas* ha evidenziato una situazione analoga a quella riscontrata in *Arabidopsis*, con le classiche Trx cloroplastiche di tipo *f*, *e*, *m*, e le due classi aggiuntive *x* e *y* (Lemaire et al., 2003, 2004). La molteplicità di Trx negli organismi fotosintetici ha generato domande relative alla loro

specificità e alla loro possibile ridondanza funzionale. In effetti, non è stato facile assegnare una funzione specifica a ogni membro delle varie classi. Per investigare la specificità delle diverse Trx verso determinati enzimi bersaglio è necessario svolgere studi biochimici *in vitro* con le proteine purificate. I primi studi sono stati svolti testando l'efficienza di diverse Trx cloroplastiche nell'attivare i due enzimi modello, la FBPasi e la NADP-MDH. Mentre la regolazione del primo enzima è strettamente dipendente dalla Trx *f* (Collin et al., 2003, 2004), la NADP-MDH ha una specificità meno stringente. Infatti, questo enzima viene attivato da entrambe le classi seppure con una maggiore efficienza da parte della Trx *f*. Il ruolo delle Trx *f* e *m* è stato ulteriormente confermato da studi recenti che hanno evidenziato come queste due classi di Trx siano in grado di regolare l'attività di numerosi enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio (Lemaire et al., 2007; Marri et al., 2009; Née et al., 2009; Valerio et al., 2011) (fig. 5). Al contrario delle Trx *f* e *m*, le classi *x*, *y* e *z* sono coinvolte nella risposta antiossidante. Queste tre classi di Trx sono risultate infatti efficienti donatori di elettroni per alcuni enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, come la 2-cys perossiredossina (2-Cys-Prx) e la perossiredossina Q (Prx Q), la glutatione perossidasi (Gpx) e la metionina sulfossido reduttasi di tipo B2 (MSRB2) (Lemaire et al., 2007; Chibani et al., 2012) (fig. 5).

4. REGOLAZIONE ENZIMATICA ROS-DIPENDENTE

Come descritto in precedenza, alcune cisteine proteiche, oltre a essere coinvolte nella formazione di ponti disolfuro, possono andare incontro a diverse tipologie di modificazioni redox dipendenti dalle ROS. La capacità di una particolare cisteina proteica di subire modificazioni redox è strettamente dipendente dallo stato di deprotonazione del tiolo che ne influenza la sensibilità all'attacco da parte delle ROS, in particolare del perossido d'idrogeno (H_2O_2) (Dalle-Donne et al., 2007; Zaffagnini et al., 2012b). La reazione del perossido d'idrogeno con una cisteina reattiva porta alla formazione di diversi stati di ossidazione. Il gruppo tiolico della cisteina può essere infatti ossidato ad acido sulfenico (-SOH, ossidazione primaria), ad acido sulfinico (-SO₂H) o sulfonico (-SO₃H) (fig. 1). La forma sulfenica di una cisteina rappresenta una modificazione reversibile e instabile che tende facilmente a subire ulteriori *step* d'ossidazione ad acido sulfinico e sulfonico che vengono considerati modificazioni irreversibili. Alternativamente, la cisteina sulfenica può interagire con eventuali tioli vicini formando un ponte disolfuro intramolecolare, o

con il glutatione ridotto formando un ponte disolfuro misto (*i.e.* glutationilazione).

4.1 La S-glutationilazione

La S-glutationilazione è una modificazione post-traduzionale di tipo redox che avviene principalmente in condizioni di stress ossidativo e che consiste nella formazione di un ponte disolfuro misto tra un tiolo proteico e una molecola di glutatione ridotto (Dalle-Donne et al., 2007) (fig. 2). La S-glutationilazione costituisce principalmente un meccanismo di protezione di specifiche cisteine nei confronti dell'ossidazione irreversibile. Infatti, uno dei meccanismi possibili per formare questo ponte disolfuro misto, è la reazione del GSH con una cisteina sulfenica, reazione che ne previene la sovra-ossidazione. Oltre a questa funzione di protezione, la S-glutationilazione può costituire anche un meccanismo di regolazione dell'attività della proteina bersaglio sia che la cisteina glutationilata sia direttamente coinvolta nel processo catalitico della proteina sia che si trovi in prossimità dei residui coinvolti nella catalisi (Dalle-Donne et al., 2007).

