

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI
MUTANTI INSERZIONALI PER EPIREGOLATORI
DI MAIS AL TERMINE DEL PROCESSO
DI INTROGRESSIONE**

Relatore: Prof.ssa Varotto Serena

Correlatore: Dott. Forestan Cristian

Laureanda: Angeli Alice

Matricola n. 616324

Anno Accademico 2013 – 2014

SOMMARIO

1. ABSTRACT.....	5
2. RIASSUNTO.....	7
3. INTRODUZIONE.....	8
3.1 LA REGOLAZIONE EPIGENETICA DEI GENI.....	8
3.1.1 METILAZIONE DELLE CITOSINE.....	9
3.1.2 MODIFICHE AD ISTONI CANONICI.....	10
3.1.3 RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA.....	12
3.2 MECCANISMI DI REGOLAZIONE DI FLC IN <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
3.2.1 PATHWAY DEGLI smallRNA.....	16
3.3 I TRASPOSONI	19
3.4 MUTAGENESI INSERZIONALE	22
3.4.1 MUTANTE <i>chr120 (AtMOM1)</i>	23
3.4.2 MUTANTE <i>hda108 (AtHDA6)</i>	24
3.4.3 MUTANTE <i>fpa</i>	25
4. SCOPO DELLA TESI.....	26
5. TECNICHE UTILIZZATE.....	28
5.1 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO.....	28
5.2 ESTRAZIONE DI RNA.....	29
5.3 QUANTIFICAZIONE AL NANODROP.....	31
5.4 CORSA ELETTROFORETICA.....	32
5.5 PCR E DISEGNO DEI PRIMER.....	33
5.6 RT - PCR (Reverse Transcriptional PCR).....	37
6. DISCUSSIONE DEI RISULTATI.....	38
6.1 RISULTATI DEI MUTANTI <i>chr120</i>	40
6.2 RISULTATI DEI MUTANTI <i>hda 108</i>	43
6.3 RISULTATI DEI MUTANTI <i>fpa</i>	48
7. PROSPETTIVE FUTURE.....	51
8. BIBLIOGRAFIA.....	53

1. ABSTRACT

Maize (*Zea mays*) has always been one of the most common plant species cultivated in the world. For this reason, it is one of the most studied plants of agricultural interest: thanks to the technical advances in molecular genetics, transcriptomic and the proteomic, it has been possible to increase the knowledge regarding the physiological and regulatory processes that characterize the development and the yield of this crop. In the last few years, the attention has been focused on epigenetic regulation of development and adaptation to abiotic stresses in the light of creation of new heritable epigenetic resources (epialleles) that can be use in new breeding programs.

In this thesis characterize three maize mutants of genes involved in epigenetic regulation (epiregulators):

- a histone deacetylase (*ZmHDA108*),
- a factor which is responsible for the silencing of repetitive sequences (*ZmCHR120*),
- a RNA-binding protein, component of the autonomous pathway, which promotes flowering in *A. thaliana* (*ZmFPA*).

The insertional mutants obtained in maize are the result of crossbreeding between wild-type plants and pollen taken from a line in which the Mu transposon is particularly active, therefore they present a hybrid genome.

To characterize the mutants there is the necessity of inserting the mutations in the genetic background of the B73 line, an inbred line whose genome has been completely sequenced, before performing at least two cycles of selfing to have the mutation in the homozygous state. My work consisted of the last stages of this long process (two selfing of mutant plants) and of phenotypic and molecular characterization of BC5S1 mutant plants.

For this purpose it has been used an approach of Reverse Genetics based on the use of PCR (Polymerase Chain Reaction).

This approach makes the identification of mutant genotypes in the population easier in short times by exploiting specific primers drawn on the sequences that border the transposon, which are used in combination with other primers of the sequence of the target gene.

Furthermore, techniques derived from PCR have been used to analyze the expression level of the examined genes in wild type and mutant plants.

The results of the characterization shows that homozygous individuals for the mutation have the target gene of the transposon effectively silenced: the *chr120* mutants show no evident phenotypes, while the population of *hda108* mutants has shown a particular phenotype with visible differences in leaf and shoot development, both in BC3S1 and BC5S1 stage.

Finally, more work is necessary to better characterize the *fpa* mutant because the alternative splicing of the intron containing the Mu transposon determines different levels of gene silencing, and, probably, of protein activity, making more difficult the identification of molecular phenotypes.

2. RIASSUNTO

Il mais (*Zea mays*) è da sempre una delle specie vegetali più diffuse e coltivate al mondo. Per questo motivo è una delle piante d'interesse agrario più studiate: grazie agli sviluppi della genetica molecolare, la trascrittomica e la proteomica, si è potuto estendere le conoscenze che riguardano i processi regolativi e fisiologici che caratterizzano le diverse varietà di mais, il loro sviluppo e la loro resa produttiva.

In questa tesi viene spiegato come si ottengono e come vengono caratterizzati tre mutanti per i geni coinvolti nella regolazione epigenetica (epiregolatori): una per una deacetilasi istonica (*ZmHDA108*), per un fattore responsabile del silenziamento di sequenze genomiche (*ZmCHR120*) e per una proteina RNA-binding componente della via autonoma che promuove la fioritura in *A. thaliana* (*ZmFPA*).

I mutanti inserzionali ottenuti in mais sono il risultato di incroci di piante wild type con polline estratto da una linea in cui il trasposone Mu è particolarmente attivo, pertanto presentano un genoma ibrido. Da qui la necessità di introgredire le mutazioni nella linea B73, una linea che è altamente studiata e per cui il genoma è stato completamente sequenziato, prima di eseguire almeno due cicli di autofecondazione per portare la mutazione allo stato omozigote.

L'elaborato che presento si inserisce negli ultimi stadi di questo lungo processo durato diversi anni, e prevede la caratterizzazione molecolare e fenotipica delle piante mutanti del BC5S1.

A questo scopo è stato usato un approccio di Reverse Genetics basato sull'uso della PCR (Polimerase Chain Reaction), che sfruttando specifici primers disegnati sulle sequenze fiancheggianti il trasposone, utilizzati in combinazione con altri primer della sequenza del gene in questione, rende facile l'individuazione dei genotipi mutanti nella popolazione in tempi abbastanza veloci. Inoltre, sono state utilizzate tecniche derivate dalla PCR per analizzare il livello di espressione dei geni presi in esame.

I risultati della caratterizzazione hanno mostrato che gli individui omozigoti per la mutazione risultano avere il gene target del trasposone effettivamente silenziato: i mutanti *chr120* non presentano fenotipi evidenti, mentre la popolazione dei mutanti *hda108* presenta un fenotipo particolare, con alterazioni ben visibili nello sviluppo dell'apparato aereo sia nelle popolazioni BC3S1 sia BC5S1.

Infine, il mutante *fpa*, abbiamo capito essere molto difficile da caratterizzare, in quanto i singoli individui mutanti, mostrando splicing alternativi dell'introne contenente il trasposone Mu, possono presentare fenotipi diversi a seconda del livello di silenziamento del gene.

3. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, grazie all'innovazione delle tecniche di biologia molecolare, è stato chiaramente dimostrato che le modificazioni epigenetiche quali la metilazione del DNA, le modificazioni delle code istoniche e la presenza di varianti istoniche, possono agire a livello della cromatina per alterare e regolare spazialmente e temporalmente l'espressione genica di molti organismi superiori, specialmente in risposta a fattori ambientali.

Queste modifiche possono essere reversibili, quindi non avere nessun impatto dal punto di vista evolutivo, mentre in altri casi è stato dimostrato che alcune di esse possono essere ereditate attraverso la mitosi e la meiosi, portando quindi alla creazione di nuova variabilità genetica (epialleli) che può essere trasmessa alla progenie.

La formazione di epialleli che rimangono stabili nella progenie per numerose generazioni può rappresentare una fonte importante di variabilità utilizzabile per nuovi programmi di miglioramento genetico delle piante di interesse agrario.

Unendo le tecniche molecolari di ultima generazione al bisogno di migliorare le coltivazioni vegetali, questa tesi si prefigge l'obiettivo di gettare le basi per studiare i meccanismi che portano alla creazione di nuova variabilità genetica all'interno della specie di mais (*Zea mays*), una delle specie vegetali più importanti economicamente al mondo.

3.1 LA REGOLAZIONE EPIGENETICA DEI GENI

La struttura locale della cromatina è parte integrante dell'espressione dei geni. I geni possono trovarsi in due condizioni strutturali diverse e sono in uno stato "attivo" soltanto nelle cellule in cui sono espressi.

La cromatina può assumere due diverse conformazioni:

- **Eucromatina:** ha un aspetto meno condensata nel nucleo e occupa la maggior parte della regione nucleare. Questa frazione rappresenta la cromatina trascrizionalmente attiva.
- **Eterocromatina:** si trova solitamente in corrispondenza dei centromeri e rappresenta la regione più condensata, ovvero quella trascrizionalmente inattiva. Essa si suddivide ulteriormente in:
 - Eterocromatina costitutiva: condensata costitutivamente, consiste di poche ripetizioni multiple di poche sequenze di DNA che non sono trascritte.

- Eterocromatina facoltativa: prende la forma di regioni cromosomiche che sono inattive in una linea cellulare, anche se possono essere espressi in altre linee.

Variazioni del grado di condensazione della cromatina possono essere ottenute mediante modifiche covalenti del DNA e delle proteine istoniche. I processi che catalizzano queste modifiche possono essere raggruppati secondo i loro meccanismi d'azione:

1. Metilazione delle citosine
2. Modifiche covalenti degli istoni canonici
3. Rimodellamento della cromatina

3.1.1 Metilazione delle citosine

Il primo meccanismo importante prevede l'aggiunta di un gruppo metile alla base citosina mediante l'enzima Metil-tranferasi, con la formazione di una 5-Metilcitosina, solitamente correlata a silenziamento genico (Figura 3.1). Nelle piante sono presenti sequenze consenso, quali CG, CHG e CHH (dove H può rappresentare Timina, Adenosia oppure Guanina).

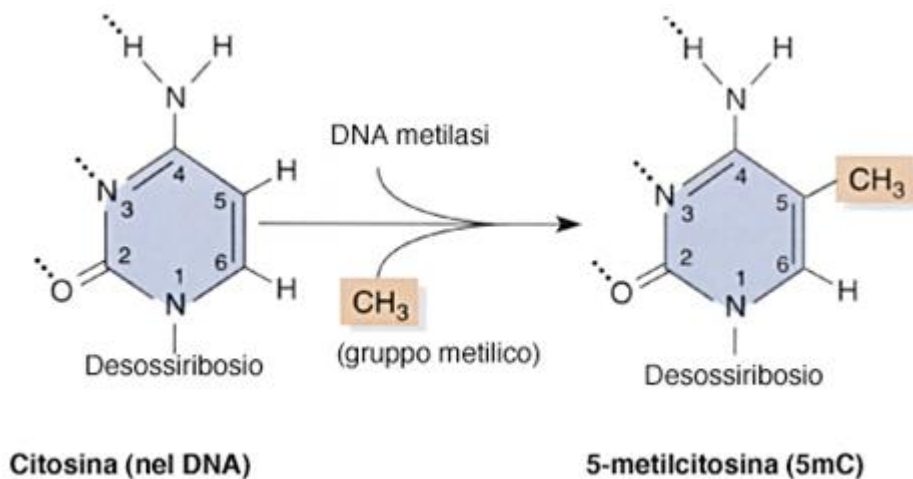


Fig. 3.1: *Formazione della 5-metilcitosina per azione enzimatica della DNA metilasi.*

Le piante possiedono tre tipi di DNA metiltransferasi, che possono agire nei geni target a seconda della loro funzione e della specie di appartenenza:

- **MET1** (methyltransferase1): mantiene una metilazione simmetrica sui siti 5'-CG-3' durante la replicazione del DNA, copiando l'informazione dal filamento stampo al filamento di nuova sintesi (Zhang, 2010). Questo enzima interviene più precisamente nel mantenere silenziati gli elementi trasponibili dopo la replicazione del DNA.
- **CMT3** (chromomethylase3): agiscono su sequenze 5'-CHG-3' e riescono a metilare de novo il DNA in corrispondenza di particolari modifiche degli istoni;

- **DRM1** (domains rearranged methyltransferase 1) e **DRM2** (domains rearranged methyltransferase 2): sono delle proteine strettamente correlate tra loro che hanno funzioni simili nel metilare le sequenze CHH non simmetriche. Questo tipo di metilazione porta alla perdita di informazione durante la replicazione del DNA, in quanto un filamento non dispone della citosina metilata.

La metilazione può avvenire anche a livello del promotore di geni; in questo caso è più frequente una situazione di specificità di espressione tissutale. Studi in *Arabidopsis* e in endosperma di mais hanno dimostrato che ipometilazioni nella regione a monte del sito d'inizio della trascrizione (TSS) sono correlate ad un'espressione sito specifica dei geni dell'endosperma (Lauria and Rossi, 2011).

La metilazione delle citosine a livello genico è uno strumento di controllo trascrizionale che agisce seguendo due vie, a seconda della regione interessata: a livello dei promotori, che se metilati impediscono ai fattori di trascrizione e alla polimerasi di legarsi ai siti d'inizio inibendone la trascrizione, e il richiamo delle proteine MBD (Methyl-Binding-Domain) da parte dei siti metilati, che formano complessi proteici che richiamano HDACs garantendo la deacetilazione degli istoni, la condensazione della cromatina e l'inattivazione della trascrizione.

3.1.2. Modifiche ad istoni canonici

Il primo livello di condensazione della cromatina è infatti reso possibile grazie all' interazione tra il DNA e alcune proteine istoniche (H2A, H2B, H3, H4) che associandosi tra di loro formano un ottamero chiamato *Core del nucleosoma*.

Gli istoni sono proteine basiche, dato l'alto contenuto di lisina e arginina, che grazie alla loro carica positiva facilitano l'affinità al DNA carico negativamente. Il DNA, quindi, si attacca al Core del nucleosoma attraverso le regioni ricche in A e T presenti nel solco minore dell'elica, compiendo 2 giri e tre quarti attorno al core. Si forma così una struttura chiamata "a filo di perle" dove un nucleosoma è alternato al DNA linker, costituendo una fibra da 10 nm (Figura 3.2).

Successivi livelli di condensazione della cromatina richiedono la presenza di un'altra proteina istonica, l'istone H1, che inserendosi all'entrata o all' uscita del DNA linker, forma la fibra da 30 nm, che può assumere due conformazioni: a solenoide oppure a zig-zag.

L'ultimo livello di compattazione, tipico della metafase della mitosi prevede delle strutture ad "X" con due braccia più lunghi degli altri due. Il DNA in questa fase (cromosoma metafase)

è condensato circa 50 volte rispetto all'eucromatina, e circa 10.000 volte rispetto il DNA lineare doppia elica, tanto da essere facilmente visualizzabile.

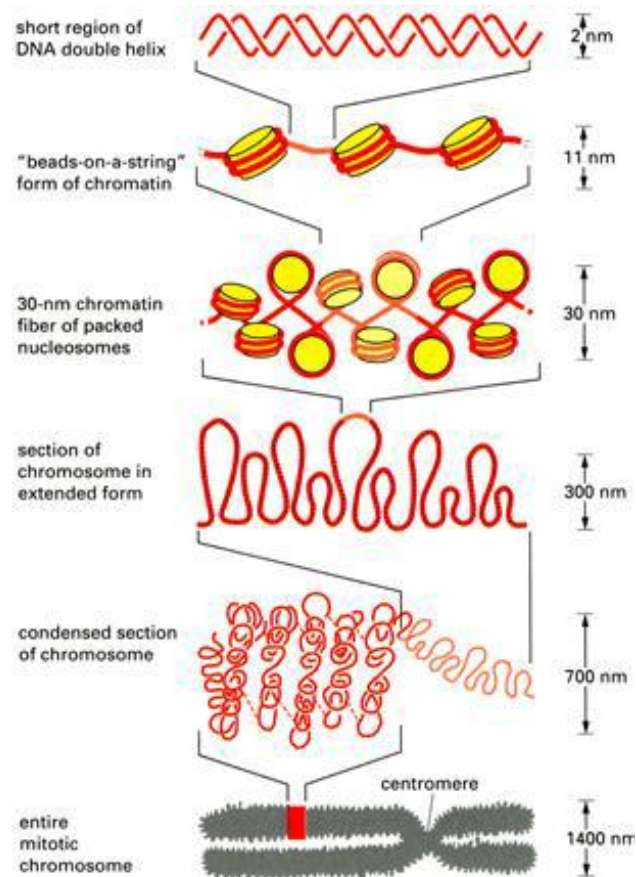


Fig. 3.2: *Schema che illustra i vari passaggi di condensazione della cromatina, dalla semplice doppia elica al cromosoma metafasico.*

La seconda possibilità di modificare la condensazione della cromatina avviene nelle code delle proteine istoniche (10 – 20 aa nella regione N-terminale).

