

L'endosperma di frumento: una fabbrica per l'assemblaggio di macromolecole proteiche

INTRODUZIONE

Il frumento è alla base dell'alimentazione di più di un terzo della popolazione mondiale (Orth e Shellenberger, 1988) ed è principalmente coltivato per le sue cariossidi. Di questo cereale sono coltivate soprattutto due specie allopoliploidi: *Triticum durum* Desf., tetraploide ($2n=28$), con genoma AABB, e *Triticum aestivum* L., esaploide ($2n=42$), con genoma AABBDD.

La cariosside matura è formata da tre parti fondamentali: il germe o embrione, la crusca e l'endosperma. L'endosperma rappresenta più dell'80% della massa della cariosside ed è rivestito esternamente da uno strato di cellule aleuroniche. L'embrione ("germe di grano") rappresenta invece circa il 3% della cariosside. La crusca è formata dagli strati di rivestimento della cariosside (pericarpo all'esterno e residui dei tegumenti seminali all'interno) e dallo strato di aleurone e rappresenta circa il 14% del frutto.

Nei cereali la cariosside è la sede di accumulo dei prodotti della fotosintesi e del metabolismo dell'azoto: contiene infatti una limitata quantità di proteine (7-15%) e di lipidi (2-9%) e ha un elevato contenuto di carboidrati (65-75%), accumulati principalmente sotto forma di amido.

L'estesa coltivazione del frumento su scala mondiale trova spiegazione nel buon profilo nutrizionale, nella facilità di conservazione e trasporto delle relative cariossidi e nella grande versatilità degli impasti ottenuti mescolando la farina o la semola di frumento con acqua. Per quanto concerne il profilo nutrizionale, la cariosside di frumento è un'ottima fonte di carboidrati, essen-

* Cnr-Istituto di biologia e biotecnologia agraria, Milano

** Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli studi della Tuscia, Viterbo

do costituita per l'80% da amido e inoltre presenta un discreto contenuto di fibre, proteine, vitamine e minerali. Il contenuto proteico della cariosside di grano è compreso fra il 10% e il 18% del peso secco ma, come gran parte delle proteine di origine vegetale, le proteine di riserva del frumento sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali, quali la lisina e il triptofano.

LE PROTEINE DELLA CARIOSSIDE

La prima classificazione delle proteine di frumento è stata sviluppata da Osborne (1924) ed è basata sulla diversa solubilità delle proteine in vari solventi. Le proteine, quindi, possono essere classificate in:

- *albumine*, solubili in acqua;
- *globuline*, solubili in soluzioni saline;
- *gliadine*, solubili in soluzioni alcoliche;
- *glutenine*, solubili in acidi diluiti o alcali.

Le due ultime classi, gliadine e glutenine, costituiscono le proteine di riserva della cariosside. Queste proteine sono accumulate nell'endosperma durante la maturazione e rappresentano una fonte energetica di carbonio e azoto per l'embrione nelle fasi precoci di germinazione. Le proteine di riserva della cariosside conferiscono proprietà reologiche uniche agli impasti ottenuti con le farine di frumento, permettendone la lavorazione in una vasta gamma di prodotti, quali la pasta, il pane, il cous-cous, i biscotti e tanti altri e determinano, quindi, l'alto valore tecnologico che è proprio degli sfarinati di questo cereale.

Le proteine di riserva costituiscono il cosiddetto "glutine", ovvero la massa proteica viscoelastica che rimane dopo aver estratto con acqua le sostanze solubili (principalmente amido e proteine metaboliche) (Beccari, 1785).

La qualità e la quantità delle proteine costituenti il glutine sono i principali fattori che influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento e, in particolare, le proprietà visco-elastiche degli impasti. È generalmente accettato che le gliadine contribuiscano principalmente all'estensibilità dell'impasto, mentre le glutenine ne determinino la forza e l'elasticità (Shewry et al., 1997). Nel loro insieme, gliadine e glutenine rappresentano circa l'80% delle proteine della cariosside.

Le proprietà reologiche degli impasti di frumento sono in stretta relazione con le caratteristiche fisico-chimiche delle proteine costituenti il glutine, che si organizzano in un reticolo complesso stabilizzato da legami covalenti (legami disolfuro) e da legami di natura secondaria (legami a idrogeno e

di natura idrofobica) (Belton, 1999; Shewry et al., 2001). In particolare, mentre le glutenine sono proteine polimeriche le cui singole unità componenti sono unite fra di loro da legami disolfuro inter-molecolari, le gliadine sono proteine monomeriche che prendono parte alla formazione del glutine mediante legami idrogeno inter-catena, grazie ai numerosi residui di glutammina presenti, e mediante legami di natura idrofobica fra le catene non polari degli amminoacidi.

Gliadine

Le gliadine sono proteine monomeriche in quanto prive di residui cisteinici o in quanto tutte le cisteine presenti formano legami intra-molecolari. Inoltre, sono considerate il fattore principale che causa la malattia celiaca (Londei et al., 2005), la più comune intolleranza umana al glutine.

Le gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 25.000 e 50.000 e vengono tipicamente classificate in tre gruppi, α/β (o solo α), γ e ω -gliadine (Woychik et al., 1961), a seconda della loro mobilità elettroforetica su gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) (fig. 1). Le gliadine sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi omeologhi dei gruppi 1 e 6 (Lafiandra et al., 1984). I *loci* che codificano per la maggior parte delle α -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 6 e sono indicati come *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*), mentre quelli codificanti la maggior parte delle γ e ω -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 1 e sono indicati come *Gli-1* (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*) (fig. 2).

Le α -gliadine hanno una struttura primaria caratterizzata dalla presenza di tre distinte regioni (fig. 3): un breve dominio N-terminale, un dominio centrale privo di cisteine (formato da ripetizioni di sequenze ricche in prolina e glutammica) e infine un lungo dominio C-terminale contenente i sei residui di cisteina e la maggior parte degli amminoacidi carichi. Le α -gliadine hanno un peso molecolare compreso fra 30.000 e 34.000.

Anche le γ -gliadine sono formate da tre distinte regioni (fig. 3): un breve dominio N-terminale, un dominio centrale ripetuto formato dalla ripetizione di una sequenza ricca in prolina e glutammina e infine un dominio C-terminale contenente gli otto residui di cisteina e la maggior parte degli amminoacidi carichi. Le γ -gliadine hanno un peso molecolare compreso fra 26.000 e 36.000 e hanno una composizione amminoacidica simile alle α -gliadine e alle subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS), sebbene differiscano considerevolmente nelle loro sequenze.

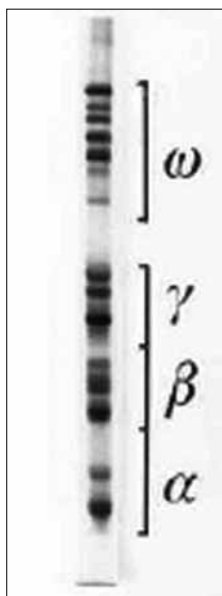


Fig. 1 Gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) di gliadine di frumento

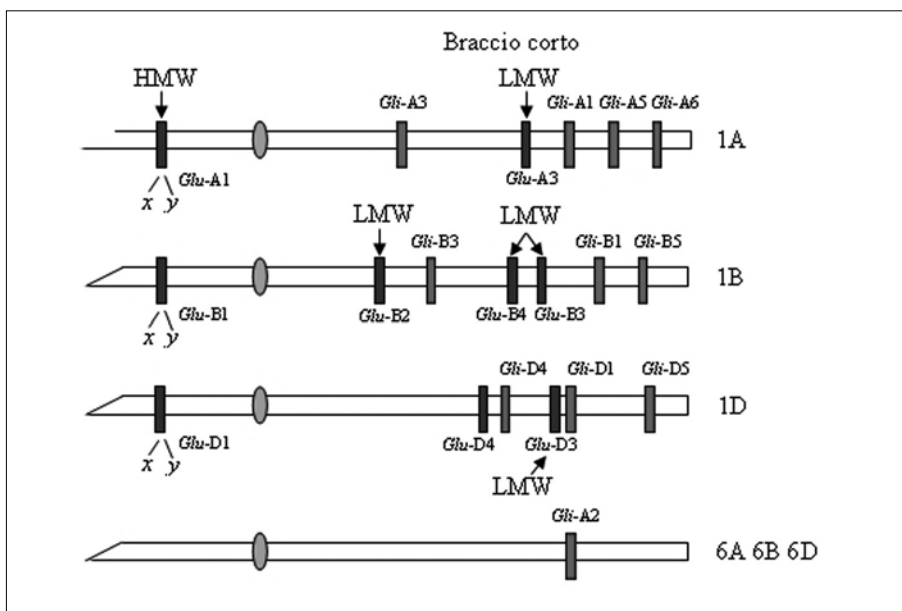


Fig. 2 Schema relativo alla localizzazione cromosomica dei geni codificanti le diverse proteine di riserva del frumento. I loci indicati dalle sigle HMW o LMW codificano rispettivamente per le HMW-GS (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare) e LMW-GS (subunità gluteniniche a basso peso molecolare); tutti gli altri loci (compresi quelli minori) sono relativi alle gliadine. L'ovale corrisponde al centromero