La S-glutationilazione può avvenire attraverso diversi meccanismi non enzimatici che coinvolgono reazioni di scambio tiolo/disolfuro o l'attivazione dei residui di cisteina (Zaffagnini et al., 2012a). Le reazioni di scambio tiolo/disolfuro coinvolgono il glutatione ossidato (GSSG) che è in grado di reagire con i tioli proteici determinandone la glutationilazione e liberando una molecola di GSH. Tuttavia questo meccanismo è poco probabile che avvenga *in vivo* dove i livelli fisiologici di GSSG sono molto inferiori a quelli normalmente utilizzati negli esperimenti di S-glutationilazione *in vitro* (Zaffagnini et al., 2012b). Viceversa, una cisteina acida che diventa sulfenica in presenza di perossido d'idrogeno può subire il successivo attacco da parte del GSH con conseguente formazione di un ponte disolfuro misto e liberazione di una molecola d'acqua. Oltre alla cisteina della proteina bersaglio, anche la cisteina del glutatione può subire modificazioni che ne aumentano la reattività. Forme ossidate del glutatione, come il glutatione sulfenato (GSOH) e il glutatione disolfuro monossido [GS(O)SG], sono infatti considerate mediatori alternativi e più efficienti del GSSG nell'indurre la S-glutationilazione (Gao et al., 2009).

Mentre la S-glutationilazione può avvenire attraverso diversi meccanismi, la reazione inversa, denominata deglutinationilazione, è affidata a piccole proteine appartenenti alla famiglia multigenica delle ossidoreduttasi omologhe alle Trx, chiamate glutaredossine (Grx).

4.2 I bersagli cloroplastici della S-glutationilazione

Un esempio di particolare rilievo riguardante la segnalazione redox mediata dalla glutationilazione coinvolge la Trx *f* e il ciclo di Calvin-Benson. Questa classe di Trx cloroplastiche è caratterizzata dalla presenza di una cisteina addizionale che non ha funzioni catalitiche ma che è localizzata in prossimità del sito attivo (Michelet et al., 2005). Questo residuo di cisteina è strettamente conservato in tutte le Trx della classe *f* ed è assente nelle altre Trx cloroplastiche. Il trattamento della Trx *f* con H₂O₂ e GSH determina la glutationilazione specifica di questo residuo di cisteina addizionale, e la Trx *f* è la sola Trx cloroplastica a essere sensibile a questo tipo di modificazione redox. È interessante notare che la glutationilazione della cisteina addizionale non altera la capacità della Trx *f* a effettuare reazioni di scambio ditiolo/disolfuro, ma ostacola fortemente la sua interazione strutturale e funzionale con l'FTR (Michelet et al., 2005). Infatti, la Trx *f* glutationilata non viene ridotta in modo efficace dall'FTR e ciò altera negativamente la sua funzione di collegamento tra le reazioni luminose della fotosintesi e il ciclo di Calvin-Benson, essendo la Trx *f* l'unica tioredossina capace di regolare l'attività di due enzimi del ciclo di Calvin-Benson, la GAPDH e la FBPasi. Inoltre, la Trx *f* agisce anche come donatore di elettroni preferenziale per l'attivazione di altri enzimi del medesimo ciclo (Lemaire et al., 2007; Marri et al., 2009) e per l'inibizione del ciclo dei pentosi fosfati, necessaria da evitare cicli futili nel cloroplasto alla luce (Née et al., 2009). Nonostante la glutationilazione della Trx *f* non sia stata confermata *in vivo*, possiamo comunque ipotizzare che glutationilazione della Trx *f* sia una modificazione redox che contribuisce alla down-regolazione del ciclo di Calvin-Benson in condizioni di stress ossidativo.