Queste possono subire modificazioni quali la metilazione, l'acetilazione, la fosforilazione e l'ubiquitazione di alcuni aminoacidi, alterandone la carica elettrostatica e quindi causando la perdita dell'affinità con il DNA. Inoltre agiscono da richiamo per complessi proteici di rimodellamento della cromatina, che regolano l'accessibilità del DNA alla RNA Polimerasi II e fattori trascrizionali vari. I principali siti di bersaglio di queste modificazioni sono la lisina (K), la serina (S) e l'arginina (A).

Uno degli esempi più significativi di questo tipo di regolazione è sicuramente l'acetilazione della lisina, in cui dei gruppi acetili vengono attaccati a questo aminoacido facendone perdere la carica positiva, allentando le code istoniche legate al DNA e promuovendo quindi l'ingresso di fattori di trascrizione e della polimerasi. Nello stato acetilato, quindi, il DNA è trascrizionalmente attivo.

Altre modificazioni possono caratterizzare la struttura della cromatina, per esempio, per l'eterocromatica, si possono osservare le seguenti condizioni:

- metilazione delle citosine in posizione 5 del DNA
- dimetilazione della lisina in posizione 9 dell'istone H3 (H3K9me2)
- trimetilazione della lisina in posizione 27 dell'istone H3 (H3K27me3)
- deacetilazione degli istoni H3 e H4

Mentre nell'eucromatina si possono osservare le seguenti caratteristiche:

- Metilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3K4me3)
- Acetilazione dell'istone H3
- Fosforilazione della serina in posizione 10 dell'istone H3 (H3phS10)

Le proteine che interagiscono con code modificate sono di diverse tipologie: possono appartenere alla famiglia delle Bromoproteine (riconoscono residui acK), oppure alla famiglia delle Cromoproteine (per residui metK).

3.1.3. Rimodellamento della cromatina

Il rimodellamento della cromatina è effettuato dai *Complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti* che utilizzano l'energia dall'idrolisi di ATP per rimuovere i nucleosomi da specifiche sequenze di DNA.

Il rimodellamento della cromatina comporta il cambiamento dell'organizzazione dei nucleosomi a livello del promotore di un gene che deve essere trascritto. Questo processo, nella maggior parte dei casi, comprende lo spostamento di uno o più ottameri causando un'alterazione del suo posizionamento, oppure, in casi più drastici, alla completa rimozione del nucleosoma.

Alcuni di questi complessi riescono ad inserire istoni non canonici, bensì dotati di modifiche nella loro struttura in grado di alterare la condensazione. Un esempio è l'istone H2A.Z. La funzione di questa variante è stata determinata mediante l'utilizzo di un anticorpo per il core proteico legato ad un fluorocromo di colore verde, che se associato ad altri coloranti per il DNA ha permesso di constatare che H2A.Z è assente nelle regioni cromatiniche più condensate; quindi è un promotore della trascrizione (Pasqua et al, 2011).

Riassumendo, i fattori di rimodellamento e metilazione del DNA possono essere così riassunti in tabella:

MODIFICAZIONE della CROMATINA	TIPOLOGIA della MODIFICAZIONE	AZIONE SU:	MECCANISMO	RISULTATO nella TRASCRIZIONE
Metilazione del DNA	CG e non-CG	Promotori	Inibizione della trascrizione	Repressione
	CG	geni (da 5' a 3')	Modifica la lunghezza del trascritto	Repressione
Rimodellamento della cromatina	SW1/SNF	Nucleosoma	Modificazione dell' ottamero istonico	Attivazione o Repressione
	SWR1	Istoni	Incorporazione della variante istonica H2a.Z	Attivazione
Modifiche istoniche	Acetilazione	Lisine	Neutralizzazione di carica e reclutamento di regolatori della cromatina	Attivazione
	Fosforilazione	Serine, Treonine		
	Metilazione	Lisine, Arginine	Recluta altri regolatori della cromatina	Attivazione (H3K4) o repressione (H3K9)
	Ubiquitinazione	Lisine	Modifica la distanza degli istoni dal DNA	Attivazione (H2A) o repressione (H3K9)

Fig. 3.3: Tabella che riassume i meccanismi che modificano la condensazione della cromatina.

3.2 MECCANISMI DI REGOLAZIONE DI FLC IN *A. thaliana*

La promozione alla fioritura è causata da controlli epigenetici che riescono a silenziare il gene FLC (Flowering Locus C), identificato come principale regolatore negativo dell'induzione a fiore (Pasqua et al, 2011).

Le analisi molecolari condotte su *Arabidopsis thaliana* hanno individuato molti geni che regolano questo interruttore dello sviluppo, che permette il controllo del successo riproduttivo dei vegetali.

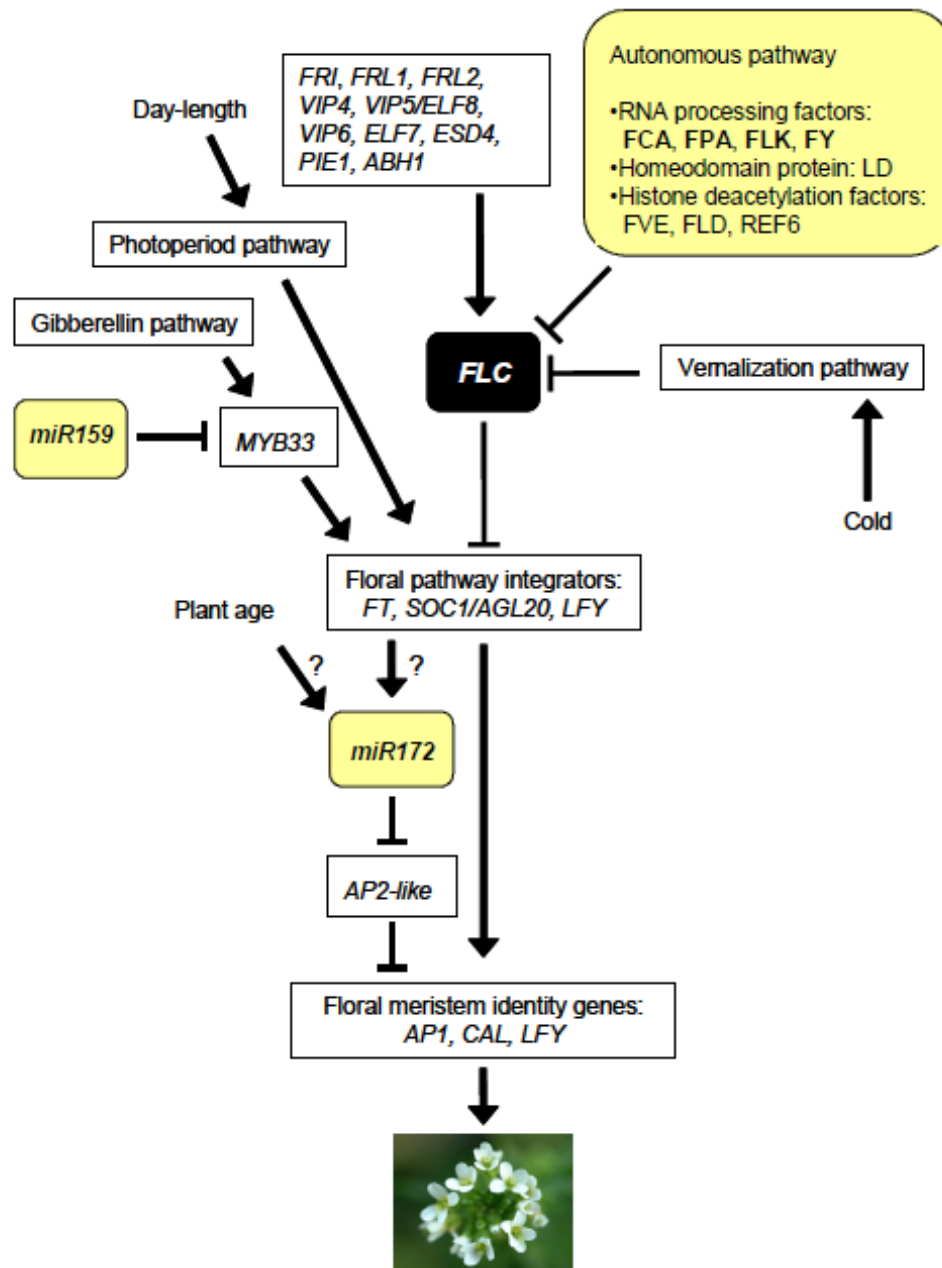


Fig. 3.4: Illustrazione rappresentativa dei diversi pathway che concorrono alla regolazione della fioritura in *Arabidopsis thaliana*.

Il controllo del periodo di fioritura è un processo complesso che coinvolge l' integrazione delle risposte a molteplici stimoli ambientali e segnali endogeni.

La caratterizzazione genetica molecolare di mutanti difettosi per questa regolazione in *A. thaliana* ha portato all'identificazione di molti geni coinvolti in questo processo.

Questi geni comprendono percorsi geneticamente separabili che controllano quantitativamente la transizione alla fioritura. I diversi pathway che concorrono alla regolazione del periodo di fioritura possono essere così schematizzati:

- **Pathway delle giberelline**, gli ormoni che stimolano l'accrescimento della struttura florale in 15 – 20 giorni.
- **Pathways autonomi**
- **Pathway del fotoperiodo**
- **Pathway della vernalizzazione**, ovvero l'esposizione obbligatoria della pianta a basse temperature precedentemente al periodo di fioritura.

Il processo di vernalizzazione promuove la formazione di un complesso, composto da una proteina PCR2 (*Drosophila* Polycomb repressive 2) e tre proteine PHD (Plant HomeoDomain). Questo complesso promuove la trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3) in corrispondenza del promotore di FLC. Inoltre la vernalizzazione porta ad una serie di modifiche istoniche che hanno la funzione di condensare la cromatina di FLC, portandolo al silenziamento.

Un esempio è il gene VRN2, che riesce ad agire a livello degli istoni legati nella regione del promotore e del primo introne di FLC (localizzati in corrispondenza di H3K9 e H3K27 e fortemente acetilati) deacetilandoli e metilandoli.

Il pathway autonomo impedisce l'accumulo dell' mRNA di FLC (Simpson, 2004). Esso, attualmente, comprende sette mutanti recessivi loss-of-function: LD, FCA, FY, FPA, FVE, FLD e *luminidependens*.

Attraverso mutanti con perdita di funzione è stato appreso che LD codifica una proteina con un homeodominio normalmente presente in proteine che sono in grado di legare DNA o, più raramente, RNA (Lee et al., 1994; Dubnau e Strhul, 1996; Rivera – Pomar et al., 1996). Altri geni del pathway autonomo, FCA, FPA e FLK, codificano proteine che legano l'RNA (Macknight et al., 1997; Schomburg et al., 2001; Lim et al., 2004), mentre FY è probabilmente un fattore di poliadenilazione. FLD e FVE, invece, codificano per deacetilasi che modificano la cromatina al locus FLC, impedendone la trascrizione.

In sintesi, sia il pathway di vernalizzazione che quello autonomo agiscono come soppressori di FLC e nei periodi di freddo, FRI (Frigida) aiuta a tenere alti questi soppressori dell'induzione fiorale.

Il locus FLC è sotto controllo epigenetico, e questo è stato confermato dal fatto che in presenza di alti livelli di questo trascritto, sia presente anche l'istone H2A.Z. FLC codifica per una proteina MADS-BOX, che quando è espressa agisce come soppressore di SOC1 e FT, responsabili dell'induzione fiorale.

Molto importante al fine della fioritura è LFY (Leafy), geni indotti direttamente da FPI e AG (Agamous), e rappresentano il marcatore molecolare per il meristema differenziato fiorale. Altri geni con questa attività possono essere AP1 e CAL.

3.2.1 Pathway degli smallRNA

Attraverso recenti studi molecolari si è dimostrato che anche altre piccole molecole di RNA (smallRNA) sono implicate nella regolazione del periodo di fioritura.

È stato dimostrato che la vernalizzazione induce l'accumulo di FLC antisenso e che una lunga sequenza di RNA non codificante chiamata COLDAIR interviene nell'indirizzare il PHD-PCR2. Da queste osservazioni si evince che la produzione di trascritti antisenso è un evento chiave nel reprimere FLC, sia mediante la via autonoma che la vernalizzazione, essi agiscono da segnale di targeting per epi – regolatori e/o interferisce direttamente con la RNA Polimerasi II (Lucia et al, 2010).

Gli smallRNA sono noti per essere una componente fondamentale di una rete di segnalazione che media le modificazioni epigenetiche nelle piante. Queste possono essere mediate attraverso un'interazione dinamica tra smallRNAs, la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni, che insieme modulano il silenziamento trascrizionale del DNA.

I tre principali tipi di smallRNA (miRNA, siRNA e piRNA), si distinguono per le loro diverse modalità di biogenesi: i primi due vengono elaborati da Dicer, una endonucleasi della famiglia delle RNasi III, che agisce sulla doppia elica producendo piccoli frammenti dsRNA aventi 2 – 3 nt all'estremità 3' non appaiati. I piccoli duplex RNA sono poi svolti a generare un singolo filamento di miRNA o siRNA. I miRNA si distinguono dagli altri tipi in quanto l'RNA precursore di origine endogena, forma una struttura a forcina (Figura 3.9). I piRNA (piwi-interacting RNA), invece, sembra che derivino da precursori a singolo filamento e che vengono processati in maniera indipendente da Dicer.