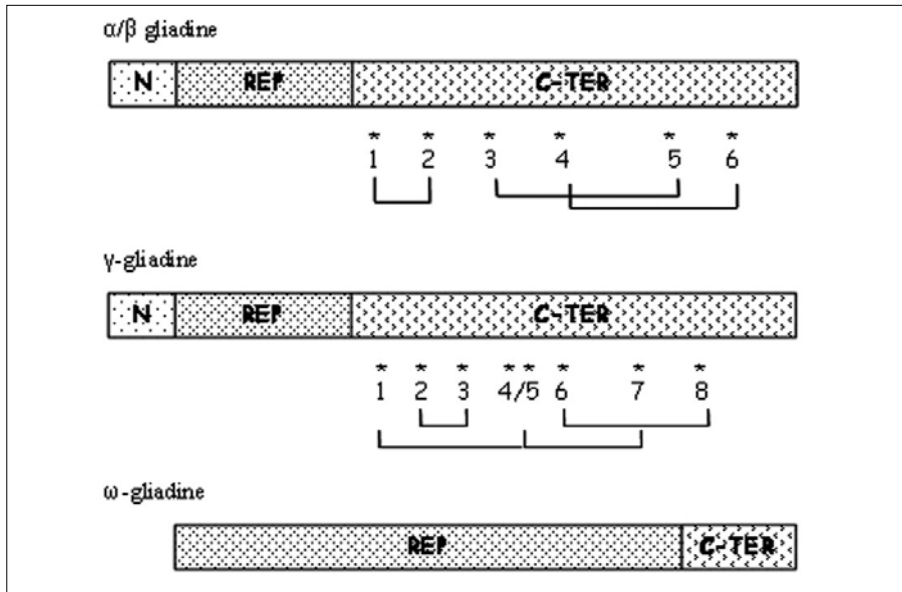


Fig. 3 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica delle α -, γ - e ω -gliadine. N, dominio N-terminale; REP, dominio ripetuto, C-TER, dominio C-terminale. Gli asterischi indicano la posizione dei residui cisteinici. Sono riportati inoltre i presunti ponti disolfuro intra-molecolari nelle α - e γ -gliadine

Infine, le ω -gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 44.000 e 74.000 e mostrano una composizione amminoacidica e una struttura del tutto diversa da quella delle α - e γ -gliadine (fig. 3). Le ω -gliadine sono prive di residui di cisteina e sono costituite quasi esclusivamente da un dominio a sequenze ripetute, ricco in glutammina, acido glutammico, prolina e fenilalanina (Hsia and Anderson, 2001).

Glutenine

Le glutenine, o polimeri gluteninici, sono polimeri con un peso molecolare che può variare da 60.000 fino all'ordine del milione, costituendo uno dei polimeri proteici di maggiori dimensioni presenti in natura (Wrigley, 1996). Le dimensioni dei polimeri gluteninici costituiscono il fattore più importante nel determinare le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento. In particolare, maggiori sono le dimensioni di questi polimeri e migliori sono le caratteristiche di forza ed elasticità tipiche degli impasti (Weegels et al., 1996).

In seguito a riduzione dei ponti disolfuro inter- e intra-molecolari, le subunità gluteniniche possono essere separate su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) in due gruppi a diversa mobilità elettroforetica, costituiti da subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS) e subunità a basso peso molecolare (LMW-GS).

Le HMW-GS sono rappresentate da un numero ridotto di subunità che varia da 3 a 5 (raramente 6), mentre le LMW-GS sono molto più abbondanti ed eterogenee.

Subunità gluteniniche ad alto peso molecolare

Nonostante rappresentino solo il 5-10% delle proteine totali nella cariosside matura, le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS) costituiscono il gruppo di prolamine di frumento più ampiamente studiato. Le HMW-GS hanno un peso molecolare compreso tra 80.000 e 120.000 e, diversamente dalle altre proteine del frumento, hanno un alto contenuto in glicina e un più basso contenuto in prolina (Shewry et al., 1986).

Le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sui bracci lunghi dei cromosomi 1A, 1B, 1D (Payne et al., 1981) e sono indicati come *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1*, e *Glu-D1*) (fig. 2). Ognuno di questi *loci* è costituito da due geni strettamente associati che codificano per due subunità proteiche con differente struttura e peso molecolare, denominate subunità *x* e *y*, rispettivamente a maggiore e minore peso molecolare. Tutte le cultivar di frumento tenero possiedono le subunità 1Bx, 1Dx, e 1Dy, mentre possono avere o non avere la subunità 1By e/o la 1Ax.

Le HMW-GS di tipo *x* e di tipo *y* sono costituite da tre domini, un dominio N-terminale di circa 100 residui, un dominio centrale di circa 400-600 residui, formato da una lunga serie di sequenze amminoacidiche ripetute e infine un breve dominio C-terminale, di circa 50 residui (fig. 4). Fondamentalmente, la differenza di grandezza tra le varie subunità è dovuta alla diversa estensione del dominio ripetuto e in particolare al diverso numero di ripetizioni presenti (D'Ovidio et al., 1995).

Una caratteristica delle HMW-GS è la presenza, in prossimità delle estremità N e C-terminali, di residui di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intra- e inter-molecolari. Le subunità di tipo *x* possiedono quattro residui di cisteina per catena polipeptidica, di cui tre localizzati nell'estremità N-terminale e uno nella sequenza C-terminale. Unica eccezione ad oggi nota, è rappresentata dalla subunità 1Dx5 che presenta, oltre alle quattro cisteine

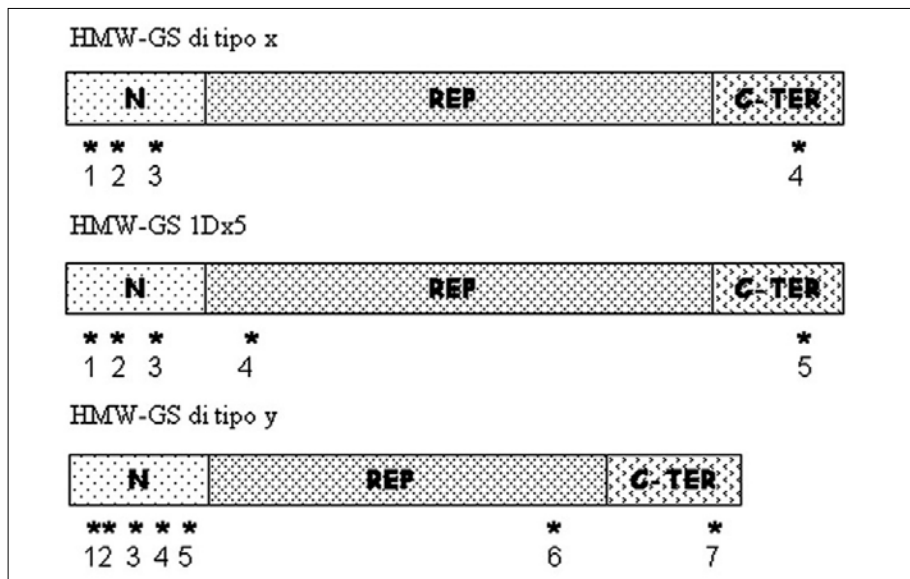


Fig. 4 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica delle HMW-GS di tipo x e di tipo y. È riportata, oltre alla struttura delle HMW-GS di tipo x canoniche (in alto), anche quella della subunità 1Dx5 (al centro) che presenta un'addizionale cisteina localizzata all'inizio del dominio ripetuto. I numeri indicano i residui di cisteina

tipiche delle subunità di tipo x, un addizionale residuo di cisteina localizzato nel dominio ripetuto, in prossimità della regione N-terminale. La subunità 1Dx5 è presente in varietà di frumento tenero le cui farine mostrano elevate qualità tecnologiche, in particolar modo per quanto riguarda i processi di panificazione.

Le subunità di tipo y possiedono sette residui cisteinici, di cui cinque localizzati nel dominio N-terminale e due in quello C-terminale.

Subunità gluteniniche a basso peso molecolare

Le subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS) sono un gruppo di proteine molto vasto ed eterogeneo e per questo motivo la loro struttura, organizzazione e correlazione con i parametri qualitativi è a uno stadio di caratterizzazione ancora incompleto. In base alla loro mobilità elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), le LMW-GS sono state classificate in tre gruppi distinti, gruppo B, C e D (Payne e Corfield, 1979). Questa classificazione, inizialmente basata sulla diversa mobilità elettroforetica, riflette

di fatto le differenti caratteristiche biochimiche e strutturali dei polipeptidi (D'Ovidio e Masci, 2004).

Il gruppo D comprende subunità con peso molecolare di circa 40.000 e corrisponde a ω -gliadine modificate che hanno acquisito un residuo di cisteina in seguito a un evento di mutazione, tramite il quale prendono parte alla formazione dei polimeri gluteninici, formando legami inter-molecolari con le altre subunità (Masci et al., 1993; Masci et al., 1999).

Il gruppo C include almeno trenta proteine, con peso molecolare compreso tra 30.000 e 35.000, di cui la maggior parte corrisponde a gliadine di tipo α/β e γ , modificate nel numero e/o nella posizione dei residui cisteinici. In virtù di questa caratteristica, prendono parte alla formazione della frazione polimerica (aggregata), come anche le subunità appartenenti al gruppo D.

