



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente
DAFNAE

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

CARATTERIZZAZIONE DI MUTANTI INSERZIONALI PER EPIREGOLATORI IN MAIS

Relatore: Prof.ssa Serena Varotto

Correlatore: Dott. Cristian Forestan

Laureando: Castaldello Matteo

Matricola n. 614658-BDA

ANNO ACCADEMICO 2011- 2012

SOMMARIO

1.	<u>RIASSUNTO</u>	5
2.	<u>ABSTRACT</u>	6
3.	<u>INTRODUZIONE</u>	7
3.1.	<u>MECCANISMI E PATHWAY EPIGENETICI</u>	7
3.1.1.	<u>METILAZIONE DELLE CITOSINE</u>	8
3.1.2.	<u>NUCLEOSOMI E LORO COMPOSIZIONE</u>	12
3.1.3.	<u>MODIFICHE ISTONICHE</u>	15
3.2.	<u>PATHWAY AUTONOMO</u>	18
3.3.	<u>PATHWAY DEGLI SMALLRNA</u>	19
3.4.	<u>TRASPOSONI E LORO ATTIVITA'</u>	22
3.5.	<u>MUTAGENESI INSERZIONALE</u>	26
3.6.	<u>GENI TARGET DELLE MUTAZIONI IN <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	27
3.6.1.	<u>MUTANTE <i>chr120 (AtMOM1)</i></u>	27
3.6.2.	<u>MUTANTE <i>hda108 (AtHDA6)</i></u>	29
4.	<u>SCOPO DELLA TESI</u>	33
5.	<u>TECNICHE UTILIZZATE</u>	35
5.1.	<u>ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI DNA GENOMICO</u>	35
5.2.	<u>ESTRAZIONE RNA</u>	37
5.3.	<u>CORSA ELETTROFORETICA</u>	38
5.4.	<u>QUANTIFICAZIONE AL NANODROP</u>	39
5.5.	<u>PCR (Polimerase Chain Reaction, "reazione a catena della polimerasi")</u>	40
5.6.	<u>RT-PCR o Reverse Transcription PCR</u>	43
5.7.	<u>ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA DAL GEL</u>	44
5.8.	<u>ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE ATTRAVERSO RT-PCR</u>	44
6.	<u>RISULTATI</u>	45
6.1.	<u>RISULTATI SUI MUTANTI <i>hda108</i></u>	48

<u>6.2.</u>	<u>RISULTATI SUI MUTANTI chr120</u>	57
<u>7.</u>	<u>PROSPETTIVE FUTURE</u>	61
<u>7.1.</u>	<u>CONSULTAZIONE COMPARATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE IN ATLANTE</u>	61
<u>7.2.</u>	<u>IL FUTURO DEI MUTANTI <i>hda108</i></u>	66
<u>7.3.</u>	<u>IL FUTURO DEI MUTANTI <i>chr120</i></u>	66
<u>8.</u>	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	67

1. RIASSUNTO

Il mais (*Zea mays*) è certamente una tra le specie vegetali coltivate più diffuse ed importanti al mondo. Dopo gli enormi progressi ottenuti con la “Rivoluzione Verde” nella produzione di varietà coltivate altamente produttive, la biologia molecolare la genetica la trascrittomica e la proteomica sono diventate il motore del “breeding molecolare” anche grazie alla realizzazione di popolazioni di mutanti di *Zea mays* efficaci e realizzate in tempi brevi. Un nuovo settore di studio del miglioramento genetico è l’epigenetica e lo studio degli epialleli, la cui ereditarietà risulta di tipo non mendeliano.

Questa tesi è uno studio su linee mutanti per inserzione del trasposone *Mutator* in mais, inserzione a carico di due geni importanti per la regolazione epigenetica, una deacetilasi istonica *ZmHDA108* e uno responsabile del silenziamento di sequenze genomiche, il gene *ZmCHR120*. Il loro studio e la comprensione della loro funzione sono avvenuti mediante esperimenti condotti sui geni orologi in *Arabidopsis thaliana*, considerata specie modello per gli studi di genetica. 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 è particolarmente attivo e presentano quindi un genoma ibrido. Da qui la necessità di introgredire nella linea B73 (linea sequenziata totalmente e utilizzata per uniformare il background) la mutazione e di eseguire almeno due cicli di autofecondazione per portare la mutazione allo stato omozigote. In due popolazioni, una al quarto ciclo di introgressione, chiamata BC4, ed una che ha subito un’autofecondazione dopo il terzo ciclo BC3S1 è stato eseguito un genotyping, e sulla BCS1 è iniziata la caratterizzazione dei mutanti, caratterizzazione che verrà confermata nella popolazione BC5S2.

Questo approccio di Reverse Genetics è basato sull’uso della PCR (*Polimerase Chain Reaction*, reazione a catena della polimerasi), che sfruttando specifici primers disegnati sulle sequenze fiancheggianti il trasposone, utilizzati in combinazione con altri della sequenza del gene in questione, rende facile l’individuazione dei genotipi mutanti nella popolazione in tempi abbastanza veloci. Essa è stata utilizzata per analizzare sia le BC4 che le BC3S1, sia per eseguire l’analisi di espressione. I risultati della caratterizzazione hanno mostrato che gli individui omozigoti per la mutazione risultano avere il gene target del trasposone effettivamente silenziato. Mentre la caratterizzazione fenotipica dei mutanti *chr120* non ha mostrato risultati interessanti, la popolazione *hda108* ha mostrato un fenotipo particolare, con difetti nello sviluppo dell’apparato aereo, difetti che probabilmente si manifestano già a livello di embrione. L’analisi del fenotipo fa supporre che il gene *ZmHDA108* sia implicato nell’embriogenesi, probabilmente nella regolazione dell’attività del meristema vegetativo apicale (SAM), ipotesi che verrà confermata nei prossimi studi.

2. ABSTRACT

Among cultivated plant species, maize (*Zea mays*) is certainly one of the most important in the world as source of food, feed and many unique industrial and commercial products.

After the era of the "Green Revolution" molecular biology with genetics, transcriptomics and proteomics science have become the engine of the current research towards the creation in a short time of mutant or improved populations of *Zea mays*. The emerging of epigenetics as a method of control and manipulation of genes, along with the study of epiallels, appears to be one of the most important and interesting new study strategies.

This thesis reports the study of two maize mutant lines obtained by the insertion of the Mutator transposon in two genes involved in epigenetic regulation, *HDA108*, a histone deacetylase and *CHR120*, a gene responsible for the maintenance of genomic sequences normally silenced. Their study and understanding of their function is passed through previous experiments on orthologous genes in *Arabidopsis thaliana*, a model species.

The insertional mutants obtained in maize are the result of crossbreeding of plants with wild type pollen arising from a line in which the transposon is particularly active and have thus of a hybrid genome. At this point the logic diagram studied by the research group was to do several crosses of the mutant plant with the inbred line B73 (line fully sequenced and used to standardize the genome background) followed by selfing to carry the mutation in homozygous status. In general practice, the project has come to have two populations: one in the fourth round of introgression, called BC4, and one that has been selfed after the third cycle BC3S1, allowing us to preliminarily characterize the mutants to obtain some preliminary indications that will be confirmed and formalized with the population BC5S2.

The instrumental emblem of this approach of Reverse Genetics is the PCR (*polymerase chain reaction*), that exploiting specific primers designed on the sequences flanking the transposon, used in combination with other of the sequence of the gene in question, makes it easy and rapid the screening of the mutant population. PCR has been used both for the two population genotyping, both to perform the expression analysis homozygous BC3S1 plants. The results of the characterization showed that in homozygous plants for both insertions, the mutated gene were effectively silenced. While the phenotypic characterization of the *chr120* mutant plants did not show interesting results, the *hda108* population has shown a particular phenotype, with defects in the development of shoots and leaves, defects that may occur already at the level of embryo. This has suggested that this gene could play a role in some way during embryogenesis, probably in the regulation of meristem, a hypothesis that will be confirmed in future studies.

3. INTRODUZIONE

3.1. MECCANISMI E PATHWAY EPIGENETICI

Il primo modello di regolazione genica procariotica fu proposto da Laureates Francois Jacob e Jacques Monod e valsero loro il premio Nobel per la medicina nel 1965. Essi dimostrarono che i geni sono controllati a livello trascrizionale dai prodotti di altri geni codificanti dei regolatori che agiscono legando specifici siti nel DNA vicino alla regione che controllano; diversi anni dopo si è scoperto che queste proteine regolative riescono ad attivare o reprimere la trascrizione. Oggi sappiamo che assieme ad esse interviene anche un particolare tipo di RNA nel dirigere la modulazione dell'espressione (Lauria and Rossi, 2011).

Questa concezione è applicabile anche a livello eucariotico, ma bisogna considerare in questo caso che il DNA è impacchettato attorno ad un complesso proteico istonico, a generare l'unità nucleosomale e, più ampiamente considerata, la cromatina. Anche se i principi di base della regolazione genica sono universali, l'impacchettamento della cromatina determina un incremento evolutivo nella regolazione, essenziale per gli organismi eucarioti per esprimere geni in situazioni di alta complessità biologica. (Lewin et al, 2010).

Una serie di studi condotti su queste strutture, come la scoperta che i nucleosomi inibiscono la trascrizione in vitro, che la delezione di istoni porta ad un globale aumento della trascrizione genica in vivo, e che complessi di rimodellamento della cromatina e enzimi che modificano post-traduzionalmente gli istoni agiscono come co-attivatori o co-repressori della trascrizione del gene, hanno portato alla conclusione che la cromatina rappresenta una barriera fisica che impedisce la trascrizione, e fattori in grado di modificare la struttura della cromatina e la composizione riescono ad attivare o silenziare quel gene (Lauria and Rossi, 2011).

Questi meccanismi, definiti epigenetici, anche se diversi tra loro, hanno in comune il fatto di non andare a modificare la sequenza nucleotidica del DNA primario, agendo sia in trans (come i fattori di trascrizione che legano il DNA) che in cis (un esempio sono i trasposoni).

Lo studio di questi fenomeni ha portato ad identificare un cosiddetto *landscape* epigenetico nel genoma, permettendo quindi di confrontare epigenetica e trascrizione genica.

Inoltre mentre alcune di queste modifiche risultano essere il risultato di stimoli ambientali, coinvolte quindi solo nella programmazione genetica dell'individuo in esame, altre risultano essere stabilmente ereditate attraverso replicazione (epialleli) e per questo fonte di variabilità genetica.

È compito e missione dei programmi di miglioramento genetico in ambito vegetale agrario, estrapolare e modificare questi epialleli per generare variabilità genetica utile.

Le modifiche epigenetiche in un ambito generale possono essere così riassunte:

- metilazione delle citosine;
- variazione di istoni non canonici;
- modifiche ad istoni canonici.

Queste rappresentano gli strumenti che l'epigenetica utilizza per costruire i numerosi processi di regolazione, che passano attraverso tre distinti pathway: la metilazione del DNA, il pathway autonomo, inizialmente individuato come pathway di regolazione della fioritura e il pathway degli small-RNA (sRNA).

3.1.1. METILAZIONE DELLE CITOSINE

Questo processo prevede l'aggiunta di un gruppo metile alla base citosina mediante l'enzima metiltransferasi, con la formazione di una 5-METILCITOSINA. Nelle piante la citosina viene metilata nelle sequenze-contesto CG, CHG e CHH (dove H rappresenta una qualsiasi base azotata esclusa la citosina) ad opera di enzimi della famiglia delle metiltransferasi, che riescono a legare un gruppo metile alla base azotata mediante legame covalente.

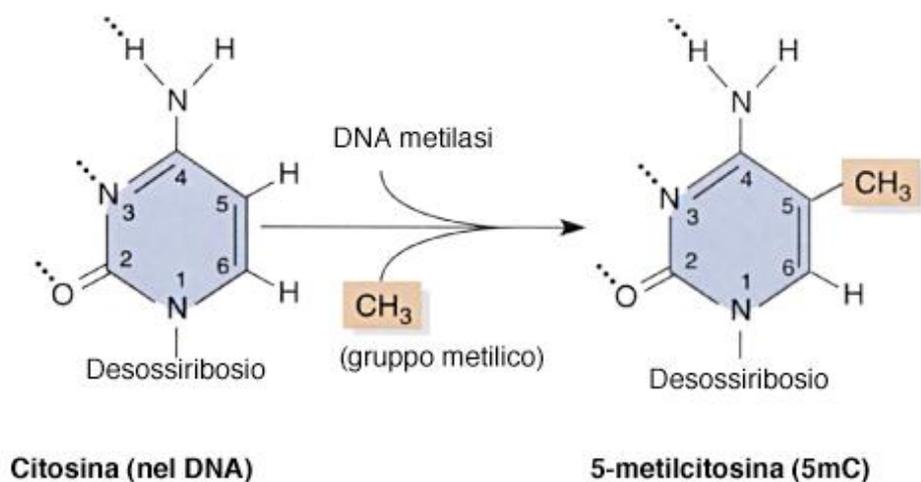


Fig3..1: Formazione della 5' metilcitosina per azione enzimatica della DNA metilasi.

Tra di esse si ricordano:

- MET1 (methyltransferasi I) che interviene a replicazione del DNA ultimata, quando nasce la necessità di ristabilire i pattern della elica stampo (mancanti sulla neosintetizzata grazie alla proprietà semiconservativa del DNA), si occupa di tenere una metilazione sui siti 5'-CG-3'. Questo enzima interviene più precisamente nel mantenere silenziati gli elementi trasponibili dopo la replicazione del DNA;

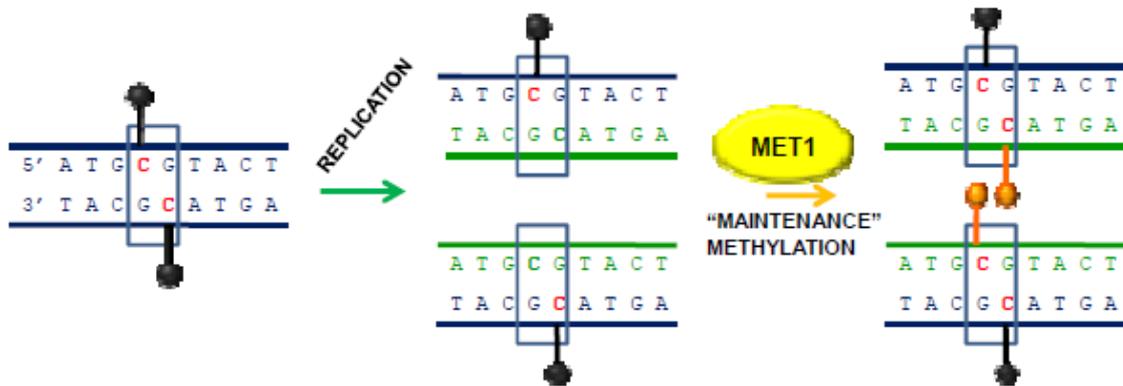


Fig 3.2: Il meccanismo d'azione dell'enzima MET1 permette di ricopiare i pattern di metilazione nel filamento di neosintesi.

- CMT3 (chromometilase3) agiscono su sequenze 5'-CHG-3' e riescono a metilare de novo il DNA in corrispondenza di particolari modifiche degli istoni;
- DRM1 (Domain Rearranged Methyltransferase 1) intervengono in sequenze 5'-CHH-3' queste ultime, avendo sequenza asimmetrica, portano alla perdita dell'informazione genetica dopo la replicazione del DNA, in quanto il filamento complementare avrà una sequenza diversa da quella dello stampo, e quindi non riconosciuta dall'enzima.

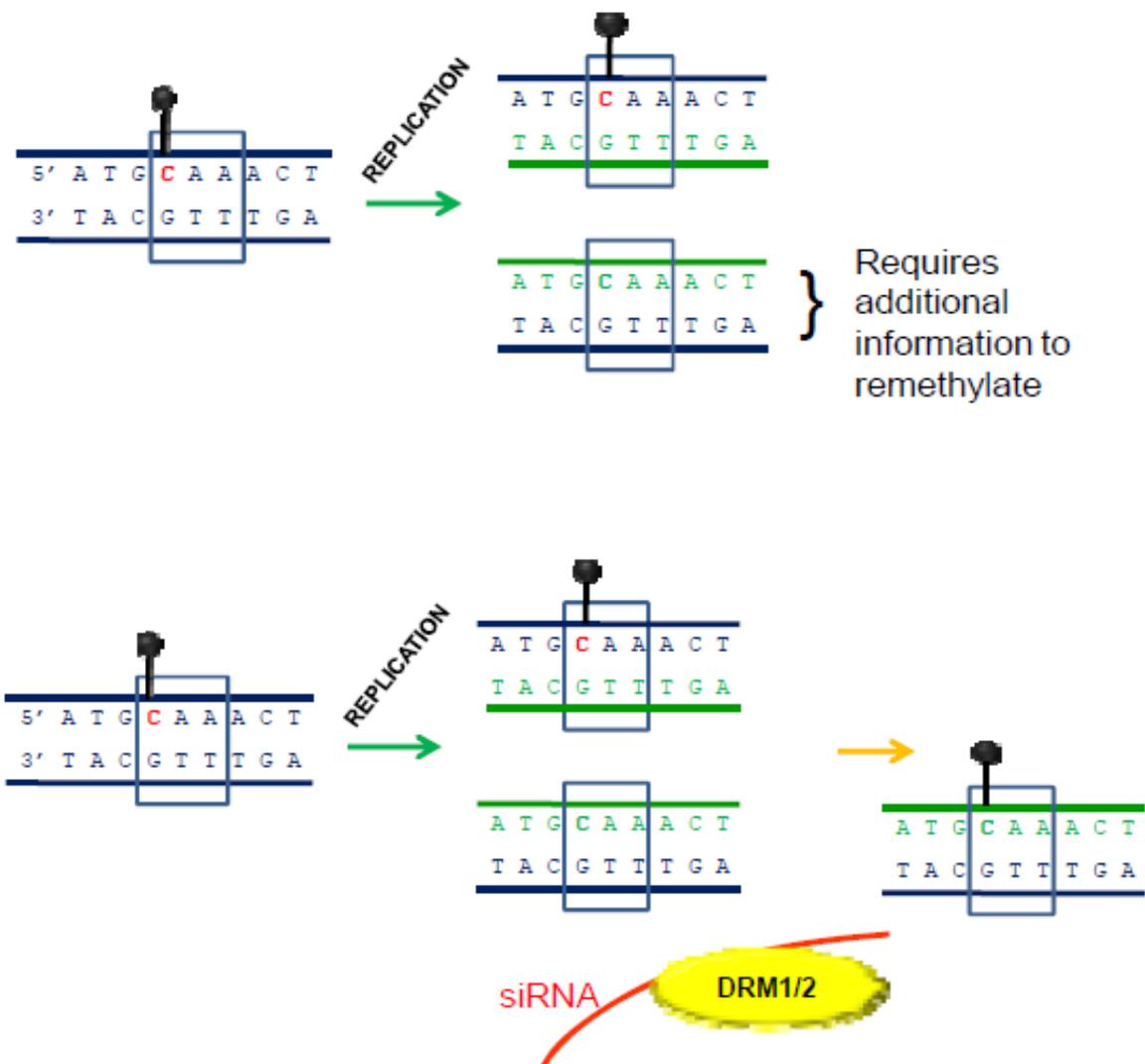


Fig 3.3: La metilazione asimmetrica comporta la necessità di assumere informazioni per ristabilire i pattern ad entrambe le emieliche; esse possono essere associate a modifiche istoniche o meccanismi legati a RNA, come mostrato nello schema inferiore, che riporta il meccanismo d'azione della classe DRM1/2, in questo caso mediato attraverso il pathway degli short interfering RNA (American Society of Plant Biologist, 2010).