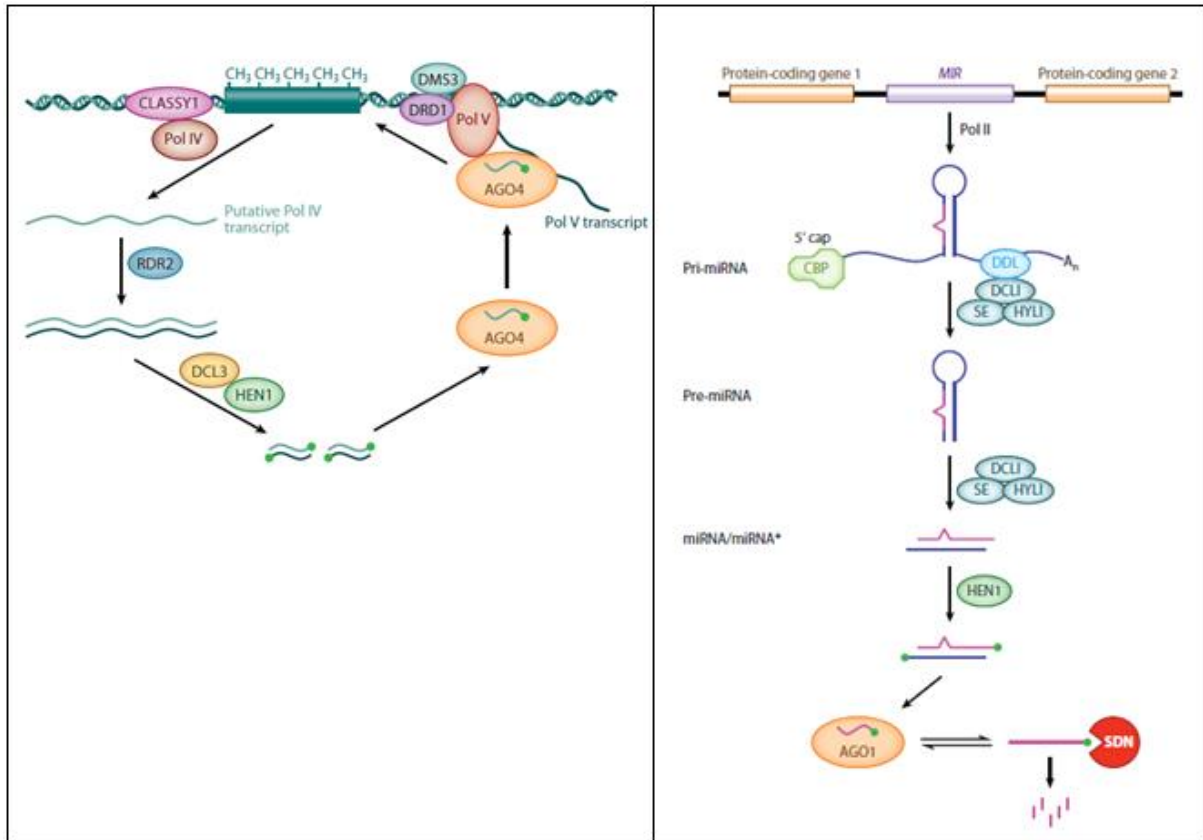


Fig. 3.5: Nella parte sinistra viene illustrata la formazione degli short interfering RNA, che sono responsabili della metilazione de novo del DNA. Nella parte destra è rappresentata la formazione dei miRNA.

Nonostante le diverse modalità di biogenesi, questi smallRNA condividono simili funzioni molecolari: ad esempio, tutti i tre tipi possono dirigere la scissione di RNA complementari, gli miRNA e siRNA possono inibire la traduzione degli mRNA bersaglio, mentre siRNA e piRNA sono responsabili delle modificazione dirette della cromatina

Per esempio, nel genoma di *A.thaliana*, sono presenti quattro precursori di miR172: miR172a-1, miR172a-2, miR172b e mir172c che mostrano complementarità di sequenza con i geni che identificano gli organi fiorali.

Un' altro esempio di miRNA presente nella regolazione del periodo di fioritura in *A. thaliana* è il miR159 (Achard et al., 2004). La presenza di gibberelline promuove l'accumulo di questo miRNA, causandone una sovraespressione, soprattutto in condizioni di fotoperiodo breve. Il bersaglio del miR159 è l' mRNA del fattore di trascrizione MYB33, che viene degradato, riducendo quindi i livelli del trascritto di LFY e producendo quindi un ritardo della fioritura.

Gli siRNA giocano invece un ruolo fondamentale nel meccanismo di silenziamento genico post – trascrizionale e, ancora più importante, nella funzione di metilazione diretta delle sequenze di DNA mediata da RNA.

Nello specifico, la genesi di questi short interfering RNA richiede una polimerasi specializzata, la Polimerasi IV, e un fattore di rimodellamento della cromatina CLASSY1 (Herr et al. 2005, Kanno et al. 2005 Onodera et al. 2005, Smith et al. 2007). Si pensa che Pol IV trascriva le regioni eterocromatidiche per produrre trascritti che vengono utilizzati per la produzione di siRNA.

RDR2 è un altro fattore fondamentale nel processo di sintesi perché genera il doppio filamento di RNA, utilizzando i trascritti della Polimerasi IV come stampo. I dsRNA vengono poi tagliati in frammenti di 24 nt dall' endonucleasi DCL3 (Xie et al. 2004), metilati da HEN1, e successivamente reclutati da RISC contenente un effettore, AGO4, che aiuta a modificare le sequenze omologhe della cromatina.

La RNA Polimerasi DNA-dipendente V agisce nelle ultime fasi, in un complesso denominato DDR (Defective in RNA Directed DNA Methylation) dove è presente un' altro fattore di rimodellamento della cromatina, DMS3 (Defective in Meristem Silencing 3), avente un dominio a cerniera che lega RDM 1, consente la metilazione *de novo* delle sequenze omologhe nel DNA.

L'attività della Polimerasi V è essenzialmente quello di reclutare diverse DNA metiltransferasi (vedi capitolo 3.1.1), comprese le DRM1 e DRM2 e altri enzimi con funzione di rimodellamento dei siti bersaglio nella cromatina.

Altre proteine in piante con questa particolare attività sono le DNA glicosilasi e DNA liasi ROS1 e ROS3 (Repressor Of Silencing 1 e 3), DME (Demeter) e DME – like.

3.3 I TRASPOSONI

Gli elementi trasponibili sono sequenze mobili di DNA che si muovono o traspongono da un sito del genoma ad un altro, interrompendo a volte la funzione di un gene. Più precisamente, la trasposizione può avvenire da un sito a un altro di uno stesso cromosoma, da un cromosoma ad un altro (in organismi eucariotici il cui genoma è organizzato in più cromosomi), o da un sito cromosomico a un sito plasmidico (in organismi contenenti plasmidi, elementi genetici indipendenti dal cromosoma e capaci di replicazione autonoma).

Questi elementi possono essere classificati in base alla loro modalità di trasposizione in:

- **Elementi mobili (TE) o trasposoni:** si muovono direttamente e codificano per uno o più prodotti genici necessari alla loro trasposizione. Sono elementi caratterizzati da sequenze ripetute invertite (IR) di circa 10 pb alle estremità, riconosciute dall'enzima trasposasi, che si lega a queste ripetizioni integrando la sequenza nel sito bersaglio.

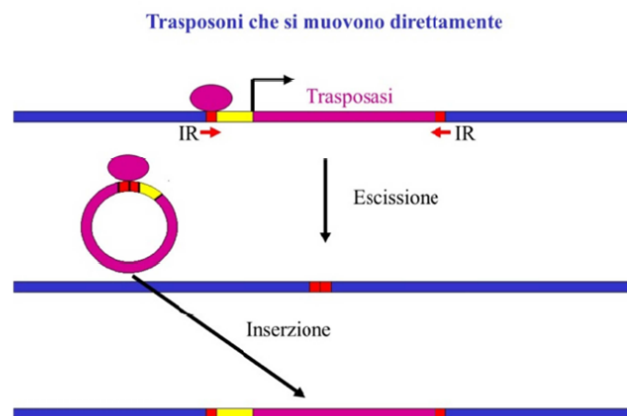


Fig. 3.6: *L'escissione da parte del trasposone e la conseguente inserzione, avviene spesso in siti casuali.*

- Trasposoni che attuano un meccanismo che implica la replicazione del DNA dell'elemento stesso. La trasposasi, codificata dal trasposone stesso, funge da mediatore nell'inserzione tra l'elemento e il potenziale sito d'inserzione. Durante questa interazione, l'elemento si replica, una copia di questo si inserisce nel nuovo sito mentre l'altra rimane nel sito originario.

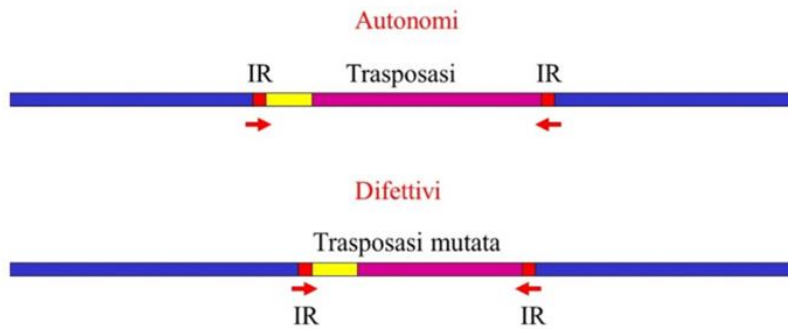


Fig. 3.7: Movimento autonomo dei trasposoni mediante trasposasi, codificata dall'elemento stesso, che aiuta il movimento dell'elemento nel nuovo sito d'inserzione.

- **Retrotrasposoni:** sono elementi che si pensa abbiano delle origini virali. Essi infatti presentano la struttura di virus tumorali a RNA integrati nel genoma. Una delle proteine che codifica è la trascrittasi inversa, che replica il DNA creandone una copia mediante un filamento stampo di RNA intermedio.

Trasposoni che si muovono indirettamente (retroposoni)

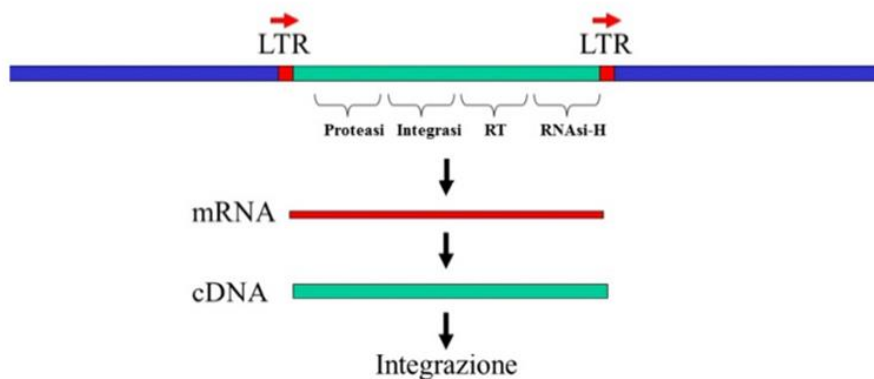


Fig. 3.8: Movimento dei retrasposoni mediante il meccanismo dell'integrazione grazie ad un intermedio a RNA, che porta alla formazione di molecole di cDNA che vengono inserite nei nuovi siti cromosomici.

I retrotrasposoni si possono ulteriormente dividere in due categorie:

- Retrotrasposoni LTR: sono caratterizzate da Long Terminal Repeats, cioè sequenze fiancheggianti il retrotrasposone lunghe 300-2200 pb. Questi elementi codificano per enzimi necessari alla loro trasposizione.
- Retrotrasposoni non-LTR: in questa categoria rientrano i LINEs, retrotrasposoni caratterizzati da una coda poly-A terminale e codificano per gli enzimi necessari alla

loro trasposizione e una proteina in grado di legare il DNA, e i SINEs, brevi sequenze che solitamente sono non codificanti.

L'impatto dell'inserzione di una nuova sequenza nel genoma di una pianta influisce sulla struttura del suo genoma e conseguentemente sulla sua espressione genica.

Per questo motivo le piante sono in grado di controllare l'attività di trasposizione nel genoma, infatti quasi tutti i trasposoni presenti nel genoma dei vegetali sono trascrizionalmente inattivi. L'attività periodica di trasposizione riguarda solo una frazione molto bassa dei trasposoni presenti nel genoma.

Inoltre, la pianta sembra essere tollerante nei confronti dei trasposoni, in quanto la maggior parte di essi determina variabilità nei tessuti somatici della pianta: durante la vita della pianta la modifica

provocata dagli eventi traspositivi è sottoposta a selezione; solo successivamente il tessuto somatico produce i gameti. È, quindi, vantaggioso per la pianta mantenere una bassa attività di trasposizione.

3.4 MUTAGENESI INSERZIONALE

Dal 1950, anno in cui Barbara McClintock pubblicò i suoi primi studi, sono stati scoperti numerosi altri trasposoni in mais. Uno dei più importanti e studiati fin dalla sua scoperta, avvenuta nel 1978, è stato il trasposone Mu (Mutator), una sequenza di DNA in grado di spostarsi da un sito ad un altro all'interno del genoma, codificante per una trasposasi che riconosce l'elemento Mu a livello delle 2 estremità terminali ripetute e invertite (TIR) di circa 220 pb. Gli elementi Mu, in particolare, si inseriscono a livello di sequenze codificanti, rappresentando un ottimo mezzo per la mutagenesi casuale.

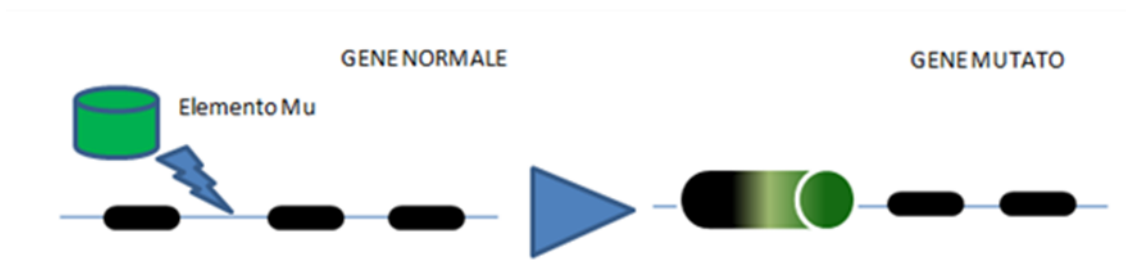


Fig. 3.9: Inserimento casuale del trasposone Mutator (Mu) in un gene.

Dato che la trasposizione avviene molto tardi nello sviluppo, al punto che il gametofito normalmente contiene mutazioni indipendenti, è sufficiente utilizzare il polline di una linea Mu attiva per impollinare un'infiorescenza femminile di una pianta "recipiente". In aggiunta, poiché gli elementi Mu raramente si excidono, le mutazioni causate da questo elemento trasponibile sono ereditabili (Lisch D et al., 1995; China F. Lunde et al., 2003).

A questo punto le popolazioni ottenute da questo incrocio devono essere sottoposte a screening alla ricerca di mutanti inserzionali che possano essere interessanti dal punto di vista fenotipico o genotipico, al fine di individuare la mutazione che permetteranno di avere linee con variabilità genetica superiore per qualche carattere importante.

Infatti, nella progenie mutante, ogni pianta che porta la trasposizione in un locus differente, è possibile, conoscendo la sequenza del trasposone risalire alla sequenza delle regioni fiancheggianti l'inserzione, e di conseguenza alla sequenza del gene interrotto.

Lo screening di mutanti così ottenuti è possibile attraverso due vie:

- *Forward genetics*: ovvero l'osservazione delle piante alla ricerca di fenotipi mutanti interessanti.
- *Reverse genetics*: implica l'applicazione della reazione a catena della polimerasi (PCR). In questo caso primers disegnati sulle sequenze TIR vengono utilizzati in combinazione con primers gene-specifici, per individuare eventuali inserzioni a carico

di un gene di interesse (Bensen et al.1995; Das and Martienssen 1995; Chuck et al. 1998; Hanley et al. 2000). Nella progenie mutante, si può quindi risalire alla sequenza delle regioni fiancheggianti l'inserzione, e di conseguenza alla sequenza del gene interrotto. Questo approccio è limitato dalla conoscenza delle sequenze del trasposone, ma è molto più veloce e attendibile del primo.

Con questo metodo si è potuto caratterizzare e studiare due nuove linee mutanti di mais: HDA108 e CHR120. Di tutti i mutanti derivanti dall'incrocio iniziale, si è pensato di programmare una linea di genotipizzazione e caratterizzazione proprio di questi poiché i mutanti ortologi in *A. thaliana* (rispettivamente HDA6 e MOM1) sono stati recentemente caratterizzati scoprendo un ruolo importante nel controllo epigenetico dello sviluppo della pianta. Un'altra linea mutante molto interessante derivante dall'incrocio iniziale è FPA, riscontrata nelle fasi precoci di introgressione del trasposone Mu, su cui il lavoro di genotipizzazione è iniziato più tardi rispetto agli altri due mutanti.

3.4.1 Mutante *chr120* (*AtMOM1*)

Studi di Vaillant e altri in *Arabidopsis* hanno dimostrato l'importanza epigenetica del gene, che prende il nome di MORPHEUS' MOLECULE 1 o MOM1. Esso è indirettamente responsabile del mantenimento del silenziamento di particolari regioni del genoma che sono metilate, quali i geni per la produzione di RNA ribosomale 5S, molte regioni ripetute ed elementi trasponibili.