Oltre a questo meccanismo regolativo indiretto, la glutationilazione può anche avere un effetto diretto sul ciclo di Calvin-Benson influenzando l'attività dei suoi enzimi. Infatti, è stato dimostrato che alcuni enzimi del ciclo quali la GAPDH, la trioso fosfato isomerasi e la fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi vengono inibiti mediante glutationilazione e che tale inibizione è reversibile (Ito et al., 2003; Zaffagnini et al., 2007). Inoltre, tutti gli enzimi del ciclo sono potenziali bersaglio della glutationilazione (Dixon et al., 2005; Zaffagnini et al., 2012c) (fig. 6). anche se l'effetto di questa modificazione redox sull'attività enzimatica rimane in molti casi da stabilire. Nel complesso, i risultati ottenuti fino a oggi ci permettono di ipotizzare che la glutationilazione possa costituire un meccanismo di regolazione del ciclo di Calvin-Benson in risposta all'insorgenza di condizioni di stress e che tale regolazione

possa indurre una segnalazione redox che permette alla cellula di adattarsi alle nuove condizioni intracellulari.

5. CONCLUSIONI

Sembra ormai chiaro che la regolazione luce-dipendente (*i.e.* mediata dalle Trx) del ciclo di Calvin-Benson interagisca con la glutationilazione ROS-dipendente formando un'intricata rete di relazioni (*network*), la cui comprensione è ancora a uno stadio embrionale. Questo *network* è basato principalmente sul fatto che numerosi enzimi sono stati individuati come potenziali target di entrambe le modificazioni redox. Studi futuri dovranno essere svolti allo scopo di studiare e caratterizzare i meccanismi molecolari che stanno alla base delle due diverse tipologie di regolazione redox, confermandone il ruolo nella modulazione delle attività enzimatiche coinvolte nell'assimilazione del carbonio. Si dovrà inoltre chiarire quale sia l'effettivo ruolo fisiologico della glutationilazione nella regolazione dell'assimilazione fotosintetica del carbonio in condizioni di stress.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano l'Accademia dei Georgofili e il prof. Amedeo Alpi per l'invito a presentare i propri dati sperimentali durante questa giornata di studio sul cloroplasto, un compartimento sub-cellulare estremamente interessante perché unico e fondamentale per le piante e ad alto "potenziale" energetico. Inoltre, gli autori ringraziano il progetto PRIN 2008 del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca per aver finanziato parte della ricerca presentata in questa relazione.

RIASSUNTO

La regolazione luce-dipendente dell'attività di diversi enzimi dei cloroplasti è un meccanismo di regolazione redox piuttosto noto che coinvolge le tioredossine (Trx) e le reazioni di scambio ditioilo/disolfuro con enzimi bersaglio. Un secondo tipo di modificazione redox post-traduzionale, denominata glutationilazione, sta emergendo in questi anni come ulteriore meccanismo di regolazione attivo nelle piante e in particolare nei cloroplasti.

In questo studio, dopo aver introdotto le basi molecolari della regolazione redox, verrà presentato il sistema delle tioredossine dei cloroplasti con dettagli sui suoi componenti e sulla rivoluzione genomica e proteomica che ha permesso di identificare ulteriori

classi di tioredossine e nuove potenziali proteine bersaglio. In seguito, si parlerà della glutationilazione proteica al fine di individuarne i meccanismi molecolari e il suo ruolo come meccanismo di regolazione redox degli enzimi cloroplastici. Infine, verrà discussa l'interazione tra la regolazione Trx-dipendente e quella mediata dalla glutationilazione all'interno dei cloroplasti, con particolare enfasi sulla regolazione redox del ciclo di Calvin-Benson.

ABSTRACT

Light-dependent modulation of chloroplast enzyme activities is a well established mechanism of redox regulation that involves thioredoxins (Trxs) and dithiol/disulfide exchange reactions. Recently, another post-translational redox modification, termed glutathionylation, is emerging as an additional mechanism of redox regulation in plants and in chloroplast in particular.