Questo pathway è un classico esempio di un marchio epigenetico stabilmente ereditato, correlato con la repressione della trascrizione genica grazie alla sua capacità di assumere, attraverso l'interazione con proteine dotate di dominio che lega il metile (MBD), complessi di rimodellamento che stabiliscono una condensazione della struttura cromatica.

Più precisamente, mentre le metilazioni simmetriche (interessanti cioè entrambe le emieliche, CG e CHG) sono piuttosto comuni e stabilmente legate al silenziamento di regioni ripetute ed elementi trasponibili, quelle asimmetriche, ad opera di enzimi metilatori *de novo*, sono spesso associate ad una regolazione più plastica della trascrizione legata spesso ai promotori (Lauria and Rossi, 2011).

Lo studio della metilazione del DNA è possibile mediante diverse strategie operative, che prevedono la digestione con enzimi sensibili ai siti di metilazione o l'immunoprecipitazione con anticorpo specifico contro mC (MeDIP), seguiti da un'ibridazione con array. Una tecnica alternativa prevede l'estrazione e frammentazione del DNA con il successivo trattamento con il Bisolfito di Sodio, che riesce a convertire le citosine non metilate in uracile. Una volta sequenziati i frammenti, viene confrontato con il genoma di riferimento e questo permette di tracciare un metiloma, ovvero una mappa che indica le singole citosine metilate del genoma.

L'analisi del metiloma di piante modello, *Arabidopsis thaliana* in primis, ha permesso di estrapolare interessanti informazioni circa questo fenomeno.

In *Arabidopsis* si è visto che sono più frequenti in regioni ripetute e trasposoni, dove la percentuale di metilazione delle citosine arriva a superare il 90%, ma anche numerosi geni mostrano una certa metilazione. I geni sono invece maggiormente metilati in sequenze CG, principalmente a livello della regione trascritta codificante, definita corpo del gene. Comparando poi le sequenze con il trascrittoma si è visto che geni poco espressi sono solitamente metilati nel corpo gene. (Zhang et al, 2006).

La metilazione può avvenire anche a livello del promotore; in questo caso è più frequente una situazione di specificità di espressione tissutale. Studi in *Arabidopsis* e in endosperma di riso 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).

Quindi la metilazione delle citosine a livello genico è uno strumento di controllo trascrizionale che agisce seguendo due vie, a seconda della regione interessata: avviene a livello dei promotori, che se metilati impediscono ai fattori di trascrizione di legarli; l'altro, più fine prevede il richiamo delle proteine MBD da parte dei siti metilati, che formano complessi proteici che richiamano HDAC, ovvero le deacetilasi istoniche: questo garantisce la deacetilazione degli istoni che compattano la cromatina inibendone la trascrizione.

La metilazione del DNA in siti non-CG è stata a lungo considerata come pianta-specifica. Tuttavia, l'analisi recente del metiloma umano ha rivelato che anche i mammiferi fanno un leggero uso di questo marchio epigenetico; questi risultati suggeriscono che la metilazione non-CG è parte di un meccanismo che mantiene lo stato di pluripotenza cellule staminali embrionali . Ciò contrasta con la situazione osservata nelle piante, dove la metilazione non-CG è prevalentemente limitato a TE, in tutti i tessuti e non solo nelle cellule staminali embrionali indifferenziate (Lauria and Rossi, 2011).

La definizione dei pattern di metilazione tra le generazioni (quindi in processi meiotici) è parzialmente definito: studi hanno visto che il polline ha un calo fino ad un quinto delle citosine metilate, quindi è logico pensare che il *resetting* avvenga a livello di questo stadio (Pasqua et al, 2011).

3.1.2. NUCLEOSOMI E LORO COMPOSIZIONE.

Negli organismi eucariotici il DNA è associato a dei complessi proteici che svolgono un ruolo strutturale nell'organizzazione del doppio filamento di DNA nei cromosomi; queste proteine sono chiamate istoni e sono altamente conservati in tutti gli organismi (Pasqua et al, 2008). Essi sono costituiti principalmente da amminoacidi con carica positiva (Lisina e Arginina), questo per favorire il legame con il materiale genetico, carico negativamente. L'insieme del DNA associato a queste proteine prende il nome di cromatina, la cui unità di base, che appare come una collana di perle, viene chiamata nucleosoma. Più dettagliatamente un nucleosoma consiste in circa 200 paia di basi di DNA associato ad un'ottamero istonico, ovvero due coppie ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3 ed H4; alla struttura così composta si aggiunge un ulteriore istone, l' H1, denominato linker.

Il trattamento con una nucleasi micrococcica ha dimostrato che il nucleosoma può dividersi in due regioni: una regione *linker*, formata da materiale genetico velocemente degradato dall'enzima, ed un core formato da 146 paia di basi di DNA resistente alla digestione; è proprio questa sequenza che è legata l'ottamero, protetta quindi dall'attacco enzimatico.

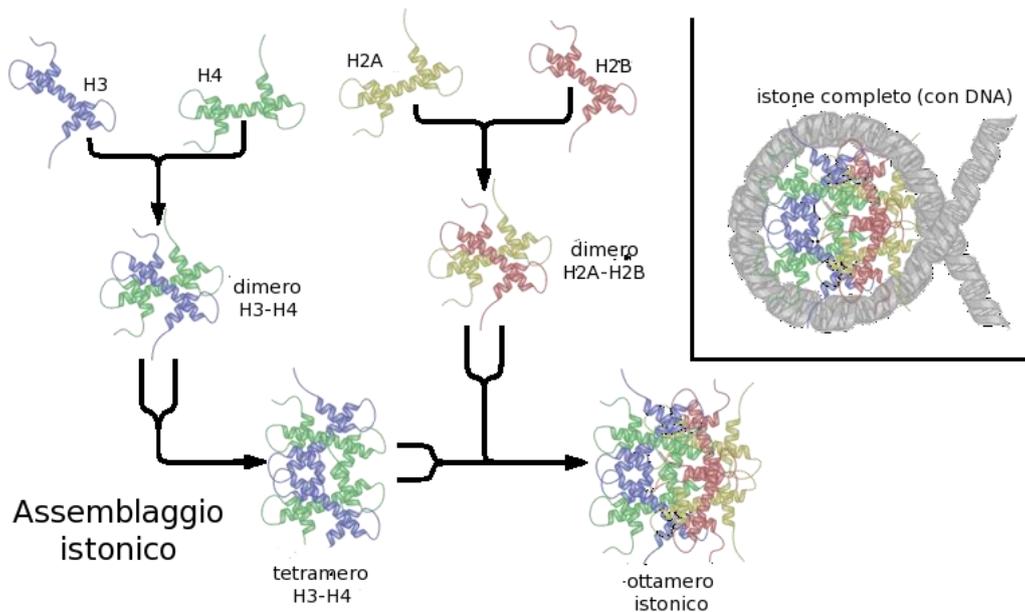


Fig 3.4: Rappresentazione dell'assemblaggio del complesso ottamero istonico- DNA. Inizialmente si legano le proteine H3 ed H4 in dimero, così come H2A e H2B; successivamente si uniscono altri dimeri formando due tetrameri, che solo alla fine daranno origine all'ottamero, che si legherà al DNA (Alberts et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 2001)

Il nucleosoma detta una prima conformazione organizzativa e riduce la lunghezza del DNA di circa sei volte, formando una cosiddetta "fibra da 10 nm". Questa disposizione si chiama anche "collana di perle" ed è un primo livello di condensazione, ma ancora insufficiente, visto che così condensato il DNA è più di 60.000 volte più lungo del diametro del nucleo.

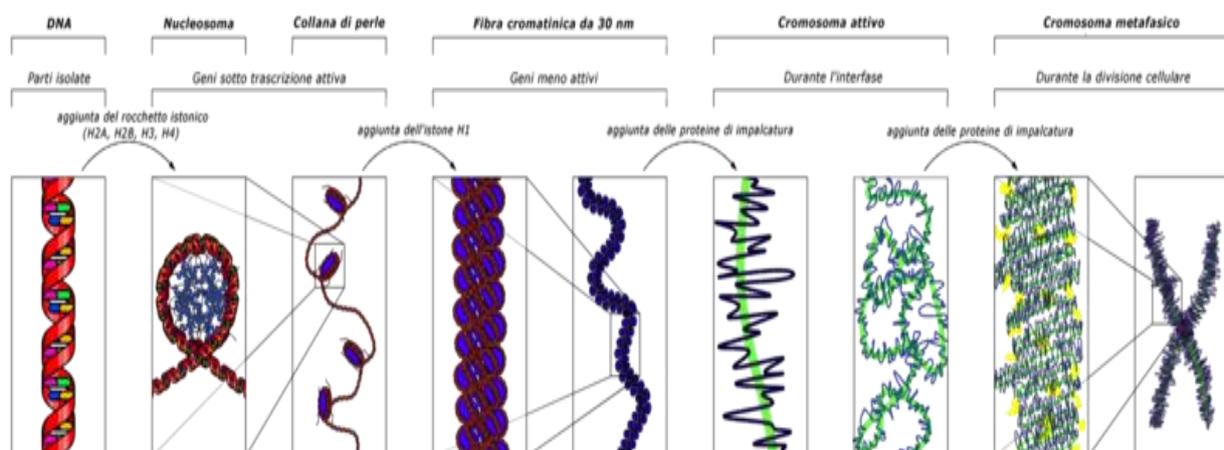


Fig 3.5: Schema che illustra i vari gradi di impacchettamento del genoma, dalla semplice doppia elica al cromosoma metafase. Non tutto e non sempre il DNA assume tutti i gradi di condensazione (Wikipedia.org).

Il secondo livello di compattazione prevede l'entrata in funzione di un quinto istone, l'H1, che accorpa i nucleosomi sovrapponendoli a due a due (fibra cromatinica) o raggruppandoli in gruppi di 8 ciascuno (solenioide). In questo modo lo spessore passa da 11 nm a 30 nm circa. Questa fibra si può contorcere su sé formando anse e costranse, accorciandosi 10 volte; questo livello di condensazione è chiamato eucromatina ed è il grado di condensazione che la cellula mantiene nel suo DNA in trascrizione attiva oppure per i geni che sono normalmente espressi durante le varie fasi dello sviluppo. Durante il differenziamento parte di eucromatina viene ulteriormente condensata, per impedirne la trascrizione; avviene così il quarto livello di condensazione, scoperto in prossimità delle estremità telomeriche e nei pressi del centromero la cromatina, dove è sempre molto condensata a prescindere dal tipo cellulare e non contiene geni o ne contiene pochissimi. Questa si forma annodando la eucromatina su se stessa molte volte ed è detta eterocromatina. Tuttavia, eucromatina ed eterocromatina nel nucleo possono ulteriormente presentarsi in livelli di condensazione variabili.

Infine un quinto livello di compattazione, tipico della metafase della mitosi prevede delle strutture ad "X" con due bracci più lunghi degli altri due; il DNA è condensato quasi 50 volte tanto lo sia la eucromatina, cioè circa 10.000 volte tanto il DNA lineare doppia elica, tanto da essere visibile. Esso prende il nome di cromosoma metafasico, quello che si osserva allacciato al fuso mitotico (per il centromero) durante la metafase della mitosi.

Il posizionamento dei nucleosomi è controllato da *Complessi di rimodellamento della cromatina ATP dipendenti*; essi agiscono in momenti diversi e secondo esigenze variabili, essendo i protagonisti della dinamicità eterocromatina/ eucromatina. Alcuni di loro riescono a far scivolare il DNA, rendendo accessibile sequenze che prima non lo erano (Lewin et al, 2010).

Inoltre 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).

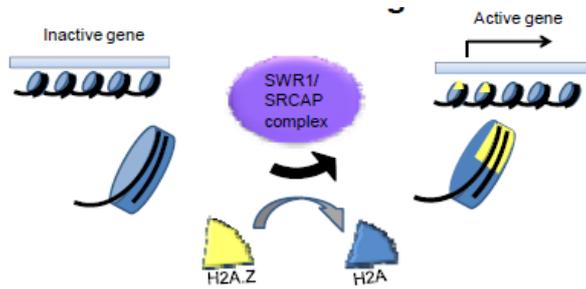


Fig 3.6: La variante istonica H2A.Z promuove la trascrizione di segmenti di DNA normalmente non accessibili (American Society of plant Biologist, 2010).

3.1.3. MODIFICHE ISTONICHE

Una delle regolazioni epigenetiche più studiate sono le modifiche alle code istoniche; le più comuni sono l'acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, ecc...

Con l'eccezione della metilazione, queste modifiche mirano a modificare la carica elettrostatica per cambiarne il legame sia con il DNA che con altri istoni. Inoltre agiscono da richiamo per complessi proteici di rimodellamento della cromatina, che regolano l'accessibilità del DNA alla RNA Polimerasi II (PolII) e fattori trascrizionali vari.

Uno degli esempi più importanti è l'acetilazione degli istoni: le code possiedono dei residui di lisina, che a cui possono essere attaccati gruppi acetili che fanno perdere la carica positiva, allentando le code al DNA, decondensandolo e promuovendolo ad uno stato trascrizionalmente attivo.

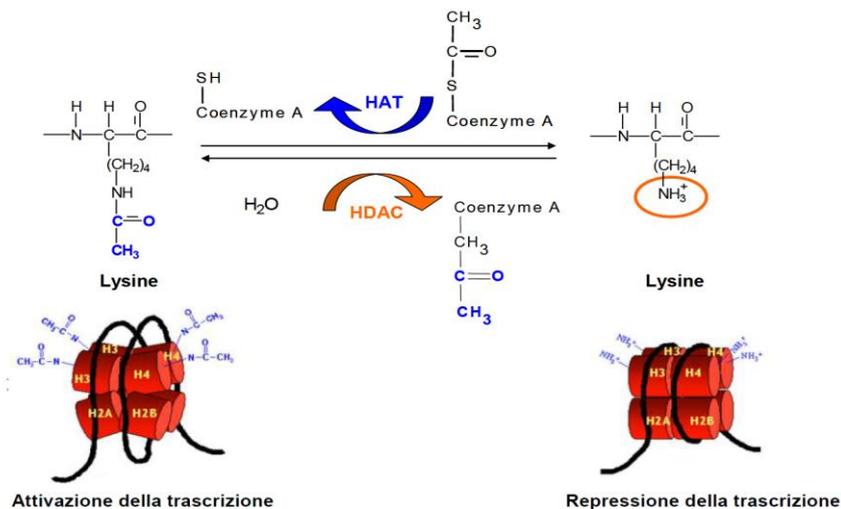


Fig 3.7: Processo di acetilazione/ deacetilazione istonica ad opera di complessi enzimatici ATP- dipendenti; l'effetto sulla struttura cromatinica è rappresentato graficamente.

Turner, negli anni '90, dettò in base ad osservazioni fatte alcune di quelle che diventeranno le regole del codice istonico; esso assunse che:

- una modificazione di un residuo istonico porta ad altre modifiche correlate;
- la sommatoria delle modifiche viene letta da complessi proteici regolatori della struttura della cromatina, influenzandone quindi la trascrizione.

In definitiva quindi gli enzimi modificatori degli istoni “scrivono” il codice, espresso come combinazioni di modificazioni precise; queste modifiche vengono interpretate poi da “lettori” proteici alteratori della struttura della cromatina.

Le proteine che interagiscono con code modificate sono di diverse tipologie: possono essere ad esempio appartenenti alle Bromoproteine (riconoscono residui acK) e Cromoproteine (per residui metK).

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
Modificazioni Istoniche	Ubiquitinazione	Lisine	Modifica la distanza degli istoni dal DNA.	Attivazione (H2A) o repressione (H2B)
	Metilazione	Lisine, Arginine	Recluta altri regolatori della cromatina	Attivazione (H3K4) o repressione (H3K9)
	Acetilazione	Lisine	Neutralizzazione di carica e reclutamento di regolatori della cromatina	Attivazione
	Fosforilazione	Serine, treonine		
Romodellamento della cromatina	SWI/SNF	Nucleosoma	Modificazione dell'ottamero istonico	Attivazione o repressione
	SWR1	Istoni	Incorporazione della variante istonica H2A.Z	Attivazione
Metilazione del DNA	CG e non-CG	Promotori	Inibizione della trascrizione	Repressione
	CG	Geni (da 5' a 3')	Modifica la lunghezza del trascritto	Repressione

Current Opinion in Plant Biology 2007

Tabella 1: Principali modifiche legate alla cromatina con i relativi meccanismi. Come si può notare le modifiche istoniche possono avere un effetto di attivazione o repressione in base alla modificazione apportata, mentre la metilazione delle CG in determinate regioni del DNA, specialmente a livello dei promotori, porta ad una repressione della trascrizione (Current Opinion in Plant Biology, 2007).

3.2. PATHWAY AUTONOMO COME VIA PER LA REGOLAZIONE DI FLC IN *Arabidopsis thaliana*

Il pathway autonomo comprende un set genico impegnato nella regolazione della fioritura in *Arabidopsis thaliana*. In questo caso la promozione alla fioritura è causata da controlli epigenetici che riescono a silenziare il gene *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), definito come regolatore negativo dell'induzione a fiore (Pasqua et al, 2011).

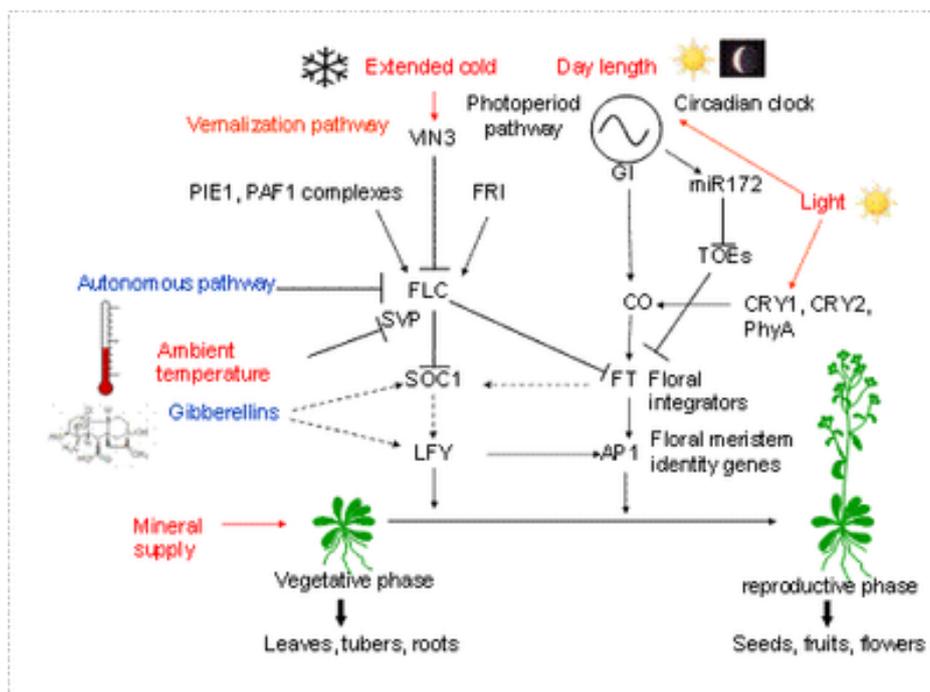


Fig 3.8: Schema che illustra l'intricata e complessa interazione tra numerosi pathway che regolano la fioritura in *Arabidopsis thaliana*.