I geni dell'RNA ribosomale 5S sono presenti come ripetizioni in tandem, e rappresentano alcuni dei geni più frequentemente trascritti; in realtà nel genoma sono presenti copie dei 5S (chiamati 5S minori) silenziati sia con pathway di metilazione DNA dipendente che indipendente; è in quest'ultima situazione che il gene MOM1 partecipa (Vaillant et al 2006).

È in quest'ultima situazione che il gene in questione interviene, rilasciando il silenziamento dei TSI (Transcriptional Silent Information, ovvero informazioni trascrizionalmente silenti) senza alterare lo stato di metilazione del DNA. Inoltre si pensa lavori grazie ad un'interazione genica con l'RNA Polimerasi V, responsabile della trascrizione delle regioni eterocromatiche. Grazie a questa interazione viene mantenuto il silenziamento dei geni target (Yokthongwatanna et al, 2009).

3.4.2 Mutante *hda108* (*AtHDA6*)

I mutanti HDA108 sono piante di mais in cui il trasposone Mu si è inserito nel gene codificante una deacetilasi istonica, cioè un enzima responsabile della rimozione dei gruppi acetile delle code N- terminali delle proteine istoniche, ortologa ad HDA6 di *Arabidopsis thaliana*.

Questa modifica contribuisce alla regolazione epigenetica, ovvero il rimodellamento della cromatina, che passa da uno stato rilassato ad uno più condensato che permette o meno la trascrizione dei geni di interesse. Questo è possibile grazie a modifiche istoniche, quali la fosforilazione, la metilazione e l' ubiquitinazione di alcuni aminoacidi che compongono gli istoni.

In particolare, i mutanti *AtHDA6* presentano caratteristiche ben distinte rispetto agli altri mutanti inserzionali:

- alti livelli di acetilazione a livello dell'istone H3
- longevità maggiore rispetto a linee wt grazie alla down-regolazione dei geni di resistenza
- fioritura ritardata, grazie alla up-regolazione di FLC, nonché della sua iperacetilazione.

La funzione regolatoria di *AtHDA6* è stata studiata da parte di Wu e il suo gruppo di ricerca nel 2008, mediante mutanti loss-of- function, ovvero mutanti in cui manca l'espressione del gene e quindi mostrano iperacetilazione a livello dell' istone H3.

Dagli stessi ricercatori è stato proposto un metodo per trovare la localizzazione del gene, inserendo il gene reporter GUS a fianco del gene d'interesse. I risultati dimostrarono che nelle giovani plantule HDA6 è presente prevalentemente a livello di cotiledoni ed ipocotili, mentre negli individui adulti si concentra nelle foglie mature e nel fusto, oltre che nei fiori. Nei semi invece non è espresso.

3.4.3 Mutante *fpa*

FPA è un componente della via autonoma che promuove la fioritura in *A. thaliana* reprimendo FLC (Schomburg et al, 2001; Lim et al, 2004). Codifica per una proteina RNA-binding che contiene tre motivi di riconoscimento dell' RNA nella regione N-terminale.(Schomburg et al., 2001).

Mutazioni in FCA o FPA non disturbano l'espressione di FLK, altro componente del pathway autonomo; altrettanto, in mutanti FLK l'espressione di FCA e FPA è normale. Questo suggerisce che suddetti componenti non regolano l'espressione uno dell'altro all'interno del pathway autonomo. Analisi di doppi mutanti suggeriscono l' esistenza di due gruppi epistatici nel pathway autonomo: uno compreso FCA e FY e l'altro FPA e FVE (Koornneef,1998).

Questi esperimenti hanno dimostrato che le proteine RNA-binding della via autonoma agiscono in parallelo al controllo dell' espressione di FLC.

Grazie all' analisi di doppi mutanti per i geni FCA/FPA è stata riscontrata un cambiamento di conformazione della cromatina in diverse sequenze, data dalla metilazione del DNA, soprattutto di trasposoni e retrotrasposoni. Inoltre, si è scoperto che hanno un ruolo importante nel processamento della regione 3' UTR dell' mRNA (poliadenilazione) e nella terminazione della trascrizione.

4. SCOPO DELLA TESI

La mia tesi si inserisce nel lavoro di ricerca del progetto AENEAS, finanziato dall'Unione Europea, che ha lo scopo di analizzare quei meccanismi che portano alla formazione di epialleli, che vengono ereditati dalla progenie e si mantengono stabili nelle generazioni successive, poiché rappresentano un'importante fonte di variabilità utilizzabile nei programmi di miglioramento genetico.

Lo studio dell'ereditabilità di epialleli viene svolto in *Zea mays* mediante particolari tecniche che permettono di trovare geni indotti da stress e regolati epigeneticamente, definiti epitarget.

Le linee mutanti inserzionali che ho studiato in questa tesi sono state ottenute attraverso l'incrocio di una linea di mais wt con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu (Mutator) è particolarmente attivo. I trasposoni sono sequenze di DNA in grado di spostarsi da un sito ad un altro all'interno del genoma, codificanti per una trasposasi che riconoscono l'elemento Mu a livello delle 2 estremità ripetute e invertite (TIR) di circa 220 pb. Gli elementi Mu, in particolare, si inseriscono a livello di sequenze codificanti, rappresentando un ottimo mezzo per la mutagenesi casuale.

In questo modo ogni individuo della progenie presenterà inserzioni indipendenti a carico di geni diversi. I geni mutati in ciascuna pianta della progenie di questo incrocio possono essere facilmente identificati attraverso sequenziamento delle regioni fiancheggianti il trasposone Mu.

Nello specifico, questa tesi si propone di studiare e caratterizzare a livello molecolare i mutanti inserzionali a carico del gene CHR120, ortologo di MOM1 in *A. thaliana*, del gene HDA108, una deacetilasi istonica, e del gene FPA, codificante un regolatore del processamento degli RNA.

I mutanti sono stati ottenuti tramite incrocio e una serie di back cross con una linea d'élite per ripristinare il background genetico: successivamente al primo incrocio, viene generata una linea F2 per avere una popolazione più uniforme. Questa linea è stata poi incrociata con la linea B73, di cui si conosce l'intero genoma, per poter lavorare appunto con un genoma di riferimento. Sono stati necessari 5 step di back cross per introdurre in maniera stabile il trasposone nel background di riferimento della linea B73. Al termine si è ottenuta una linea BC5, che è stata autofecondata due volte al fine di portare la mutazione in omozigosi.

Durante tutti questi incroci è stato necessario seguire la segregazione della mutazione attraverso la genotipizzazione di ogni singolo individuo secondo un protocollo che prevedeva l'utilizzo della reazione a catena della polimerasi (PCR), per portare avanti solo i mutanti che avevano l'inserzione del trasposone Mu.

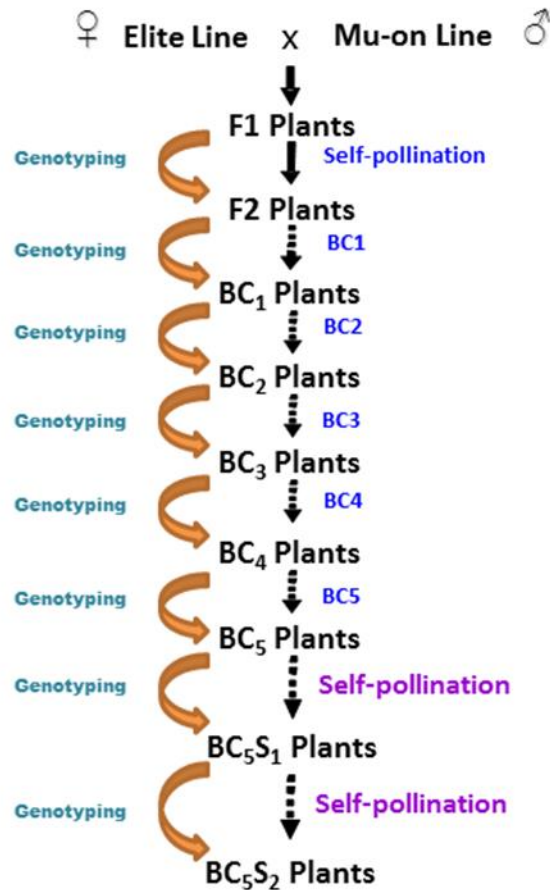


Fig. 4.1: Schema che illustra la creazione di mutanti inserzionali.

Nella pratica, il gruppo ha seguito l'impostazione logica precedentemente descritta fino ad arrivare, per i mutanti chr120 e hda108, ad effettuare la prima autofecondazione in campo nell'estate 2012 e la successiva genotipizzazione dei mutanti derivanti dal BC5S1 verso novembre-dicembre 2012, in piante cresciute in serra.

Per quanto riguarda il mutante *fpa*, nell'estate 2012 è stato condotto il terzo back cross e in parallelo sono state effettuate delle autofecondazioni delle piante allo stadio BC2 allo scopo di ottenere una popolazione segregante 1:2:1 wt:eterozigote:omozigote per eseguire una prima caratterizzazione fenotipica e molecolare dei mutanti omozigoti.

5. TECNICHE UTILIZZATE

5.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

A seconda dell'utilizzo che dovremmo farne del DNA genomico estratto dai campioni, sono stati utilizzati due diverse procedure di seguito riportate. Nell'ordine passiamo da un buffer di lisi che consente l'ottenimento in pochissimo tempo di una piccola aliquota di DNA non purificato, utile per rapide PCR di genotipizzazione, ad una estrazione/purificazione con fenolo cloroformio che per ottenere maggiori quantitativi di DNA purificato per validare in alcune piante i risultati della precedente genotipizzazione. In questo caso, dal momento del campionamento in serra o in campo, fino all'aggiunta del primo Buffer di lisi, il campione deve essere immediatamente congelato in azoto liquido e poi eventualmente conservato a - 80 °C, mentre l'estrazione veloce con il solo buffer di lisi va fatta su materiale fresco appena raccolto.

- Protocollo di estrazione con DNA microLYSIS – PLUS
 - Raccogliere una sezione di 2x1 mm della foglia più giovane della pianta e trasferirla in una microamp.
 - Aliquotare 20 µl di soluzione di microlisi e con un puntale cercare di distruggere il pezzettino di tessuto il più possibile.
 - Porre i campioni in termociclatore dove rimarranno overnight a 65°C;
 - Il giorno seguente impostare il termociclatore nel seguente modo, in modo da provocare una lisi delle pareti della cellula e il rilascio in soluzione del DNA genomico:
 - 65°C per 15 minuti
 - 96°C per 2 minuti
 - 65°C per 4 minuti
 - 96°C per 1 minuto
 - 65°C per 1 minuto
 - 96°C per 30 sec
 - Hold a 20°C

Data la bassa resa di questa estrazione è inutile controllare il DNA attraverso elettroforesi, e si può passare direttamente alla PCR.

- Protocollo di estrazione con Fenolo – cloroformio
 - Si prende una porzione di circa 3x6 mm di foglia (sempre la più giovane) e si mette in una eppendorf, dove verrà congelata con N liquido. Con dei pestellini, precedentemente raffreddati, si grinda il tutto fino ad ottenere una polvere omogenea.
 - Aggiungere 500 µl di Extraction Buffer (contiene NaCl 0,2 M, EDTA 25 mM, Tris pH 7,5 50 mM, SDS 0,5%) e vortexare per almeno 2 minuti.
 - Incubare a 65°C per 5 minuti, vortexare per almeno 2 minuti e rincubare per 5 minuti.
 - Aggiungere 500 µl di fenolo/cloroformio (soluzione di fenolo, cloroformio e alcol isoamilico in rapporto 25:24:1), vortexare per almeno 2 minuti e centrifugare per 10 minuti a 12000 g.
 - Recuperare il surnatante e trasferirlo in una nuova eppendorf, aggiungere con una pipetta 400 µl di isopropanolo e invertire gentilmente qualche volta.
 - Centrifugare 10 minuti, rimuovere il surnatante facendo attenzione a non perdere il pellet.
 - Aggiungere 200 µl di etanolo 70% (freddo), vortexare per almeno 1 minuto e centrifugare per 10 minuti.
 - Rovesciare con attenzione il surnatante e centrifugare per 2 minuti.
 - Rimuovere l' etanolo rimanente con la pipetta facendo attenzione a non rimuovere il pellet.
 - Asciugare il pellet a temperatura ambiente o a 37°C per 10 minuti.
 - Risospendere il pellet di DNA in acqua sterile o buffer TE (il volume può variare da 50 a 200 µl a seconda della concentrazione che si vuole ottenere).
 - Eventualmente aggiungere 5µl di RNAsi A e incubare per 30 minuti a 37°C per rimuovere l'RNA.

5.2 ESTRAZIONE DI RNA

L' estrazione di RNA viene fatta meno di frequente in laboratorio rispetto l' estrazione di DNA, e viene utilizzato quasi esclusivamente per controllare l' espressione dei geni di interesse tramite una RT – PCR. Per l' estrazione normalmente si usa il kit RNeasy Mini-kit, QIagen.

- Polverizzare 0,1 g di tessuto vegetale con mortaio e pestello con continue aggiunte di azoto liquido, fino ad ottenere una polvere impalpabile che deve essere trasferita in un tubino eppendorf da 2 ml, precedentemente raffreddato in azoto liquido.
- Aggiungere al campione 450 µl di Buffer RLT e 4,5 µl di β-Mercaptoetanolovortexando vigorosamente per rompere tutti gli aggregati vegetali.
- Procedere trasferendo il lisato direttamente in una colonnina QIAshredder e centrifugando 2 minuti a massima velocità in una minicentrifuga.
- Trasferire il lisato così purificato attraverso la colonnina in un nuovo tubino ed aggiungere 0,5 volumi di etanolo (96-100%), mescolando delicatamente mediante inversione. In questo modo si ottiene la precipitazione del RNA che non verrà pellettato, ma fatto legare ad una membrana silicea.
- Trasferire il campione in una colonnina RNeasy e centrifugato per 15 secondi a 12.000 rpm,
- Aggiungere 700 µl di Buffer RW1 alla colonnina e centrifugare nuovamente per 15 secondi a 12.000 rpm.
- A questo punto si trasferisce la colonnina con legato l'RNA in un nuovo tubo da microcentrifuga e si procede con due lavaggi utilizzando per ciascuno 500 µl Buffer RPE e centrifugando ogni volta per 15 secondi a 12.000 rpm.
- Eliminare tutti i residui di etanolo con un'ulteriore centrifuga a vuoto a 14.000 rpm per 1 minuto.
- Eluire l'RNA dalla colonnina con 40 µl di H₂O DEPC mediante centrifugazione per 1 minuto a 12.000 rpm prima di controllare qualità e concentrazione del RNA estratto mediante corsa su gel di agarosio.

Una variante a questo protocollo prevede degli step alternativi successivi al sesto punto del protocollo canonico:

- Aggiungere 350µl di Buffer RW1 alla colonnina Rnaeasy. Chiudere gentilmente e centrifugare per 15 secondi con rpm >10.000. Eliminare poi il surnatante.
- Aggiungere al centro della colonnina 10µl di DNasi I Stock Solution e 70µl di Buffer RDD. e lasciare in incubazione per 15min a 20-25°C;
- Aggiungere 350µl Buffer RW1 alla colonnina; chiudere il tappo e centrifugare con rpm >10.000. Continuare con il primo lavaggio con Buffer RPE da protocollo.

L'RNA così estratto viene normalmente quantificato tramite analisi al Nanodrop o corsa su gel elettroforetica per valutarne anche l'integrità.

5.3 QUANTIFICAZIONE AL NANODROP

Il NanoDrop è uno spettrofotometro che ci permette di quantificare dei campioni di diversa natura, utilizzando dei micro volumi e svincolandosi dall'utilizzo delle classiche cuvette. E' composto da una parte strumentale e da un software da installare in un computer.

