PROFILOTRASCRIZIONALEDEIMICROSPOROCITIDELMUTANTEMEIOTICCHROMOSOMECONDENSATIONDIARABIDOPSISMEDIANTELASERMICRODISSECTIONMICROARRAY (LMM)

Lucia Barra

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XXI ciclo Indirizzo Biotecnologie Vegetali Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XXI ciclo Indirizzo Biotecnologie Vegetali Università di Napoli Federico II



PROFILOTRASCRIZIONALEDEIMICROSPOROCITIDELMUTANTEMEIOTICCHROMOSOMECONDENSATIONDIARABIDOPSISMEDIANTELASERMICRODISSECTIONMICROARRAY (LMM)

Lucia Barra

Dottoranda:Lucia BarraRelatore:Prof. Luigi MontiCorrelatore:Dott.ssa Clara Conicella
Dott.ssa Federica ConsiglioCoordinatore:Prof. Giovanni Sannia

Alla mia famiglia... al suo incondizionatato sostegno

"La nostra paura più profonda non è di essere inadeguati. La nostra paura più profonda è di essere potenti oltre ogni limite..."

Nelson Mandela

INDICE

RIASSUNTO	pag. 9				
SUMMARY	pag. 11				
1. INTRODUZIONE					
1.1 La meiosi in pianta	pag. 14				
1.1.1 Il processo meiotico	pag. 14				
1.1.2 Isolamento di geni meiotici	pag. 15				
1.2 Acetilazione e meiosi	pag. 19				
1.3 Acetilazione e trascrizione	pag. 20				
1.4 Laser Capture Microdissection (LCM) nello studio	pag. 21				
dell'espressione genica					
1.4.1 Descrizione della tecnologia Laser Assisted Microdissection	pag. 21				
1.4.2 Applicazioni della tecnologia LCM	pag. 24				
1.5 Scopi e contenuti della tesi	pag. 26				
2. MATERIALI E METODI	pag. 27				
2.1 Materiale genetico	pag. 27				
2.2 Isolamento di microsporociti da Arabidopsis thaliana	pag. 27				
2.2.1 Preparazione istologica delle infiorescenze	pag. 27				
2.2.2 Colorazione delle sezioni istologiche	pag. 28				
2.2.3 Laser Capture Microdissection (LCM)	pag. 28				
2.3 Estrazione dell' RNA	pag. 28				
2.4 Analisi Microarray	pag. 28				
2.4.1 Amplificazione RNA, marcatura con biotina del cRNA e ibridazione	pag. 28				
2.4.2 Analisi dei dati e classificazione funzionale dei geni	pag. 29				

2.5 Analisi RT-PCR			
2.6 Analisi Real Time-PCR quantitativa			30
3. RISULTATI			
3.1 E	Definizione della tecnica LCM per il prelievo dei microspor	ociti	pag.
31 in arabidopsis			
3.1.1	Analisi morfologica e cito-istologica delle infiorescenze	pag.	31
3.1.2	Preparazione dei tessuti per LCM	pag.	32
3.1.3	Saggi di colorazione delle criosezioni	pag.	32
3.1.4	Cattura dei microsporociti tramite LCM	pag.	33
3.1.5	Quantità, qualità e specificità dell'RNA	pag.	34
3.2 Micro espre	array per l'identificazione di geni differenzialmente ssi nel mutante <i>mcc</i> di arabidopsis	pag.	36
3.2.1	Amplificazione dell' RNA	pag.	36
3.2.2	Analisi Microarray	pag.	37
3.2.3	Analisi Real Time-PCR quantitativa	pag.	43
4. DISCUS	SIONE	pag.	44
4.1 La stra	ategia LMM (Laser Microdissection Microarray)	pag.	44
4.2 Lo sta la tra	to di acetilazione della cromatina influenza ascrizione	pag.	44
4.2.1	Dinamica e struttura della cromatina	pag.	45
4.2.2	La proteolisi mediata dall'ubiquitina	pag.	46
4.2.3	Il ciclo cellulare	pag.	47
4.2.4	Fattori di trascrizione	pag.	47
5. Conclus	sioni	pag.	50
6. Bibliogr	afia	pag.	52

RIASSUNTO

I meccanismi molecolari che regolano la meiosi nelle piante sono ancora poco noti. Finora sono stati isolati circa cinquanta geni meiotici vegetali soprattutto tramite mutanti inserzionali di *Arabidopsis thaliana* con approcci di "forward" e "reverse genetics", in quest'ultimo caso utilizzando strategie comparative con organismi modello. Studi recenti evidenziano un coinvolgimento delle modificazioni istoniche post-traduzionali, tra cui l'acetilazione, nel processo meiotico di diversi organismi che non includono finora alcuna specie vegetale.

La ricerca svolta durante il dottorato ha riguardato l'analisi del trascrittoma nei microsporociti di Arabidopsis thaliana ai fini dell'identificazione dei geni coinvolti nel processo meiotico la cui espressione è regolata dall'acetilazione istonica. A tale scopo è stata messa a punto in questa tesi la microdissezione laser a cattura (LCM) sui meiociti maschili. Tramite LCM singole cellule identificate al microscopio invertito sono separate dalle sezioni istologiche di tessuti eterogenei facendole aderire ad un film termoplastico tramite l'attivazione di un raggio laser a infrarossi. In questa tesi è stata applicata l' LCM combinata con i microarray (LMM) nel mutante meiotic chromosome condensation (mcc) e nel wild type per ottenere il profilo trascrizionale dei microsporociti. Il mutante inserzionale *mcc*, proveniente da "enhancer activation tagging", isolato presso l'Istituto CNR di Genetica Vegetale di Portici, sovraesprime una putativa acetilasi istonica (GCN5-like N-acetiltransferasi). In tale mutante era stato dimostrato che l'acetilazione istonica ha un ruolo in meiosi ed, in particolare, nella condensazione e segregazione dei cromosomi, oltrechè nella distribuzione dei chiasmi. E' stata usata la tecnologia LMM per indagare se nel mutante mcc l'aumento di acetilazione degli istoni influenzava anche l'espressione genica e se ciò avveniva relativamente ad un set di geni durante la meiosi.

La tecnica LMM messa a punto in questa tesi sui meiociti include come step principali il criosezionamento, la microdissezione laser a cattura (LCM), l'amplificazione e la biotinilazione dell' RNA e l'analisi microarray (GeneChip Affymetrix, ATH1).