Infine il gruppo B include subunità con peso molecolare compreso tra 35.000 e 42.000 e a esso appartengono le LMW-GS propriamente dette. Queste, a loro volta sono state ulteriormente distinte in tre sottogruppi sulla base del primo residuo amminoacidico della sequenza polipeptidica matura, rispettivamente serina (LMW-s), metionina (LMW-m) e isoleucina (LMW-i). LMW-s e LMW-m sono le più abbondanti, mentre le LMW-i sono poco rappresentate e sono codificate principalmente (se non esclusivamente) da geni presenti sul braccio corto del cromosoma 1A (Muccilli et al., 2010).

Per quanto concerne la struttura polipeptidica, le LMW-s e LMW-m sono caratterizzate da pesi molecolari compresi fra 35.000 e 50.000 (LMW-s) e 30.000-40.000 (LMW-m), e sono organizzate in tre regioni distinte (fig. 5). La prima regione è costituita da 13-16 residui amminoacidici; la seconda è costituita da un dominio ripetuto ricco in prolina e glutamina; infine, il terzo dominio è caratterizzato da una regione C-terminale (D'Ovidio e Masci, 2004). Sia le LMW-s che le LMW-m contengono otto residui cisteinici, di cui il primo è presente nella corta regione N-terminale o all'inizio del dominio ripetuto, mentre i rimanenti sette sono situati nel dominio C-terminale. Il primo e il settimo residuo cisteinico sono verosimilmente coinvolti nella formazione di legami disolfuro inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche (fig. 5 e 6).

La sequenza N-terminale delle LMW-s corrisponde a SHIPGL-, mentre quella delle LMW-m è più variabile, includendo sequenze di tipo METSHIPGL-, METSRIPGL-, e METSCIPGL- (D'Ovidio e Masci, 2004). In alcuni sporadici casi è stata identificata la sequenza MENSHPGL- (Ikeda et al., 2006). LMW-m e LMW-s differiscono perciò essenzialmente per la presenza

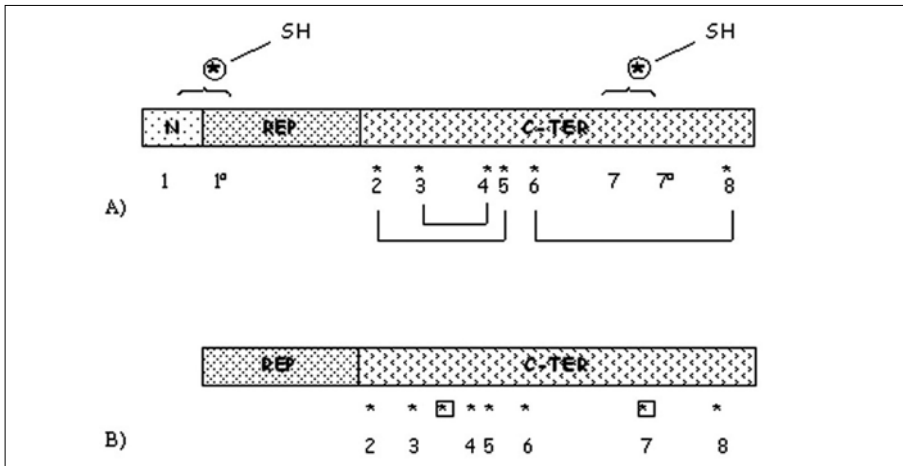


Fig. 5 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica matura delle LMW-GS tipiche con particolare riferimento alla posizione delle cisteine. A, LMW-s e LMW-m; B, LMW-i. N, regione N-terminale; REP, dominio ripetuto; C-TER, regione C-terminale. Nel pannello A la posizione dei residui cisteinici è indicata da un asterisco, in particolare i residui 2, 3, 4, 5, 6 e 8 sono verosimilmente impegnati nella formazione di legami intra-molecolari, mentre i residui 1 e 7 (o quelli nelle posizioni alternative 1a e 7a) formano legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche. Nel pannello B, i probabili residui coinvolti nella formazione dei legami inter-molecolari sono indicati da un box

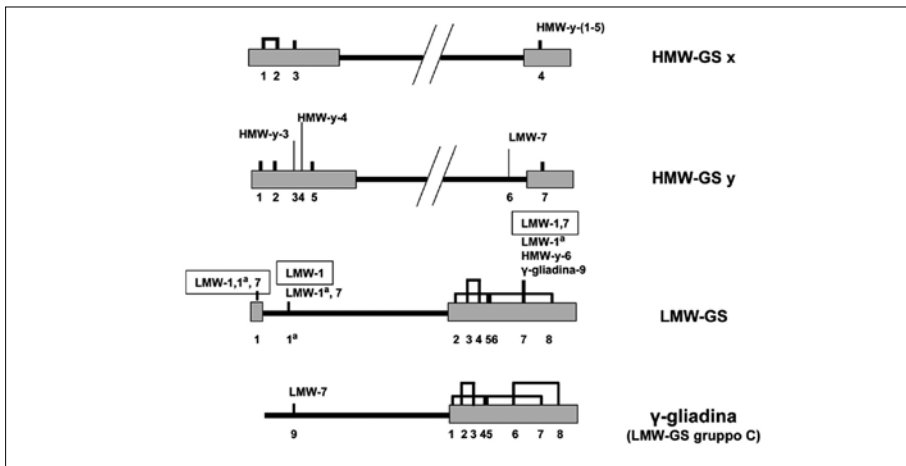


Fig. 6 Ponti disolfuro intercatena fra subunità gluteniniche. I ponti disolfuro intercatena che sono stati osservati mediante espressione di subunità gluteniniche in sistemi eterologhi sono indicati in un riquadro. Gli altri ponti disolfuro sono stati evidenziati mediante analisi diretta delle proteine del glutine. Nel caso della cisteina 4 delle HMW-GS di tipo x, non è stato determinato quale dei residui 1-5 delle subunità y sia implicato nella formazione di un disolfuro intercatena

TIPO DI LMW-GS	SEQUENZA N-TERMINALE
LMW-s	SHIPGL-
LMW-m	MET SHIPGL-
	MET SCIPGL-
	MET SRIPGL-
	MEN SHIPGL-

Tab. 1 *Confronto tra le sequenze amminoacidiche N-terminali delle sequenze LMW-GS di tipo s (LMW-s) e di tipo m (LMW-m). Si nota che i due gruppi differiscono principalmente per la presenza/assenza dei primi tre amminoacidi (MET o, raramente, MEN, in grassetto)*

nelle LMW-m dei primi tre amminoacidi MET (o MEN) (tab. 1). Questo ha indotto a ipotizzare che l'assenza dei primi tre amminoacidi nelle LMW-s sia dovuta alla rimozione della sequenza amminoacidica MEN, probabilmente per opera di una asparaginil endoproteasi (Masci et al., 1998). Un'ipotesi analoga era stata avanzata da Dupont et al. (2004) relativamente ad alcune ω -gliadine. Le asparaginil endoproteasi sono delle proteasi a cisteina, a localizzazione vacuolare, coinvolte nei processi di maturazione post-traduzionale di molte proteine di riserva (Gruis et al., 2002; Müntz e Shutov, 2002). Se questa ipotesi fosse confermata, il vacuolo sarebbe quindi il sito di maturazione delle LMW-GS.

Le LMW-i, pur presentando una struttura molto simile a quella delle LMW-m e LMW-s, mancano della breve regione N-terminale e la sequenza del polipeptide maturo inizia direttamente con il dominio ripetuto (fig. 5). Nonostante siano prive della regione N-terminale, nella quale è solitamente presente il primo residuo cisteinico, la presenza di un addizionale residuo tra la cisteina in posizione 3 e quella in posizione 4, fa sì che LMW-i mantengano inalterato il numero di cisteine caratteristico delle LMW-GS tipiche, che è pari a otto. Sebbene non ci siano dati certi circa l'organizzazione dei ponti disolfuro nelle LMW-i, in relazione alla posizione dei residui cisteinici rispetto a quella delle LMW-m e LMW-s, si ritiene che esse formino dei legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche, tramite la cisteina aggiuntiva localizzata fra C3 e C4 e la cisteina in posizione 7, agendo pertanto da elementi di allungamento dei polimeri gluteninici (Cloutier et al., 2001).

Jackson et al. (1983) e Payne et al. (1984, 1985), hanno dimostrato che la maggior parte delle LMW-GS, sia di tipo B, che C che D sono codificate

da geni presenti sui bracci corti dei cromosomi della serie 1, ovvero 1A, 1B e 1D, negli stessi *loci*, o strettamente associati, ai *loci* complessi *Gli-1* dove sono presenti i geni codificanti le γ e ω -gliadine (fig. 2). I *loci* per le LMW-GS sono stati designati come *Glu-3*. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che alcune LMW-GS di tipo C sono codificate da geni presenti sui bracci corti dei cromosomi del gruppo 6 (6A, 6B, 6D).