- Inizialmente pulire le superfici ottiche superiori ed inferiori del sistema di ritenzione spettrofotometrico, pipettando 2-3 ml di acqua deionizzata pulita sulla superficie inferiore ottica.
- Utilizzare 1 µl di tampone sulla superficie inferiore ottica per tarare la macchina e dando in questo modo un controllo "a vuoto".
- Dispensare 1 µl di campione di acido nucleico sulla superficie ottica e chiudere il braccio di leva. Dando il comando al computer, il software misura l'assorbanza alle diverse lunghezza d'onda e calcola automaticamente il rapporto di concentrazione e purezza del campione.

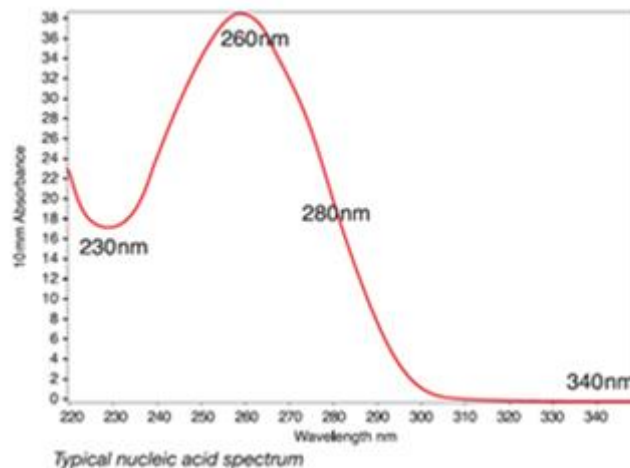


Fig. 5.1: Spettro tipico degli acidi nucleici.

In base alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti (260 nm per gli acidi nucleici, 230 nm per i polisaccaridi, 280 nm per le proteine) è possibile avere delle indicazioni sulla qualità dei campioni estratti e purificati.

Per esempio, il rapporto tra le due assorbanze 260/280 deve essere ~1,8 per il DNA e ~2,0 per l' RNA. Rapporti di purezza significativamente differenti possono indicare la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti che assorbono fortemente nei pressi di 280 nm.

Il rapporto di purezza tra le assorbanze a 260/230 è una seconda misura di controllo del DNA, che deve essere compreso tra 1,8 e 2,2. Rapporti di purezza che sono significativamente inferiori ai valori attesi possono indicare che la tecnica di estrazione e purificazione dell'acido nucleico utilizzato può richiedere un'ulteriore ottimizzazione.

5.4 CORSA ELETTROFORETICA

Questa tecnica è usata di routine per quantificare e verificare la quantità e qualità del DNA e RNA estratto e per controllare le dimensioni dei frammenti amplificati tramite PCR. Sfrutta la carica che hanno le molecole una volta poste in una particolare soluzione salina. Se sottoposta al passaggio di corrente elettrica, le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo con carica opposta rispetto a quella propria, separandosi in base al loro peso molecolare in quanto le molecole più grandi migreranno più lentamente rispetto a quelle più piccole.

Il DNA, che ha carica negativa, tenderà quindi a migrare verso l'anodo che presenta carica positiva. Utilizzando marcatori di peso molecolari a concentrazione nota è inoltre possibile stimare le dimensioni e le concentrazioni dei nostri campioni. L'elettroforesi viene normalmente condotta su gel di agarosio all' 1 – 2 % in tampone TAE 1x (1gr di agarosio in 100 ml di TAE 1x). Per la colorazione degli acidi nucleici si usa il colorante SyberSafe. Il gel solido viene immerso nel tampone TAE 1x della vaschetta dove avviene la corsa. Essa viene condotta con un voltaggio che dipende dalle dimensioni del gel (100-200 volt).

Preparazione di un gel da 25 ml all' 1 %:

- Si pesano 0,25 gr di agarosio, si mettono in una beuta e si aggiungono 25 ml di TAE 1x e 2,5 µl di SyberSafe.
- Far sciogliere l'agarosio (in forno microonde) e versare il liquido in un supporto dove precedentemente è stato inserito uno o più pettini.

Prima di inserire i vari campioni nel gel, questi devono essere diluiti e marcati con un colorante blu, il Loading Dye, che nel gel formerà due bande separate. Il Loading Dye contiene:

- Blu di bromofenolo: migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300 pb.
- Xilenciamolo: migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 400 pb.
- Glicerolo: ha la funzione di appesantire il DNA facendolo andare nel fondo del pozzetto.

5.5 PCR E DISEGNO DEI PRIMER

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità dell'enzima DNA polimerasi, che permette una duplicazione semiconservativa. Questo enzima, infatti, sintetizza frammenti di DNA racchiusi tra 2 brevi tratti di DNA di sequenza nota (primer). La PCR prevede l'alternarsi ciclica di 3 fasi:

- *Denaturazione*: la doppia elica del DNA si apre a 92 - 95°C per 30 - 60 secondi.
- *Annealing*: i primer si attaccano alle 2 estremità del frammento da amplificare. Avviene a 55 - 60°C, a seconda del contenuto in GC dei primer, per 30-60 secondi.
- *Estensione*: la DNA polimerasi (Taq) sintetizza i nuovi filamenti di DNA a 72°C aggiungendo nuovi nucleotidi liberi all'estremità 3' – OH dell'innesco.

Per agevolare il lavoro, si fa una master mix unica, aliquotando successivamente la soluzione a seconda di quante piante dobbiamo genotipizzare. Una mix contiene:

- H₂O sterile
- PCR Buffer: specifico per ogni enzima. È un mix di sali con funzione di mantenere il pH ideale per il funzionamento della Taq. polimerasi.
- MgCl₂ (o MgSO₄): è il cofattore della DNA polimerasi, influenza la specificità dei legami dei primer e favorisce l'inserimento dei dNTPs. Viene usato con una concentrazione variabile da 1,5 a 3 mM, ma un eccesso di questo cofattore può rendere aspecifica l'attività della polimerasi.
- dNTPs: sono i desossinucleotidi (A-T-C-G). Devono essere messi in uguale concentrazione, variabile da 200 a 400 μM.
- Primer Fw e Rev: devono avere l'OH libero per far continuare la polimerizzazione (può essere persa a temperatura ambiente). Devono essere efficienti e specifici, di

lunghezza variabile da 24 a 30 nt e non devono formare strutture secondarie o a forcina.

- DNA templato (genomico): deve essere il più pulito possibile perché può inibire la PCR.
- Taq DNA Polimerasi: è un' enzima con un optimum di temperatura 72 °C e un tasso di errore di 1 base ogni 10⁴ basi.

L'enzima che viene usato nelle reazioni di PCR è la Taq DNA Polymerase (Invitrogen), con l'aggiunta di alcuni composti per rendere migliore e più specifica l'amplificazione. Esso proviene dall'organismo termofilo *Thermus aquaticus* (tramite ingegnerizzazione) ed è costituito da una singola catena polipeptidica (massa molecolare di 94 kDa). Presenta un'attività principale DNA polimerasi DNA - dipendente in direzione 5' → 3', per la quale è richiesta una temperatura ottimale di 75-80 °C e la presenza di ioni Mg²⁺ (ad es. MgCl₂); in tali condizioni la reazione avviene con elevata processività e alto numero di turn over.

- Additivo per PCR: sostanze eterogenee per natura. Destabilizzano i filamenti di DNA rendendo più facile la denaturazione di regioni ricche in GC e più specifico l'appaiamento con i primer. Durante le PCR che ho eseguito è stato utilizzato l'additivo BioStab PCR Optimizer Sigma®.

La composizione standard è riassunta in questa tabella:

COMPONENTI	CONC. NEL MIX	VOLUME (50 µl)
Buffer 10X (Invitrogen)	1X	5µl
MgCl ₂	1,5/2,5 mM	3/5 µl
Primer Fw	0,4 µl	2 µl
Primer Rev	0,4 µl	2 µl
dNTPs mix	200 mM	1 µl
Taq Polimerasi (5U/ µl)	2,5 unità	0,5 µl
DNA stampo	50/100 ng	Variabile
H ₂ O sterile		A volume

Fig. 5.2: Composizione standard per PCR.

Quando si disegna un primer per le reazioni di PCR si deve tener conto della sua lunghezza, che deve essere compresa tra 24 e 30 nt, della sua composizione in C e G (>60%) e la temperatura di Melting, calcolata con la formula $2x(A+T)+4x(G+C)$. Inoltre la breve sequenza di nucleotidi non deve formare strutture secondarie o omo/eterodimeri.

In particolare, per amplificare il DNA genomico dei mutanti HDA108 e CHR120, sono stati utilizzati primer disegnati sulle sequenze TIR del trasposone (per vedere se la pianta è mutante oppure no), in combinazione con un'altra coppia di primer gene – specifici (per individuare se la mutazione è omozigote oppure eterozigote). Per entrambe le linee però, è stato utilizzato un unico primer Rev universale disegnato sulla sequenza del trasposone.

	Primer Fw	Primer Rev
Mutanti <i>chr120</i>	AEN07_F01: CTAGGGTAGCTGGTGCAG AEN07_F02: TTCGCACCTCGGAGGAAG	TIR: CTTCGTCCATAATGGCAATTATCTC AEN07_R02: CTCAAGACATTGCGCTCAAC
Mutanti <i>hda108</i>	AEN11_F03: AGACTACTACTACGGGCAG AEN11_F02: TGCCGATTGCCTAAACCC	TIR: CTTCGTCCATAATGGCAATTATCTC AEN11_R02: TGCTCAACAATCACATGAACC
Mutanti <i>fpa</i>	GEN03_F03: CGGGGTGAAAAGGTCAAGG	TIR: CTTCGTCCATAATGGCAATTATCTC GEN03_R03: GGGCTAATGCCACCAACC

Fig. 5.3: Tabella illustrativa dei Primer Rev e Fw per i mutanti *Hda108*, *Chr120* e *Fpa*.

Per eseguire una PCR si deve regolare il termociclatore a seconda delle necessità delle reazioni, in generale un profilo termico più o meno standard si può schematizzare in questo modo:

96°C per 5 min
 95°C per 1 min
 55°C per 30 sec
 72°C per 50 sec
 72°C per 12 min
 4°C per ∞

} x 35 - 40 cicli

Alla fine si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra il primer Fw e il primer Rev. All'inizio della reazione l'amplificazione sarà direttamente proporzionale, ma verso gli ultimi cicli raggiungerà un plateau dovuto all'inibizione dei prodotti di reazione, come ad esempio i prodotti di scarto, la disattivazione dell'enzima e minor disponibilità di dNTPs.

Qualora la PCR non avesse dato i risultati attesi, sono state modificate le condizioni standard cercando di aumentare la resa o la specificità della reazione a seconda delle necessità. In particolare, per ottimizzare i risultati siamo andati ad agire sulle seguenti variabili:

- la concentrazione di $MgCl_2$, che può rendere più o meno specifica l' amplificazione;
- la quantità di DNA di partenza;
- la temperatura di annealing che influenza la specificità di attacco dei primers;
- la durata dei diversi passaggi della PCR a seconda della lunghezza del frammento;
- il numero di cicli per aumentare o ridurre il numero di frammenti sintetizzati;
- il tipo di DNA polimerasi che può essere più adatta a templati difficili o lunghi.

Le dimensioni dei frammenti amplificati vengono controllate tramite elettroforesi su gel di agarosio, mentre si può quantificare il genoma al NanoDrop.

5.6 RT – PCR (Reverse Trascriptional PCR)

La RT – PCR è una tecnica usata per stabilire il livello di espressione del gene di interesse. Consiste in un primo passaggio che comprende la retrotrascrizione dell' RNA messaggero in una molecola complementare chiamata cDNA e successivamente nell'amplificazione del prodotto di retrotrascrizione. Essendo una PCR semi quantitativa, il numero di cicli che dovrà compiere sarà relativamente basso (20-25 cicli) e quindi la reazione di amplificazione si fermerà alla fine delle fase esponenziale.

Per effettuare una corretta RT – PCR è opportuno preparare una mix di reazione così composta:

Componente	Quantità
RNA	1 µg
dNTPs 10mM	1 µl
Primers	500 mg
H2O	A volume (13 µl)

Fig. 5.4: *Componenti del mix di retrotrascrizione.*

Nel nostro caso è stato utilizzato un primer OligodT (si attacca alla coda di poli A dell'mRNA maturo e permette così di iniziare la trascrizione) e l'enzima trascrittasi inversa SuperScript III Invitrogen. Il mix è stato incubato a 65°C per 5 minuti allo scopo di denaturare tutte le strutture secondarie dell'RNA, successivamente posto in ghiaccio per 1 minuto per cristallizzare il composto.

Passato il minuto, al campione sono stati aggiunti l'enzima con il suo buffer specifico, il DTT (ditiotreitolo) che ottimizza il lavoro della trascrittasi inversa e un inibitore delle RNAasi (Invitrogen). Il mix così ottenuto è stato incubato per 60 minuti a 50°C. Il campione è stato trasferito a 70°C per 15 min in modo tale da inattivare l'enzima e quindi conservato a -20°C fino al suo utilizzo in reazioni di PCR.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'ambito del progetto AENEAS (Acquired Environmental Epigenetics Advances: from *Arabidopsis* to maize) il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la tesi è particolarmente interessato allo studio del ruolo che i fattori ambientali hanno nella creazione di nuova variabilità epigenetica e all'ereditabilità di questa variabilità in mais.

Con la collaborazione di Biogemma, nota azienda internazionale che si occupa di miglioramento genetico di specie vegetali, sono stati ottenuti dei mutanti inserzionali di mais inducendo la trasposizione dell'elemento trasponibile Mu. Tra i mutanti ottenuti sono stati selezionati piante con l'inserzione a livello del gene *chr120*, gene indirettamente responsabile del mantenimento del silenziamento delle sequenze metilate, e piante con l'inserzione nel gene *hda108*, il quale codifica una deacetilasi istonica. Inoltre è stata rilevata l'importanza di un nuovo mutante dovuto all'inserzione del trasposone Mu all'interno di un introne del gene *fpa*, codificante per una proteina RNA-binding inizialmente identificata per la sua funzione nella via autonoma di regolazione della fioritura in *A. thaliana* attraverso il silenziamento del gene FLC, ma che è poi coinvolta nella regolazione e nel processamento di trascritti e nel controllo del silenziamento di trasposoni e sequenze ripetute.

I mutanti presi in esame in questa tesi sono stati ottenuti incrociando una linea di mais wt con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu (Mutator) è particolarmente attivo. In questo modo sono stati ottenuti un insieme di individui con genoma ibrido e quindi, prima di procedere con gli studi di genetica funzionale, è stato necessario introgredire la mutazione nel background omozigote della linea B73. Questo procedimento è stato ripetuto ben 5 generazioni per arrivare ad avere, nell'ultimo BC una pianta portante l'inserzione del trasposone Mu e nello stesso tempo avere una conoscenza il più estesa possibile dell'intero genoma del nuovo mutante. Al termine del processo di introgressione si devono effettuare 2 autofecondazioni al fine di portare la mutazione allo stato di omozigosi.

La tesi che presento si propone di elaborare i risultati dei mutati sopracitati durante le ultime fasi di questo lungo processo.

Per i mutanti *hda108* e *chr120*, nell'estate 2012 sono state seminate in campo piante delle popolazioni BC5, su cui è stata eseguita una genotipizzazione mediante estrazione del DNA e PCR per distinguere le piante wt da quelle eterozigoti. I mutanti eterozigoti di queste due popolazioni sono stati autofecondati per ottenere i semi alla popolazione BC5S1.

Essi sono successivamente stati seminati in serra, e nel periodo novembre – dicembre è stato fatto un genotyping per seguire la segregazione della mutazione (i rapporti di segregazione attesi sono 1:2:1, wt:eterozigote:omozigote) e per eseguire una caratterizzazione fenotipica e molecolare dei mutanti omozigoti così identificati.