Sono stati messi a punto due protocolli di istologia, uno per la criosezione ed uno per l'inclusione in paraffina di bocci fiorali di A. thaliana. Entrambi hanno consentito di conservare l'integrità del tessuto dell'antera e la morfologia dei meiociti. Poiché dati di letteratura indicavano che il metodo della criosezione garantiva i migliori risultati in termini di resa dell'RNA, quest'ultimo metodo è stato utilizzato negli esperimenti LMM. I microsporociti sono stati prelevati senza essere colorati poiché le colorazioni potevano compromettere la resa di RNA. Sono stati, infine, definiti i parametri del raggio laser e l'efficienza di cattura per il prelievo dei microsporociti tramite LCM. Sono stati raccolti circa 6000 microsporociti in profase I e successivi stadi meiotici, sia del mutante mcc che del controllo. Da guesti è stata estratta la guantità necessaria di RNA da impiegare nell'amplificazione in tre repliche biologiche. È stato utilizzato il protocollo di amplificazione lineare basato sulla tecnologia del promotore del fago T7. Partendo da una quantità totale di 40 ng di RNA per ogni replica è stata ottenuta una guantità amplificata di almeno 40000 volte, sufficiente per l'analisi microarray. Dai risultati di guest'ultimi, filtrati attraverso una soglia di fold change di 1.5 in scala logaritmica si è ricavata una lista di 150 geni differenzialmente espressi nel mutante mcc. Sette geni di questa lista particolarmente interessanti per la loro funzione biologica sono stati sottoposti ad analisi guantitativa tramite Real-Time. Sei di questi hanno confermato i dati microarray di espressione genica.

I principali risultati del progetto di dottorato hanno evidenziato che:

- La tecnica Laser Microdissection Microarray (LMM) è valida per determinare il "trascription profiling" di microsporociti. Tale tecnologia può essere estesa anche ad altre specie vegetali di interesse agronomico.

- L'aumento dell' acetilazione degli istoni influenza l'espressione genica durante la meiosi.

-Centocinquanta geni, di cui il 68% risultava "up", sono differenzialmente espressi nei microsporociti del mutante *mcc*. Alcune classi di geni quali quelli del ciclo cellulare, dei fattori di trascrizione, della condensazione dei cromosomi, della proteolisi mediata dall' ubiquitina, della ricombinazione meiotica e di trasduzione del segnale sono di particolare interesse biologico.

In conclusione, i risultati di questa tesi contribuiscono a formulare nuove ipotesi di lavoro al fine di chiarire la regolazione del processo meiotico in pianta.

SUMMARY

Meiosis is a modified cell division program essential to all the sexually-reproducing eukaryotes. Starting with DNA replication and followed by two successive nuclear divisions, the major consequences of meiosis are chromosome number halving, reassortment and segregation of genetic information (Zickler e Kleckner 1998). In recent years, there has been a considerable interest in identifying mutations affecting the processes related to sexual plant reproduction, to isolate the relevant meiotic genes. Molecular and genetic advances have been obtained mostly in the sexual model system Arabidopsis thaliana by applying insertional mutagenesis, which can induce loss-of-function or gain-of-function mutations (Consiglio et al. 2007). Another way to obtain informations about meiotic genes is the comparative analysis with other model organisms such as yeast, drosophila and C. elegans. So far, methodologies based on differential gene expression have not been applied on meiotic cells since they develop into floral organs among heterogeneous tissues. A methodology which combines the single cell technology and the analysis of gene expression using microarrays could unravel the molecular understanding of meiosis at genomic level. The approach, known as Laser Microdissection Microarray (LMM), was applied in the project of this PhD thesis. The Laser Capture Microdissection (LCM) is a powerful technique by which individual targeted cells can be harvested from heterogeneous tissues while they are viewed under the microscope: the selected cells are captured through the activation of an adhesive film by a laser beam. Cells isolated by LCM are a source of cell-specific RNA for transcript profiling. Many studies have shown that LCM can be a powerful tool in plants. However, meiotic cells have never been isolated by LCM.

In the recent years, it has been shown that histone post-translational modifications, and particularly histone acetylation, play pivotal roles in chromosomes structure influencing the compactness of chromatin during meiosis. Recently, the mutant *meiotic chromosome condensation (mcc)*, isolated at the CNR Institute of Plant Genetics (IGV), Portici, over-expressed a gene encoding a GCN5-related N-acetyltransferase belonging to GNAT family. This mutant exhibited a reduced fertility. *MCC* gene was found to be expressed in flower buds and, at a low level, in mature leaves. Over-expression of *MCC* gene in flower buds was associated to hyperacetylation of histone H3 that was observed in male meiosis. *MCC* is required during meiosis for chromosome condensation and segregation, and crossover distribution.

According to the above considerations, the main aim of this thesis was the application of Laser Microdissection Microarray (LMM) to perform a transcription profiling of the microsporocytes of the hyperacetylated mutant *mcc* of *Arabidopsis thaliana* compared with its control C24_{RD29A:LUC}. Through the meiocyte specific transcription profiling differentially expressed genes have been identified in the mutant.

The specific workpackages (WP) of the PhD project are summarized as following:

1. To set up a methodology based on the Laser Capture Microdissection (LCM) to capture male meiocytes in *Arabidopsis*;

2. To obtain transcription profiling of microsporocytes by microarray analysis in *mcc* respect to wild type C24_{RD29A:LUC}.

The research activity, presented in this thesis, was carried out at CNR Institute for Plant Genetics, Portici. The experimental procedure of laser capturing and microarray analysis have been performed at the Research Institute Gaetano Salvatore, Biogem, in Ariano Irpino (AV), in collaboration with Dr. P. De Luca.

WP 1: Setting-up the capture of male meiocytes in arabidopsis

To set up the methodology of Laser Capture Microdissection (LCM) for collecting meiocytes in arabidopsis, we followed the steps of (a) sectioning, (b) meiotic stage recognition, (c) capturing, (d) evaluation of RNA yield and specificity.