BIOSINTESI DELLE PROTEINE DI RISERVA DI FRUMENTO

L'endosperma di frumento è un tessuto specializzato nella biosintesi e nell'accumulo di diverse sostanze di riserva, in particolare di proteine, amido e lipidi. Le proteine di riserva sono accumulate all'interno del vacuolo, ma la loro biosintesi inizia sui polisomi legati alle membrane del reticolo endoplasmatico nel quale sono introdotte presumibilmente in maniera cotraduzionale (Greene, 1981). Successivamente sono trasportate, attraverso meccanismi diversi, al comparto vacuolare. Il reticolo endoplasmatico non è però un semplice sito di transito, ma piuttosto un comparto dove le proteine subiscono una serie di modificazioni che sono essenziali per la loro maturazione strutturale (Vitale e Ceriotti, 2004). Una delle principali funzioni del reticolo endoplasmatico è infatti quella di favorire il ripiegamento e, nel caso di proteine oligomeriche, l'assemblaggio delle proteine neosintetizzate. Questo comparto contiene numerosi fattori proteici che sono in grado di favorire la corretta maturazione strutturale delle proteine e che costituiscono il sistema ERAF (*Endoplasmic Reticulum Assisted Folding*). In generale, inoltre, le proteine neosintetizzate sono trattenute nel reticolo endoplasmatico finché non hanno completato la loro maturazione strutturale. La presenza di mutazioni, di errori nella trascrizione e traduzione, o nel ripiegamento della proteina, possono portare all'accumulo nel reticolo endoplasmatico di polipeptidi difettosi, che quindi non saranno trasportati fuori da questo comparto. L'eliminazione di queste proteine difettose avviene principalmente attraverso il cammino degradativo (ERAD, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*), capace di riconoscere le proteine non ripiegate o ripiegate in maniera non corretta e di indirizzarle alla degradazione. Quindi, nel suo complesso, il reticolo endoplasmatico può essere considerato il comparto di ingresso del cammino di secrezione dove le proprietà intrinseche della proteina neosintetizzata (stabilità termodinamica, cinetica di ripiegamento) e l'attività dei sistemi di ripiegamento, degradazione e trasporto determinano il destino della proteina stessa (Wiseman et al., 2008).

Modificazioni co-traduzionali o post-traduzionali nella biosintesi delle proteine di riserva di frumento

Un evento precoce nella biosintesi delle proteine di riserva è la rimozione del peptide segnale, una sequenza N-terminale che ha la funzione di indirizzare la proteina nascente al reticolo endoplasmatico. La rimozione di questa sequenza avviene per opera di una peptidasi del segnale, che non è però stata caratterizzata in frumento. Nel caso di una LMW-GS, è stato mostrato che il ripiegamento *in vitro* della proteina, monitorato attraverso la formazione dei ponti disolfuro intracatena, non è influenzato negativamente dalla mancata rimozione del peptide segnale (Orsi et al., 2001). Tuttavia, un efficiente taglio del peptide segnale è necessario *in vivo* per il rilascio della proteina nel lume di questo comparto. In mais, mutazioni che bloccano il taglio del peptide segnale causano l'associazione dei polipeptidi zeinici mutati alle membrane del reticolo endoplasmatico, e scatenano una reazione di risposta conosciuta come *Unfolded Protein Response* (Gillikin et al., 1997).

Un'altra modificazione covalente a cui sono soggette molte proteine di riserva del frumento consiste nella formazione di ponti disolfuro intracatena e, nel caso della frazione polimerica, di ponti intercatena.

Le prolamine (la famiglia di proteine di riserva a cui appartengono gliadine e glutenine), insieme alle proteine 2S e agli inibitori dell' α -amilasi/tripsina dei cereali, sono caratterizzate dalla presenza di tre regioni conservate (A, B e C) che si pensa si siano originate dalla triplicazione di un dominio ancestrale, seguita da inserzioni e delezioni (Tatham et al., 1995; Shewry et al., 1999). Nelle prolamine ricche in zolfo (il gruppo di prolamine a cui appartengono le α/β - e γ -gliadine e le LMW-GS) queste tre regioni costituiscono buona parte del dominio C-terminale a sequenza non ripetuta, dove sono localizzati i ponti disolfuro intracatena (fig. 3 e 5). Un'analisi di 98 sequenze di prolamine ricche in zolfo di otto diverse specie di cereali ha evidenziato la conservazione quasi assoluta di quattro residui di cisteina che, in diversi membri di questo gruppo di proteine, sono coinvolti nella formazione di due ponti disolfuro intracatena (Ems-McClung et al., 2002). Questo alto livello di conservazione suggerisce che questi due ponti disolfuro abbiano un ruolo importante nella maturazione strutturale delle prolamine ricche in zolfo. Utilizzando un sistema di traduzione-traslocazione *in vitro* basato su componenti vegetali, è stato possibile evidenziare il ruolo fondamentale di uno di questi due ponti disolfuro nella maturazione strutturale di una LMW-GS. La formazione di questo ponte (che coinvolge le cisteine 2 e 5 delle LMW-GS, fig. 5A) è risultata essenziale per mantenere la proteina in uno stato monomerico, evitan-

done l'aggregazione (Orsi et al., 2001). Questo ponte è conservato non solo nelle prolamine ricche in zolfo, ma anche nelle albumine 2S e negli inibitori dell' α -amilasi/tripsina dei cereali. Al contrario, la formazione degli altri due ponti intracatena (coinvolgenti le cisteine 3 e 4 e 6 e 8, rispettivamente, fig. 5A) presenti nella LMW-GS non è risultata necessaria per evitare l'aggregazione della proteina neosintetizzata. Inoltre, successivi studi *in vivo* hanno dimostrato che questi due ultimi ponti disolfuro non sono necessari per permettere alla proteina di ripiegarsi in una conformazione compatibile con la polimerizzazione (Lombardi et al., 2009).

Nel loro complesso, questi risultati indicano che uno dei tre ponti disolfuro intracatena ha un ruolo fondamentale nel ripiegamento delle LMW-GS. Queste conclusioni sono in accordo con i risultati ottenuti con due altre proteine della famiglia delle prolamine. Mutazioni introdotte in residui di cisteina corrispondenti al residuo 5 delle LMW-GS (fig. 5A) hanno una chiara influenza sulla digeribilità di γ -zeina di mais (Lee e Hamaker, 2006), sulla solubilità di questa proteina quando è espressa in *Escherichia coli* (Ems-McClung et al., 2002) e sul trasporto intracellulare di una α -globulina di riso (Kawagoe et al., 2005). Questi risultati suggeriscono quindi che un ponte disolfuro altamente conservato nella famiglia delle prolamine abbia un ruolo importante nel ripiegamento di molte di queste proteine, e non solo delle LMW-GS.

Il ruolo dei ponti disolfuro intracatena nel ripiegamento delle HMW-GS non è stato ancora analizzato. Anche queste proteine, dal punto di vista strutturale, appartengono alla famiglia delle prolamine. Nelle HMW-GS una lunga sequenza ripetuta è interposta fra la regione B e la regione C. Un confronto fra i contesti di sequenza in cui sono inserite le cisteine presenti nelle HMW-GS e le prolamine ricche in zolfo di frumento (α/β -, γ -gliadine e LMW-GS) evidenzia delle similarità, a sostegno dell'ipotesi che i domini non ripetitivi di queste proteine siano evoluti da un progenitore ancestrale comune. Di particolare interesse è l'osservazione che le subunità di tipo γ contengono una coppia di cisteine appaiate (3 e 4 in fig. 4 e 6) poste in un contesto simile a quello della coppia di cisteine appaiate a cui appartiene la cisteina 5 nelle LMW-GS (fig. 5 e 6). Non pare tuttavia che, come nelle LMW-GS e nelle altre prolamine ricche in zolfo, il primo di questi due residui (3 in fig. 4 e 6) sia implicato nella formazione di un disolfuro intracatena. L'analisi di peptidi isolati dopo digestione triptica delle proteine del glutine ha rivelato la presenza di subunità di tipo γ associate mediante la formazione di due ponti disolfuro intercatena coinvolgenti le cisteine 3 e 4 (fig. 6) (Köhler et al., 1991), che quindi non sembrerebbero essere coinvolte nella formazione di ponti intracatena.

La regione N-terminale della subunità 1Bx7 contiene invece un singolo ponte disolfuro fra i residui 1 e 2 (fig. 6) (Köhler et al., 1993). Quale sia il ruolo di questo ponte disolfuro intracatena e se un ponte disolfuro analogo sia presente anche in altre HMW-GS non è stato chiarito. In ogni caso, le informazioni disponibili suggeriscono che, nonostante la conservazione della struttura AB nel dominio non ripetuto N-terminale delle HMW-GS, la mappa dei ponti disolfuro intracatena non sia riconducibile a quella che caratterizza le prolamine ricche in zolfo.