Per verificare l'effettivo knock-out del gene dovuto all'inserzione del trasposone nella sequenza codificante, è stata eseguita un'analisi di espressione dei geni mutati tramite RT-PCR semiquantitativa dopo retro-trascrizione del RNA estratto da piante wt, eterozigoti ed omozigoti.

Per entrambi i mutanti erano state ottenute in precedenza delle popolazioni BC3S1 (da autofecondazione delle piante BC3) per una prima analisi molecolare e fenotipica, si è quindi proceduto ad un confronto tra i fenotipi osservati sulle piante omozigote ottenuti a due diversi livelli di introgressione.

Il mutante *fpa* si trova ad uno step di introgressione più arretrato rispetto gli altri due mutanti. Infatti, nell'estate 2012 le piante della popolazione BC2 sono state nuovamente incrociate con la linea B73 per ottenere i semi BC3, ma sono anche state eseguite delle autofecondazioni per una caratterizzazione molecolare e fenotipica dei mutanti omozigoti.

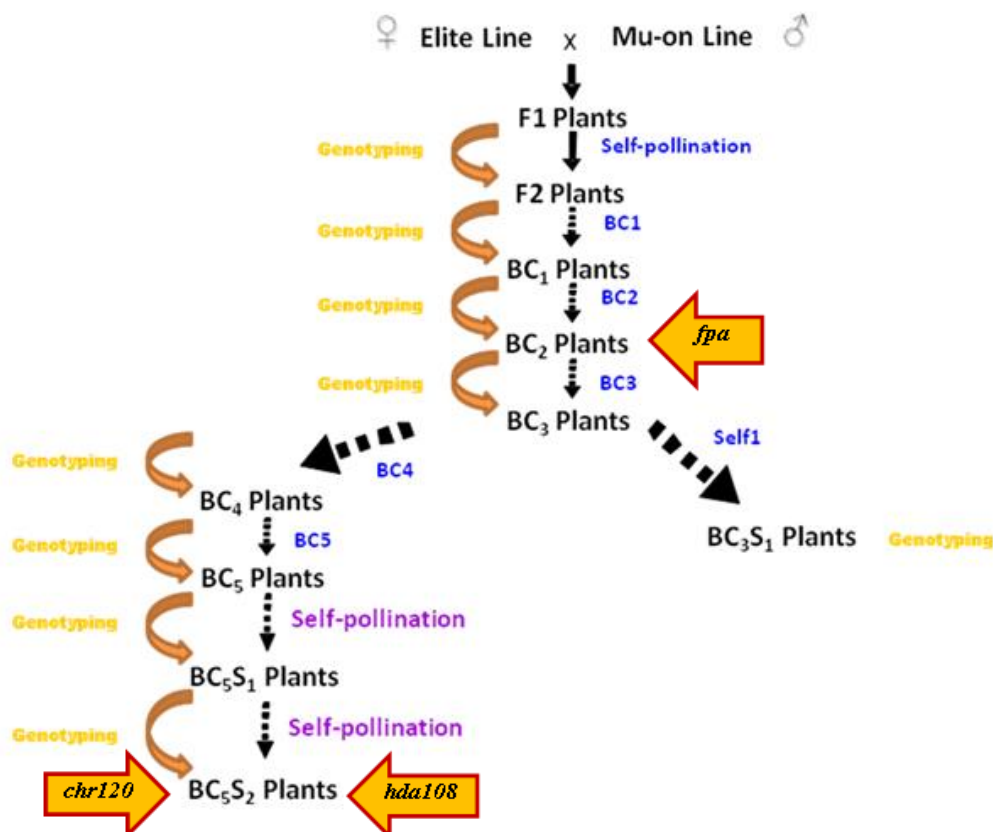


Fig. 6.1: Schema che rappresenta i passaggi per costituire le varie popolazioni di mutanti e lo stadio in cui si trovano al momento dell'analisi in questa tesi.

6.1 RISULTATI DEI MUTANTI *chr120*

In *Arabidopsis* gene *chr120* è indirettamente responsabile del mantenimento del silenziamento di particolari regioni del genoma che sono metilate, quali i geni per la produzione di RNA ribosomale 5S, molte regioni ripetute ed elementi trasponibili.

Il mutante ZmCHR120 è stato ottenuto mediante l'inserzione del trasposone Mu all'interno del primo esone del gene ortologo a quello di *Arabidopsis*, come dimostrato in figura 6.2.

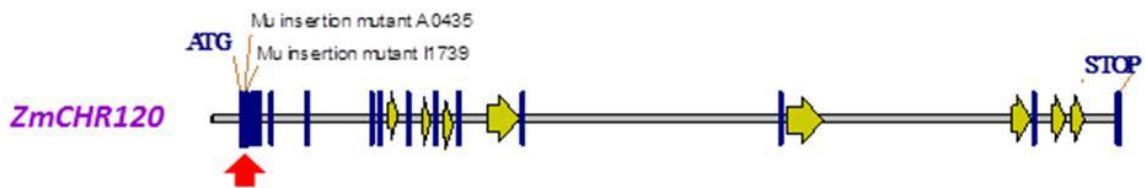


Fig. 6.2: Inserzione del trasposone Mu nel gene *chr120* di mais (*Zea Mays*).

La genotipizzazione della popolazione dei mutanti per il gene *chr120* ha previsto un'estrazione del DNA genomico con il protocollo Microlysis, o con il protocollo che prevedeva l'uso del fenolo – cloroformio.

Per confermare il genotipo degli individui della popolazione BC5S1 è stata effettuata una doppia PCR con due coppie diverse di primers: una prima coppia composta da primer Forward F01 a monte dell'inserzione del mutante Mu e il primer Reverse TIR, universale perché disegnato sulle sequenze terminali ripetute e invertite del trasposone. La PCR con questi primer è servita a discriminare inizialmente gli individui portanti il trasposone da quelli wild type.

La seconda coppia di primer, Fw02 e Rev02, entrambi specifici sulla sequenza del gene CHR120, è stata utilizzata per capire se gli individui erano omozigoti o eterozigoti per la mutazione.

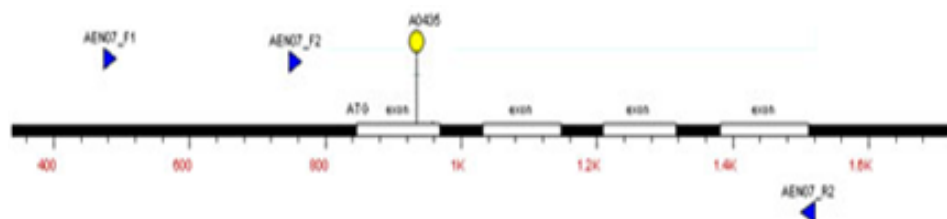


Fig. 6.3: Rappresentazione schematica del gene CHR120 con riportati il sito di inserzione del trasposone (pallino giallo), i primers Fw F01 e F02 e il primer Rev R02.

Nella tabella che segue sono riportate le combinazioni di primer usati nelle due diverse PCR, con le relative indicazioni sull'altezza della banda attesa.

<i>COMB. PRIMER</i>	<i>PRIMER Fw</i>	<i>PRIMER Rev</i>	<i>Altezza banda attesa</i>	<i>Combinazione</i>
CHR120-F01	AEN07_F01	TIR	500ca	Mu/Wt
CHR120-F02	AEN07_F02	AEN07_R02	780ca	Wt/etero

Fig. 6.4: Tabella che mostra le coppie di primer utilizzate per effettuare le PCR nei mutanti *chr120*.

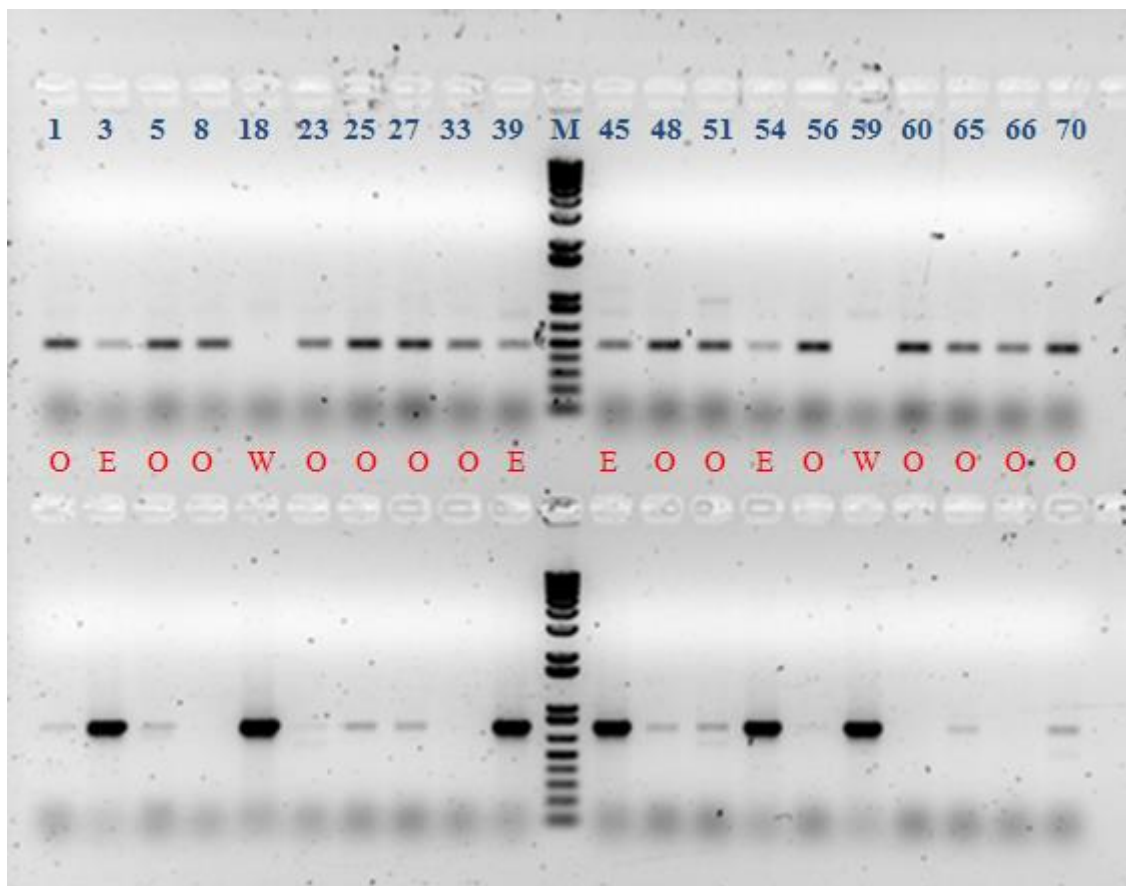


Fig. 6.5: Elettroforesi del prodotto di amplificazione ottenuto con la doppia coppia di primer: nella prima riga si può notare la discriminazione Mu/wt, mentre nella seconda i Wt/etero, negli individui facenti parte della popolazione BC5S1.

I dati raccolti indicano che da una popolazione di partenza di 70 piante, sicuramente 15 individui erano omozigoti per la mutazione del gene *chr120*, 33 sono risultati eterozigoti, mentre 17 non presentano l'inserzione del trasposone Mu.

Successivamente, dagli individui omozigoti più alcuni eterozigoti e wt di controllo, è stato estratto l'RNA dalle foglie, retrotrascritto in cDNA e utilizzato in RT – PCR per analizzare l'espressione del gene *chr120*.

Come controllo dell'amplificazione è stato utilizzato il gene GAPC, codificante per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, un enzima del ciclo di Krebs che viene normalmente espresso in tutti i tessuti in attiva crescita.

Il gel qui sotto mostra chiaramente come il gene di controllo sia espresso in tutte le piante analizzate, indipendentemente dal genotipo, mentre tutte le piante mutanti omozigoti presentano il completo silenziamento del gene, indicando che l'inserzione del trasposone determina il blocco della trascrizione di *chr120*.

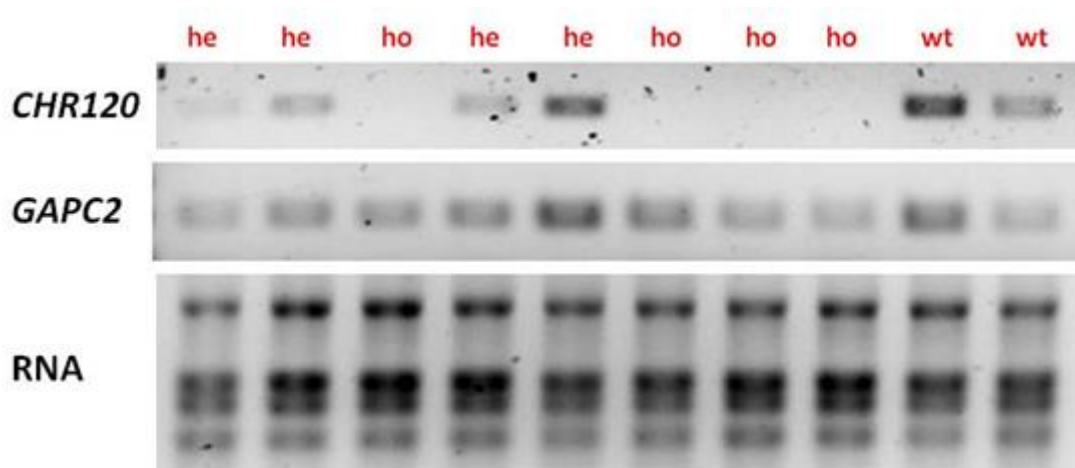


Fig. 6.6: Analisi di espressione del gene *CR120* in foglie di piante *BC3S1*.

La caratterizzazione fenotipica di questi mutanti ha riscontrato un fenotipo invariato tra individui wild type e mutanti, sia eterozigoti che omozigoti. L'unico fenotipo osservato era la scarsa produzione di polline, ma questo ha interessato, almeno in parte, anche le piante eterozigoti e wild-type, sembrando essere legato più alle condizioni di crescita in serra che ad un reale effetto della mutazione.

L'assenza di un netto fenotipo concorda sia con le osservazioni fenotipiche su mutanti del gene ortologo in *A. thaliana* (*MOM1*) sia con la funzione principale del gene. Il suo silenziamento causa infatti la trascrizione di sequenze di genoma normalmente silenziate, che comunque non inducono alterazioni del fenotipo, almeno nelle prime generazioni ottenute dall'autofecondazione del mutante. È infatti possibile che di progenie in progenie l'attività dei trasposoni non silenziati arrivi a portare mutazioni fenotipicamente evidenti.

Le piante BC5S1, cresciute in serra durante lo scorso inverno sono state quindi autofecondate o incrociate (omozigote x eterozigote) e i semi ottenuti sono stati da poco seminati in campo. Su questa popolazione BC5S1 verrà eseguito un nuovo genotyping e una più dettagliata caratterizzazione molecolare delle piante omozigoti. Si procederà anche all'analisi di espressione di alcune sequenze ripetute normalmente silenziate per valutarne l'eventuale espressione nelle piante mutanti.

6.2 RISULTATI DEI MUTANTI *hda108*

Nei mutanti *HDA108* di mais il trasposone Mu si è inserito nel gene codificante una deacetilasi istonica, un enzima responsabile della rimozione dei gruppi acetile delle code N-terminali delle proteine istoniche.

Questa modifica contribuisce alla regolazione epigenetica, ovvero il rimodellamento della cromatina, che passa da uno stato rilassato ad uno più condensato influenzando sulla trascrizione dei geni di interesse.

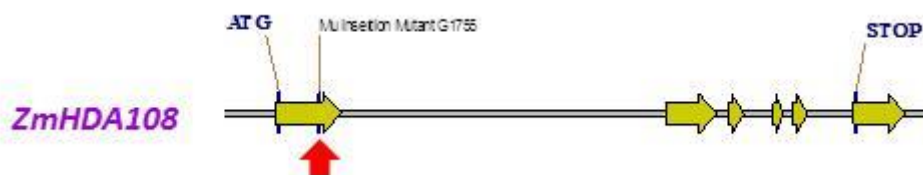


Fig. 6.6: Inserzione del trasposone Mu nel gene *chr120* di mais (*Zea Mays*).