La fioritura in questa pianta è assicurata da diversi pathway. Concorrono:

- ormoni, in particolare l'attivazione delle giberelline ad opera di FPI (Floral Pathways Integrator);
- vari pathway autonomi;
- fotoperiodo;
- vernalizzazione, ovvero l'esposizione obbligatoria della pianta a basse temperature per permettere la fioritura (Bob B. Buchanan, 2003).

Il significato biologico di queste vie è l'inibizione del repressore fiorale *FLC*; esso agisce in modi differenti a seconda degli ecotipi di *Arabidopsis* (Lauria and Rossi, 2011).

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). Inoltre la vernalizzazione porta ad una serie di modifiche istoniche che hanno la funzione di condensare la cromatina di *FLC*; 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.

La via della vernalizzazione è intrecciata con quella dei pathway autonomi, primi tra tutti FPA ed FCA; essi codificano per prodotti proteici che compongono complessi che rimuovono quelle modifiche istoniche che andavano ad attivare la trascrizione tenendo bassi i livelli del trascritto *FLC*.

Il marchio è quindi H3K27me3 e viene riconosciuto dalla "Like Heterocromatin Protein 1" (LHP1) che promuove la formazione di uno stato cromatico di *FLC* silente.

3.3. PATHWAY DEGLI SMALLRNA

È stato dimostrato che la vernalizzazione induce l'accumulo di *FLC antisense* e che una lunga sequenza di RNA non codificante chiamata *COLD AIR* interviene nell'indirizzare il PHD-PCR2. Da queste osservazioni si evince che la produzione di trascritti antisense 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 RNAPolII (Lucia et al, 2010).

Tra le popolazioni di smallRNA, quelle più importanti nella regolazione genica sono i siRNA (Small Interfering RNA) e i miRNA (MicroRNA).

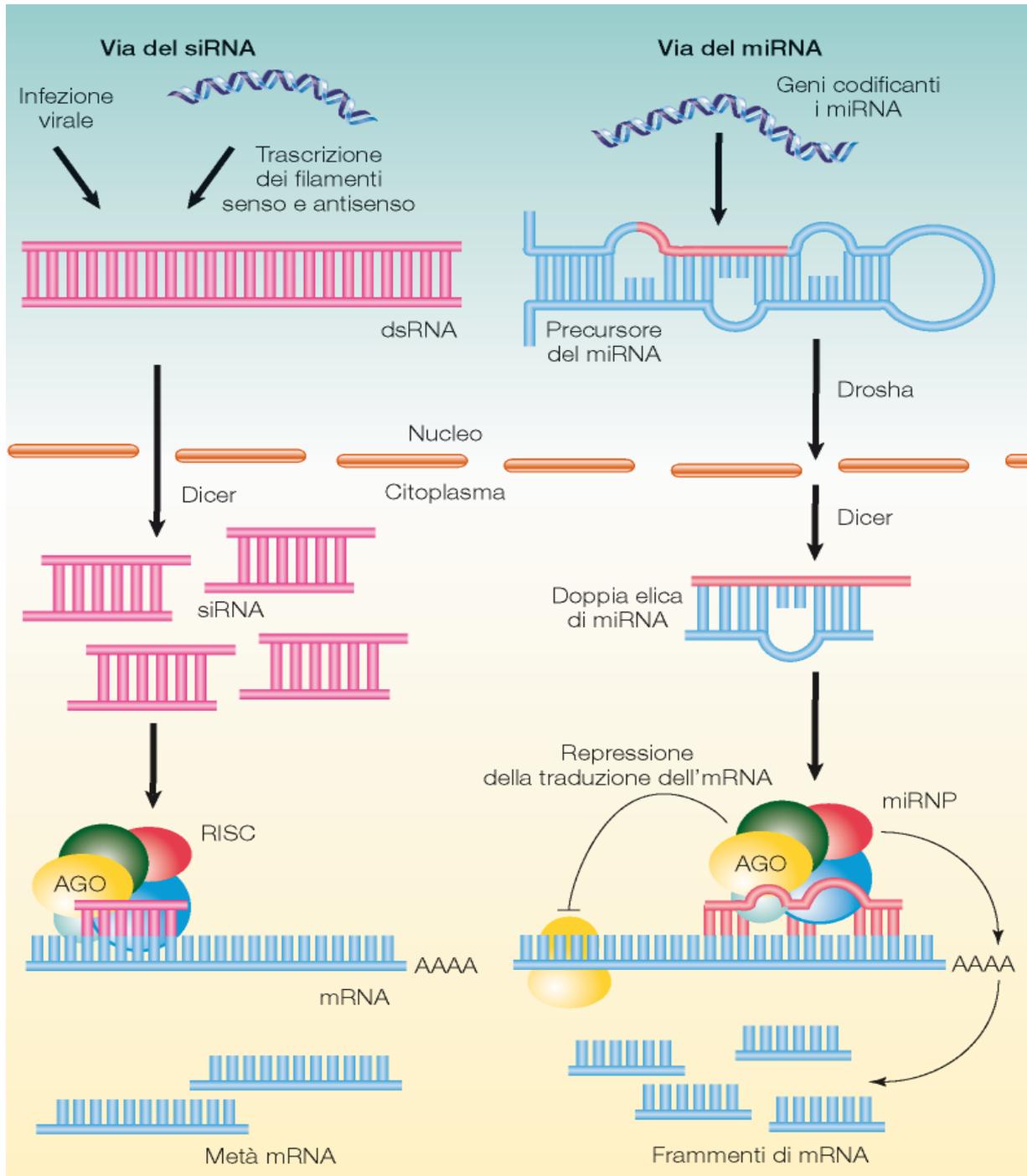


Fig 3.9 Differenze di origine e di azione tra i pathway degli small RNA micro e *short interfering* (Lewin et al, il Gene X, 2010).

Gli siRNA (*Short Interfering RNA*) sono una classe di trascritti dalla lunghezza variabile tra 15-25 nt ottenuti dal processamento di lunghi filamenti dsRNA che giocano un ruolo importante nel silenziamento genico post- trascrizionale (Lewin, et al). Essi possono essere di origine esogena, ad esempio virale, o derivare dalla trascrizione di sequenze ripetute o elementi trasponibili. Dopo essere stati ridotti in lunghezza dall'enzima DICER, il doppio filamento viene aperto dal complesso enzimatico RISC (*RNA Interfering Silencing Complex*) che ne elimina il filamento senso. Ora la sequenza ssRNA “cerca” una sequenza a lui complementare sull'mRNA, che mediante appaiamento perfetto lo destina alla degradazione.

I miRNA (*microRNA*) sono i prodotti finali di veri e propri trascritti maturi, lunghi anche migliaia di paia di basi, spesso di origine endogena e con una sequenza tale da permettere un ripiegamento a forcina, anche se imperfetta; questa struttura prende il nome di pri-miRNA. Essi sono ristretti da DROSHA (un'endonucleasi membro della superfamiglia delle endonucleasi III) in sequenze di 70pb dette pre-miRNA . Questa forma migra nel citoplasma dove trova l'enzima DICER che forma, come per il siRNA, il doppio filamento di circa 22pb, sporgente alle estremità di 2-3nt. Infine il complesso RISC forma i miRNA a singolo filamento (Lewin, et al, 2010).

La chiave in questi pathway sta nel tipo di appaiamento che formano: mentre i siRNA legano sequenze perfettamente complementari silenziando quel trascritto, i miRNA, mediante appaiamento imperfetto, reprimono la traduzione della determinata sequenza target.

Questo meccanismo è da attribuire alle capacità enzimatiche del complesso RISC; al suo interno si trovano infatti delle proteine AGO (Argonaute) con funzione diversa, in grado di svolgere una determinata operazione in base all'appaiamento che si presenta (Lewin, et al., 2010):

Appaiamento perfetto: reclutamento di enzimi con funzione di deadenilazione (al 3' del trascritto) e decapping (al 5') per rendere attaccabile la sequenza da esonucleasi ed endonucleasi; inoltre taglio endonucleasico con formazione quindi di siti esposti;

Appaiamento imperfetto: inibizione della traduzione grazie a proteine AGO , che agiscono mediante diverse strategie:

- Il dominio centrale di AGO ha elevata analogia con il fattore di inizio della traduzione EIF4E, e quindi lo sostituisce;
- AGO recluta un fattore che impedisce alle subunità del ribosoma di legarsi
- RISC recluta enzimi per la deadenilazione e per la successiva rimozione del *capping*;
- L'inibizione della traduzione può avvenire anche in corso d'opera, con il distacco prematuro dei ribosomi durante la fase di allungamento.

3.4. TRASPOSONI E LORO ATTIVITA'

Una delle maggiori cause di variazione di sequenza di un genoma è la presenza elementi trasponibili o trasposoni, delle sequenze genomiche ristrette in grado di spostarsi in altre direzioni all'interno del genoma (Lewin et al, 2010).

Mentre i trasposoni che utilizzano solo DNA sono comuni nei procarioti come negli eucarioti, la trasposizione coinvolgente un intermedio a RNA è limitata quasi esclusivamente agli organismi superiori, come piante ed animali.

Una classificazione comune basata sul tipo di elemento invece è :

- Trasposoni o TE (trasposable elements) che si muovono direttamente, descritti per la prima volta da Barbara McClintok tra gli anni '40 e '50. Essi contengono al loro interno sequenze che codificano per prodotti che servono alla trasposizione, e sono rilevabili grazie a ripetizioni invertite fiancheggianti l'elemento, lunghe circa 10 pb e riconosciute dall'enzima trasposasi, che si lega a queste ripetizioni integrando la sequenza nel sito bersaglio.

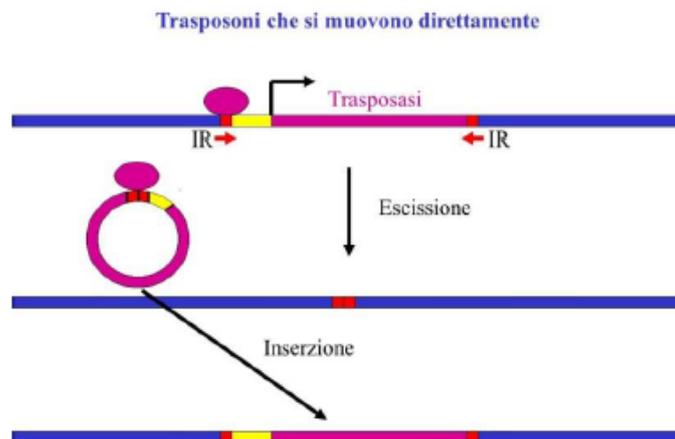


Fig 3.10: Meccanismo di movimento dei trasposoni; all'escissione segue poi l'inserzione, spesso casuale

- Trasposoni che si spostano nel genoma replicando la loro sequenza. Una proteina, la trasposasi, codificata dall'elemento 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.

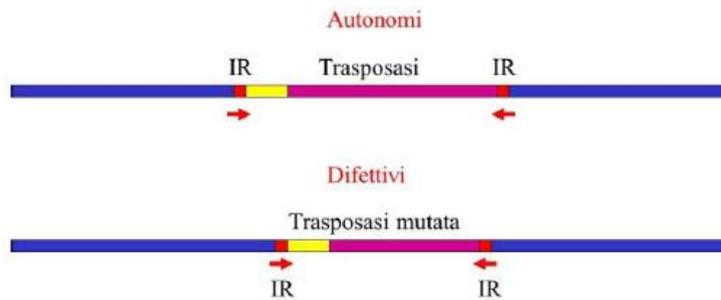


Fig 3.11: Movimento autonomo dei trasposoni mediante trasposasi, codificata dall'elemento stesso, che aiuta il movimento dell'elemento nel nuovo sito d'inserzione

- Retrotrasposoni, correlate ai provirus retrovirali sia nella loro organizzazione che nel comportamento. Una delle proteine che codifica è la trascrittasi inversa, che replica il DNA creandone una copia mediante un filamento stampo di RNA intermedio. Il DNA ricombina nel genoma, spesso casualmente; questa strategia viene utilizzata dai provirus, in grado di essere riconosciuti dalla polimerasi ospite e quindi riuscire ad essere tradotto in proteine virali. Oltre ai pro virus che, poi codificano per le proteine virali, esistono nei genomi eucariotici retrotrasposoni endogeni che codificano solo per gli enzimi necessari alla retrotrasposizione. Molti di questi sono difettivi (come riportato nell'immagine), ma molti altri si possono ancora muovere: essi sono denominati autonomi.

Trasposoni che si muovono indirettamente (retroposoni)

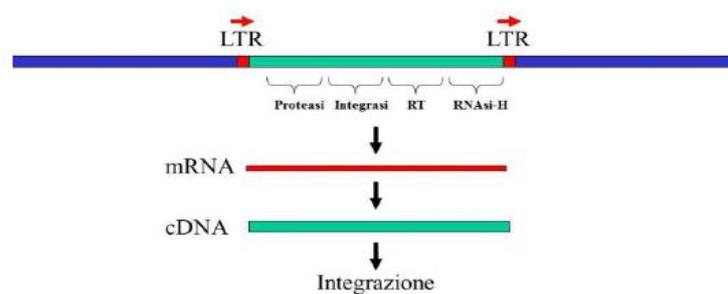


Fig 3.12: Movimento dei trasposoni mediante il meccanismo dell'integrazione mediante cDNA. Mediante la trascrittasi inversa viene sintetizzato un nuovo mRNA che, a sua volta, porta alla formazione di molecole di cDNA che vengono inserite nei nuovi siti cromosomici.

La pioniera nel campo degli elementi trasponibili è stata Barbara McClintock, che dimostrò la loro presenza. I suoi lavori nel nostro campo d'interesse partirono sull'osservazione di cariossidi di mais che, invece di presentare una colorazione uniforme erano caratterizzate da una variabilità cromatica. A quel tempo si sapeva che i geni del mais potevano presentare due forme diverse (alleli): uno, chiamato "C", responsabile della colorazione viola, e il suo mutante, chiamato "c", a cui si doveva la cariosside incolore.

McClintock scoprì che la colorazione a macchie era legata al fatto che, in alcuni casi, durante lo sviluppo delle cariossidi, l'allele mutato c (incolore) poteva trasformarsi (revertire) nel suo allele originario C (colore) originando la macchia. Scoprì inoltre, che questa mutazione era causata da un "elemento mobile" che, se presente nel gene C, ne causa la mutazione in c, rendendolo in pratica incapace di produrre il pigmento colorato, e che, durante lo sviluppo della cariosside, da questi poteva essere trasposto (exciso) revertendo c in C e rendendolo così nuovamente capace di produrre il pigmento. La McClintock chiamò questo elemento mobile dissociatore (Ds) o trasposone non autonomo. Inoltre dimostrò che, perché l'elemento Ds potesse trasporre ed excidersi dal gene, era necessaria la contemporanea presenza di un altro elemento mobile, che fu chiamato Ac (attivatore) definito oggi trasposone autonomo. (B. McClintock, The origin and behavior of mutable loci in maize, 1950).

Per quanto riguarda l'epigenetica, bisogna ricordare che spesso sono una minaccia per la stabilità dei genomi. I TE si possono inserire, interrompendo i geni o indurre importanti riarrangiamenti cromosomici come traslocazioni, inversioni e numerosi altri fenomeni mutazionali. (Lauria, Rossi, 2011).

Per queste ragioni è stato importante studiare la regolazione della repressione di queste informazioni mobili, nonché l'evoluzione da parte della pianta di difendersi per mantenere questi elementi in uno stato inattivo, mediante ipermetilazione del DNA a livello delle ripetizioni CG e deposizione di modifiche istoniche repressive.

Studi recenti hanno portato a realizzare mutanti del gene *DDM1* (DECREASED DNA METHYLATION1), un rimodellatore ATP-dipendente della cromatina che è necessario anche per la piena soppressione dell'attivazione dei trasposoni. Mutanti con perdita di funzione *ddm1* hanno riscontrato diversi fenotipi instabili ed anomali causati dall'azione mutagena dei trasposoni attivati, fenomeno ancora più marcato nel doppio mutante *ddm1-met1*.

Un'altra regolazione epigenetica importante per il mantenimento della metilazione del DNA e silenziamento di trasposoni è il pathway dei siRNA. Trascritti generati da RNA polimerasi IV della regione pericentromerica sono convertiti a RNA doppio filamento da una RNA polimerasi RNA-dipendente che viene successivamente scisso in siRNAs dall'azione di Dicer Like Protein. Quando sono legati alle proteine Argonaute, i siRNAs interagiscono con i trascritti prodotti dalla RNA polimerasi V per indirizzare le metilasi DRM alle regioni pericentromeriche, portando di fatto alla metilazione del DNA ed al silenziamento della trascrizione (Kakutani et al, 1996).



Fig 3.14: Dopo l'inattivazione del gene *DDM* le progenie diventano di generazione in generazione sempre più anormali per via dell'accumulo di mutazioni indotte dall'attività trasposizionale; questo ha portato a considerare il silenziamento epigenetico come una necessità per il mantenimento dell'integrità genomica (Kakutani et al, 1996, American Society of plant Biologist, 2010)

Gli elementi trasponibili tendono così ad accumularsi in eterocromatina (centromerica, telomerica,..) dove svolgono un ruolo chiave nella modellare l'architettura epigenetica di queste regioni tuttavia è possibile incontrarli in eucromatina, tra e all'interno dei geni (Lauria and Rossi, 2011).

3.5. MUTAGENESI INSERZIONALE

Dal 1950, anno in cui la McClintock pubblicò i suoi primi studi, sono stati scoperti numerosi altri trasposoni in mais; tra questi da ricordare è il trasposone Mu (*Mutator*). Questo trasposone, identificato nel 1978, codifica per una *trasposasi* che riconoscono l'elemento Mu a livello delle due estremità terminali ripetute ed invertite (TIR) di circa 220bp. Gli elementi trasponibili Mu, in particolare, si inseriscono prevalentemente a livello di sequenze codificanti, rappresentando un ottimo mezzo per la mutagenesi casuale.

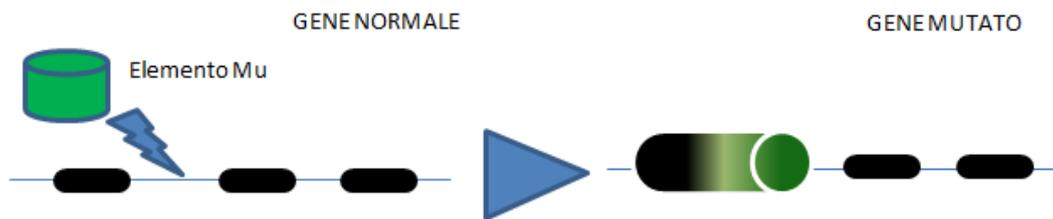


Fig3.15: Meccanismo d'azione dell'elemento mobile Mutator (Mu)

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).

A questo punto le popolazioni ottenute da questo incrocio devono essere sottoposte a screening alla ricerca di mutanti inserzionali che possano avere mutazioni interessanti dal punto di vista del fenotipo o a carico di geni di interesse.

Infatti, nella progenie mutante, con 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.

Diverse organizzazioni e aziende private hanno sviluppato negli anni vaste collezioni di mutanti Mu e queste sono uno strumento molto utile per studi sulla funzione dei geni e per progetti di genomica. In una di queste collezioni di mutanti è stato possibile isolare due mutanti di mais portanti l'inserzione del trasposone Mu a livello di due geni coinvolti nella regolazione epigenetica dello sviluppo.