Organizzazione delle subunità nei polimeri gluteninici

Oltre a rivestire un ruolo importante nel ripiegamento di alcune prolamine, i ponti disolfuro svolgono un ruolo essenziale nella formazione dei polimeri gluteninici. Infatti una delle caratteristiche fondamentali che distinguono le proteine di riserva del frumento da quelle di altri cereali è la capacità di formare grandi polimeri che conferiscono agli impasti ottenuti dalle farine di questo cereale specifiche proprietà tecnologiche. Sebbene la formazione dei polimeri gluteninici abbia un ruolo fondamentale nel determinare la qualità delle farine, molti aspetti di questo processo non sono stati ancora chiariti. Analogamente, la struttura finale dei polimeri gluteninici rimane in gran parte oscura. Le difficoltà nel determinare la struttura di questi polimeri è in parte dovuta alle loro caratteristiche fisico-chimiche e alla loro complessità, essendo costituiti da un numero elevato di diverse subunità (HMW-GS, LMW-GS, gliadine aggregate). I dati finora disponibili sull'organizzazione delle singole subunità nei polimeri gluteninici sono stati ottenuti utilizzando essenzialmente tre diversi approcci: la riduzione parziale dei polimeri, l'identificazione di peptidi cistinici dopo digestione proteolitica del glutine e l'espressione di singole subunità gluteniniche in sistemi eterologhi.

La riduzione parziale di polimeri gluteninici porta all'accumulo prevalentemente di dimeri x - y , suggerendo che la formazione di ponti disolfuro fra subunità di tipo x e subunità di tipo y sia una caratteristica importante di questi polimeri proteici (Werner et al., 1992). Questa conclusione è corroborata dalla identificazione di un peptide cistinico in cui la regione C-terminale di una subunità di tipo x forma un ponte disolfuro con una delle cisteine presenti nella regione N-terminale di una subunità di tipo y (Tao et al., 1992). A conferma di quanto esposto, è stato riportato che una proteina ricombinante di fusione costituita dal dominio N-terminale della subunità 1Dy10 e dal dominio ripetuto e C-terminale della subunità 1Dx5, è presente principal-

mente in forma monomerica nell'endosperma di frumento (Shimoni et al., 1997). La presenza della proteina come monomero è dovuta alla formazione di un legame disolfuro intra-molecolare tra la cisteina presente nel dominio C-terminale della subunità 1Dx5 e una posta nel dominio N-terminale della subunità 1Dy10. Queste osservazioni dimostrano che esiste una marcata affinità tra il dominio N-terminale della subunità *y* e quello C-terminale della subunità *x*. Tuttavia, i risultati ottenuti mediante analisi di peptidi cistinici, che suggeriscono la presenza di legami intercatena fra subunità di tipo *y* (Köhler et al., 1991), insieme all'osservazione che sia subunità di tipo *x* che di tipo *y* possono essere incorporate in polimeri ad alto peso molecolare quando espresse in piante di tabacco (Shani et al., 1994), suggeriscono che le HMW-GS possano associarsi anche tramite la formazione di ponti disolfuro fra subunità dello stesso tipo (*x* o *y*).

Nel caso delle LMW-GS, l'analisi di peptidi cistinici derivati da digestione di proteine del glutine ha rivelato la presenza di quattro diversi legami disolfuro intercatena coinvolgenti le cisteine 1^a e 7 delle LMW-GS (fig. 6) (Keck et al., 1995). Questi risultati indicano che le LMW-GS possono associarsi sia fra loro, che con HMW-GS e gliadine aggregate (fig. 6).

Ulteriori dettagli sul meccanismo di assemblaggio delle LMW-GS sono stati ottenuti mediante espressione di queste proteine in sistemi eterologhi (Lombardi et al., 2009). Questi studi hanno evidenziato una bassa specificità nella formazione di ponti disolfuro intercatena durante l'assemblaggio di una LMW-GS. Questa subunità, contenendo due residui di cisteina che rimangono disponibili per la formazione di ponti disolfuro intercatena (1 e 7), può potenzialmente formare omopolimeri contenenti tre diversi tipi di legame (1-1, 1-7 e 7-7). La formazione di questi tre tipi di legame è stata in effetti osservata, indicando che lo stesso residuo di cisteina può formare un legame disolfuro con *partner* diversi. Inoltre, la coespressione di mutanti di due diverse LMW-GS (in cui i residui disponibili per la polimerizzazione erano 1 e 7 nella prima e 1^a e 7 nella seconda, vedi fig. 5) ha permesso di verificare la formazione di eterodimeri associati attraverso legami 1-1^a, 1-7, 1^a-7 e 7-7, vale a dire coinvolgenti tutte le possibili combinazioni dei quattro residui di cisteina presenti nelle proteine *wild-type* e non impegnati nella formazione di disolfuri intracatena (fig. 6). Nel loro complesso, questi risultati evidenziano un'importante caratteristica delle LMW-GS: il loro assemblaggio non è controllato da una rigida specificità nella formazione di ponti disolfuro intercatena e quindi consente potenzialmente la formazione di un numero molto elevato di polimeri diversi, non solo per lunghezza, ma anche per composizione e organizzazione delle subunità gluteniniche. Infine, l'analisi di peptidi

isolati dopo digestione enzimatica delle proteine del glutine ha evidenziato la presenza di un legame fra la cisteina 7 di una LMW-GS e la cisteina 6 di una HMW-GS di tipo γ (Keck et al., 1995).

Esistono svariati modelli molecolari ipotetici della struttura dei polimeri gluteninici di cui uno dei primi, proposto da Ewart (1979) e successivamente elaborato da Kasarda (1989), propone che le HMW-GS e le LMW-GS siano legate tra di loro casualmente, in modo più o meno lineare. Tale modello si basa sull'assunzione che ogni singola subunità gluteninica (HMW-GS e LMW-GS del gruppo B) sia in grado di formare solo due legami disolfuro con le altre subunità e, pertanto, l'incorporazione nel polimero in crescita di subunità in grado di formare un solo ponte disolfuro (come le LMW-GS appartenenti ai gruppi C e D), determinerebbe l'arresto della crescita del polimero. Sulla base di quanto esposto, secondo tale modello le dimensioni dei polimeri gluteninici dovrebbero variare in maniera lineare.

Alcune evidenze, come ad esempio l'esistenza di una subunità x delle HMW-GS (la subunità 1D α 5) che si suppone sia in grado di formare tre legami disolfuro inter-molecolari dando luogo a una ramificazione, non sono però in accordo con questo modello.

Nel 1985, Graveland et al. hanno proposto un differente modello secondo cui le subunità HMW-GS di tipo x e di tipo y sono unite in successione alternata da legami disolfuro a formare una catena lineare principale a cui associano le LMW-GS, formando ponti disolfuro con le HMW-GS di tipo y e andando a formare ramificazioni laterali. Secondo questo modello sono presenti uno o relativamente pochi polimeri gluteninici in quanto, in virtù dei numerosi punti di ramificazione presenti nel polimero gluteninico, l'incorporazione di un terminatore di catena non è in grado di arrestarne completamente la crescita. Sebbene il modello proposto da Graveland et al. (1985) tenga conto dell'affinità intrinseca fra le subunità di tipo x e quelle di tipo y , non dà spiegazione del fatto che le dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici, almeno quelle al di sotto del milione, varino linearmente.

In base a quanto esposto è evidente che, sia il modello proposto da Ewart, e successivamente elaborato da Kasarda, sia quello di Graveland presentano dei punti deboli. È verosimile che la reale struttura dei polimeri gluteninici sia rappresentata da una fusione elaborata di entrambi i modelli. In particolare, è possibile che una subunità di tipo x e una di tipo y si leghino tra di loro e che altre subunità (principalmente LMW-GS, ma anche HMW-GS e gliadine modificate) si leghino a loro volta a questo dimer (fig. 7). Tale modello potrebbe spiegare la variazione lineare delle dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici e anche la presenza di dimeri x - y e x - x .

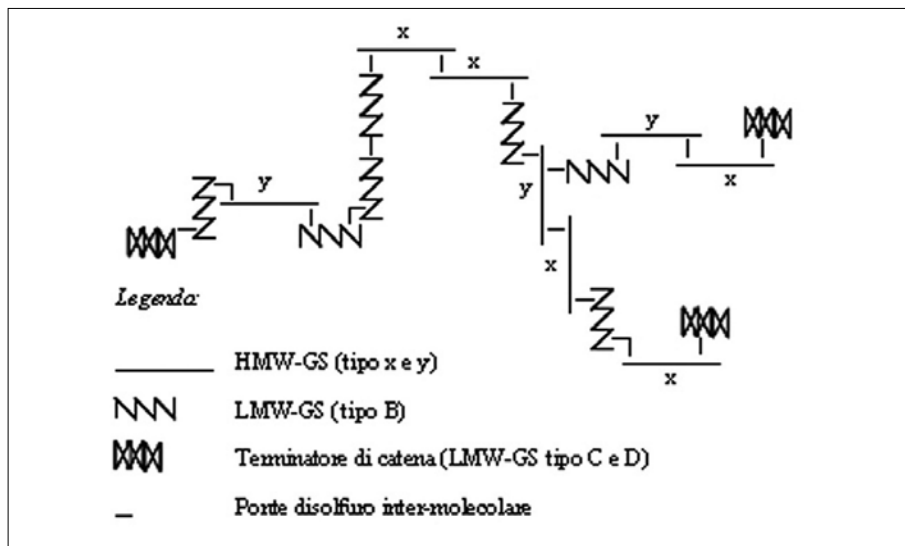


Fig. 7 Modello ipotetico della struttura dei polimeri gluteninici

Regolazione dell'assemblaggio delle subunità gluteniniche nel reticolo endoplasmatico