- (a) Floral buds were collected and processed according to the histology techniques for paraffin embedding or cryosectioning. Although, the two techniques gave similar results in terms of tissue morphology integrity, the criosectioning method was chosen because it allows to extract a better RNA yield and quality.
- (b) Meiotic stages were recognized in the criosections from different developmental stages of floral buds and anthers by staining them with 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Unstained microsporocytes were captured at stages from prophase I to telophase II by positional recognition as compared to DAPI stained cells.
- (c) The parameters of LCM Arcturus Pix Cell II system, laser power, laser pulse duration and spot size, were set up to perform a high capture efficiency and meiotic cell specific capture. The parameters were set as following: 90-100 mW for power range, duration of 1.0-1.5 ms and spot size of 7.5 μm.
- (d) About 1200 meiocytes allow to recover 6-12 ng/μL RNA, that is a sufficient quantity for RNA amplification step. The RNA quality estimated by RNA Integrity Number (RIN) and 28S/18S ratio, was guaranteed in samples infiltrated with the saline solution RNA LATER (Qiagen) that stabilizes RNA. RNA was meiotic cell specific as evidenced by RT-PCR with the meiotic gene DMC1 expressed at prophase I stage. Few tapetal somatic cells occurred in the samples of microsporocytes as estimated with the tapetal specific gene ATA7.

WP 2: Transcription profiling of meiocytes by microarray analysis in mcc

Following RNA amplification step a sufficient quantity of biotinylated cRNA (in the order of micrograms) was obtained for the hybridization with ATH1 GeneChip, Affymetrix. Complete GeneChip® Instrument System generated digitized image data (DAT) files which were analyzed by GCOS 1.4 (Affymetrix Inc.). The full data set was normalized by using the Robust Multialignment Algorithm (RMA). The expression values obtained were analyzed by using GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies,

USA). Further normalization steps included a per chip normalization to 50th percentile and a per gene normalization to median. Results were filtered for fold change >1,5. Statistical analysis was performed using the ANOVA with a 0.05 p-value cutoff. A list of 150 differentially expressed genes was obtained. Interestingly, genes involved in chromosome remodeling, histone post-translational modifications, cell cycle, meiotic recombination, ubiquitination pathway were identified. The implications of histone acetylation in the meiotic process have been discussed in the thesis. Seven of these genes, according to the k-means clustering and to the biological functions, were analyzed through the quantitative Real Time PCR. Six genes confirmed the microarray results.

In conclusion, Laser Microdissection Microarray approach was demonstrated to be valuable for collecting microsporocytes in arabidopsis, and for obtaining cell specific transcription profiling. Differentially expressed genes were identified in mutant *mcc vs* wild type by demonstrating that histone hyperacetylation, driven by *MCC*, causes a modulation of gene expression in meiosis.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA MEIOSI IN PIANTA

1.1.1 Il processo meiotico

Il sistema riproduttivo determina la struttura genetica delle popolazioni vegetali e condiziona i metodi da seguire nel miglioramento genetico. Le piante possono riprodursi per via sessuata, cioè mediante la produzione meiotica dei gameti maschili e femminili o per via asessuata. Nelle piante superiori con riproduzione sessuata nel corso della fase riproduttiva si differenziano le strutture fiorali dell' androceo e del gineceo all' interno delle quali avviene rispettivamente la microsporogenesi, che precede la formazione del polline, e la macrosporogenesi, che precede la formazione del polline, e la macrosporogenesi, che precede la formazione del polline, e la macrosporogenesi, che precede la formazione del polline (Raven *et* al., 2002). La meiosi, quindi, occupa un ruolo centrale nel ciclo vitale delle piante marcando il passaggio tra la generazione sporofitica e quella gametofitica.

La meiosi è un processo conservato in tutti gli organismi a riproduzione sessuata ed è un processo biologico tra i più complessi poichè deve garantire l'accurata trasmissione dei cromosomi di generazione in generazione e creare la variabilità genetica che è alla base della selezione. Gli eventi che rendono la meiosi peculiare rispetto alla divisione cellulare mitotica consistono in due successive divisioni nucleari, di cui una riduzionale, precedute da un unico ciclo di replicazione del DNA, nella ricombinazione, nell'appaiamento e sinapsi tra cromosomi omologhi. Questi ultimi tre processi si verificano durante la profase I (Fig. 1.1). La ricombinazione meiotica inizia nello stadio di leptotene con la formazione dei "Double-Strand Breaks" (DSB) a livello del DNA, a cui segue la riparazione e lo scambio di porzioni di bracci cromosomici omologhi. In zigotene si verifica l'appaiamento dei cromosomi omologhi che implica il loro riconoscimento ed allineamento. L'appaiamento è seguito dalla formazione del complesso sinaptinemale (SC) i cui elementi centrali stabiliscono il legame tra i cromosomi appaiati per l'intera lunghezza. In pachitene viene completata la formazione dell'SC insieme alla ricombinazione meiotica tra gli omologhi (Ronceret et al., 2007). Questi tre processi sono formalmente distinti ma le analisi genetiche e molecolari evidenziano uno scenario più complesso in cui questi eventi sono interconnessi e fortemente coordinati (Pawlowski e Cande, 2005).



Figura 1. Schema dei principali eventi meiotici che avvengono nelle cinque sottofasi della profase I.

1.1.2 Isolamento di geni meiotici

Il sequenziamento del genoma di Arabidopsis thaliana (AGI, 2000) ha determinato una notevole accelerazione nello sviluppo di tecnologie e di strategie per l'isolamento di geni meiotici. La conoscenza della sequenza del genoma, la disponibilità di mutanti tagged con T-DNA o con trasposoni in tutti i loci e le numerose informazioni reperibili in diverse banche dati, ha fatto si che la specie Arabidopsis sia divenuta un modello per gli studi genetici e di biologia molecolare anche per lo studio della meiosi. Ad oggi sono stati identificati in Arabidopsis circa 40 geni meiotici (fig. 2). L'individuazione di questi geni è stata possibile mediante l'utilizzazione di strategie definite di "forward" e "reverse genetics". La strategia di forward genetics per l' identificazione di geni meiotici è basata sulla selezione in popolazioni mutate di Arabidopsis, di genotipi con bassa fertilità o sterilità. Ogni mutante isolato è caratterizzato a livello citologico in micro- e macrosporogenesi allo scopo di evidenziare alterazioni meiosi-specifiche (Mercier et al., 2001). Le analisi citologiche sono indispensabili poiché la riduzione della fertilità o la completa sterilità può essere provocata anche da alterazioni in processi diversi dalla meiosi quali lo sviluppo del gametofito, la fecondazione e lo sviluppo dell'embrione (Consiglio et al., 2007). Quando lo screening è effettuato su popolazioni con inserzioni di trasposoni o T-DNA, il locus interessato può essere rapidamente identificato attraverso la localizzazione della sequenza tagged mediante tecnologie come TAIL PCR (Thermal Asymmetric Inter-Laced Polymerase Chain Reaction), IPCR (Inverse Polimerase Chain Reaction) e Plasmid rescue (Liu et al., 1995; Gash et al., 1992; Behringer e Medford, 1992; Feldmann, 1992) analizzando le seguenze fiancheggianti l'inserzione nelle banche dati. Nella strategia di "forward genetics" le mutazioni meiotiche finora identificate sono causate da "perdita di funzione" (loss-of-function), che producono generalmente fenotipi recessivi. Esiste anche la possibilità di isolare mutazioni che