3.6. GENI TARGET DELLE MUTAZIONI IN *Arabidopsis thaliana*

3.6.1. 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 della 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 uno indipendente; è in quest'ultima situazione che il gene *MOM1* partecipa (Vaillant et al, 2006).

Lo studio di mutanti *ddm1* (vedi capitolo 2.4) ha dimostrato una ridotta metilazione, nonché il rilascio di sequenze normalmente silenziate; per determinare se la perdita del silenziamento dei geni 5S è mediata da una perdita di metilazione del DNA o dai cambiamenti di accompagnamento nella struttura della cromatina è stato condotto uno studio sul silenziamento genico dei 5S in piante mutanti per le DNA metiltransferasi MET1 e CMT3.

Per rilevare il rilascio di silenziamento delle ripetizioni 5S, sono state progettate specifiche coppie di primers che coprono l'intera sequenza delle ripetizioni e in seguito è stata fatta una RT-PCR. Una coppia di inneschi in particolare ha rilevato bassi livelli di trascrizioni 5S di 140 e 210 nucleotidi ciascuno, in piante wild type di *Arabidopsis*, mentre si è visto un accumulo maggiore in piante mutanti *ddm1*; questi trascritti sono stati chiamati 5S-140 e 5S-210, e si pensa siano correlati al rilascio del silenziamento dei 5S minori (Vaillant et al, 2006).

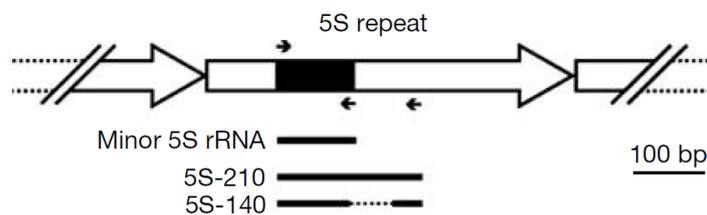


Fig 3.16: Schema delle ripetizioni 5S; esso mostra la posizione dei primers utilizzati. La regione nera indica l'rRNA. La linea tratteggiata indica invece una delezione di circa 70nt a livelli del eS-140 (Vaillant et al, EMBO Reports , 2006).

Pertanto, è stato usato l'accumulo di 5S-210 come marcatore di rilascio di silenziamento dei geni 5S. Successivamente con un'analisi di espressione dei geni 5S nel mutante *mom1* mediante RT-PCR semiquantitativa si è visto che effettivamente i mutanti esprimono più 5S-210 rispetto ai wild type, anche se la loro metilazione a livello sia del DNA sia degli istoni rimane inalterata.

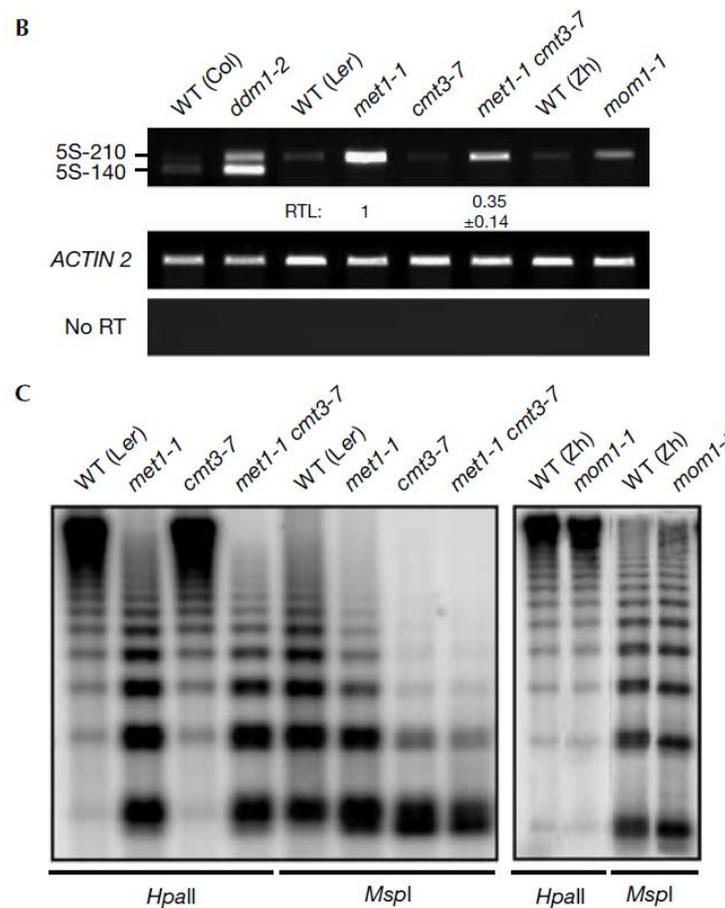


Fig 3.17: Metilazione a carico dei geni 5S; il DNA, estratto e purificato, è stato digerito con enzima di restrizione HpaI e MspI (rispettivamente sensibile e insensibile alla metilazione DNA) e marcato con sonda 5S. Confrontando i profili di digestione dei due enzimi in piante wt e *mom1* si nota che non ci sono variazioni nella metilazione ai loci 5S tra i due genotipi, ma la metilazione viene completamente persa nel mutante *met1* (Vaillant et al, EMBOreports , 2006).

La funzione del gene in questione agisce proprio a questo livello, rilasciando il silenziamento dei TSI (Transcriptional Silent Information, ovvero informazioni trascrizionalmente silenti) senza alterare lo stato di metilazione del DNA.

Inoltre si pensa che *MOM1* lavori grazie ad un'interazione genica con l' RNA Polimerasi V, responsabile della trascrizione delle regioni eterocromatiche (e quindi non codificanti per polipeptidi); è stato realizzato un mutante per un enhancer di *MOM1* che ha portato ad un nuovo allele che si è visto avere come direzione quella di regolare *MOM1* con RNAPolV.; grazie a questa interazione viene mantenuto il silenziamento dei geni target.(Yokthongwatanna et al, 2009).

3.6.2. MUTANTE *hda108* (*AtHDA6*)

Il gene in questione è una deacetilasi istonica, ovvero codifica per un enzima responsabile della rimozione dei gruppi acetile dalle code N- terminali delle proteine istoniche.

Questa modifica, assieme ad altre, come la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione giocano un ruolo chiave nel controllo dell'espressione genica. Attraverso il rimodellamento dinamico della cromatina è infatti possibile modulare l'espressione dei geni, contribuendo alla transizione eterocromatina- eucromatina e viceversa.

Table 1: RPD3/HDA1 superfamily histone deacetylases in yeast and metazoans used for phylogenetic analysis with *Arabidopsis thaliana*

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Candida albicans</i>
Class I	ScHDA201 (RPD3)	CeHDA301 (hda-1)	DmHDA401 (Rpd3)	HsHDA501 (hsHDAC1)	CaHDA3201
	ScHDA202 (HOS2)	CeHDA302	DmHDA402 (Hdac3)	HsHDA502 (hsHDAC2)	CaHDA3202 CaHDA3205
	ScHDA203 (HOS1)	CeHDA303 (ceHDA-3)		HsHDA503 (hsHDAC3)	CaHDA3206
				HsHDA508 (hsHDAC8)	
Class II	ScHDA204 (HDA1)	CeHDA304	DmHDA404 (HDAC6)	HsHDA504 (hsHDAC4)	CaHDA3203
	ScHDA205 (HOS3)	CeHDA305 (ceHDA-5)	DmHDA405 (HDAC4)	HsHDA505 (hsHDAC5)	CaHDA3204
		CeHDA306 (hda-7)		HsHDA506 (hsHDAC6)	
		CeHDA307		HsHDA507 (hsHDAC7)	
				HsHDA509 (hsHDAC9)	
				HsHDA510 (hsHDAC10)	
Class IV	---	CeHDA308	DmHDA403 (CG31119)	HsHDA511 (hsHDAC11)	---
TOTAL:	5	8	5	11	6

*Alias and other names referred to the following histone deacetylases are written in parenthesis under its formal name assigned by chromatin database (ChromDB).

Tabella2: riassunto delle classi di deacetilasi istoniche RPD3/HDA1 utilizzate per l'analisi filogenetica (Alisung MV, BMC Plant Biology 2009).

Ad oggi non esiste una base chiara per la classificazione delle istone deacetilasi della classe RPD3, per questo un gruppo di ricerca guidato da Alinsung et al. propone di ricostruire un albero filogenetico per determinare le relazioni evolutive tra RPD3/HDA1 istone deacetilasi da sei diverse piante che rappresentano dicotiledoni come *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* e *Pinus taeda*, monocotiledoni come *Oryza sativa* e *Zea mays*, e le piante inferiori con *Physcomitrella patens*. Dopo l'analisi filogenetica di 62 istone deacetilasi per determinare gli ortologi corrispondenti.

Studi di bioinformatica che sfruttano diversi programmi e database sono stati condotti per prevedere i propri siti di localizzazione corrispondenti, segnale di esportazione nucleare, segnale di localizzazione nucleare, così come pattern di espressione. Valutazione del pattern di espressione genica che utilizzano Genevestigator, sembra che RPD3/HDA1 istone deacetilasi sono espressi tutti in tutte le parti della pianta e stadi di sviluppo. I risultati hanno mostrato la presenza di tre gruppi, formati dalla separazione evolutiva, chiamati Classe I, Classe II e Classe IV. della pianta (Alinsung et al,2009).

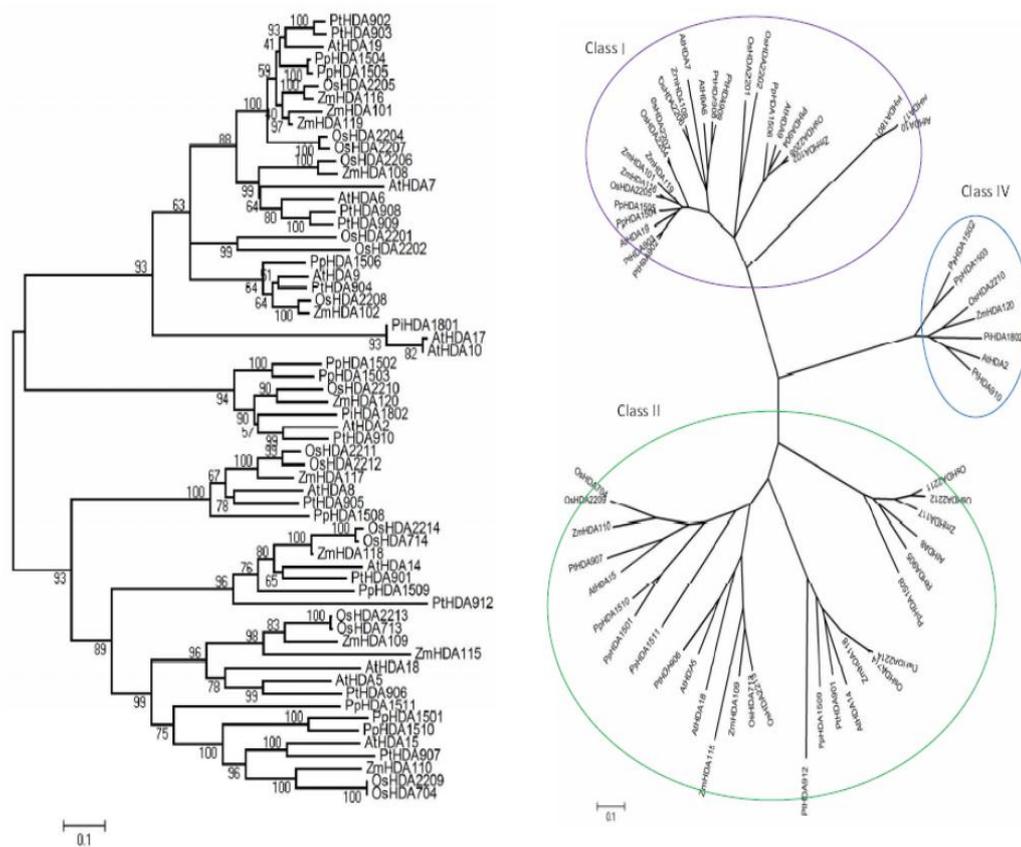


Fig 3.18: Rappresentazioni filogenetiche della famiglia delle deacetilasi RPD3/HDA1 in *Arabidopsis* (Alinsung MV, BMC Plant Biology 2009).

La funzione regolatoria di *HDA108* è importante per diverse vie: essa è stata studiata finora solo in *Arabidopsis*, il cui gene ortologo in questione è *HDA6*, mediante lo studio di piante mutanti *loss-of-function*, in cui manca l'espressione del gene e che quindi mostrano iperacetilazione a livello dell'istone H3 da parte di Wu ed il suo gruppo di ricerca, nel 2008.

Osservazione in mutanti <i>hda6</i>	RUOLO HDA6 ASSOCIATO
Down regolazione dei geni coinvolti nella risposta allo Jasmonato	Risposta a JA
Maggior longevità fogliare rispetto i wild-type	Senescenza
Down regolazione dei geni della senescenza	Senescenza
Ritardo nella fioritura per via dell' up regolazione di FLC.	Fioritura

Dagli stessi ricercatori citati precedentemente è stato proposto un metodo per trovare la localizzazione del gene; questo è stato reso possibile mediante fusione del gene *HDA6* con il reporter GUS, in modo da localizzarlo in seguito a trasformazione.

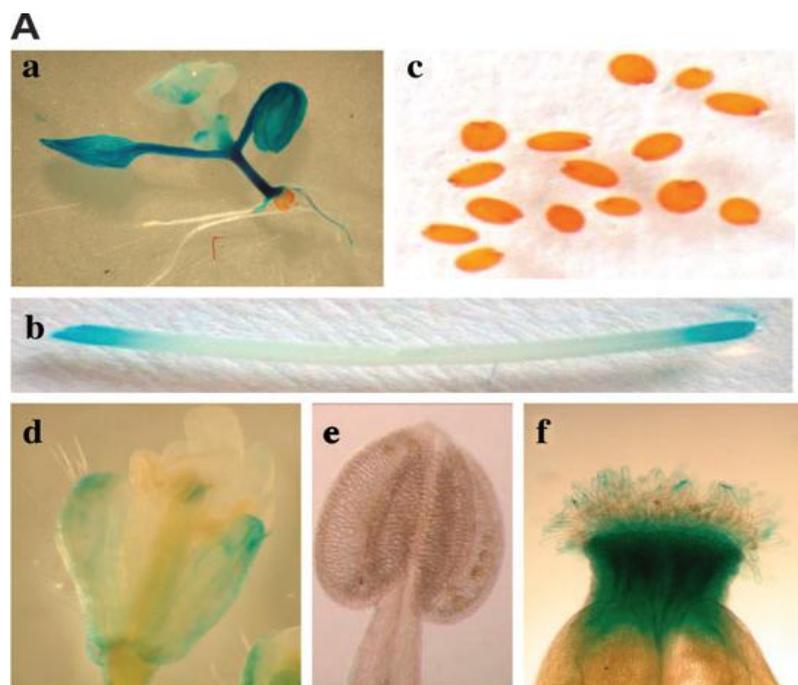


Fig 3.19: Colorazione di GUS in piante trasformate *HDA6:GUS* di (a) plantule, (b) stelo, (c) semi, (d) fiori, (e)stame, (f) stigma (Wu et al, JEBAA, 2008).

Mentre nelle giovani plantule *HDA6* è presente prevalentemente a livello di cotiledoni ed ipocotili, negli individui adulti si concentra nelle foglie mature e nel fusto, oltre che nei fiori. Nei semi invece non è espresso.

4. SCOPO DELLA TESI

Questa tesi è parte del lavoro di ricerca nell'ambito del progetto AENEAS, finanziato dall'Unione Europea, dove il nostro gruppo di ricerca è interessato ad analizzare i meccanismi che portano alla formazione di epialleli ereditabili dalle progenie 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.

Più precisamente questa tesi propone uno studio su mutanti inserzionali per il trasposone Mu (Mutator) a carico di geni che regolano e controllano queste modificazioni epigenetiche (epiregolatori), il gene *CHR120*, ortologo di *MOM1* Arabidopsis e coinvolto nel mantenimento del silenziamento delle sequenze metilate, e *HDA108*, una deacetilasi istonica.

Queste linee mutanti inserzionali sono state ottenute attraverso l'incrocio di una linea di mais wild-type con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu è particolarmente attivo.

Ogni individuo della progenie di questo incrocio 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. In questo modo si possono ottenere mutazioni inserzionali a carico di geni di interesse.

La generazione F1 ottenuta è stata quindi autoimpollinata a generare una linea F2, dalla quale si è partiti con una serie di reincroci con la linea B73 (il genoma di questa linea è stato totalmente sequenziato). Ad ogni ciclo verranno portate avanti solo le piante che presentano la mutazione. Dopo 5 reincroci con la B73 si ottiene una linea BC5, che per 2 cicli sarà autofecondata al fine di portare la mutazione in omozigosi.

Nella pratica il gruppo ha seguito l'impostazione logica precedentemente descritta fino ad arrivare, attorno a maggio 2011, ad avere la generazione BC3 in campo.

A questo punto sia i mutanti per il gene *HDA108* che quelli per il *CHR120*, sono stati separati in due gruppi che sono stati soggetti rispettivamente a:

1. Autofecondazione, producendo semi BC3S1, quindi una popolazione segregante 1:2:1 wt:eterozigote:omozigote e proprio le piante omozigoti sono il materiale per il primo lavoro di caratterizzazione dell'effetto del silenziamento di questi geni a livello sia fenotipico sia molecolare. I risultati preliminari ottenuti su queste piante verranno poi confermati su sulla popolazione BC5S2, ovvero su piante che completata l'introggressione con 5 cicli di incrocio con la linea B73 subiranno due successivi cicli di autofecondazione;

2. Reincrocio (back-crossing) fino ad arrivare alle piante BC5 ad aprile 2012, piante che poi subiranno i due cicli di autofecondazione per arrivare alla popolazione BC5S2.

In entrambe le popolazioni coltivate, l'identificazione degli individui mutanti, omozigoti o eterozigoti (*genotyping*) è stato reso possibile mediante tecnica PCR, sfruttando diverse coppie di primers con amplificazioni diverse:

- nelle piante delle popolazioni BC3S1 sono state utilizzate due diverse coppie di primers per identificare le piante omozigoti per l'inserzione, piante su cui poi è stato verificato il silenziamento effettivo del gene tramite RT-PCR;
- nelle piante della generazione BC4, gli eterozigoti da destinare all'ultimo re incrocio sono invece stati identificati con un primer disegnato sul gene, in prossimità dell'inserzione, e uno sull'estremità del trasposone.

5. TECNICHE UTILIZZATE

5.1. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI DNA GENOMICO

Questa tecnica è risultata una delle prime ed indispensabili per ogni argomento trattato. A seconda delle necessità, per estrarre il DNA genomico è stato utilizzato un protocollo con un kit (DNeasy® - QIAGEN) e una soluzione di lisi (microLYSIS®-PLUS - Microzone Ltd); mentre il kit produce del DNA genomico pulito ed in grande quantità, la soluzione di lisi permette di ottenere in maniera molto veloce piccole quantità di DNA da utilizzare in veloci reazioni di PCR durante il genotyping. Inoltre durante un'esperienza di laboratorio si è estratto del genomico dalla linea B73 utilizzato un ulteriore kit, KIT NUCLEON PHYTOPURE della Amersham.