Se esistono dei modelli riguardo alla struttura dei polimeri gluteninici nel seme maturo, pochissimo è noto riguardo al processo di formazione dei polimeri stessi e non è chiaro come esso sia influenzato dalla struttura delle subunità gluteniniche e dall'andamento della loro sintesi durante lo sviluppo della cariosside. Le subunità gluteniniche sono sintetizzate fin dai primi stadi di sviluppo della cariosside, già da 7-10 giorni dopo la fioritura (Gupta et al., 1996; Scossa et al., 2008) e nello stesso periodo comincia il processo di polimerizzazione (Bushuk e Wrigley, 1971), che termina con la maturazione fisiologica. In particolare, è stato osservato che la formazione dei polimeri gluteninici di maggiori dimensioni comincia solo nei periodi tardivi dello sviluppo, all'incirca a 28 giorni dopo la fioritura, in concomitanza con il picco di accumulo delle subunità gluteniniche (Gupta et al., 1996). È stato suggerito che questo sia dovuto all'esistenza di una soglia di concentrazione dei monomeri e di oligomeri (che dovrebbe corrispondere a circa i 2/3 delle subunità totali), oltre la quale inizia il processo di formazione dei polimeri gluteninici di maggiori dimensioni, oppure che i meccanismi enzimatici necessari all'innesco di tale processo siano attivati a questo stadio (Gupta et al.,

1996). Dato che a questo stadio inizia il processo di essiccazione della carioside, è stato proposto che sia proprio questo fattore a innescare il processo di estensiva polimerizzazione (Carceller e Aussenac, 2001), forse perché aumenta di conseguenza la concentrazione dei monomeri e degli eventuali enzimi coinvolti. È tuttavia probabile che cambiamenti nella stato redox abbiano un ruolo importante in queste fasi finali del processo di polimerizzazione.

Un'analisi approfondita del processo di formazione dei polimeri glutenici potrebbe fornirci utili strumenti per capire come la struttura delle subunità gluteniniche, l'ambiente cellulare e l'ambiente esterno influenzino le proprietà fisico-chimiche e tecnologiche dei polimeri stessi. Tuttavia, le informazioni sui meccanismi che controllano il processo di polimerizzazione sono piuttosto scarse. Ad esempio non è chiaro quali siano i comparti subcellulari responsabili della formazione di questi polimeri, quale sia la fonte degli equivalenti ossidanti necessari per la formazione dei ponti disolfuro e se la loro formazione sia catalizzata *in vivo* da ossidoreduttasi.

In generale, la formazione di ponti disolfuro avviene a livello del reticolo endoplasmatico. Infatti, il reticolo endoplasmatico e lo spazio intermembrana dei mitocondri sono gli unici due comparti subcellulari nei quali è stato identificato un *pathway* ossidativo dedicato all'introduzione di ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate (Riemer et al., 2009). Studi effettuati su lievito e cellule di mammifero hanno portato all'identificazione di vari componenti di questo cammino ossidativo. In generale, la formazione dei ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate e inserite nel reticolo endoplasmatico avviene attraverso una reazione di scambio tiolo/disolfuro in cui un membro della famiglia delle ossidoreduttasi del reticolo endoplasmatico si riduce con la contestuale introduzione di un ponte disolfuro nella proteina. A sua volta, l'ossidoreduttasi è riossidata dall'enzima flavinico Ero1, che trasferisce gli elettroni attraverso una molecola di FAD all'ossigeno molecolare (Riemer et al., 2009) (fig. 8). In generale, si ritiene che la catalisi della formazione dei ponti disolfuro intercatena avvenga con gli stessi meccanismi. Nelle piante, il meccanismo di formazione dei ponti disolfuro nel reticolo endoplasmatico non è stato studiato in dettaglio. Tuttavia, l'analisi di cloni di cDNA e genomici e, più recentemente, dell'intero genoma di alcune piante ha rivelato la presenza di omologhi dei componenti che in lievito e mammiferi sono implicati nella introduzione di ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate (Ciaffi et al., 2001; Dixon et al., 2003; Houston et al., 2005; Ciaffi et al., 2006). Si può quindi ritenere che i meccanismi di formazione dei ponti disolfuro siano almeno in parte conservati. Nel genoma della pianta modello *Arabidopsis thaliana*, ad esempio, sono state identificate 19 sequenze codificanti per

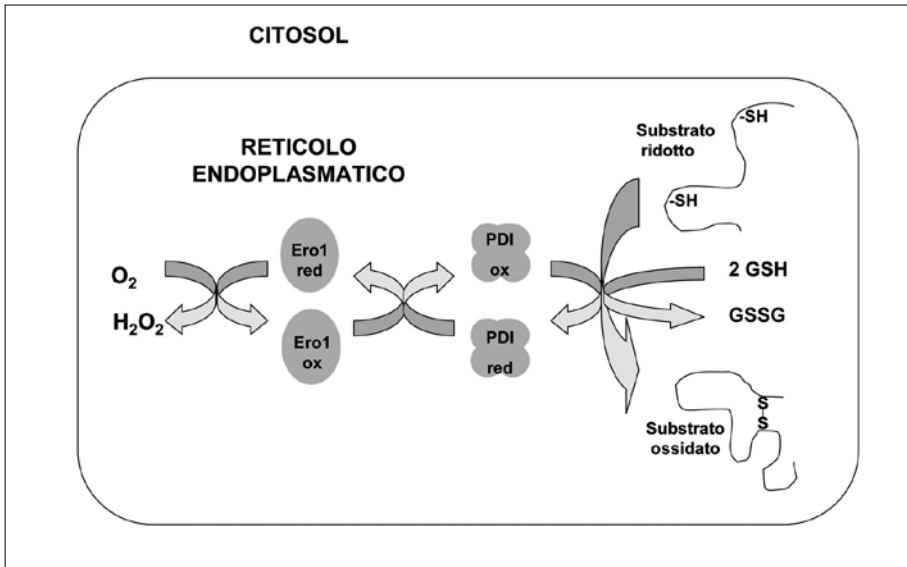


Fig. 8 *Formazione dei ponti disolfuro nel reticolo endoplasmatico. Il substrato è introdotto nel reticolo endoplasmatico sotto forma ridotta ed è ossidato per azione di uno o più componenti della famiglia delle proteina disolfuro isomerasi (PDI) attraverso reazioni di scambio tiolo/disolfuro. Sempre attraverso reazioni di scambio tiolo/disolfuro, PDI ridotta è riossidata da Ero1, mentre PDI nello stato ossidato può essere ridotta da glutathione ridotto (GSH), con formazione di glutathione ossidato (GSSG). Gli elettroni derivanti dai fenomeni di ossidazione sono trasferiti all'ossigeno con formazione di H_2O_2*

ossidoreduttasi potenzialmente localizzate nel cammino di secrezione (Houston et al., 2005; Lombardi e Ceriotti, dati non pubblicati). L'alto numero di ossidoreduttasi presenti nel reticolo endoplasmatico è probabilmente legato al grande numero di proteine diverse che vanno incontro a un ripiegamento ossidativo in questo comparto subcellulare e quindi alla necessità da parte della cellula di inserire ponti disolfuro in diversi moduli strutturali (Riemer et al., 2009). Il numero di geni di frumento che codificano per ossidoreduttasi potenzialmente localizzate nel cammino di secrezione rimane ancora da determinare, ma l'identificazione del ruolo delle singole ossidoreduttasi di frumento e della loro eventuale specificità costituisce un interessante campo di ricerca che potrebbe rivelare la presenza di enzimi specializzati nella formazione dei polimeri gluteninici.

Oltre a introdurre ponti disolfuro intra/intercatena, le ossidoreduttasi del reticolo endoplasmatico devono svolgere le funzioni di isomerasi e di reduttasi che sono necessarie, rispettivamente, per il ripiegamento di proteine nelle quali sono stati introdotti ponti disolfuro non nativi e per il de-ripiegamento

di proteine che devono essere inviate alla degradazione. Per svolgere queste funzioni le ossidoreduttasi devono essere mantenute in forma ridotta. Infatti, nelle cellule di mammifero, la maggior parte dei disolfuri che costituiscono i siti attivi nelle ossidoreduttasi di reticolo sono mantenuti in questa forma. Studi effettuati in lievito e cellule di mammifero hanno suggerito che la riduzione delle ossidoreduttasi di reticolo endoplasmatico può essere svolta da glutatione ridotto, prodotto nel citosol per opera dell'enzima glutatione reduttasi, che utilizza NADPH come fonte di equivalenti riducenti (Chakravarthi et al., 2006) (fig. 8). La presenza di disolfuri misti glutenine-glutatione è in relazione negativa con le dimensioni dei polimeri gluteninici e con la qualità delle farine (Li et al., 2004), suggerendo che il glutatione ridotto abbia un ruolo nel processo di polimerizzazione, dove potrebbe agire sia riducendo direttamente i polimeri gluteninici, sia mantenendo le ossidoreduttasi di reticolo endoplasmico in uno stato ridotto. Studi sull'attività del cammino ossidativo e sui livelli di glutatione durante la maturazione delle cariossidi di frumento potranno aiutarci a comprendere come la dimensione dei polimeri gluteninici possa essere controllata dallo stato fisiologico delle cellule dell'endosperma e dalle condizioni ambientali.