La genotipizzazione di questa linea mutante di mais è avvenuta in maniera analoga a quella descritta precedentemente per il mutante *chr120*. Dopo aver estratto il DNA genomico dalle singole piante della popolazione BC5S1, si è proseguito effettuando una prima PCR per individuare le piante che portavano il trasposone Mu e quelle wt. Nello stesso tempo è stata fatta una seconda PCR con primer specifici per vedere se la mutazione fosse omozigote oppure eterozigote. Come mostrato nella foto che segue, si può notare che è stato usato un primer Reverse universale disegnato sulle sequenze TIR del trasposone, mentre i primer Forward sono disegnati uno sulla sequenza dell'introne a monte dell'inserzione di Mu e l'altro su una sequenza all'interno dell'esone.

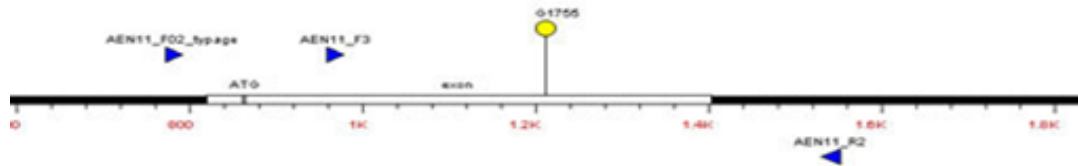


Fig. 6.7: Rappresentazione schematica del gene *HDA108* con riportati il sito di inserzione del trasposone (pallino giallo), i primers Fw F02 e F03 e il primer Rev R02.

Nella tabella che segue sono riportate le combinazioni di primer usati nelle due diverse PCR, con le relative indicazioni sull'altezza della banda attesa.

<i>COMB. PRIMER</i>	<i>PRIMER Fw</i>	<i>PRIMER Rev</i>	<i>Altezza banda attesa</i>	<i>Combinazione</i>
HDA108-F03	AEN11_F03	TIR	300ca	Mu/Wt
HDA108-F02	AEN11_F02	AEN11_R02	780ca	Wt/etero

Fig. 6.8: Tabella che mostra le coppie di primer utilizzate per effettuare le PCR nei mutanti *hda108*.

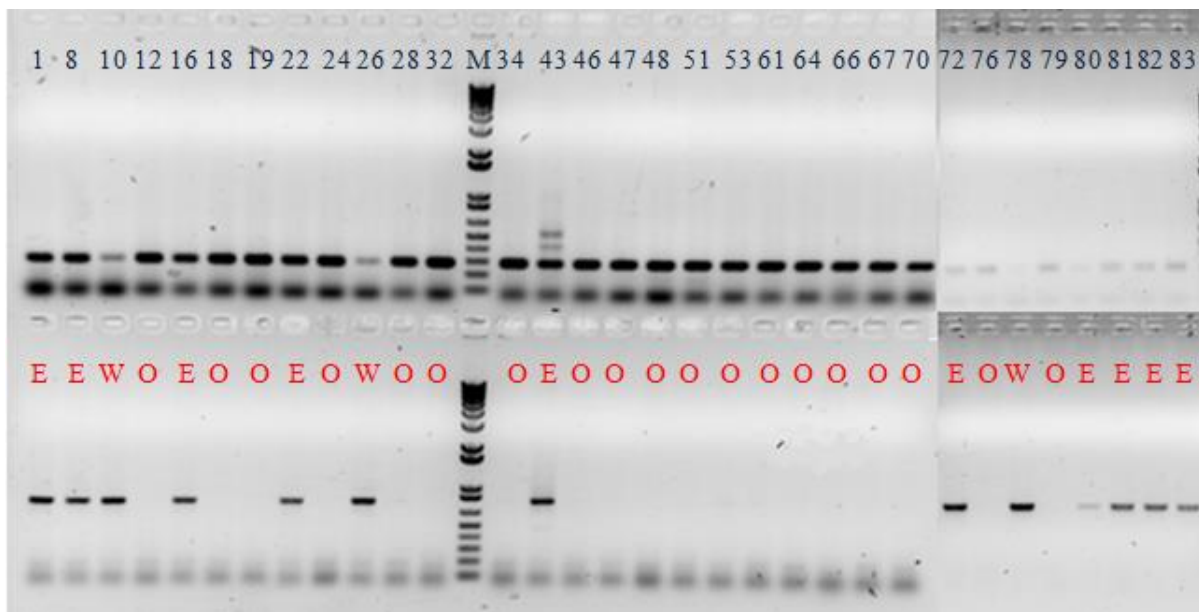


Fig. 6.9: Elettroforesi del prodotto di amplificazione ottenuto con la doppia coppia di primer: nella prima riga si può notare la discriminazione Mu/wt, mentre nella seconda i Wt/etero, negli individui facenti parte della popolazione BC5S1.

Dai dati raccolti dalla genotipizzazione della popolazione BC5S1 dei mutanti *hda108*, dalla popolazione iniziale di 100 piante, si è osservata la presenza di 20 individui wt, 45 eterozigoti e 21 piante omozigote per la mutazione. Con una germinabilità dell' 86% dei semi totali, il numero di piante per ogni genotipo ha confermato la segregazione attesa di 1:2:1 (omozigoti:eterozigoti:wt).

Successivamente, come per i mutanti *chr120*, si è proceduto con l'analisi d'espressione. È stato estratto l'RNA dalle foglie delle piante mutanti e piante wt di controllo e retrotrascritto in cDNA, utilizzato per realizzare la RT – PCR.

Come controllo dell'amplificazione è stato utilizzato il gene GAPC, codificante per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, un enzima del ciclo di Krebs che viene normalmente espresso in tutti i tessuti in attiva crescita.

L' immagine del gel sottostante mostra chiaramente come il gene di controllo sia espresso in tutte le piante analizzate, indipendentemente dal genotipo, mentre tutte le piante mutanti presentano il completo silenziamento del gene *hda108*.

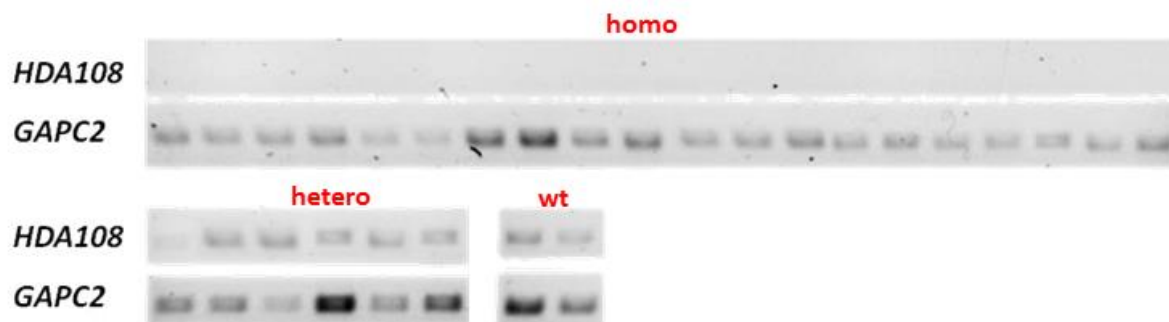


Fig. 6.10: Analisi di espressione del gene *HDA108* in foglie di piante BC5S1.

Come si può notare dalla Fig.6.11, il fenotipo delle piante mutanti omozigoti BC5S1 è molto più simile alle piante wt rispetto al fenotipo che si osservava nei mutanti omozigoti nella popolazione BC3S1. Le piante BC5S1, infatti presentano la lamina fogliare ben sviluppata, producono polline e si distinguono dalle piante wt solamente per l'altezza del fusto, che è di poco inferiore. In serra le piante *hda108* della popolazione BC3S1 morivano allo stadio di sesta – settima foglia, le infiorescenze maschili non completavano lo sviluppo, non producendo così il polline.

La severità del fenotipo tra le piante mutanti è diversa o perché il fenotipo è influenzato dal livello di introgressione della mutazione in un genotipo non uniforme, o è dovuto alla diversa influenza dell' ambiente e delle condizioni di crescita sul genotipo stesso, cosa molto comune in mutanti per epiregolatori.

Di seguito sono riportate due figure che illustrano le due popolazioni di *hda108* a confronto, nello stadio di quarta – quinta foglia.

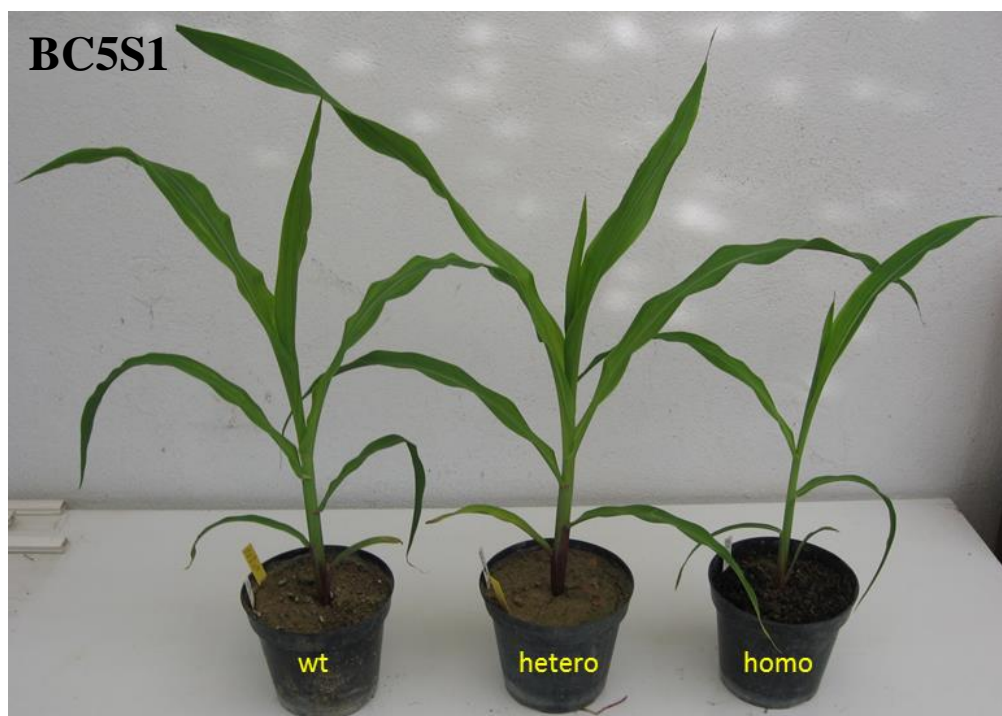
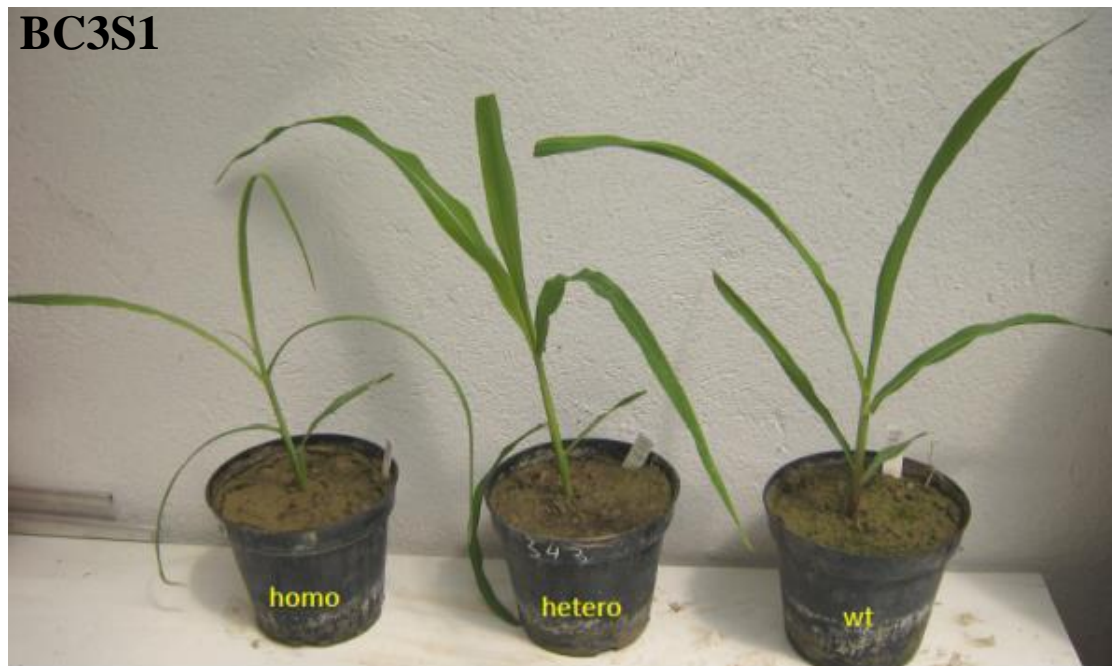


Fig. 6.11: *Il fenotipo dei mutanti omozigoti del BC3S1 (figura in alto) sono molto deboli, presentano infatti bassa vigoria, lamina fogliare stretta e una mancata formazione dell' infiorescenza maschile. Nelle piante BC5S1 (figura in basso), invece, il fenotipo delle piante omozigoti è molto più simile a quello delle piante wt.*

Un caratteristica che si è sempre manifestata in tutte le popolazioni di mutanti *hda108* è stata la bassa germinabilità dei semi.

La rappresentazione grafica dell'espressione del gene nei diversi tessuti e alle diverse fasi di crescita ci fa capire che questo gene è presente maggiormente nel SAM e nell'endosperma ai primi stadi, ma viene considerato comunque un gene costitutivo (www.MaizeGDB.org).