comportano un "guadagno di funzione" (gain-of-function), che producono, invece, generalmente fenotipi dominanti. In guesto caso il fenotipo è generato da mutazioni dipendenti da un' attivazione della trascrizione genica o da una espressione ectopica del gene (Weigel et al., 2000). Il metodo tradizionalmente utilizzato per indurre quest' ultimo tipo di mutazione è stato quello dei riarrangiamenti cromosomici e dei trasposoni che possono accidentalmente produrre nuove combinazioni di geni e promotori o "enhancer". Uno dei metodi sviluppato per indurre tali mutazioni prevede l'uso di vettori T-DNA (pSKI074, pSKI015) recanti quattro copie di un elemento "enhancer" del promotore costitutivo del gene CaMV35S che può causare l' attivazione trascrizionale dei geni vicini all' inserzione del T-DNA. Questo approccio è divenuto noto come "enhancer activation tagging" (Weigel et al., 2000). Un altro approccio che è stato utilizzato nelle strategie di "forward genetics" riguarda l'identificazione di geni mutagenizzati chimicamente o fisicamente, attraverso reagenti come etilmetansulfonato (EMS) o neutroni veloci. In questo caso è necessario un lavoro di clonaggio basato su mappa (MBC) che utilizza i marcatori molecolari da associare alle regioni del genoma che contengono il gene d'interesse. A causa della difficoltà dell'MBC, il numero di geni meiotici isolati da popolazioni chimicamente o fisicamente trattate è minore di guello ottenuto per mutagenesi inserzionale. Tuttavia i miglioramenti attesi nell'approccio MBC, soprattutto grazie alla presenza di diversi tipi di marcatori molecolari (SNPs, SSR, AFLP, CAPS, SCAR), e i progressi fatti nell' identificazione di polimorfismi nella seguenza del DNA, renderanno il clonaggio posizionale meno problematico (Peters et al., 2003). Le strategie di "reverse genetics" si basano su analisi comparative con i determinanti meiotici di altri organismi per identificare putativi geni omologhi in pianta. Tuttavia l'approccio in silico utilizzato in questo tipo di strategia essendo basato sull' omologia di seguenza con i geni conosciuti può assegnare ai geni soltanto funzioni putative (Consiglio et al., 2007). Per tale motivo il ruolo biologico del gene meiotico deve essere confermato con l'analisi funzionale tramite la caratterizzazione dei mutanti (Mercier et al., 2001). Tra le strategie di "reverse genetics" si annovera l' RNA Interference (RNAi), che causa il silenziamento di un singolo gene o, simultaneamente, di un' intera famiglia genica che condivide motivi conservati. L' approccio RNAi è un' alternativa per l' analisi funzionale di geni meiotici quando i mutanti "tagged" non sono disponibili (Stevens et al., 2004). Una collezione di linee knock-out RNAi per Arabidopsis, è disponibile al sito http://www.agrikola.org. La strategia di "reverse genetics" può giovarsi anche dell' analisi del trascrittoma. A riguardo è disponibile la piattaforma Genevestigator che, combinando i dati "microarray" generati dalla comunità scientifica, consente all'utente di accedere ai dati di espressione genica per un particolare gene in ogni fase di sviluppo, in risposta cambiamenti ambientali in forma di northern trattamenti o digitali а (http://www.genevestigator.ethz.ch). La strategia di "reverse genetics" è risultata molto utile per identificare geni meiotici coinvolti in processi come la ricombinazione, che è conservata tra gli organismi a riproduzione sessuale. Il limite della strategia di "reverse genetics" è quello di non consentire l'identificazione di geni coinvolti in processi peculiari delle piante come ad esempio il processo di differenziazione delle cellule meiotiche (Consiglio et al., 2007).