Studi effettuati in sistemi eterologhi indicano che alcuni eventi di polimerizzazione delle subunità gluteniniche possano effettivamente aver luogo nel reticolo endoplasmatico. Il sito di polimerizzazione di una LMW-GS espressa in protoplasti di tabacco è stata studiata mediante separazione degli organelli subcellulari su gradiente isopicnico di saccarosio (Lombardi et al., 2009). I risultati hanno confermato la presenza di polimeri nel reticolo endoplasmatico, suggerendo che anche in frumento la formazione dei polimeri gluteninici possa iniziare in questo comparto e quindi essere soggetta ai meccanismi regolativi sopra menzionati.

A differenza di altri cereali, dove le proteine di riserva sono accumulate, totalmente o in parte, nel reticolo endoplasmatico, le proteine di riserva del frumento sono trasportate e depositate nei vacuoli di riserva (Tosi et al., 2009). Dopo essere state trasportate in questo comparto, le subunità gluteniniche possono essere soggette a cambiamenti nello stato redox. Ad esempio, è stato evidenziato che durante le fasi di divisione e di espansione cellulare le subunità gluteniniche e in particolare le LMW-GS hanno un elevato contenuto in residui di cisteina ridotti, che vengono poi ossidati durante la fase di essiccazione (Rhazi et al., 2003). Questa fase di sviluppo della cariosside coincide con quella di accumulo della frazione polimerica non estraibile (UPP), che svolge un ruolo importante nel determinare le proprietà tecnologiche delle farine (Gupta et al., 1993). La probabile localizzazione vacuolare delle

proteine coinvolte in questi eventi suggerisce che questi processi ossidativi siano mediati da meccanismi diversi da quelli che potrebbero catalizzare la polimerizzazione delle subunità gluteniniche a livello del reticolo endoplasmatico.

CONCLUSIONI

L'intenso lavoro di caratterizzazione delle proteine di riserva di frumento ci ha permesso di comprendere le basi molecolari delle proprietà tecnologiche che caratterizzano le farine ottenute da questo cereale. Allo stesso tempo, le nostre conoscenze sulla struttura dei polimeri gluteninici e sui meccanismi della loro biosintesi sono ancora piuttosto limitate. I risultati finora ottenuti indicano che l'accumulo di questi polimeri coinvolge diversi comparti subcellulari ed è probabilmente regolato dai sistemi enzimatici che catalizzano la formazione dei ponti disolfuro. Gli studi sui meccanismi di biosintesi dei polimeri gluteninici ci permetteranno di individuare i fattori che ne controllano le dimensioni e la struttura e quindi di identificare i componenti cellulari da cui dipendono le caratteristiche tecnologiche delle farine.

RINGRAZIAMENTI

Il lavoro nei nostri laboratori è finanziato dal progetto MIUR-FAR "Agro-Gen - Laboratorio di GENomica per caratteri di importanza AGRONomica in frumento duro: identificazione di geni utili, analisi funzionale e selezione assistita con marcatori molecolari per lo sviluppo della filiera sementiera nazionale" e dal progetto CNR-Regione Lombardia "Risorse biologiche e tecnologie innovative per lo sviluppo sostenibile del sistema agro-alimentare".

RIASSUNTO

Le caratteristiche che rendono le farine di frumento diverse da quelle degli altri cereali sono principalmente dovute alla presenza nelle cariossidi di un insieme di macropolimeri proteici chiamati glutenine. Questi polimeri costituiscono, insieme alla frazione monomerica delle proteine di riserva, gran parte delle proteine del glutine, cioè della massa visco-elastica che si ottiene rimuovendo con acqua l'amido e le altre componenti solubili presenti nelle farine. La qualità e la quantità delle proteine del glutine sono i principali fattori che influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumen-

to. Negli ultimi decenni sono stati chiariti molti aspetti riguardanti le caratteristiche delle singole subunità gluteniniche. Le grandi dimensioni e le proprietà fisico-chimiche dei polimeri hanno invece ostacolato la loro caratterizzazione strutturale. Nonostante queste difficoltà, le informazioni finora raccolte hanno permesso di costruire alcuni modelli che descrivono la possibile organizzazione delle singole subunità all'interno dei polimeri gluteninici. Gli studi sui meccanismi di biosintesi delle glutenine hanno inoltre fornito alcune indicazioni sui meccanismi che controllano la struttura e le dimensioni dei polimeri e che quindi influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento.

ABSTRACT

The unique properties of wheat flours are mainly due to the presence of a set of polymeric proteins that accumulate in the caryopsis and that are collectively named glutenins. These protein polymers, together with the monomeric fraction of wheat storage proteins, are the main components of gluten, the visco-elastic mass that is obtained after water-soluble components, including starch, are removed from wheat flour. The quality and amount of gluten proteins are the main factors that control the technological properties of wheat flours. During the last decades, the characteristics of the individual glutenin subunits have been in part clarified. However, the large size and physical-chemical characteristics of the protein polymers have somehow hampered their precise structural characterization. Notwithstanding this, the information that has been collected has led to different hypothesis on the possible arrangement of individual subunits in the glutenin polymers. In addition, the studies on glutenin biosynthesis have started shedding light on the mechanisms that, by controlling the size and structure of these polymeric proteins, can potentially have an impact on the technological characteristics of wheat flours.

BIBLIOGRAFIA

- BECCARI G.B. (1785): *De frumento. «De Bononiensi Scientarium et Artium Instituto atque Academia Commentarii»*, tomo II-1, pp. 122-127.
- BELTON P.S. (1999): *On the elasticity of wheat gluten*, «Journal of Cereal Science», 29, pp. 103-107.
- BUSHUK W., WRIGLEY C.W. (1971): *Glutenin in developing wheat grain*, «Cereal Chemistry», 48, pp. 448-455.
- CARCELLER J.-L., AUSSÉNAC T. (2001): *SDS-insoluble glutenin polymer formation in developing grains of hexaploid wheat: The role of the ratio of high to low molecular weight glutenin subunits and drying rate during ripening*, «Functional Plant Biology», 28, pp. 193-201.
- CHAKRAVARTHI S., JESSOP C.E., BULLEID N.J. (2006): *The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress*, «EMBO Reports», 7, pp. 271-275.

- CIAFFI M., PAOLACCI A.R., DOMINICI L., TANZARELLA O.A., PORCEDDU E. (2001): *Molecular characterization of gene sequences coding for protein disulfide isomerase (PDI) in durum wheat* (*Triticum turgidum* ssp *durum*), «Gene», 265, pp. 147-156.
- CIAFFI M., PAOLACCI A.R., D'ALOISIO E., TANZARELLA O.A., PORCEDDU E. (2006): *Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences*, «Gene», 366, pp. 209-218.
- CLOUTIER S., RAMPITSCH C., PENNER G.A., LUKOW O.M. (2001): *Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene*, «Journal of Cereal Science», 33, pp. 143-154.
- DIXON D.P., VAN LITH M., EDWARDS R., BENHAM A. (2003): *Cloning and initial characterization of the Arabidopsis thaliana endoplasmic reticulum oxidoreductins*, «Antioxidants & Redox Signaling», 5, 389-396.
- D'OVIDIO R., MASCI S., PORCEDDU E. (1995): *Development of a set of oligonucleotides primers specific for genes at Glu-1 complex loci of wheat*, «Theoretical and Applied Genetics», 91, pp. 189-194.
- D'OVIDIO R., MASCI S. (2004): *The low-molecular-weight glutenin subunits*, «Journal of Cereal Science», 39, pp. 321-339.
- DUPONT F.M., VENSEL W., ENCARNACAO T., CHAN R., KASARDA D.D. (2004): *Similarities of omega gliadins from Triticum urartu to those encoded on chromosome 1A of hexaploid wheat and evidence for their post-translational processing*, «Theoretical and Applied Genetics», 108, pp. 1299-1308.
- EMS-MCCLUNG S.C., BENMOUSSA M., HAINLINE B.E. (2002): *Mutational analysis of the maize gamma zein C-terminal cysteine residues*, «Plant Science», 162, pp. 131-141.
- EWART J.A.D. (1979): *Glutenin structure*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 30, pp. 482-492.
- GILLIKIN J.W., ZHANG F., COLEMAN C.E., BASS H.W., LARKINS B.A., BOSTON R.S. (1997): *A defective signal peptide tethers the flourey2 zein to the endoplasmic reticulum membrane*, «Plant Physiology», 114, 345-352.
- GRAVELAND A., BOSVELD P., LICHTENDONK W.J., MARSEILLE J.P., MOONEN J.H.E., SCHEEPSTRA A. (1985): *A model for the molecular structure of glutenins from wheat flour*, «Journal of Cereal Science», 3, pp. 1-16.
- GREENE F.C. (1981): *In vitro synthesis of wheat (Triticum aestivum L.) storage proteins*, «Plant Physiology», 68, pp. 778-783.
- GRUIS D., SELINGER D.A., CURRAN J.M., JUNG R. (2002): *Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases*, «Plant Cell», 14, pp. 2863-2882.
- GUPTA R.B., KHAN K., MACRITCHIE F. (1993): *Biochemical basis of flour properties in bread wheats. Effects of variation in the quality and size distribution of polymeric protein*, «Journal of Cereal Science», 18, pp. 23-41.
- GUPTA R.B., MASCI S., LAFIANDRA D., BARIANA H.S., MACRITCHIE F. (1996): *Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats*, «Journal of Experimental Botany», 47, pp. 1377-1385.
- HOUSTON N.L., FAN C.Z., XIANG Q.Y., SCHULZE J.M., JUNG R., BOSTON R.S. (2005): *Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins*, «Plant Physiology», 137, pp. 762-778.
- HSIA C.C., ANDERSON O.D. (2001): *Isolation and characterization of wheat omega gliadin genes*, «Theoretical and Applied Genetics», 103, pp. 37-44.