In this study, we first introduce the molecular basis of redox regulation and present the chloroplastic thioredoxin system from its discovery to the genomic and proteomic revolution that allowed the identification of additional chloroplastic thioredoxins and new potential TRX targets. Then, we introduce protein glutathionylation in order to pinpoint its possible molecular mechanisms and its role as a redox regulatory mechanism of chloroplastic enzymes. Finally, we discuss the possible interplay between TRX system and glutathionylation in chloroplasts, with emphasis on the redox regulation of Calvin-Benson cycle in response to both light and oxidative stress conditions.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BUCHANAN B.B., BALMER Y. (2005): *Redox regulation: a broadening horizon*, «Annu. Rev. Plant Biol.», 56, pp. 187-220.
- CHIBANI K., TARRAGO L., GUALBERTO J.M., WINGSLE G., REY P., JACQUOT J.P., ROUHIER N. (2012): *Atypical thioredoxins in poplar: the glutathione-dependent thioredoxin-like 2.1 supports the activity of target enzymes possessing a single redox active cysteine*, «Plant Physiol.», 159, pp. 592-605.
- COLLET J.F., MESSENS J. (2010): *Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins*, «Antioxid Redox Signal», 13, pp. 1205-16.
- COLLIN V., ISSAKIDIS-BOURGUET E., MARCHAND C., HIRASAWA M., LANCELIN J.M., KNAFF D.B., MIGINIAC-MASLOW M. (2003): *The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity*, «J. Biol. Chem.», 278, pp. 23747-52.
- COLLIN V., LAMKEMEYER P., MIGINIAC-MASLOW M., HIRASAWA M., KNAFF D.B., DIETZ K.J., ISSAKIDIS-BOURGUET E. (2004): *Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new γ -type*, «Plant Physiol.», 136, pp. 4088-95.
- DAI S., SCHWENDTMAYER C., SCHÜRMANN P., RAMASWAMY S., EKLUND H. (2000): *Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster*, «Science», 285, pp. 655-8.
- DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., COLOMBO R., MILZANI A. (2007): *S-glutathionylation in protein redox regulation*, «Free Radic. Biol. Med.», 43, pp. 883-898.