Gene				
symbol ^a	ID number	Protein features	Function	References b
ASK1	At1g75950	SCF subunit	Homolog separation	Yang et al. 1999
			Inhibit recombination	Wang et al., 2005
ASK2	At5g42190	SCF subunit	Homolog separation (?)	Zhao et al., 2003
ASY1	At1g67370	HOP1 homolog	Homolog pairing	Caryl et al., 2000
				Armstrong et al., 2002
ATK1	At4g21270	C-terminal kinesin	Spindle assembly	Chen et al, 2002
ATM	At3g48190	ATM homolog	Regulation of DNA repair	Garcia et al., 2000
				Garcia et al., 2003
BRCA2a	At4g00020	BRCA2 homolog	Melotic recombination	Siaud et al., 2004
BRCA2b	At5g01630	BRCA2 homolog	Melotic recombination	Siaud et al., 2004
CAP-E1=TTN3	At5g62410	SMC2 homolog	Condensation	Siddiqui et al., 2003
CAP-E2	At3g47460	SMC2 homolog	Condensation	Siddiqui et al., 2003
CDC45	At3g25100	CDC45 homolog	Melotic progression	Stevens et al., 2004
DIF1=SYN1	At5g05490	REC8 homolog	Sister chromatid cohesion	Blatt et al., 1999
DMC1	At3g22880	DMC1	Melotic recombination	Doutriaux et al., 1998
	*			Couteau et al., 1999
DUET=MMD1	At1g66170	PHD finger	Melotic progression	Reddy et al., 2003
DYAD=SWI1	A5q51330	Novel	Sister chromatid cohesion	Siddigi et al., 2000
				Agaabe et al., 2002
MFI1	t1g77320	BBCT motifs	Melotic DNA repair	Greion et al., 2003
MER3-RCK	At3n27730	MEB3 homolog	Crossover formation	Mercier et al. 2005
MMD1-DUFT	At1066170	PHD finger	Maintic progression	Vana et al. 2003b
MRE11	At5054260	MRE11 homolog	Melotic DNA repair	Hartung and Puchta 199
WHE !!	Al3g34200	MAETT Notholog	melotic DNA repair	Puizing and Puchta, 199
MOS_TOM	414-20000	Maural	Malatia programalan	Clever et al. 1009
M00=1DM	At9=10E04	NOVEI homolog	helolic progression	Giover et al., 1996
MORIZ	AL3010324	MSH2 homolog	Inhibit recombination	Emmanuel et al., 2006
MSH4	At4g17380	MSH4 nomolog	Crossover formation	Higgins et al., 2004
PID	At1g12/90	Similar to EHOCI	Crossover tormation	Wijerathe et al., 2006
HAD50	At2g31970	RAD50 homolog	Homolog pairing, synapsis,	Gallego et al., 2001
		B10541	recombination	Bleuyard et al., 2004b
HAD51	At5g20850	RAD51 homolog	Homolog pairing, synapsis,	Doutriaux et al., 1998
			recombination	Li et al., 2005
RAD51C	At2g45280	RAD51C	homolog Homolog pairing,	Abe et al., 2005
			synapsis, recombination	Bleuyard et al., 2005
				Li et al., 2005
RCK=MER3	At3g27730	MER3 homolog	Crossover formation,	Chen et al., 2005
			synapsis	
SCC3	At2g47980	SCC3 homolog	Sister chromatid cohesion	Chelysheva et al., 2005
SDS	At1g14750	Novel cyclin	Homolog pairing, synapsis,	Azumi et al., 2002
			recombination	Wang et al., 2004a
SMC1=TTN8	At3g54670	SMC1 homolog	Highly expressed in	Lam et al., 2005b
			floral buds	
SMC3=TTN7	At2g27170	SMC3 homolog	Localized to chromosomes	Lam et al., 2005b
	-	-	and the spindle	
SP011-1	At3g13170	SPO11 homolog	Homolog pairing, synapsis,	Greion et al., 2001
	-	-	recombination	
STD=TES	At3:43210	Kinesin	Mejotic cytokinesis	Hulskamp et al. 1997
SWI1=DYAD	At5d51330	Novel	Sister chromatic coheeion	Mercier et al 2001 2009
SVN1=DIE1	A15g01300	Rec8 homolog	Sister chromatid cohesion	Bai et al 1999
STATEDICT	Alogoorioo	Recentionolog	Sister chiomatic conesion	Cai et al. 2002
evin	ME#40940	Deal homolog	Mahhr assessed in	Dana et al. 2003
3111/2	MI0040	Hece homolog	Highly expressed in	Dong et al., 2001
~~~~	440	Dee 8 hornele r	aiviaing ceils	Dana at al. 0004
SYNS	A13g59550	Hec8 homolog	Highly expressed in	Dong et al., 2001
			dividing cells	
TAM=CycA1,2	At1g77390	Cyclin A	Meiotic progression	Magnard et al., 2001
				Wang et al., 2004b
TDM=MS5	At4g20900	Novel	Meiotic progression	Ross et al., 1997
TES=STD	At3g43210	Kinesin	Meiotic cytokinesis	Spielman et al., 1997
				Yang et al., 2003a
XRCC3	At5g57450	XRCC3 homolog	Homolog pairing, synapsis,	Bleuyard and White, 2004
			recombination	Bleuyard et al., 2004a
ZYP1a	At1g22260	Similar to ZIP1	Synapsis, meiotic	Higgins et al., 2005
ZYP1a	At1g22260	Similar to ZIP1	Synapsis, meiotic progression	Higgins et al., 2005
ZYP1a ZYP1b	At1g22260 At1g22275	Similar to ZIP1 Similar to ZIP1	Synapsis, meiotic progression Synapsis, meiotic	Higgins et al., 2005 Higgins et al., 2005

Figura 2 – Elenco dei geni meiotici isolati in *Arabidopsis thaliana* (da Ma, 2006).

#### 1.2 ACETILAZIONE E MEIOSI

Gli stati epigenetici della cromatina ed in particolare le modifiche istoniche, hanno un ruolo fondamentale nell'organizzazione dei cromosomi in meiosi (Ivanovska e Orr-Weaver, 2006). Tra le modifiche istoniche post-traduzionali, la fosforilazione e l'acetilazione sono importanti nel cambiare lo stato conformazionale della cromatina (Kouzarides, 2007). Tale effetto può essere dovuto alle interazioni tra gli istoni che appartengono a nucleosomi adiacenti o tra istoni e DNA (Hansen et al., 1998) e/o al riconoscimento di determinate modificazioni istoniche da parte di proteine che interagendo con la cromatina ne regolano la struttura secondo il modello che viene definito come "codice istonico" (Strahl e Allis, 2000). E' stato dimostrato, in vitro, che l'acetilazione della lisina 16 sull' istone H4 (H4K16) influenza la configurazione della cromatina inibendo il suo compattamento (Shogren-Knaak et al., 2006). In lievito, la maggior parte del genoma si trova in uno stato di decondensazione e più dell'80% degli istoni H4 sono acetilati in corrispondenza della lisina 16 suggerendo un ruolo diretto in vivo dell'acetilazione di H4K16 nel rilassamento della cromatina (Lohr et al., 1997; Smith et al., 2003). Le modifiche istoniche possono controllare la struttura della cromatina anche modulando il legame di proteine non istoniche alla fibra cromatinica. Per esempio in cellule somatiche di uomo e topo è stato dimostrato che la deacetilazione dell' istone H3 e la successiva metilazione della lisina 9 è essenziale per il riconoscimento della proteina eterocromatica 1 (HP1) a livello dei centromeri nei cromosomi in mitosi (Ekwall et al., 1997: Taddei et al., 2001). L'associazione di HP1 ai centromeri è inoltre alterata in mitosi guando gli istoni sono mantenuti in uno stato di iperacetilazione in profase (Cimini et al., 2003). Nel caso della proteina ISWI, coinvolta nel rimodellamento della cromatina, l' interazione tra questa ed il nucleosoma è regolata dall'acetilazione dell'istone