Protocollo per kit DNEASY: si preleva 0,1 g di campione di foglie giovani in attiva divisione, precedentemente raccolte e congelate a -80°C, seguendo il protocollo della ditta QiAgen qui seguito riportato:

- Pestellare e polverizzare il materiale vegetale con continue aggiunte di azoto liquido e trasferire il campione in una eppendorf;
 - Aggiungere 400 µl di Buffer AP1, 4 µl di RNasi in ogni eppendorf ed incubare 10 minuti a 65°C (in termoblocco), invertendo le eppendorf ogni 2-3 minuti durante l'incubazione: questo passaggio serve a lisare tessuti e cellule vegetali;
 - Aggiungere 130 µl di Buffer AP2, agitare e porre in ghiaccio per 5 minuti al fine di far precipitare proteine e polisaccaridi;
 - Centrifugare per 5 minuti a 14000rpm per rimuovere i frammenti più grossolani quali componenti di parete e membrane cellulari;
 - Trasferire il lisato nella colonnina QIAshredder del kit e centrifugare per 2 minuti a 14000rpm al fine di rimuovere i detriti cellulari più piccoli;
 - Trasferire la frazione liquida, senza disturbare il pellet, in una nuova eppendorf;
 - Aggiungere in questa eppendorf per ogni volume di frazione liquida 1,5 volumi di Buffer AP3/E addizionato di etanolo al fine di precipitare il DNA;
 - Pipettare 650 µl del mix ottenuto in una colonnina DNeasy del kit ;
 - Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto e eliminare il centrifugato;
- Ripetere il passo precedente con la soluzione rimanente;
- Porre la mini colonnina, che ora contiene DNA, in una nuova provetta e aggiungere 500 µl di Buffer AW (addizionato di etanolo) per lavare il DNA;
 - Centrifugare per 1 minuto a 8000rpm ed eliminare il liquido;

- Aggiungere nuovamente 500 µl di Buffer AW nella colonnina del kit e centrifugare per 2 minuti a 20000rpm al fine di eliminare l'etanolo;
- Eliminare il liquido e ripetere la medesima centrifugata a vuoto per eliminare tutti gli eventuali residui di etanolo;
- Trasferire la colonnina in una eppendorf nuova e aggiungere 100 µl di Buffer AE;
- Incubare per 5 minuti a 15-25°C e centrifugare per 1 minuto a 8000rpm per eluire il DNA genomico;
- Ripetere il passaggio precedente trasferendo l'eluizione dalla eppendorf alla colonnina;
- Il DNA genomico è ora pronto per essere utilizzato, ma prima ne viene determinata la quantità e la qualità attraverso in una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Protocollo di estrazione con DNA MICROLYSIS: con questo sistema si ottiene una piccola quantità di DNA genomico non purificato partendo però da un piccolo frammento vegetale:

- _Raccogliere una sezione di 2x1 mm della foglia più giovane della pianta e trasferirla in microamp;
- _Aggiungere 20µl di soluzione di microlisi e cercare, per quanto possibile, di distruggere con l'aiuto di un puntale la sezione di foglia;
- _Porre i campioni in termociclatore dove rimarranno overnight a 65°C;
- _Il giorno seguente impostare il termociclatore per eseguire il seguente profilo termico:
 - _ 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

Ovviamente è necessario impostare il termociclatore diversamente da una normale PCR: innanzitutto non si devono far compiere dei cicli; inoltre devono essere modificati tempi e temperature (tempo infinito, cioè 99min 59sec)

Attraverso questo ciclo termico il DNA genomico viene rilasciato in soluzione ed è subito pronto per una PCR. Data la bassa resa di questa estrazione è inutile controllarlo attraverso elettroforesi.

Protocollo di estrazione con KIT NUCLEON PHYTOPURE

- Pestellare e polverizzare il materiale vegetale con continue aggiunte di azoto liquido;
- Trasferire il campione in una falcon contenente 4,6ml di Reagent1 e mescolare bene fino all'ottenimento di una soluzione omogenea;
- Aggiungere 10ul di RNAasiA (concentrata 10ng/μl) ed incubare 30min a 37°C;
- Aggiungere 1,5ml di Reagente 2 ed agitare nuovamente fino ad ottenere una sospensione omogenea e senza grumi;
- Incubare 20min a 65°C in agitazione;
- Trasferire in ghiaccio per 30min;
- Aggiungere alcune gocce di cloroformio (mantenuto a -20°C)
- Aggiungere 300μl di Nucleon PhytoPure DNA extraction resin suspension precedentemente vortexato;
- Agitare e invertire per 10-15min a temperatura ambiente;
- Centrifugare per 10min a massimo rpm a 15°C;

A questo punto si formeranno due fasi: una sottostante, organica, contenente il cloroformio e la resina, mentre quella superiore, liquida, conterrà gli acidi nucleici. A separarle ci sarà un anello di proteine e polisaccaridi;

- Delicatamente trasferire la fase acquosa in una nuova falcon e misurarne il volume;
- Aggiungere un uguale volume di isopropanolo freddo ed agitare, fino alla precipitazione del DNA che tenderà ad assumere l'aspetto di una medusa in soluzione;
- Recuperare la "medusa" e trasferirla in una eppendorf da 2ml con etanolo 70%
- Lavare overnight o overweek-end a 4°C;
- Ripescare la medusa e trasferirla in una nuova eppendorf con etanolo e lavata alcune ore a -20°C;
- Centrifugare a massima velocità per 10 minuti, eliminare il surnatante e risospendere il DNA in acqua sterile o DEPC (750ul);
- Controllare l'estrazione in un gel di agarosio.

5.2. ESTRAZIONE RNA

Per l'estrazione del RNA totale è stato utilizzato il kit "RNeasy Plant Mini Kit" (QiAgen), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Tutto il materiale necessario per l'estrazione (mortaio, pestello, spatoline, etc...) è stato precedentemente sterilizzato in stufa a secco a 180°C per almeno 6 ore. Anche in questo caso siamo partiti da diversi tessuti precedentemente raccolti e congelati a -80°C, seguendo il seguente protocollo:

- 1) 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.
- 2) Aggiungere al campione 450 μ l di Buffer RLT e 4,5 μ l di β -Mercaptoetanolio vorticando vigorosamente per rompere tutti gli aggregati vegetali.
- 3) Procedere trasferendo il lisato direttamente in una colonnina QIAshredder e centrifugando 2 minuti a massima velocità in una minicentrifuga.
- 4) Trasferire il lisato così purificato attraverso la colonnina in un nuovo tubino ed aggiungere 225 μ l di etanolo, mescolando delicatamente mediante inversione. In questo modo si ottiene la precipitazione del RNA che non verrà pellettato, ma fatto legare ad una membrana silicea.
- 5) Trasferire il campione in una colonnina RNeasy e centrifugato per 15 secondi a 12.000 rpm,
- 6) Aggiungere 700 μ l di Buffer RW1 alla colonnina e centrifugare nuovamente per 15 secondi a 12.000 rpm.
- 7) 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 μ l Buffer RPE e centrifugando sempre per 15 secondi a 12.000 rpm.
- 8) Eliminare tutti i residui di etanolo con un'ulteriore centrifuga a vuoto a 14.000 rpm per 1 minuto.
- 9) Eluire l'RNA dalla colonnina con 40 μ l 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 punto 6 del protocollo canonico:

- D1) aggiungere 350 μ l di Buffer RW1 alla colonnina Rnaeasy. Chiudere gentilmente e centrifugare per 15s con rpm >10.000. prelevare poi il supernatante;
- D2) Aggiungere al centro della colonnina 10 μ l di DNasi I Stock Solution e 70 μ l di Buffer RDD. e lasciare in incubazione per 15min a 20-25°C;
- D4) aggiungere 350 μ l Buffer RW1 alla colonnina; chiudere il tappo e centrifugare con rpm >10.000. Continuare con il primo lavaggio con Buffer RPE da protocollo.

5.3. CORSA ELETTROFORETICA

L'elettroforesi è una tecnica di biologia molecolare che sfrutta la polarità delle molecole in esame per poterle discriminare in base al peso, e quindi stimarne poi quantità e qualità.

Le molecole sono poste in una soluzione salina e sottoposte ad una corrente elettrica dal voltaggio variabile. In questa situazione le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo dotato di carica

opposta alla propria. Inoltre molecole di dimensioni maggiori tenderanno a migrare più lentamente rispetto a quelle più piccole.

Più precisamente gli acidi nucleici sono dotati di carica elettrica negativa; in seguito al passaggio di corrente, essi migreranno verso il catodo.

Utilizzando marker a peso molecolare e concentrazione nota (solitamente si è utilizzato 1 Kb Plus DNA Ladder -Invitrogen) è inoltre possibile stimare le dimensioni e le concentrazioni dei nostri campioni, derivanti da estrazioni di DNA, di RNA o da reazioni di PCR.

L'elettroforesi da me condotta viene fatta con gel di agarosio al 1% in tampone TAE 1X, praticamente 1g di agarosio in 100 ml di TAE 1X.

Ovviamente gli acidi nucleici devono essere visualizzabili dall'operatore; questo viene fatto mediante colorazione degli acidi nucleici con SybrSafe (Invitrogen). Il gel solido viene immerso nel tampone TAE 1X della vaschetta dove avviene la corsa. Quindi si possono caricare nel gel i campioni da controllare, preparati aggiungendo acqua demineralizzata e gel loading buffer (blu di bromofenolo). La corsa viene condotta con un voltaggio che dipende dalle dimensioni del gel, circa 100V ogni 10 cm di gel (a bassi voltaggi la corsa procederà più lentamente).

5.4. QUANTIFICAZIONE AL NANODROP

Il NANODROP è uno strumento di laboratorio molto semplice ed intuitivo per quantificare dei campioni di diversa natura, anche se personalmente l'ho utilizzato solo per la quantificazione di DNA ed RNA. Esso è uno spettrofotometro di nuova generazione, che permette l'analisi di micro volumi di campione, svincolandosi dall'uso delle classiche cuvette. È composto da una parte strumentale e da un software da installare in un normale PC.

Il principio di funzionamento è semplice: viene calcolata la curva di assorbimento del campione in relazione ad un "bianco", cioè un paragone, impostato per primo (si utilizza il composto in cui è tenuto in soluzione il campione da analizzare).

Viene infatti messo 1ul di campione nel recettore apposito, che verrà poi chiuso permettendo allo strumento di analizzarlo. In base alla natura che noi avevamo dato in precedenza, avremo quindi una serie di informazioni utili all'analizzatore quali ad esempio la concentrazione del campione (espressa in ng/μl), il picco di assorbimento (diverso a seconda della natura del composto, ad esempio per il DNA è 260nm, per polisaccaridi 230nm, infine per le proteine 280nm).

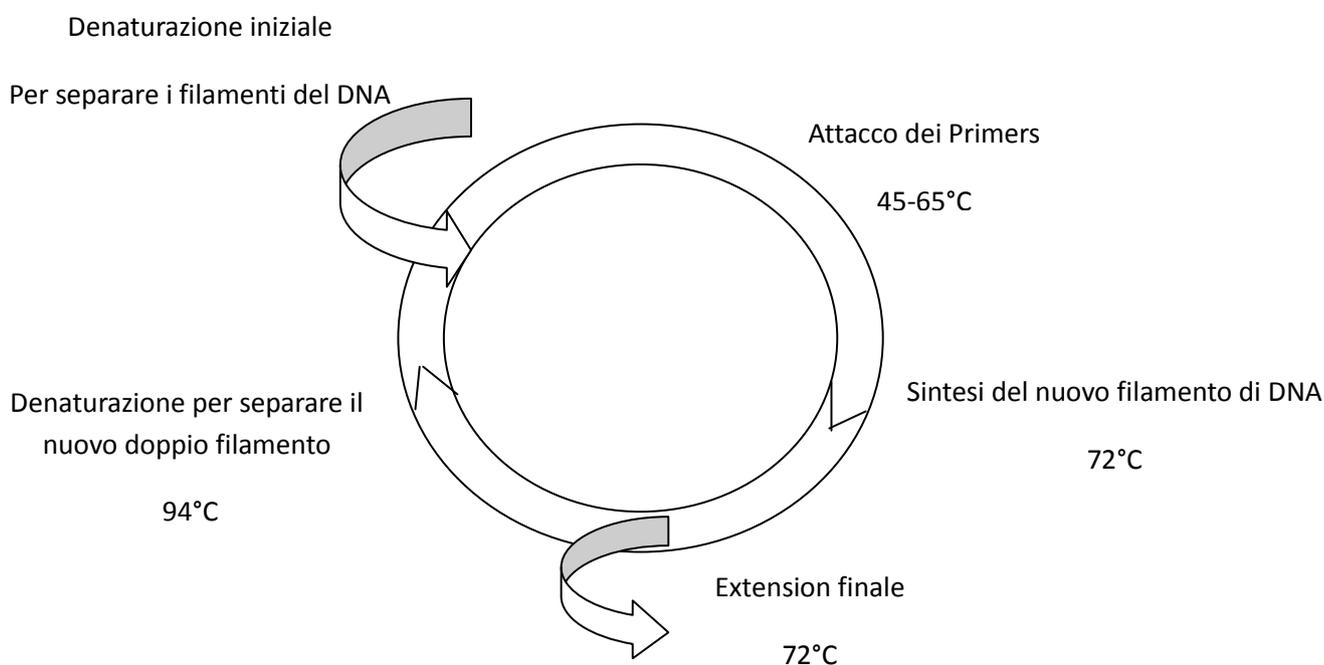
I dati estrapolati possono essere esportati in tabelle di Microsoft Excel, aumentando la maneggevolezza e la facilità di lavoro.

5.5. PCR (Polimerase Chain Reaction, “reazione a catena della polimerasi”)

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare (creare cioè molte copie) di un frammento di DNA senza l'uso di organismi viventi, ma semplicemente in vitro sfruttando attività enzimatica della DNA polimerasi.

Questa amplificazione si può rendere specifica sfruttando la conoscenza delle regioni che fiancheggiano la sequenza target. Vi partecipa uno degli enzimi più importanti per la vita: la DNA polimerasi: essa fa “allungare” un corto frammento di DNA/RNA (chiamato innesco o primer) quando esso è legato ad un filamento più lungo di DNA che fa da stampo.

Con questa situazione si assiste all'aggiunta di nucleotidi liberi all'estremità 3'-OH dell'innesco, con identità complementare al filamento stampo. La PCR prevede l'alternanza di diverse fasi:



COMPONENTI	CONC. NEL MIX	VOLUME (50ul)
Buffer 10X (Invitrogen)	1X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1,5/2,5 mM 3/5 µL
Primer Fw 10µM	0,4µM	2 µL
Primer Rev 10µM	0,4µM	2 µL
dNTPs mix 10mM	200 µM	1µL
DNA stampo	50/100ng	Variabile
Taq polimerasi (5U/µl)	2,5 unità	0,5 µL
H ₂ O sterile		A VOLUZIONE

Tabella 3: Componenti del mix di PCR

- MgCl₂/MgSO₄: lo ione magnesio è molto importante all'interno della PCR per diversi motivi:
- è un cofattore della DNA polimerasi e ne stimola l'attività;
- influenza positivamente la specificità dei primers;
- forma complessi solubili con i dNTPs facilitandone l'incorporazione.

D'altro canto un eccesso di questo elemento può dare problemi di resa e specificità; la concentrazione ideale deve quindi essere valutata in funzione dell' enzima, del templatato e dei primers.

dNTPs: ovvero dei Desossinucleotidi trifosfati (cioè in forma attiva per l'enzima) che verranno incorporati dall'enzima nel filamento di nuova sintesi.

TEMPLATO - STAMPO: può essere di diversa natura, DNA singolo o doppio filamento, ibridi di DNA/RNA o colonie batteriche (PCR-colony); un fattore molto importante ai fini della buona riuscita è la pulizia (assenza cioè di molecole inibitrici dei processi, come proteine e polisaccaridi).

PRIMERS: ovvero degli inneschi oligonucleotidici fiancheggiati le regioni target (che dovranno cioè essere amplificate) fungendo da attacco per la DNA polimerasi. La loro progettazione deve essere accurata e deve seguire delle regole molto importanti, il più delle volte basato su appositi software (vedi il capitolo sul disegno dei primers).

DNA POLIMERASI: è presente in tutti gli organismi viventi, dato che la replicazione del DNA è un processo che sta alla base della vita; in laboratorio si utilizza principalmente la Taq Polimerasi, estratta dal batterio *Thermus aquaticus*, previa ingegnerizzazione. La scelta di sfruttare questo microorganismo sta nel fatto che è termofilo, vive cioè a temperature elevate (è stato infatti scoperto nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, (USA). Questo batterio che quindi ha un optimum si circa 75°C e per questo possiede una DNA polimerasi altamente termostabile (lavora bene a 72°C), che quindi non viene degradata durante la prima fase di denaturazione del DNA, in cui si deve lavorare a temperature di circa 95°C. Altri vantaggi sono riconducibili alla bassa frequenza di mutazione ed all'attività transferasica terminale, cioè la capacità di aggiungere un'Adenina al termine della polimerizzazione (capacità sfruttata nelle tecniche di clonaggio per la costruzione di vettori).

Oltre alla Taq polimerasi, esistono in commercio enzimi ancora più sofisticati (PfuPol, PfxPol, ecc..) dotati di correzione di bozze, cioè la capacità di procedere in senso opposto alla polimerizzazione per sostituire eventuali basi errate, quelle che non sono complementari allo stampo. In laboratorio ho utilizzato la *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen)

ADDITIVI PER PCR: hanno la funzione di favorire le reazioni di PCR destabilizzando i doppi filamenti facilitando quindi la denaturazione, aumentando la specificità dei legami con i primers ed

incrementare l'attività enzimatica. Esse sono usate in templati ricchi in C+G e che formano strutture secondarie complesse. Durante le PCR che ho eseguito è stato utilizzato l'additivo *BioStab PCR Optimizer* Sigma®.

SETTAGGI della REAZIONE DI PCR

- 95°C per 5'
- 95°C per 1'
- 58-60°C per 30"
- 72°C per 1'-3'
- 72°C per 12'
- 4°C



CICLI RIPETUTI PER CIRCA 35 VOLTE



Inizialmente l'amplificazione è direttamente proporzionale, poi raggiunge un plateau per inibizione della reazione (accumulo di prodotti di scarto, disattivazione dell'enzima, minor disponibilità di dNTPs, e primers,...

VALUTAZIONE DEI RISULTATI DI AMPLIFICAZIONE

Una volta ottenuto l'amplificato, è possibile controllarlo mediante una corsa elettroforetica (per il procedimento v.sopra); se la PCR è venuta, avremo una corrispondenza di grandezza, legata all'amplificato ed al marker.

Se invece i risultati non sono soddisfacenti, bisogna andare a modificare dei parametri nel protocollo al fine di migliorarne il prodotto di amplificazione:

- concentrazione di $MgCl_2$ che può rendere più o meno specifica l'amplificazione;
- quantità e qualità del template di partenza;
- modifica settaggi del termociclatore (temperatura annealing, tempi in base alla lunghezza del frammento, ecc..).

DISEGNO DEI PRIMERS

Disegnare un primer significa andare ad individuare la sequenza nucleotidica che si ritiene più adatta al fine di utilizzarla nella PCR.

Un primer ideale deve soddisfare determinate caratteristiche:

- lunghezza di circa 24-30 nucleotidi;
- percentuale di contenuto in Citosine e Guanine >60%;
- temperatura di Melting >60%: calcolata con la formula $2x(A+T)+4x(G+C)$;
- non deve formare strutture secondarie;
- non deve formare omo o eterodimeri.

Oggi i Primers vengono ottenuti con appositi software specifici, come *Primer3* e *OLIGOANALYZER*, dove si può ottenere una serie di informazioni, compresa la rappresentazione

grafica della sequenza in modo da vedere un'eventuale formazione di harping o altre conformazioni poco favorevoli.