- DIXON DP., SKIPSEY M., GRUNDY NM., EDWARDS R. (2005): *Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis*, «Plant Physiol.», 138, pp. 2233-2244.
- FERMANI S., SPARLA F., FALINI G., MARTELLI PL., CASADIO R., PUPILLO P., RIPAMONTI A., TROST P. (2007): *Molecular mechanism of thioredoxin regulation in photosynthetic A2B2-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 104, pp. 11109-11114.
- FOYER C.H., NOCTOR G. (2005): *Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses*, «Plant Cell», 17, pp. 1866-75.
- GAO XH., BEDHOMME M., VEYEL D., ZAFFAGNINI M., LEMAIRE SD. (2009): *Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms*, «Mol. Plant», 2, pp. 218-235.
- ITO H., IWABUCHI M., OGAWA K. (2003): *The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in Arabidopsis thaliana: detection using biotinylated glutathione*, «Plant Cell Physiol.», 44, pp. 655-660.
- JACOB C., KNIGHT I., WINYARD P.G. (2006): *Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways*, «Biol. Chem.», 387, pp. 1385-97.
- LEMAIRE S.D., COLLIN V., KERYER E., QUESADA A., MIGINIAC-MASLOW M. (2003): *Characterization of thioredoxin γ , a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii*, «FEBS Letters», 545, pp. 87-92.
- LEMAIRE S.D., MICHELET L., ZAFFAGNINI M., MASSOT V., ISSAKIDIS-BOURGUET E. (2007): *Thioredoxins in chloroplasts*, «Curr. Genet.», 51, pp. 343-365.
- MARRI L., ZAFFAGNINI M., COLLIN V., ISSAKIDIS-BOURGUET E., LEMAIRE SD., PUPILLO P., SPARLA F., MIGINIAC-MASLOW M., TROST P. (2009): *Prompt and easy activation by specific thioredoxins of calvin cycle enzymes of Arabidopsis thaliana associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex*, «Mol. Plant», 2, pp. 259-269.
- MICHELET L., ZAFFAGNINI M., MARCHAND C., COLLIN V., DECOTTIGNIES P., TSAN P., LANCELIN JM., TROST P., MIGINIAC-MASLOW M., NOCTOR G., LEMAIRE SD. (2005): *Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants*, «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 102, pp. 16478-16483.
- MONTRICHARD F., ALKHALFIOU F., YANO H., VENSEL W.H., HURKMAN W.J., BUCHANAN B.B. (2009): *Thioredoxin targets in plants: the first 30 years*, «J. Proteomics», 72, pp. 452-74.
- NÉE G., ZAFFAGNINI M., TROST P., ISSAKIDIS-BOURGUET E. (2009): *Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin*, «FEBS Letters», 583, pp. 2827-2832.
- ROUHIER N., GELHAYE E., GUALBERTO J.M., JORDY M.N., DE FAY E., HIRASAWA M., DUPLESSIS S., LEMAIRE S.D., FREY P., MARTIN F., MANIERI W., KNAFF D.B., JACQUOT J.P. (2004): *Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense*, «Plant Physiol.», 134, pp. 1027-38.
- RUELLAND E., MIGINIAC-MASLOW M. (1999): *Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition?*, «Trends Plant Sci.», 4, pp. 136-141.
- SCHEIBE R. (1991): *Redox-modulation of chloroplast enzymes: a common principle for individual control*, «Plant Physiol.», 96, pp. 1-3.
- SCHURMANN P. (2003): *Redox signaling in the chloroplast: the ferredoxin/thioredoxin system*, «Antioxid. Redox Signal.», 5, pp. 69- 78.
- SCHURMANN P., JACQUOT J.P. (2000): *Plant thioredoxin systems revisited*, «Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.», 51, pp. 371-400.

- TROST P., FERMANI S., MARRI L., ZAFFAGNINI M., FALINI G., SCAGLIARINI S., PUPILLO P., SPARLA F. (2006): *Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms*, «Photosynth. Research», 89, pp. 263-275.
- VALERIO C., COSTA A., MARRI L., ISSAKIDIS-BOURGUET E., PUPILLO P., TROST P., SPARLA F. (2011): *Thioredoxin-regulated beta-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress*, «J. Exp. Bot.», 62, pp. 545-555.
- WINTERBOURN C.C., HAMPTON M.B. (2008): *Thiol chemistry and specificity in redox signaling*, «Free Radic. Biol. Med.», 45, pp. 549-561.
- ZAFFAGNINI M., MICHELET L., MARCHAND C., SPARLA F., DECOTTIGNIES P., LE MARCHAL P., MIGINIAC-MASLOW M., NOCTOR G., TROST P., LEMAIRE S.D. (2007): *The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation*, «FEBS J.», 274, pp. 212-226.
- ZAFFAGNINI M., BEDHOMME M., MARCHAND C.H., MORISSE S., TROST P., LEMAIRE S.D. (2012a): *Redox regulation in photosynthetic organism: focus on glutathionylation*, «Antioxid. Redox Signal.», 16, pp. 567-86.
- ZAFFAGNINI M., BEDHOMME M., LEMAIRE S.D., TROST P. (2012b): *The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts*, «Plant Sci.», 185-186, pp. 86-96.
- ZAFFAGNINI M., BEDHOMME M., GRONI H., MARCHAND C.H., PUPPO C., GONTERO B., CASSIER-CHAUVAT C., DECOTTIGNIES P., LEMAIRE S.D. (2012c): *Glutathionylation in the photosynthetic model organism Chlamydomonas reinhardtii: a proteomic survey*, «Mol. Cell. Proteomics», <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.014142>