H4 in posizione K16 (Corona et al., 2002; Shogren-Knaak et al., 2006; Corona et al., 2007). L'unica evidenza dell'influenza dell'acetilazione istonica sulla struttura dei cromosomi in meiosi è relativa agli oociti di Xenopus laevis dove la deacetilazione istonica è richiesta per la condensazione dei cromosomi in metafase (Magnaghi-Jaulin e Jaulin, 2006). Negli organismi eucariotici, l'acetilazione e la deacetilazione istonica sono mediate dagli enzimi acetilasi (HAT) e deacetilasi (HDAC), rispettivamente. L'azione svolta dalle HAT e HDAC determina un equilibrio dinamico tra stato acetilato e deacetilato della cromatina che cambia durante le diverse fasi della meiosi e che è fondamentale per la sua progressione, per la ricombinazione e un'accurata segregazione dei cromosomi. In oociti di topo, è stato osservato che gli istoni H3 e H4, sono acetilati in profase I e deacetilati successivamente (Kim et al., 2003; Sarmento et al., 2004). In oociti di mammifero trattati con tricostatina A, un inibitore delle HDAC, la progressione in meiosi (Wang et al., 2006) è inibita in una alta percentuale di cellule (De La Fuente et al., 2004). Anche in lievito la perdita dell'attività acetiltransferasica induce un precoce arresto della meiosi (Choy et al., 2001). Per quanto riguarda la ricombinazione, è stato osservato che in Schizosaccharomyces pombe gli istoni H3 e H4 associati al locus ade6-M26 risultano altamente acetilati durante la meiosi (Yamada et al., 2004). Yamada e collaboratori (2004) hanno inoltre dimostrato che, se l'acetilazione viene impedita dalla mutazione nel gene HAT SpGCN5, si ha una diminuzione nella formazione dei "Double-Strand Breaks" (DSBs) e guindi della ricombinazione. La mutazione in Saccharomyces cerevisiae del gene SIR2 che codifica per una HDAC determina un cambiamento nella distribuzione dei DSBs nel genoma (Mieczkowski et al., 2007). Per guanto riguarda l' acetilazione/deacetilazione e la segregazione dei cromosomi in meiosi è stato osservato che l'iperacetilazione

determina la presenza di cromosomi "lagging" in topo e maiale (De La Fuente et al., 2004; Akiyama et al., 2006; Wang et al., 2006). L' unica descrizione della dinamica dell'acetilazione degli istoni, in particolare dell' H3 ed H4, durante la meiosi in pianta riguarda il mutante di Arabidopsis thaliana ask1 che presenta una mutazione in un gene coinvolto nella degradazione delle proteine dipendente da ubiquitina (Yang et al., 2006). Ad oggi non è stato dimostrato se le HAT e HDAC hanno un ruolo durante la meiosi nelle piante. Nel genoma di Arabidopsis thaliana sono stati annotati 18 geni codificanti per putative HDAC e 12 geni per putative HAT (Pandey et al., 2002; http://www.chromdb.org). Sono stati inoltre identificati diversi mutanti nei geni codificanti per HAT e HDAC e l'analisi delle linee antisenso o dei "knockout" hanno rivelato un ruolo di gueste nello sviluppo riproduttivo. In particolare, la mutazione di AtHD1, influenza differenti processi di sviluppo tra i quali il tempo di fioritura e la fertilità (Tian et al., 2003). Anche il silenziamento del gene AtHD2A causa alterazioni dello sviluppo riproduttivo e determina l'aborto di semi (Wu et al., 2000). La mutazione del gene AtGCN5 induce numerosi difetti nello sviluppo della pianta e una ridotta produzione di semi (Vlachonasios et al., 2003; Bertrand et al., 2003). Presso l'Istituto di Genetica Vegetale (CNR-IGV) di Portici è stato isolato, mediante una strategia di T-DNA activation tagging, il mutante di Arabidopsis thaliana mcc (Perrella et al., 2006) che sovraesprime una putativa GCN5-related N-acetiltransferasi istonica. In guesto mutante la sovraespressione del gene MEIOTIC CHROMOSOME CONDENSATION (MCC) in bocci fiorali è associata alla iperacetilazione dell'istone H3. osservata nella meiosi maschile. E' stato inoltre visto che MCC è coinvolto nella condensazione, segregazione dei cromosomi e distribuzione dei "crossing-over" in meiosi. Questi difetti meiotici portano all'aborto di circa la metà dei gameti maschili oltre che di quelli femminili (Perrella et al., 2008).

#### 1.3 ACETILAZIONE E TRASCRIZIONE

I primi studi sul ruolo dell' acetilazione istonica nell' espressione genica suggerivano che l'aggiunta di un gruppo acetile sulla coda N terminale degli istoni avesse un ruolo nella riorganizzazione della cromatina determinando un' efficiente trascrizione (Allfrey et al., 1964). Più recentemente e a supporto di questa ipotesi è stato osservato che gli istoni presenti in regioni trascrizionalmente attive della cromatina risultano maggiormente acetilati rispetto alle regioni inattive (Grunstein, 1997; Kuo e Allis, 1998), L'osservazione che molti cofattori trascrizionali possiedono un'attività HAT supporta inoltre la relazione causale tra l'acetilazione istonica e la trascrizione. Le HAT sono reclutate a livello dei promotori di alcuni geni attraverso l'interazione con fattori di regolazione della trascrizione che si legano al DNA inducendo così l'acetilazione dei siti bersaglio e la conseguente attivazione della trascrizione (Kundu et al, 2000; An et al., 2002). Gli enzimi HAT generalmente sono assemblati in complessi multiproteici che contengono anche degli attivatori trascrizionali che conferiscono la specificità verso i geni "target". L' acetilazione istonica, come precedentemente riportato, è un evento altamente dinamico a causa della presenza delle HDAC che inducono la rimozione dei gruppi acetili dagli istoni (Yang e Seto, 2003) e sono generalmente associati alla repressione della trascrizione. Infatti il trattamento di cellule di lievito con un inibitore delle HDAC determina un aumento della sensibilità della cromatina alla DNasi-I dovuto ad una sua minore condensazione e l'attivazione di geni prima silenti (Roth et al., 2001). Resta ancora da chiarire il meccanismo molecolare con cui l'acetilazione istonica influenza la regolazione della trascrizione genica. Due possibili meccanismi sono stati ipotizzati per giustificare l'attivazione trascrizionale, guali la neutralizzazione delle cariche istoniche e il riconoscimento di proteine specifiche. L' effetto di neutralizzazione della carica di alcune lisine