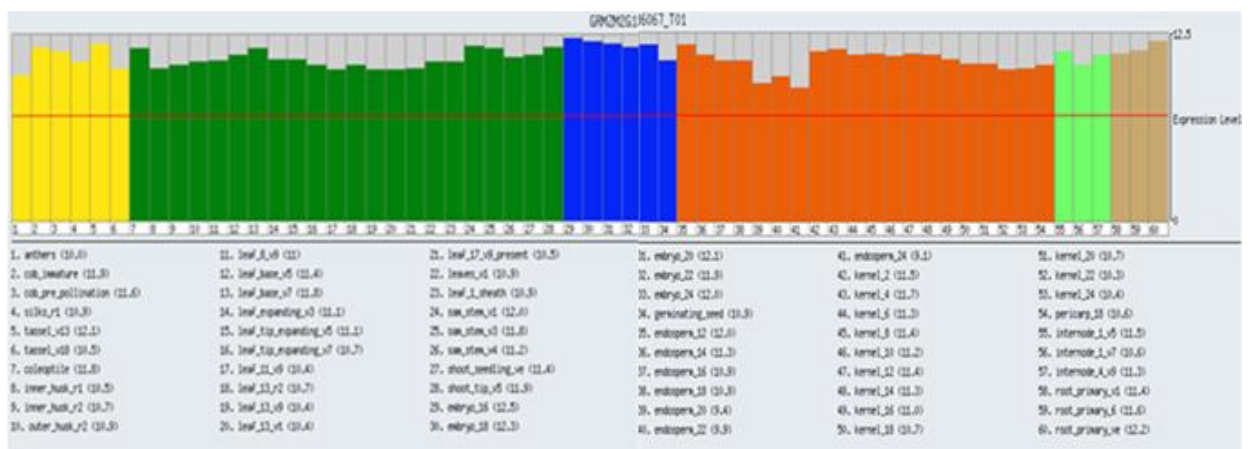
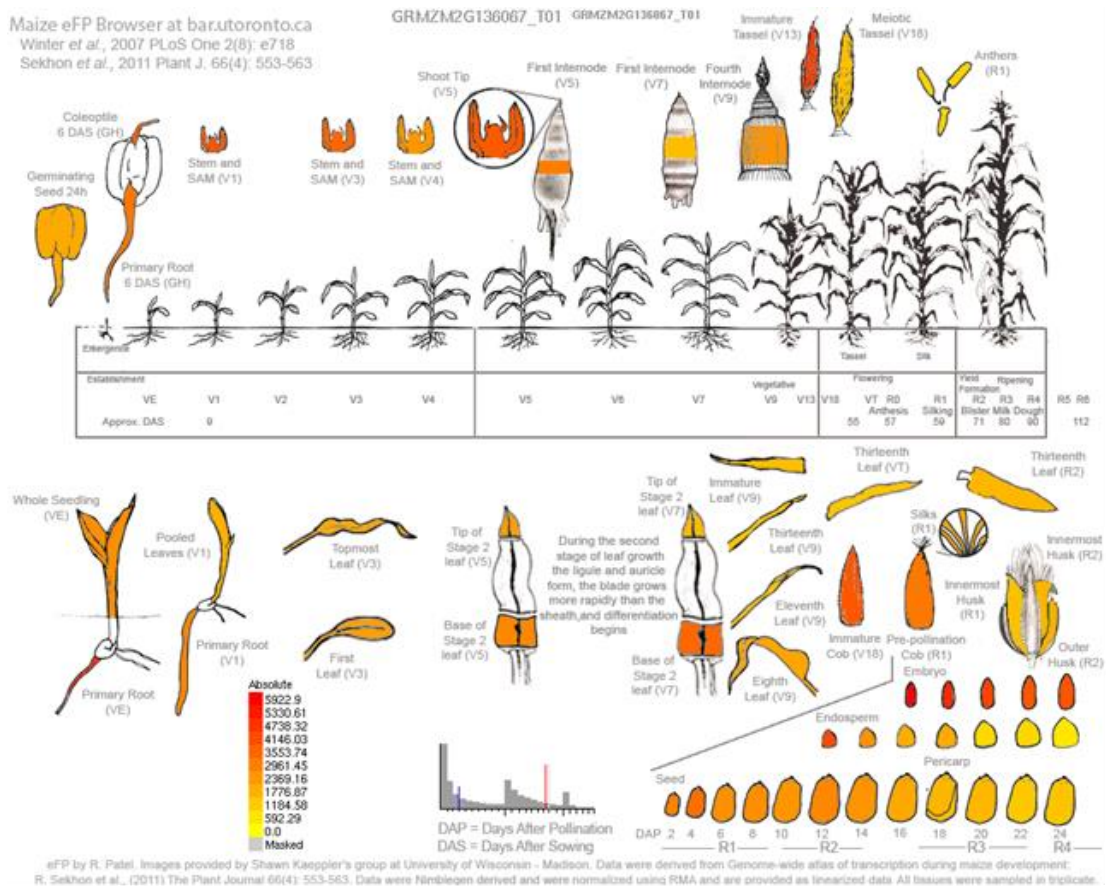


Fig. 6.12: Rappresentazione grafica dell'espressione del gene *hda108* e relativo istogramma.

Ciò che si osserva è che questo gene viene espresso in tutti i tessuti.

Dall' istogramma della Fig. 6.12 è evidente che il gene *hda108* è considerato costitutivo in quanto è presente ad alti livelli in tutti i tessuti della linea di mais B73, tuttavia mostra dei picchi di espressione nelle infiorescenze e negli embrioni, confermando quindi le ipotesi fatte precedentemente sul ruolo di questa deacetilasi istonica nella regolazione dell' embriogenesi e potrebbe spiegare la scarsa germinabilità dei semi di questo mutante.

Le piante del BC5S1, a gennaio 2013 sono state autofecondate una seconda volta, al fine di portare la mutazione in uno stato di completa omozigosi.

In questo step i mutanti omozigoti hanno subito due tipi di incroci: una parte è stata autofecondata e i semi, facenti parte della popolazione BC5S2, sono stati seminati in campo recentemente. Il 20% di queste piante sono nate albine, mentre altre sono morte nei stadi successivi.

L'altra parte di omozigoti è stata incrociata con il polline dei mutanti eterozigoti, ottenendo la seconda parcella di piante BC5S2, che sono state anch'esse seminate in campo nella primavera 2013. Anche in questo caso nei mutanti è stata riscontrata una bassa germinabilità, superiore comunque a quelli derivati da autofecondazione, arrivando al 50% di piante nate.

6.3 RISULTATI DEI MUTANTI *fpa*

FPA è un componente della via autonoma che promuove la fioritura in *A. thaliana* reprimendo la trascrizione di FLC. Questo gene codifica per una proteina RNA-binding che contiene tre motivi di riconoscimento dell' RNA nella regione N-terminale.

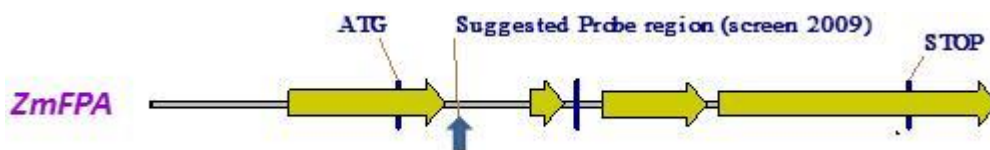


Fig. 6.13: Inserzione del trasposone Mu all' interno del gene *fpa* di mais (*Zea mays*).

Il trasposone Mu, si è inserito nel primo introne del gene. Questo dato farebbe pensare che il gene target venga trascritto normalmente, in quanto il trasposone Mu viene tolto durante la maturazione del trascritto primario ad opera dello splicing. Ciò che si è visto invece, è che viene trascritto solo in piccola quantità il trascritto canonico, ma il resto dei trascritti subiscono uno splicing alternativo, dando vita a putative forme aberranti di questa proteina.

Una volta estratto il DNA genomico dalle foglie del mutante *fpa*, si inizialmente proceduto con la genotipizzazione, per vedere se i mutanti fossero omozigoti o eterozigoti, oppure se fossero wt.

<i>COMB. PRIMER</i>	<i>PRIMER Fw</i>	<i>PRIMER Rev</i>	<i>Altezza banda attesa</i>	<i>Combinazione</i>
FPA-R03	GEN03_R03	TIR	500ca	Mu/Wt
FPA-F03	GEN03_R03	GEN03_F03	688	Wt/etero

Fig. 6.14: Tabella che mostra le coppie di primer utilizzate per effettuare le PCR nei mutanti *fpa*.

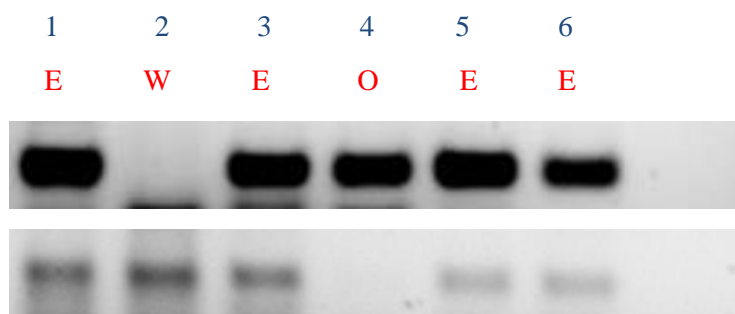


Fig. 6.15: Elettroforesi del prodotto di amplificazione ottenuto con la PCR dove sono stati utilizzati i primer specifici per la sequenza TIR del trasposone e primer disegnati sulla sequenza dell' introne.

Per completare l' analisi di questo mutante si è provveduto ad estrarre l'mRNA dai tessuti fogliari, retrotrascriverlo in cDNA e effettuare una RT-PCR per osservare l'analisi di espressione. Come per gli altri due mutanti descritti in questa tesi, è stato utilizzato il gene GAPC.

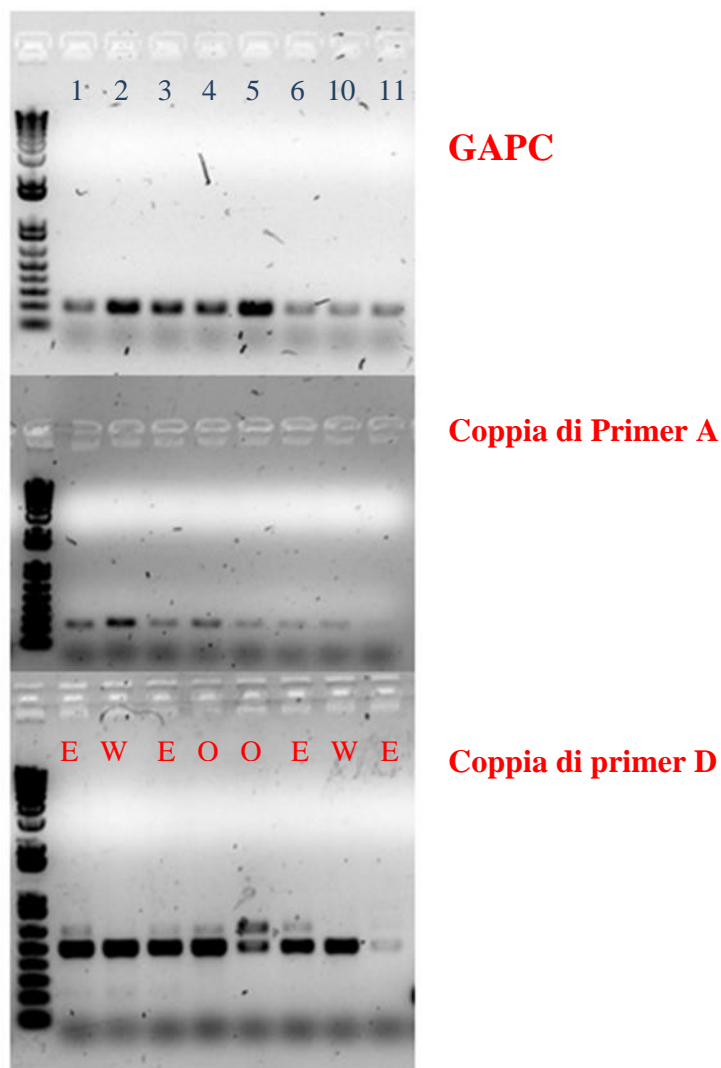


Fig. 6.16: *Analisi di espressione del gene fpa in foglie di piante di mais.*

I risultati ottenuti dalla RT-PCR effettuata con una prima coppia di primer disegnati sulla sequenza del primo esone (coppia di primers A), mostrano una banda più o meno evidente in tutti i campioni, senza differenze significative tra mutanti omozigoti e wt. Considerando che l'inserzione del trasposone si trova a livello del primo introne è stata ripetuta l'analisi di espressione utilizzando una seconda combinazione dei primer (coppia di primers D), disegnati questa volta sul primo e secondo esone, a cavallo quindi dell'inserzione. In questo caso si è visto che tutti gli individui omozigoti ed eterozigoti, oltre ad avere la banda della dimensione attesa, mostrano una seconda banda, di circa 150 pb più lunga.

Il sequenziamento di questo prodotto aspecifico, amplificabile solo da piante portanti il trasposone, ha dimostrato che si tratta di una forma di splicing alternativo aberrante in cui viene trattenuto un breve tratto di una delle due sequenze TIR del trasposone.

7. PROSPETTIVE FUTURE

Dallo studio dei mutanti *chr120*, si è visto che l'inserzione del trasposone Mu porta al completo silenziamento del gene, anche se le piante omozigoti non presentano un fenotipo evidente. Visto il ruolo dell'ortologo *MOM1* in *Arabidopsis* nel controllo del silenziamento di sequenze ripetute sarebbe interessante verificarne l'espressione nei mutanti di mais.

Questo può essere fatto "per tentativi" tramite Real Time PCR su poche sequenze candidate (RNA ribosomali, qualche elemento trasponibile) oppure sequenziando totalmente il trascrittoma con tecniche di next-generation sequencing (NGS). Questa ultima operazione è bene però eseguirla sulla popolazione BC5S2, in quanto si deve aspettare la sicura introgressione della mutazione.

Per quanto riguarda i mutanti *hda108*, si è osservato che i fenotipi della popolazione BC3S1 e della popolazione BC5S2 sono molto più evidenti e drammatici rispetto a quelli osservati nella popolazione BC5S1. Nelle popolazioni BC3S1 e BC5S1 si sono infatti osservati bassa germinabilità, drammatica riduzione della lamina fogliare, debole vigoria, albinismo e mancata formazione di infiorescenze.

Dall'analisi complessiva dei dati raccolti finora è emerso che i semi di queste due popolazioni derivano da piante che sono state cresciute e fecondate in serra durante la stagione invernale, mentre la popolazione BC5S1 deriva da piante cresciute in campo durante la scorsa estate. Non è quindi da escludere, visto il ruolo di questa proteina nel mantenere silenziate le regioni ripetute, nella risposta a stress abiotici e vista la sua espressione durante la formazione dell'embrione e del seme, che i fenotipi osservabili nelle piante BC3S1 e BC5S2 siano il risultato dello stress derivato dalla crescita in serra delle piante madri e da una embriogenesi non corretta.

Sarà quindi interessante seguire questa ipotesi per confermare se le differenze fenotipiche all'interno della stessa popolazione di mutanti è dovuta a fattori ambientali o ad altri meccanismi. Sempre in questi mutanti si stanno eseguendo prove di immunolocalizzazione sui nuclei, utilizzando anticorpi contro diverse modifiche istoniche (in particolare acetilazione degli istoni H3 e H4) allo scopo di vedere se e come cambia la distribuzione delle modifiche dei vari amminoacidi dell'istone H3 e H4, per poi indagare come queste modifiche possano avere un effetto sulle caratteristiche della cromatina.

Infine, i mutanti *fpa*, che allo stato attuale si trovano al BC3, subiranno altri cicli di introgressione con lo scopo di vedere se il problema dello splicing alternativo che avviene nell'introne dove si inserisce il trasposone Mu, persiste anche nelle generazioni successive. L'obbiettivo è di arrivare ad avere le piante del BC4 e fare un' autofecondazione per poter studiare il meccanismo di regolazione dello splicing, ed eventualmente ricercare, tra gli individui che mostrano il maggior silenziamento del gene, dei target putativi.

8. BIBLIOGRAFIA

- **Lewin B.**, Krebs JE, Goldstrin ES, Kilpatrick ST (201) “Il gene X”, Zanichelli Editore
- **McClintock B.** (1950) The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. Proc Natl Acad Sci U S A.
- **Pasqua G.**, Abbate G., Forni C. (2011) “Biologia cellulare e biotecnologie vegetali”, Piccin editore
- **Yokthongwattana C.**, Bucher E, Caikovski M, Vaillant I, Nicolet J, Mittelstein Scheis O, Paszkowski J (2009) “MOM1 and Pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing”. The EMBO Journal 1-12
- **Cagla S.**, Isabel B., Andreas M., Rene Dreosa, Sascha Laubingerb, Detlef Weigelb, Caroline Deana (2011) “RNA 3' processing functions of *Arabidopsis* FCA and FPA limit intergenic transcription”.
- **Liu X.**, Chun-Wei Yu, Jun Duan, Ming Luo, Koching Wang, Gang Tian, Yuhai Cui, and Keqiang Wu (2012) “HDA6 Directly Interacts with DNA Methyltransferase MET1 and Maintains Transposable Element Silencing in Arabidopsis”.
- **Vaillant I.**, Shubert I, Tourment S, Mathieu O (2006) “MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in *Arabidopsis*”. EMBO Reports VOL7 No12: 1273-1278
- **Quesada V.**, Caroline Dean and Gordodn G. Simpson (2005) “Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering”.
- **Stacey A.**, Simon and Blake C Meyers (2011) “Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants”.
- **Chen X.**, (2009) “Small RNAs and Their Roles in Plant Development”.

- <http://www.maizedb.org>
- <http://en.wikipedia.org>
- <http://www.sciencedirect.com>
- <http://www.biomedcentral.com>