5.6. RT-PCR o Reverse Transcription PCR

L'RNA messaggero viene retrotrascritto in una molecola di DNA complementare (cDNA) che può essere usato come stampo, e quindi amplificato, in una reazione di PCR. La tecnica prevede prima la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e la successiva amplificazione del cDNA.

Come la Taq polimerasi, anche l'enzima retro-trascrittasi necessita di un innesco a cui aggiungere nucleotidi al 3'. Esistono principalmente tre categorie di primers possibili:

- *Primer OligodT*, che si lega al polyA presente in tutti i messaggeri maturi, dopo la retrotrascrizione si ottengono i cDNA full length di tutti i messaggeri;
- *Random Primers*, che invece consentono di ottenere diversi frammenti parziali di cDNA a partire da un unico mRNA;
- *Primer reverse* specifico gene specifico, GPS, che dovrebbe consentire la produzione di un unico cDNA, quello di interesse, e non del mix come nei due casi precedenti.

Nel nostro caso è stato utilizzato un primer OligodT e l'enzima trascrittasi inversa SuperScript III Invitrogen per retrotrascrivere RNA estratti da foglie dei mutanti della linea hda108.

La reazione di retrotrascrizione inizia con la preparazione di un mix di reazione contenente RNA, dNTPs, H₂O e il primer (Tabella XX). Il mix è stato incubato a 65°C per 5 minuti allo scopo di denaturare tutte le strutture secondarie dell'RNA. Successivamente per cristallizzare la situazione pongo in ghiaccio per 1 minuto.

COMPONENTE	QUANTITA'
RNA	1 µg
dNTPs 10mM	1 µl
Primers	500mg
H2O	A volume(13 µl)

Tabella 4: Mix di reazione di RT-PCR

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.

5.7. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA DAL GEL

Dopo l' amplificazione e la corsa elettroforetica è necessario estrarre e purificare dal gel le bande che hanno la dimensione desiderata per poterle sequenziare e clonare. A questo scopo è stato utilizzato il kit QIAquick Gel Extraction, di cui si riporta il protocollo.

1. Excidere la banda di interesse da gel con l'apposito puntale. Si trasferisce quindi il frammento di gel in una eppendorf e lo si pesa.
2. Aggiungere 3 volumi di buffer QG a ciascun volume di gel (100mg di gel corrispondono a 100 µl di soluzione).
3. Incubare a 50°C per 10 minuti, agitando ogni 2-3 minuti vigorosamente fino al completo scioglimento del gel.
4. Aggiungere 1 volume di isopropanolo, mescolare e trasferire la soluzione nella colonnina fornita col kit QIAquick.
5. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità, eliminare lo scarto e riporre la colonnina nello stesso tubino. In questa fase il DNA si lega alla membrana della colonnina.
6. Aggiungere altri 500 µl di buffer QG, ricentrifugare e eliminare nuovamente la soluzione.
7. Aggiungere 750 µl di buffer PE e centrifugare per 1 minuto. Per rimuovere tutti i residui di etanolo dalla colonnina viene fatta una ulteriore centrifuga a vuoto.
8. Eluire il DNA con 30 µl di buffer EB, centrifugando sempre per un minuto.
9. La resa della purificazione viene valutata attraverso corsa elettroforetica su gel agarosio. I campioni così purificati sono stati sequenziati direttamente o dopo il clonaggio in vettori plasmidico.

5.8. ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE ATTRAVERSO RT-PCR

L'analisi di espressione del gene HDA108 nelle piante mutanti ed eterozigoti è stata effettuata mediante amplificazione a partire dai cDNA precedentemente ottenuti dalla retrotrascrizione di mRNA isolati da foglie delle diverse piante. Sono stati utilizzati primers specifici per i trascritti di nostro interesse mentre come gene di controllo è stato utilizzato la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPC2). L'intensità delle bande amplificate è stata quindi controllata mediante corsa elettroforetica.

6. RISULTATI

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. Per fare ciò la disponibilità di mutanti per specifici epiregolatori è di fondamentale importanza. 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.

La procedura di ottenimento delle linee mutanti ha fatto sì che i mutanti abbiano un genotipo completamente ibrido e quindi, prima di procedere con i nostri studi di genetica funzionale, è necessario introgredire la mutazione nel *background* omozigote della linea B73. Per far questo si sta procedendo a successivi reincroci dei mutanti con piante B73, per almeno 5 generazioni. Alla fine saranno effettuate delle autofecondazioni dei mutanti per portare la mutazione allo stato di omozigosi.

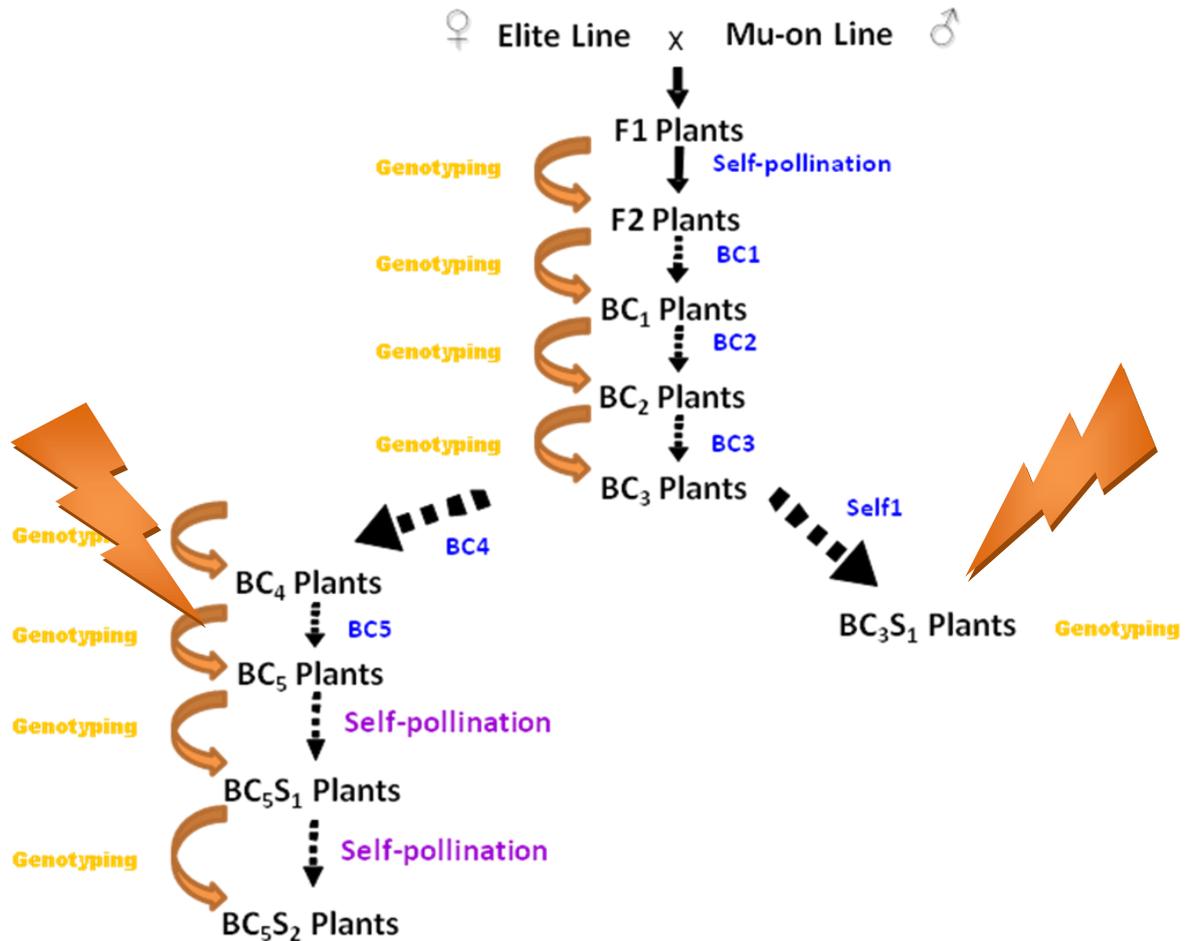


Fig 6: Schema semplificato delle operazioni programmate. I fulmini rappresentano il punto d'azione descritto nella tesi.

Il gruppo ha eseguito l'impostazione logica precedentemente descritta fino ad arrivare, nel maggio 2011, alla generazione BC3 in campo.

A questo punto sia i mutanti per il gene *HDA108* che quelli per il *CHR120*, sono stati separati in due gruppi che sono stati soggetti rispettivamente a:

- Autofecondazione, producendo semi BC3S1, quindi una popolazione segregante 1:2:1 wt:eterozigote:omozigote. Le piante omozigoti sono il materiale per il primo lavoro di caratterizzazione dell'effetto del silenziamento di questi geni a livello sia fenotipico sia molecolare. I risultati preliminari ottenuti su queste piante verranno poi confermati sulla popolazione BC5S2, ovvero su piante che completata l'introgresione con 5 cicli di incrocio con la linea B73 subiranno due successivi cicli di autofecondazione;

- Reincrocio (back-crossing) fino ad arrivare alle piante BC5 ad aprile 2012, piante che poi subiranno i due cicli di autofecondazione per arrivare alla popolazione BC5S2.

Visto che dopo ogni incrocio è necessario identificare i mutanti all'interno della progenie, è stato sviluppato, insieme alla *Biogemma*, un protocollo rapido per la genotipizzazione di un alto numero di piante. Questo protocollo si basa sull'isolamento del DNA genomico da piccoli frammenti fogliari e su una successiva PCR utilizzando un primer sul gene d'interesse e uno sul trasposone. Dal momento che il trasposone possiede sequenze invertite e ripetute (TIR) alle estremità di circa 200bp, i primers disegnati con queste sequenze possono funzionare sia come forward che come reverse, in combinazione con primers gene-specifici.

Più precisamente in entrambe le popolazioni coltivate, l'identificazione degli individui mutanti, omozigoti o eterozigoti (genotyping) è stato reso possibile mediante tecnica PCR, sfruttando diverse coppie di primers con amplificazioni diverse:

- nelle piante delle popolazioni BC3S1 sono state utilizzate due diverse coppie di primers per identificare le piante omozigoti per l'inserzione, piante su cui poi è stato verificato il silenziamento effettivo del gene tramite RT-PCR;
- nelle piante della generazione BC4, gli eterozigoti da destinare all'ultimo reincrocio sono invece stati identificati con un primer disegnato sul gene, in prossimità dell'inserzione, e uno sull'estremità del trasposone.

La purificazione rapida del DNA genomico accoppiata alla tecnica di PCR utilizzando primers specifici sul trasposone e sulle sequenze del gene fiancheggianti l'inserzione ha permesso di genotipare circa 300 piante tra BC3S1 e BC4 per ciascuna delle due linee mutanti, identificando da una parte (popolazioni BC3S1) wild-type, eterozigoti e omozigoti su cui sono state condotte le analisi fenotipiche e di espressione e dall'altra (BC4) circa 20 piante per linea che sono state utilizzate nel quinto ed ultimo ciclo di introgressione.

Di seguito sono mostrati i risultati delle reazioni di PCR riportando i gel di elettroforesi dei diversi campioni. Per comodità in ogni immagine sono riportate le coppie di primers ed al centro il genotipo determinato, mutante (E per eterozigoti e O per omozigoti) o wildtype (W). Visto che la procedura di genotyping della popolazione BC3S1 include anche quella applicata per la popolazione BC4, nei prossimi capitoli verranno riportati solo i risultati per entrambi i mutanti sulle piante BC3S1

6.1.RISULTATI SUI MUTANTI *hda108*

hda108: GENOTYPING

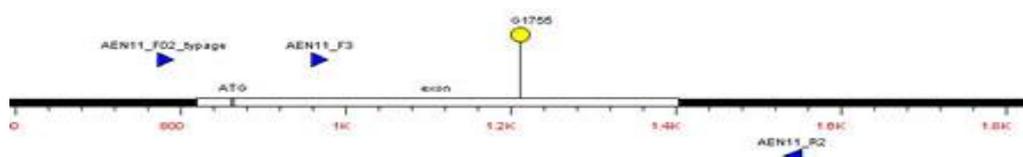


Fig 6.1: Rappresentazione schematica del gene HDA108 con riportati il sito di inserzione del trasposone (pallino giallo), a livello del primo esone dei due geni, e i primers forward con F02 e F3; il primer reverse invece è universale disegnato sulle sequenze terminali ripetute invertite del trasposone. Sotto, lo schema che mostra i primers in combinazione utilizzati per le diverse PCR.

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

La popolazione iniziale era di circa 50 piante; esse hanno subito un primo genotyping con kit Mycrolisis accoppiato con PCR. Il metodo di estrazione precedentemente citato risulta essere veloce e pratico, ma approssimativo, a volte l'amplificazione della banda attesa non avviene a causa della bassa qualità del DNA. Per questo motivo le piante identificate come putativi mutanti omozigoti (amplificazione dalla coppia di primers sul trasposone e mancata amplificazione dalla coppia di primer gene-specifica, a cavallo dell'inserzione) sono state selezionate e si è proceduto alla verifica del genotipo tramite estrazione e purificazione del DNA genomico con kit commerciale e successive PCR.

Di seguito sono riportati i risultati delle PCR di controllo sui putativi omozigoti scremati dalla popolazione iniziale.

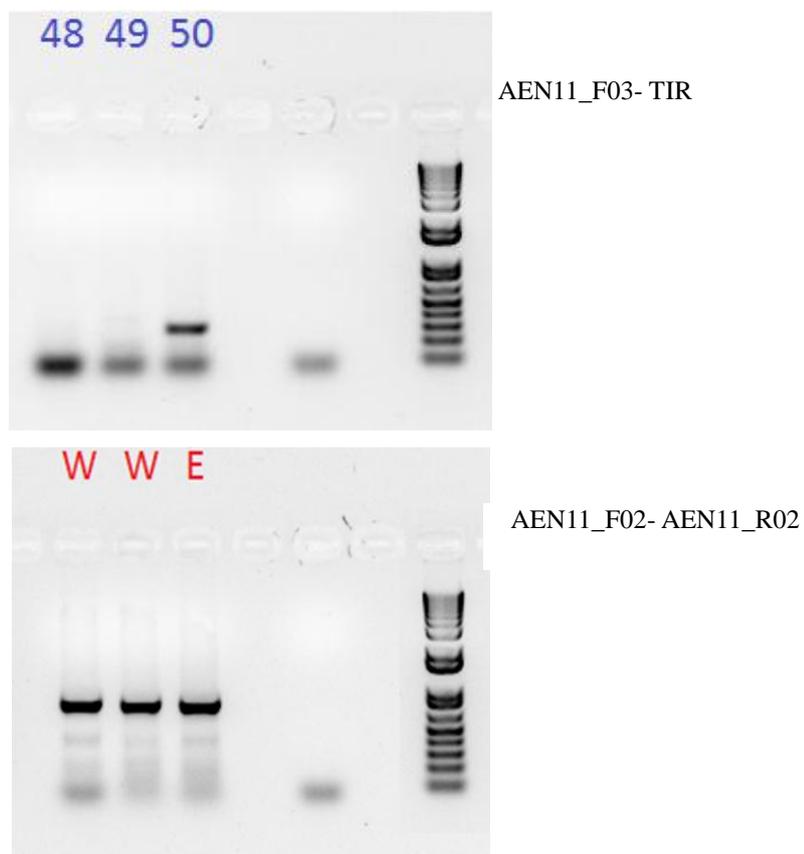
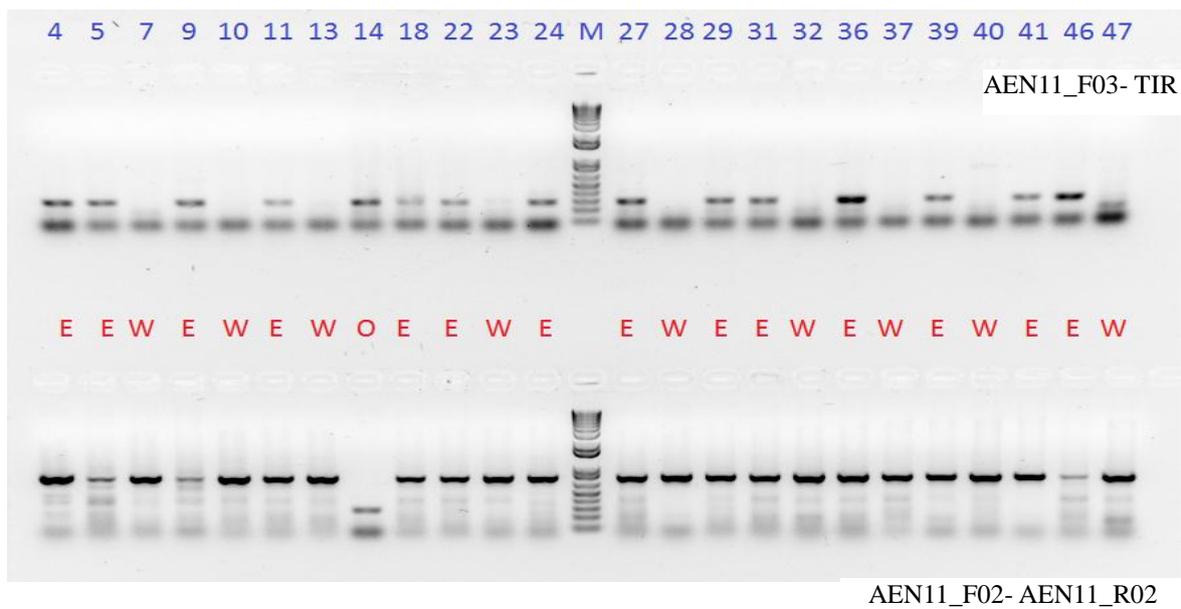


Fig. 6.1.1: Elettroforesi su campioni con due coppie di primers, inidcando gli individui mutanti, e se tali, omozigoti o eterozigoti.

Di lato sono riportate le coppie di primers utilizzate.

Dai risultati ottenuti è emerso un solo individuo omozigote per la mutazione di nostro interesse. Questo ha reso indispensabile una seconda semina, creando un'altra popolazione, questa volta di circa 100 piante. Con la medesima procedura descritta precedentemente (prima estrazione veloce con Mycrolisis seguito da PCR di verifica su estratto genomico), sono emersi altri 3 individui omozigoti.



Fig 6.1.2: Foto del gel elettroforetico che riporta i nomi dei campioni con testate le due coppie di primers, indicando quindi gli individui mutanti, e se tali, omozigoti o eterozigoti.

Di lato sono riportate le coppie di primers utilizzate.

Riassumendo dalle due popolazioni, composte da circa 150 semi in totale, sono stati identificati 4 individui omozigoti per la mutazione.

hda108: CARATTERIZZAZIONE

Dai 4 omozigoti più alcuni etero e wt di controllo è stato quindi estratto RNA da foglia, retro trascritto in cDNA e utilizzato in RT-PCR per analizzare l'espressione del gene *HDA108*.

Come controllo dell'amplificazione è stato utilizzato il gene *GAPC*, codificante per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi un enzima del ciclo di Krebs, 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 quattro piante mutanti presentano il completo silenziamento del gene, indicando che l'inserzione del trasposone determina il blocco della trascrizione di *HDA108*.