delle code istoniche a causa dell'acetilazione è in accordo con l'ipotesi che la cromatina sia stabilizzata da interazioni polari tra le code istoniche basiche e le porzioni acide sui nucleosomi adiacenti (Wade et al., 1997; Hansen et al., 1998). L'alterazione della carica destabilizza lo stato di compattazione della cromatina consentendo un efficiente legame dell'apparato trascrizionale al DNA. L' effetto del riconoscimento di proteine specifiche, generalmente noto come "histone code", prevede che specifici pattern di acetilazione delle code istoniche così come altre modificazioni post-traduzionali (metilazione, ubiguitinazione, fosforilazione, sumoilazione, miristilazione e neddilazione), agiscano come marcatore epigenetico per il riconoscimento di differenti proteine regolatrici al fine di modulare in maniera differenziale la struttura della cromatina e la sua funzione (Strahl et Allis, 2000; Turner, 2000; Jenuwein e Allis, 2001). Infatti recenti evidenze hanno mostrato che l'acetilazione istonica crea un segnale sulla cromatina per il legame di proteine caratterizzate dalla presenza del "bromodominio" che risulta essere presente in molti regolatori della trascrizione e della cromatina come: GCN5, PCAF, p300/CBP, TAF250 ed altri (Zeng e Zhou, 2002). Ad esempio è stato dimostrato che la proteina GCN5 di lievito è richiesta per la formazione del complesso di attivazione della trascrizione Spt-Ada-Gcn5-Acetvltransferase (SAGA) е che attraverso il l'associazione nucleosomi bromodominio avviene ai acetilati durante il rimodellamento della cromatina. Evidenze in pianta sul ruolo dell'acetilazione nella trascrizione si hanno in Arabidopsis dove Stockinger e collaboratori (2001) hanno isolato una proteina omologa a GCN5 di lievito con attività acetiltransferasica a carico degli istoni e hanno dimostrato che l' attivatore trascrizionale CBF1, richiesto per la trascrizione di geni regolati da basse temperature, dipende dall'attività di AtGCN5 del complesso SAGA. Inoltre il mutante per l'istone deacetilasi HD1 presenta un aumento dei livelli di acetilazione dei residui H3K9, H3K27, H4K5 e H4K8 rivelando una differente modulazione della trascrizione dei geni regolati dalla luce (Behamed et al., 2006).

# 1.4 LASER CAPTURE MICRODISSECTION (LCM) NELLO STUDIO DELLA ESPRESSIONE GENICA

#### 1.4.1 Descrizione della tecnologia Laser Assisted Microdissection

Gli organi delle piante sono strutture complesse costituiti da differenti tessuti con distinti tipi di cellule. Ciascun tipo di cellula ha una funzione particolare che è diretta dai suoi unici trascrittomi, proteomi e metabolomi (Demura *et* al., 2002). Gli approcci analitici tradizionali, che utilizzano organi interi, possono mascherare le differenze cellula-specifiche nei livelli di RNA o proteine. Per questo motivo, sono stati utilizzati diversi approcci per prelevare specifici tipi di cellule dai tessuti vegetali. Il primo è rappresentato dall'uso di microcapillari (Karrer *et* al., 1995) che si limita alle cellule più superficiali, come cellule di guardia, epidermide e mesofillo fogliari, essendo difficile identificare specifici tipi cellulari al centro di un organo intatto (Brandt *et* al., 2002). La Laser Assisted Microdissection (LAM) è un potente mezzo per isolare

tessuti specifici, tipi di cellule e perfino organelli da campioni biologici sezionati in modo da poter essere utilizzati per l'estrazione di RNA, DNA e proteine (Nelson et al., 2006). E' applicabile a tutte le cellule che possono essere definite istologicamente. Da quando è stata sviluppata nel 1996 (Emmert-Buck et al., 1996), le applicazioni hanno riguardato in campo umano maggiormente gli eventi geneticomolecolari associati all' insorgenza di una determinata patologia, in particolare lo sviluppo tumorale, consentendo di identificare profili di espressione delle cellule tumorali, nuovi marker tumorali e nuove terapie. Tuttavia sono stati fatti significativi progressi nell'applicare la LAM anche ai tessuti vegetali e sono stati sviluppati protocolli per specie diverse, incluse riso, mais ed arabidopsis. Esistono diversi sistemi LAM che si basano sull' impiego di strumenti combinati con un microscopio ottico, che di solito permette la visualizzazione del campione in campo chiaro, scuro o fluorescente. Tali sistemi sono varianti riconducibili ai due metodi di base per l'isolamento del "target": Laser Capture Microdissection (LCM) e Laser Excision. Quest'ultimo basato su "taglia e rimuovi" impiega di solito raggi laser UV per asportare i tessuti circostanti al target per fotodecomposizione (Burgemeister, 2005). Il laser impiegato ha una lunghezza d'onda leggermente più alta del picco di assorbimento delle proteine e degli acidi nucleici che per questo non dovrebbero essere danneggiati. Il campione così circoscritto, può essere raccolto con diverse tecniche. Nella tecnica del Laser Pressure Catapulting (LPC) il target tagliato è catapultato grazie ad una forte defocalizzazione dell'impulso laser in un contenitore di raccolta. La raccolta del campione può anche avvenire sfruttando la gravità, grazie ad un particolare tipo di supporto plastico di polietilenenaftalenato (PEN) su cui vengono adagiate le sezioni. Il Laser Cutting ha il vantaggio di evitare contaminazioni grazie al fatto che durante il processo di taglio le cellule confinanti vengono distrutte (Cornea e Mungenast, 2002). Nella LCM, invece, le cellule target vengono "catturate" da una sezione di tessuto tramite una strategia di "fusione-fissaggio-estrazione". La sezione di tessuto viene ricoperta con un film polimerico termoplastico di etil-vinilacetato (EVA) che riveste un "cap". Sotto l'effetto del laser (infrarosso) il film si espande e aderisce alla cellula/e di interesse. La dimensione del contatto tra il film ed il target può essere controllata agendo sulla messa a fuoco, la potenza, la durata e il diametro del raggio laser. Quando le cellule "target" aderiscono al film, il "cap" è sollevato, raccogliendo con esse le cellule. Poiché le cellule "target" sono letteralmente "strappate" via da quelle circostanti, porzioni di cellule indesiderate possono aderire a quelle selezionate a