- IKEDA T.M., ARAKI E., FUJITA Y., YANO H. (2006): *Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit genes and their protein products in common wheats*, «Theoretical and Applied Genetics», 112, pp. 327-334.
- JACKSON E.A., HOLT L.M., PAYNE P.I. (1983): *Characterisation of high-molecular-weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and chromosomal localisation of their controlling genes*, «Theoretical and Applied Genetics», 66, pp. 29-37.
- KASARDA D.D. (1989): *Glutenin structure in relation to wheat quality*, in *Wheat is Unique*, Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN. pp. 277-302.
- KAWAGOE Y., SUZUKI K., TASAKI M., YASUDA H., AKAGI K., KATOH E., NISHIZAWA N.K., OGAWA M., TAKAIWA F. (2005): *The critical role of disulfide bond formation in protein sorting in the endosperm of rice*, «The Plant Cell», 17, pp. 1141-1153.
- KECK B., KÖHLER P., WIESER H. (1995): *Disulphide bonds in wheat gluten. Cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion*, «Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung», 200, pp. 432-439.
- KÖHLER P., BELITZ H-D., WIESER H. (1991): *Disulfide bonds in wheat gluten: isolation of a cystine peptide from glutenin*, «Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung», 192, pp. 234-239.
- KÖHLER P., BELITZ H-D., WIESER H. (1993): *Disulfide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadins*, «Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung», 196, pp. 239-247.
- LAFIANDRA D., MORRIS R., KASARDA D.D. (1984): *Chromosomal assignment of genes coding for the wheat gliadin protein components of the cultivars Cheyenne and Chinese Spring by two-dimensional (two-pH) electrophoresis*, «Theoretical and Applied Genetics», 68, pp. 531-539.
- LEE S.H., HAMAKER B.R. (2006): *Cys155 of 27 kDa maize γ -zein is a key amino acid to improve its in vitro digestibility*, «FEBS Letters», 580, pp. 5803-5806.
- LI W., TSIAMI A.A., BOLLECKER S.S., SCHOFELD J.D. (2004): *Glutathione and related thiol compounds II. The importance of protein bound glutathione and related protein-bound compounds in gluten proteins*, «Journal of Cereal Science», 39, pp. 213-224.
- LOMBARDI A., BARBANTE A., DELLA CRISTINA P., ROSIELLO D., CASTELLAZZI C.L., SBANO L., MASCI S., CERIOTTI A. (2009): *A relaxed specificity in interchain disulfide bond formation characterizes the assembly of a low-molecular-weight glutenin subunit in the endoplasmic reticulum*, «Plant Physiology», 149, pp. 412-423.
- LONDEI M., CIACCI C., RICCIARELLI I., VACCA L., QUARANTINO S., MAIURI L. (2005): *Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease*, «Immunology», 42, pp. 913-918.
- MASCI S., LAFIANDRA D., PORCEDDU E., LEW E.J.-L., TAO H.P., KASARDA D.D. (1993): *D-glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine*, «Cereal Chemistry», 70, pp. 581-585.
- MASCI S., D'OVIDIO R., LAFIANDRA D., KASARDA D.D. (1998): *Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer*, «Plant Physiology», 118, pp. 1147-1158.
- MASCI S., EGOROV T.A., RONCHI C., KUZMICKY D.D., KASARDA D.D., LAFIANDRA D. (1999): *Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type low molecular weight subunits of wheat glutenin*, «Journal of Cereal Science», 29, pp. 17-25.

- MUCCILLI V., CUNSOLO V., SALETTI R., FOTI S., MARGIOTTA B., SCOSSA F., MASCI S., LAFIANDRA D. (2010): *Characterisation of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach*, «Journal of Cereal Science», 51, pp. 134-139.
- MÜNTZ K., SHUTOV A.D. (2002): *Legumains and their functions in plants*, «Trends in Plant Science», 7, pp. 340-344.
- ORSI A., SPARVOLÍ F., CERIOTTI A. (2001): *Role of individual disulfide bonds in the structural maturation of a low molecular weight glutenin subunit*, «Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 32322-32329.
- ORTH R.A., SHELLENBERGER J.A. (1988): *Origin, production and utilization of wheat*, in *Wheat Chemistry and Technology*, Ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, pp. 1-14.
- OSBORNE T.B. (1924): *The vegetable proteins*, Longmans, Green & Co., London, p. 154.
- PAYNE P.I., CORFIELD K.G. (1979): *Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium*, «Planta», 145, pp. 83-88.
- PAYNE P.I., HOLT L.M., LAW C.N. (1981): *Structural and genetic studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. I. Allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (Triticum aestivum)*, «Theoretical and Applied Genetics», 60, pp. 229-236.
- PAYNE P.I., JACKSON E.A., HOLT L.M., LAW C.N. (1984): *The genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat*, «Theoretical and Applied Genetics», 67, pp. 235-243.
- PAYNE P.I., HOLT L.M., JARVIS M.G., JACKSON E.A. (1985): *Two-dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (Triticum aestivum)*, Biochemical and genetic studies. «Cereal Chemistry», 62, pp. 319-326.
- RHAZI L., CAZALIS R., AUSSÉNAC T. (2003): *Sulphydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain: influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation*, «Journal of Cereal Science», 38, pp. 3-13.
- RIEMER J., BULLEID N.J., HERRMANN J.M. (2009): *Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process*, «Science», 324, pp. 1284-1287.
- SCOSSA F., LAUDENCIA-CHINGQUANCO D., ANDERSON O.D., VENSEL W.H., LAFIANDRA D., D'OVIDIO R., MASCI S. (2008): *Comparative proteomic and transcriptional profiling of a bread wheat cultivar and its derived transgenic line over-expressing a low molecular weight glutenin subunit gene in the endosperm*, «Proteomics», 8, pp. 2948-2966.
- SHANI N., ROSENBERG N., KASARDA D.D., GALILI G. (1994): *Mechanism of assembly of wheat high-molecular-weight glutenin subunits inferred from expression of wild-type and mutant subunits in transgenic tobacco*, «Journal of Biological Chemistry», 269, pp. 8924-8930.
- SHEWRY P.R., TATHAM A.S., FORDE J., KREIS M., MIFLIN B.J. (1986): *The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment*, «Journal of Cereal Science», 4, pp. 97-106.
- SHEWRY P.R., NAPIER J.A., TATHAM A.S. (1995): *Seed storage proteins: structures and biosynthesis*, «The Plant Cell», 7, pp. 945-956.
- SHEWRY P.R., TATHAM A.S., LAZZERI P. (1997): *Biotechnology of wheat quality*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 73, pp. 397-406.
- SHEWRY P.R., POPINEAU Y., LAFIANDRA D., BELTON P. (2001): *Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project*, «Trends in Food Science and Technology», 11, pp. 433-441.

- SHIMONI Y., BLECHL A.E., ANDERSON O.D., GALILI G. (1997): *A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in transgenic wheat*, «Journal of Biological Chemistry», 272, pp. 15488-15495.
- TAO H.P., ADALSTEINS A.E., KASARDA D.D. (1992): *Intermolecular disulfide bonds link specific high-molecular-weight glutenin subunits in wheat endosperm*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1159, pp. 13-21.
- TOSI P., PARKER M., GRITSCH CS, CARZANIGA R., MARTIN B., SHEWRY P. (2009): *Trafficking of storage proteins in developing grain of wheat*, «Journal of Experimental Botany», 60, pp. 979-991.
- VITALE A., CERIOTTI A. (2004): *Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests?*, «Plant Physiology» 136, pp. 3420-3426.
- WEEGELS P.L, HAMER R.J., SCHOFIELD J.D. (1996): *Functional properties of wheat glutenin*, «Journal of Cereal Science», 23, pp. 1-18.
- WISEMAN RL, POWERS ET, BUXBAUM JN, KELLY JW, BALCH WE (2008): *An adaptable standard for protein export from the endoplasmic reticulum*, «Cell», 131, pp. 809-821.
- WERNER W.E., ADALSTEIN A.E., KASARDA D.D. (1992): *Composition of high-molecular-weight glutenin subunit dimers formed by partial reduction of residue glutenin*, «Cereal Chemistry», 69, pp. 535-541.
- WOYCHIK J.H., BOUNDY J.A., DIMLER R.J. (1961): *Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea*, «Archives of Biochemistry and Biophysics», 94, pp. 477-482.
- WRIGLEY C.W. (1996): *Giant proteins with flour power*, «Nature», 381, pp. 738-739.