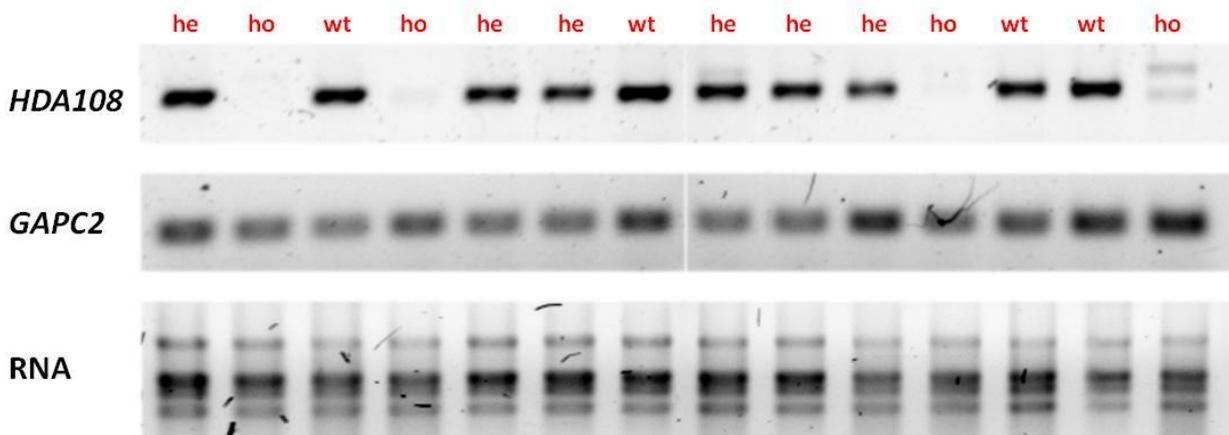


Fig 6.1.3: Analisi di espressione del gene *HDA108* in foglie di piante BC3S1.

In una piccola popolazione segregante di 150 piante della linea *hda108* sono stati identificati quattro mutanti omozigoti (segregazione attesa di 1:4), tre dei quali mostrano un fenotipo ben visibile a carico della parte aerea, con una riduzione dell'altezza e la mancata espansione della lamina fogliare. È stata così eseguita una caratterizzazione fenotipica sui tre mutanti omozigoti, come ben visibile nelle foto di seguito, già dai primi stadi di sviluppo.



Fig 6.1.4: Piante omozigoti *hda108* allo stadio di terza foglia. Le piante omozigoti mutanti mostrano un forte fenotipo, con una riduzione dell'altezza e scarsa lamina fogliare.

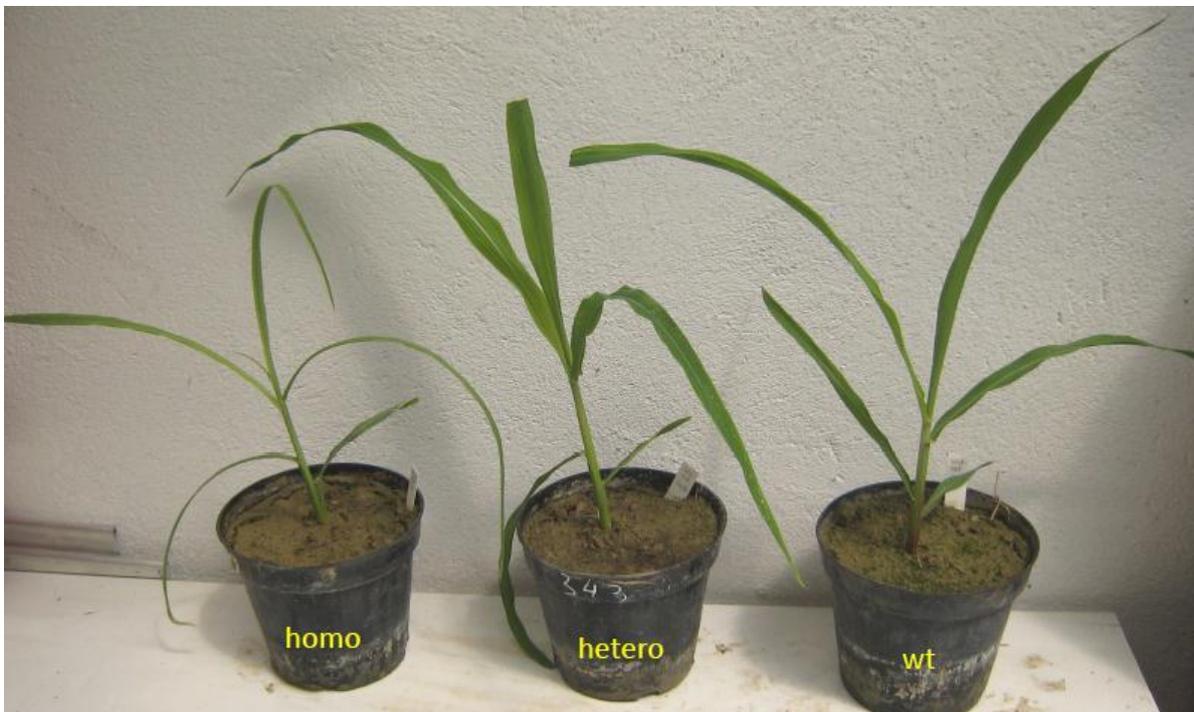


Fig 6.1.5: Piante allo stadio di quarta- quinta foglia.



Fig 6.1.6: Piante allo stadio di quinta- sesta foglia. La pianta a sinistra è omozigote, quella di destra eterozigote.



Fig 6.1.7: La foto mostra la differenza tra i tre omozigoti su cui è stata eseguita la caratterizzazione fenotipica; uno dei tre (a sinistra) presenta caratteristiche che possono essere ricondotte ad un wild type, o comunque eterozigote per la mutazione.



Fig 6.1.8: In serra le piante hda108 muoiono attorno allo stadio di sesta- settima foglia .nella foto in basso si può notare che un omozigote ha abbozzato un'infiorescenza maschile, ma è risultata comunque deforme e non fertile.

Da notare come la severità del fenotipo sia variabile tra diverse piante mutanti, questo può essere dovuto alla non completa introgressione della mutazione in un genotipo uniforme o all'influenza dell'ambiente e delle condizioni di crescita, cosa molto comune in mutanti per epiregolatori.

Interessante è stato osservare negli individui omozigoti, i rapporti di segregazione sono risultati inferiori del previsto (molto meno del 10% , contro il 25% teoricamente atteso in questa popolazione BC3S1).

Inoltre la percentuale di germinazione dei semi di questa popolazione BC3S1 è molto bassa, 70-80% contro il 90-95% osservato nella medesima popolazione del mutante *chr120*.

Come si vede nella foto sottostante, alcuni semi che non sono riusciti a germinare mostrano una radice primaria ben sviluppata ma la totale assenza del germoglio, suggerendo che l'*HDA108* possa agire a livello del meristema apicale del fusto, come ipotizzabile anche dal fenotipo osservabile sulle foglie.



Fig 6.1.9: A sinistra pannocchia di un individuo eterozigote autofecondato con numerose cariossidi abortite e probabilmente non vitali A destra germinazione di una cariosside, visibilmente alterata nella parte epigea; .

Inoltre dall'autofecondazione in serra di un individuo eterozigote è stata ottenuta una spiga con numerose cariossidi abortite e probabilmente non vitali facendo ipotizzare che la mutazione in omozigosi causi effetti negativi sui processi embriogenetici.

Riassumendo le informazioni derivanti dall'osservazione delle piante allevate indicano che il mutante *hda108* allo stato omozigote possiede un fenotipo ben marcato, soprattutto nella parte aerea, caratterizzato da un'altezza ed una superficie fogliare di ridotta rispetto al wild-type. Questo fenotipo risulta essere comunque letale.

Il fenotipo letale presenta dal punto della ricerca un lato positivo ed uno negativo; il fattore negativo è che risulta complicato ottenere omozigoti; infatti, di generazione in generazione l'introggressione aumenta, proiettando il suo stato genetico anche alle caratteristiche esterne della pianta.

Tuttavia, queste osservazioni fanno ipotizzare che il gene silenziato possa partecipare in qualche modo come regolatore nel processo di embriogenesi.

La chiave su cui agire per chiarire il dubbio sta negli individui che presentano un fenotipo meno accentuato; essi verranno selezionati e riprodotti, per analizzare gli individui omozigoti e gli eterozigoti, che dopo l'autofecondazione forniranno dei semi per lo studio dell'embriogenesi.

6.2. RISULTATI SUI MUTANTI chr120

chr120: GENOTYPING

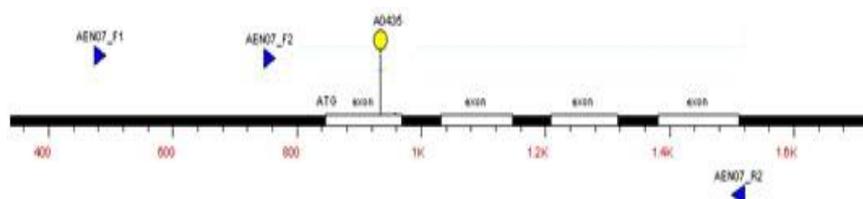


Fig 6.2: Rappresentazione schematica del gene CHR120 con riportati il sito di inserzione del trasposone (pallino giallo), a livello del primo esone dei due geni, e i primers forward con F2 e F3; il primer reverse invece è universale disegnato sulle sequenze terminali ripetute invertite del trasposone. Sotto, lo schema che mostra i primers in combinazione utilizzati per la PCR.

<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-F01	AEN07_F02	AEN07_R02	780ca	Wt/etero

Per quanto riguarda la genotipizzazione della popolazione dei mutanti per il gene CHR120 si è partiti con circa 50 individui. Anche per queste piante è stato eseguito lo stesso schema d'azione dei mutanti precedentemente descritti: estrazione veloce con kit Microlysis per scremare i presunti omozigoti per la mutazione, in questo caso circa 30 piante; su di esse è stata impostata una PCR di controllo da DNA genomico purificato con il kit per confermare l'effettivo genotipo per il gene di interesse.

In questo caso la PCR ha prodotto risultati spesso ambigui o comunque poco chiari; per sicurezza le PCR sono state ripetute su alcuni individui, aumentando la temperatura di annealing.

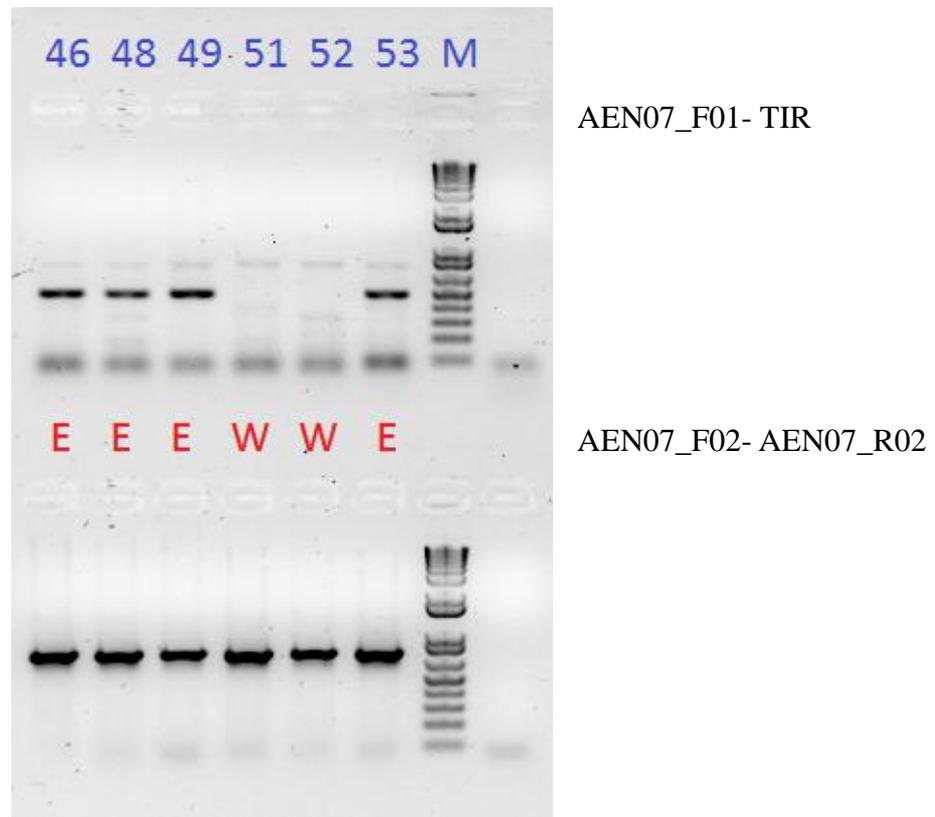


Fig 6.2.1: Elettroforesi con le due coppie di primers, inidcando gli individui mutanti, e se tali, omozigoti o eterozigoti.

Le bande di difficile lettura sono cerchiare in rosso.

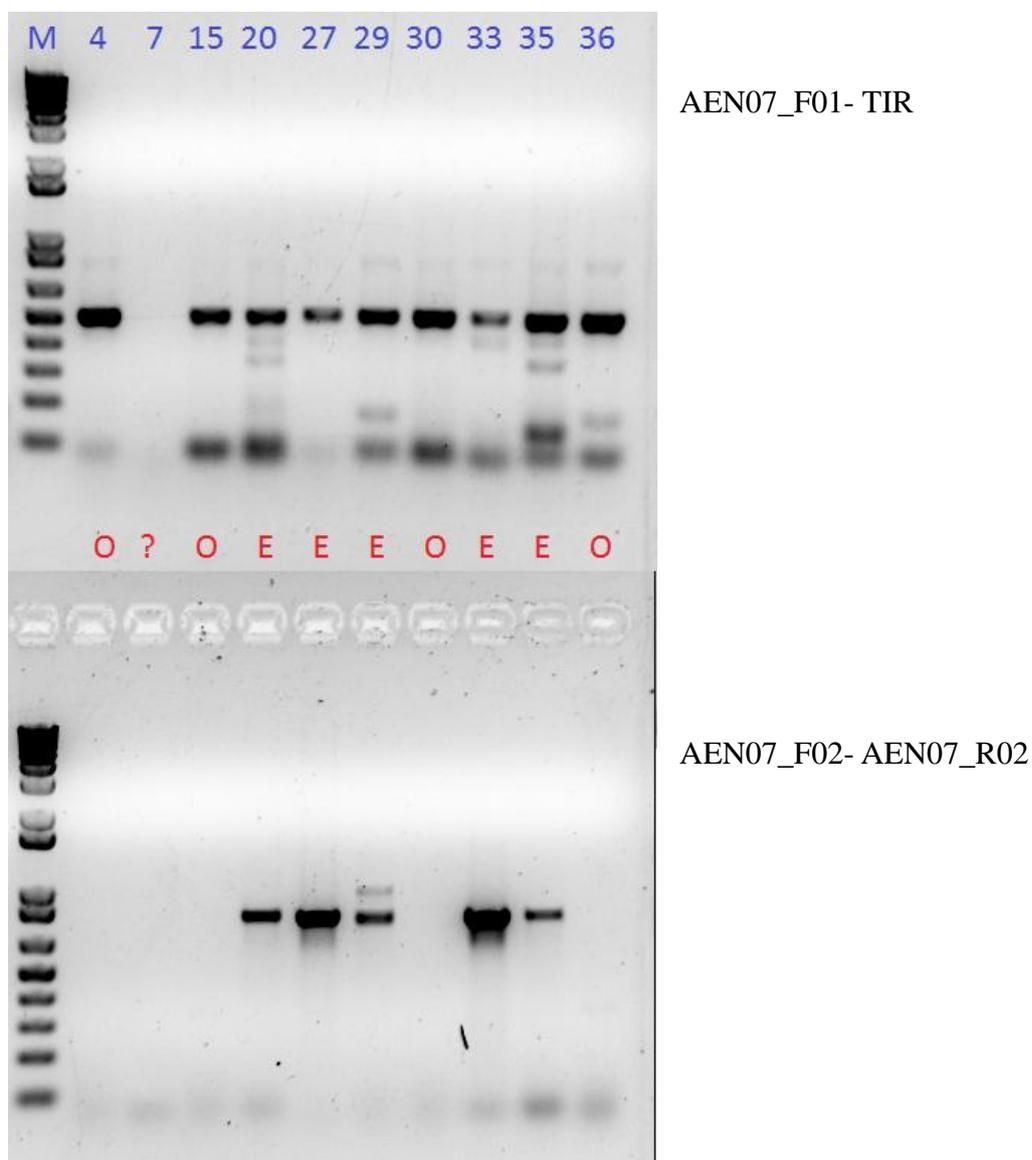


Fig 6.2.2 Elettroforetico dei campioni cerchiati nella figura precedente. I risultati sono stati in parte confermati. Di fianco sono riportate le coppie di primers utilizzate.

chr120: CARATTERIZZAZIONE

Dai 4 individui omozigoti più alcuni etero e wt di controllo è stato quindi estratto RNA da foglia, retro trascritto 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 quattro piante mutanti presentano il completo silenziamento del gene, indicando che l'inserzione del trasposone determina il blocco della trascrizione di *CHR120*.



Fig 6.2.4: 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).

Questa osservazione concorda sia con le osservazioni fenotipiche su mutanti del gene ortologo in *Arabidopsis thaliana* (*mom1*) che sulla base della 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.

7. PROSPETTIVE FUTURE

In questo periodo verranno raccolti i semi dalla popolazione BC5S1; I risultati della caratterizzazione dei mutanti, sia per i mutanti *hda108* che *chr120*, devono quindi essere confermati in popolazioni che hanno subito due ulteriori cicli di reincrocio e quindi presentano un background più uniforme e quasi comparabile a quello della B73,.

7.1. CONSULTAZIONE COMPARATIVA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE IN ATLANTE

In parallelo dovranno essere eseguite delle analisi di espressione dei due geni sui wild-type, sia a livello temporale e quantitativo (RT-PCR) sia a livello spaziale (ibridazione *in situ*). Una prima indicazione sui pattern di espressione di questi geni è già stata ottenuta dai i risultati dell'atlante di espressione in mais, prodotto dal totale sequenziamento del genoma accoppiato con l'analisi di espressione dei singoli geni correlandoli agli organi della pianta in varie fasi di sviluppo (Sekhon et al, 2011). Mediante tecnica Microarray sono state testate più di 80.000 sonde in 60 diversi tessuti, rappresentanti di 11 diversi organi della linea B73, creando un atlante completo di profili di trascrizione globali attraverso stadi di sviluppo e delle piante. Il risultato è un atlante utile per la scoperta genica e la caratterizzazione funzionale in mais.

I dati estrapolati dall'atlante ottenuto assieme ad altri lavori (ad esempio Winter et al.) sono stati messi a disposizione di numerosi siti al fine di permettere una semplice ed intuitiva ricerca dei geni di interesse. Il sito che ho utilizzato è stato www.maizegdb.org , il quale, una volta identificato il gene mediante un codice ID, grazie al suo database permette la navigazione all'interno del genoma. Esso è in grado di mostrare la struttura del gene, nonché i livelli di espressioni nelle varie parti della pianta a diversi stadi di sviluppo sia in forma schematica che grafica.

RICERCA IN MAIZEGDB DEL GENE HDA108 (CODICE ID GRMZM2G136067)

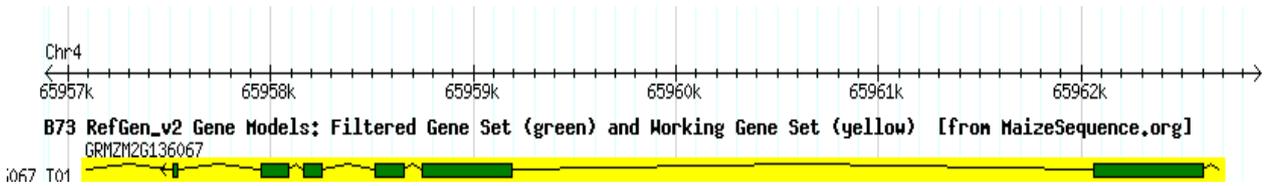


Fig 7.1.1 : rappresentazione schematica in MaizeGDB del gene *HDA108* è importante ricordare la direzionalità di lettura, che in questo caso è da destra a sinistra (www.MaizeGDB.org).

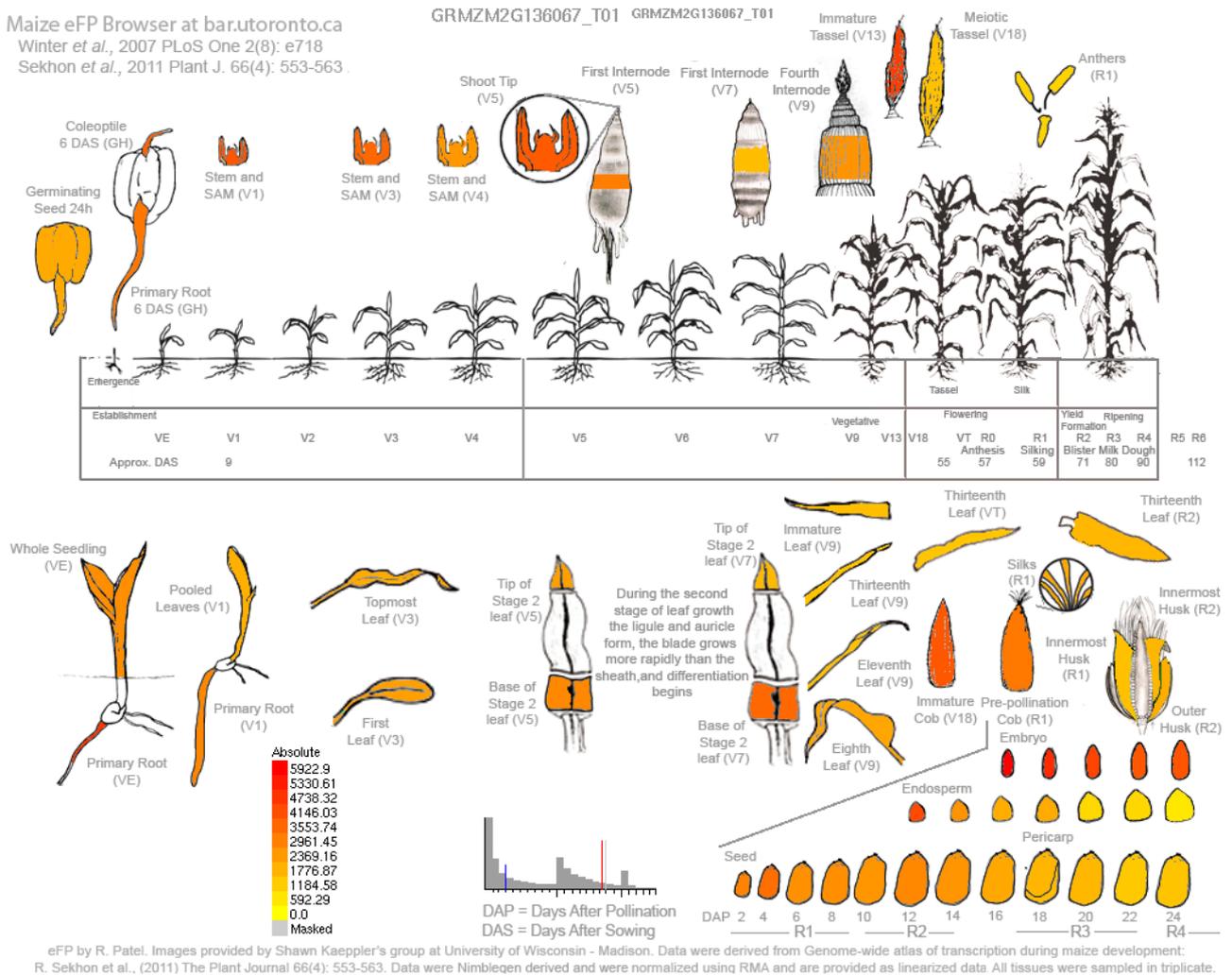


Fig 7.1.2: Rappresentazione grafica dell'espressione del gene nei diversi tessuti ed alle diverse fasi di tessuto; esso risulta essere presente maggiormente nel SAM e nell'endosperma ai primi stadi, ma viene considerato comunque un gene costitutivo(www.MaizeGDB.org).

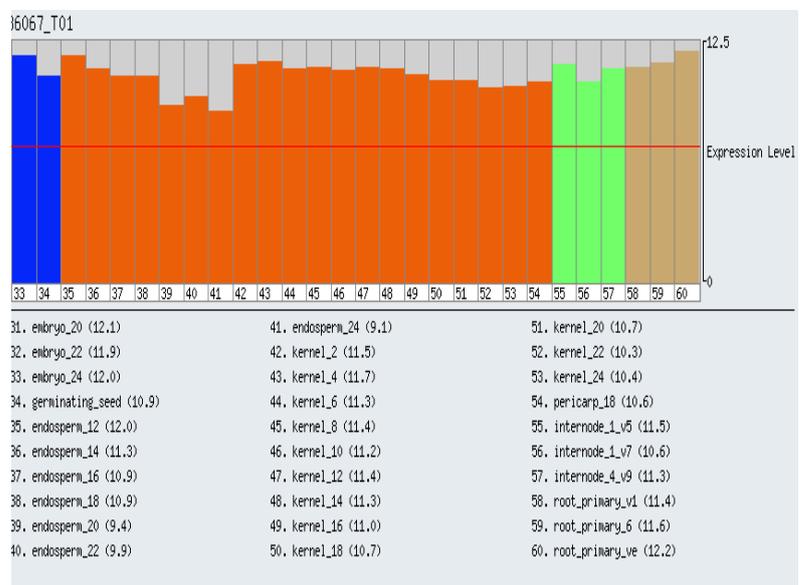
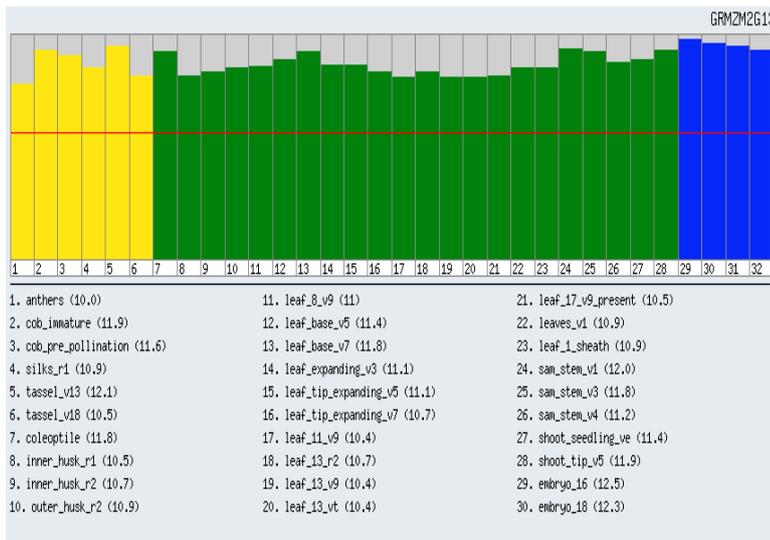


Fig 7.1.3: Istogramma Di espressione del gene HDA108 in mais appartenente alla linea B73. I risultati mostrano un livello costitutivo, ovvero espresso in ogni tessuto della pianta (www.MaizeGDB.org).

Come si vede dalle due diverse rappresentazioni, il gene HDA108 è espresso in tutti i tessuti e organi analizzati, anche se mostra degli evidenti picchi di espressione nelle infiorescenze e negli embrioni, confermando le ipotesi fatte in precedenza sul ruolo di questa deacetilasi istonica nella regolazione dell'embriogenesi.

RICERCA IN MAIZGDB DEL GENE CHR120 (codice ID GRMZM2G472428)

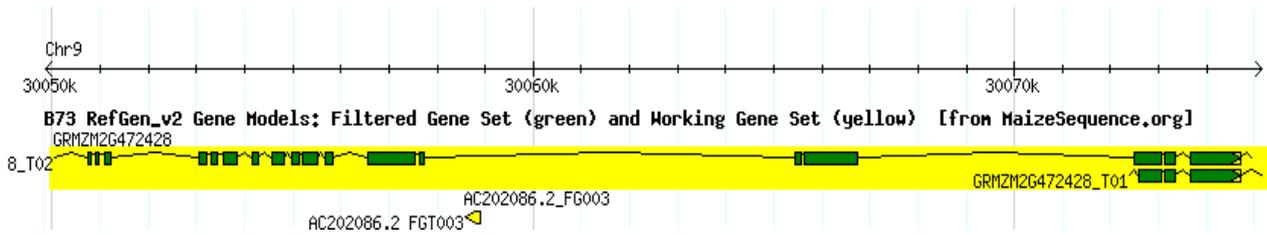


Fig 7.1.4 : rappresentazione schematica in MaizGDB del gene *CHR120* ; è importante ricordare la direzionalità di lettura, che in questo caso è da destra a sinistra. Dallo schema si evince che esistono due forme di splicing differenti (www.MaizeGDB.org).

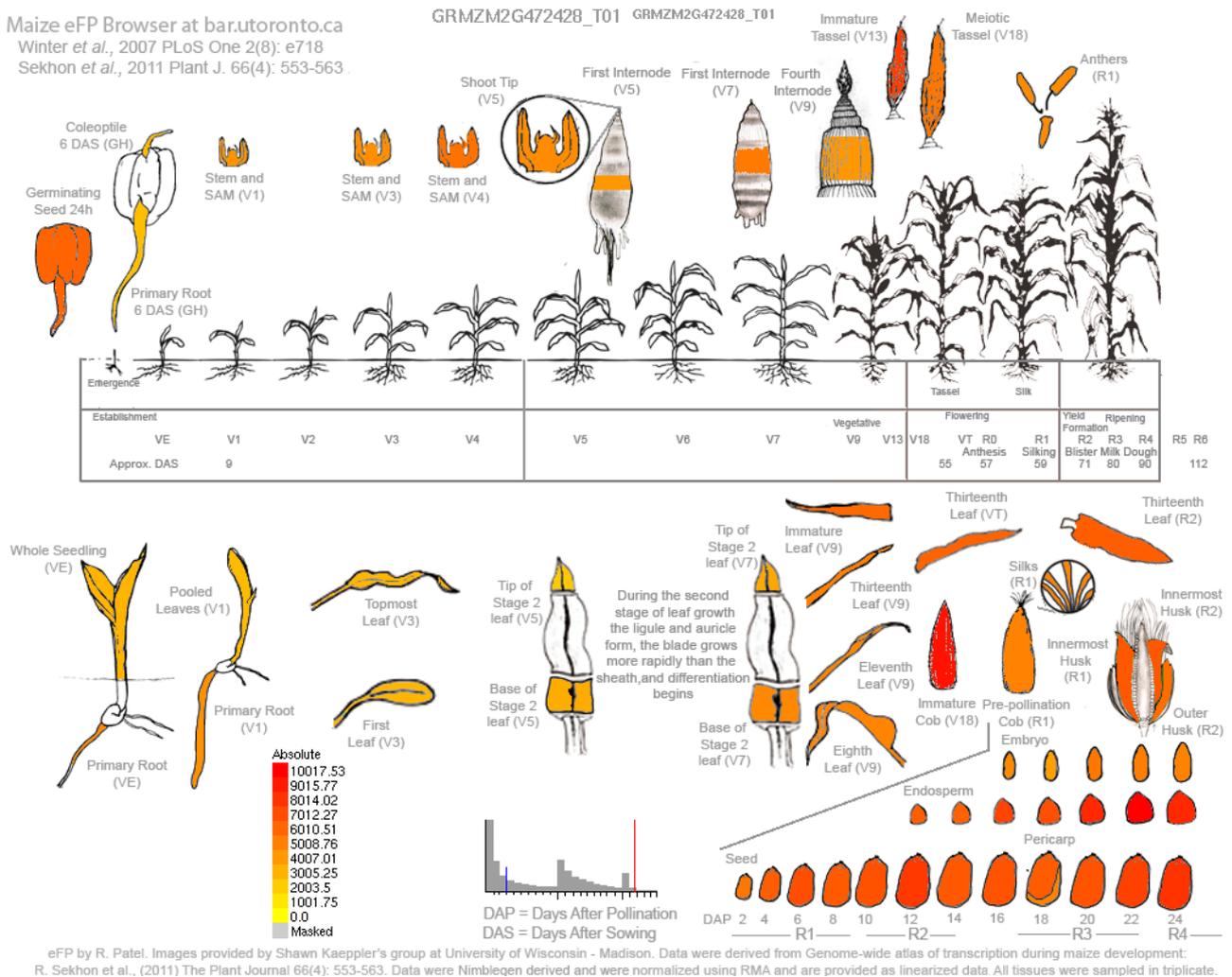


Fig 7.1.5: Rappresentazione grafica dell'espressione del gene a diverse localizzazioni tissutali e stadi di sviluppo. Esso risulta essere presente maggiormente nella pannocchia immatura e nell'endosperma agli ultimi stadi, ma viene considerato comunque un gene costitutivo (www.MaizeGDB.org).

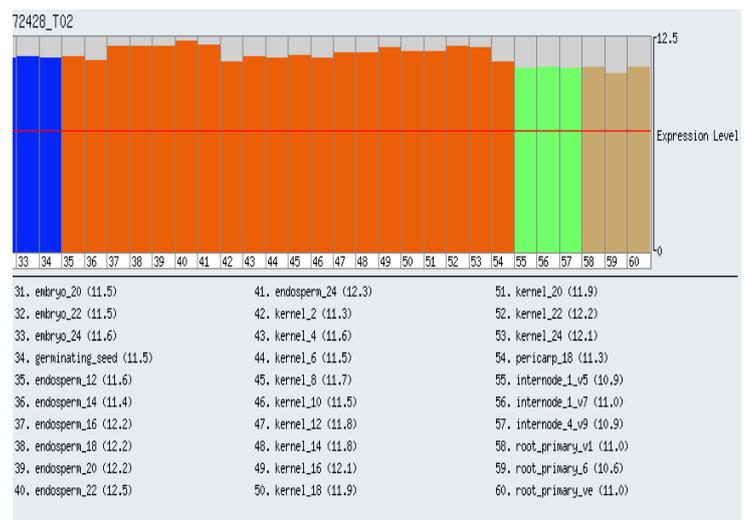
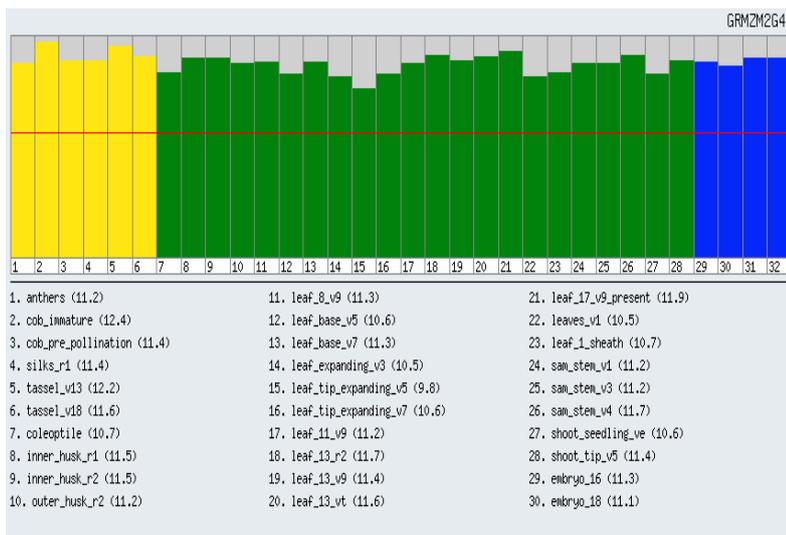


Fig 7.1.6: Istogramma Di espressione del gene CHR120 in mais appartenente alla linea B73. I risultati mostrano un livello costitutivo, ovvero espresso in ogni tessuto della pianta (www.MaizeGDB.org).

Anche il gene CHR120 presenta elevati livelli di espressione in tutti i tessuti inclusi nell'atlante di espressione, in linea con quella che dovrebbe essere la sua funzione biologica, ovvero mantenere il silenziamento delle sequenze ripetute e dei trasposoni.

7.2. IL FUTURO DEI MUTANTI *hda108*

Molto interessante in futuro sarà verificare l'embriogenesi nei mutanti, dato che la caratterizzazione fenotipica fa intendere che in qualche modo il gene giochi un ruolo importante in questo processo. Dei semi raccolti dalla prima autoimpollinazione si potranno utilizzare gli individui omozigoti in parte per continuare con una popolazione S2, ed in parte per analizzare il processo embriogenetico a diversi stadi di sviluppo, principalmente mediante osservazioni al microscopio delle cariossidi.

Un'altra operazione interessante destinata al futuro risulta essere quella di andare a vedere come cambia l'acetilazione degli istoni in questi mutanti, operazione possibile mediante tecniche che fanno uso di anticorpi; verranno infatti eseguite analisi su embrioni, foglie e radici utilizzando un anticorpo anti- code istoniche acetilate.

Un'applicazione interessante di questo intervento potrebbe essere quella dell'immunoprecipitazione della cromatina; in questo caso l'estrazione di genomico sarebbe sostituita da una prima fase di fissaggio degli istoni al DNA con conseguente trattamento con anticorpo contro l'istone H3 acetilato; in questo modo vengono isolate regioni del genoma che presentano l'acetilazione.

7.3. IL FUTURO DEI MUTANTI *chr120*

Anche per questa popolazione vale il discorso fatto in precedenza riguardo il secondo ciclo di autofecondazione, seguito da un'ulteriore caratterizzazione.

Inoltre anche in questo caso i valori di espressione genica devono essere comparati con l'atlante di espressione.

Interessante risulterebbe anche sequenziare il trascrittoma del mutante per vedere le differenze di espressione; essa è realizzabile per tentativi, analizzando l'espressione di singole sequenze che dovrebbero essere silenziate o 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 mutazi

8. BIBLIOGRAFIA

Alisung MV, Yu C-W, Wu K (2009) Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression pattern of RPD3/HDA1 family histone deacetylase in plants. *BMC Plant Biology* 1-15.

Kakutani , T. Joddeloh, J.A. Flowers, S.K. Manakata and Richards, E.J (1996) Developmental abnormalities and epimutations associated with a DNA hypomethylation mutation. *PNAS* 93: 12406-12411.

Lauria M, Rossi V (2011) Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*.

Lewin B, Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST (201) “Il gene X”, Zanichelli Editore

Lisch D, Chomet P, Freeling M (1995) Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. *Genetics* **139**: 1777–179

López E et al. *BMC Evolutionary Biology* 2009

McClintock B. (1950) The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **36** : 344 – 355

Pasqua G, Abbate G, Forni C (2011) “Biologia cellulare e biotecnologie vegetali”, Piccin editore

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

Wu K, Zhang L, Zhou C, Yu C-W, Chaikam V. (2008) HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany Advance Access, da Journal of experimental Botany, 1-10

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

<http://ww.maizedb.org>

<http://www.sciencedirect.com>

<http://www.biomedcentral.com>

<http://en.wikipedia.org>