seconda delle relative forze di contatto cellula/film, cellula/cellula, cellula/vetrino. Tali forze dipendono dalla preparazione del tessuto e dalle caratteristiche intrinseche del tessuto stesso, ma una volta ottimizzato il protocollo di preparazione istologica e i parametri del laser per un particolare tessuto, la raccolta di materiale indesiderato è notevolmente ridotta, e comunque può essere limitata dal "blotting" con un nastro adesivo, o per asportazione usando raggi UV. Va sottolineato che sono stati sviluppati "cap" per LCM ad alta sensibilità per limitare i contatti del film solo alle cellule bersaglio. Accanto a guesto, altri vantaggi della LCM, rispetto ad altre tecniche LAM, consistono nel fatto che la raccolta delle cellule target sul cap preserva le loro relazioni spaziali nella sezione originaria e questo, tra l'altro, ne facilita la verifica di qualità; inoltre, la maggior parte dell'energia del laser è assorbita dal film e non dal campione, rendendo improbabile che la sua composizione venga alterata dal laser. Infine, gli strumenti di ultima generazione realizzano una raccolta automatica delle cellule target, che possono essere identificate tramite software di analisi di immagine impostati sulle caratteristiche morfometriche delle cellule bersaglio. Un importante prereguisito per la maggior

parte delle applicazioni LAM è la capacità di ottenere buoni preparati istologici dei tessuti, che da un lato consentano l'identificazione del target, e dall'altro mantengano le macromolecole in uno stato suscettibile di estrazione. Occorre dunque, bilanciare tra la preservazione morfologica e il recupero genomico/proteomico. I tre aspetti chiave per la preparazione di tessuti sono la fissazione, l'inclusione e la colorazione dei campioni. Lo scopo della fissazione è bloccare i processi biologici e preservare l'integrità del campione. I fissativi fanno ciò alterando la struttura dei componenti cellulari, processo che può influenzare l'integrità e l'estraibilità delle macromolecole. Vengono usati due tipi di fissativi chimici: fissativi "cross-linking" (aldeidi, formalina, etc.) che danno dettagli istologici superiori ma comportano una scarsa resa di acidi nucleici e proteine; e fissativi "coagulanti" (acetone, etanolo, etc.) che permettono dettagli istologici buoni mantenendo un recupero delle macromolecole discreto (Gillespie et al., 2002). In alcuni casi il congelamento può essere un'alternativa alla fissazione chimica e, tramite inclusione in mezzo idoneo, i tessuti congelati sono sezionati con il criostato dando il migliore prodotto in termini di RNA. Sfortunatamente, però, il congelamento comporta svantaggi a livello dell'aspetto istologico del campione, a causa della difficoltà di stabilizzare il vacuolo centrale delle cellule vegetali durante il congelamento (Nelson et al., 2006). Poiché quest' organello contiene enzimi lisosomiali e mantiene la pressione di turgore, una sua distruzione risulta in una drammatica perdita dell'integrità del tessuto. Di recente diversi gruppi hanno modificato le procedure standard di criosezionamento per poterlo applicare alla preparazione di tessuti floematici di riso, embrioni agli stadi iniziali di sviluppo in arabidopsis, tessuti epidermici e vascolari di mais; in quest'ultimo caso, i tessuti sono stati fissati prima del congelamento usando un crioprotettivo. Un' alternativa al congelamento è l' inclusione in paraffina, sebbene il recupero delle molecole biologiche è generalmente meno efficiente. Tuttavia, diversi lavori, partendo da sezioni istologiche di vari tessuti vegetali inclusi in paraffina e saggiando diversi metodi di fissazione e di estrazione di RNA, hanno concluso che l' LCM è di generale applicabilità per isolare specifiche cellule vegetali anche da tessuti inclusi in paraffina quali il mesofillo fogliare, il parenchima del peduncolo fogliare, il meristema della radice e del germoglio (Kerk et al., 2003). Anche studi recenti in vari tessuti di Arabidopsis, inclusi i cotiledoni, hanno mostrato che l'uso di paraffina, in combinazione con fissativi coagulanti, dava una resa di RNA in qualità e quantità sufficiente per analisi di RT-PCR e microarray (Kerk et al., 2003). Inoltre, è stata sviluppata una preparazione di paraffina in combinazione con microonde, che richiede circa 5 ore, rispetto ai 4-7 giorni richiesti dalla tecnica tradizionale, che è più efficiente nella preservazione delle molecole, proprio in virtù della rapidità, e che conserva contemporaneamente le proprietà anatomiche dei tessuti. Questa tecnica è stata anche adattata a tessuti vegetali particolarmente delicati, come le foglie di Arabidopsis, mediante lo sviluppo di una variante basata sull'impiego di un tampone fosfato e sulla regolazione della potenza delle microonde (Inada e Wildermuth, 2005). L' altro parametro critico, dopo la fissazione e l' inclusione, è rappresentato dalla colorazione che puo' essere effettuata con differenti colorazioni istologiche. Poiché i coloranti, interagendo con i componenti cellulari come DNA/RNA, possono interferire con il recupero degli acidi nucleici e, in particolare, dell' RNA, vari studi hanno esaminato gli effetti delle colorazioni nucleari sul recupero e sulla successiva amplificazione degli acidi nucleici (Ehrig et al., 2001). I coloranti come ematossilina, "methyl green", toluidina (blue O) e "azure B" danno risultati soddisfacenti sia per quanto riguarda i dettagli istologici che per il recupero e successivo utilizzo degli acidi nucleici (Huang et al., 2002).



www.welgene.com.tw/en Product-LCM.html

#### 1.4.2 Applicazioni della tecnologia LCM

Le prime applicazioni della tecnologia LCM in campo vegetale sono state pubblicate recentemente (Kerk *et* al., 2003; Nakazono *et* al., 2003; Casson *et* al., 2005) mentre in campo umano hanno già dato importanti contributi alla diagnosi di varie infezioni e alla comprensione dei meccanismi genetici di diverse patologie come carcinomi, aterosclerosi, morbo di Alzheimer, sclerosi multipla (Ohyama *et* al., 2002). Nelle piante le principali applicazioni LCM stanno avendo lo scopo di studiare i profili di trascrizione specifici per tipo di cellula (Nelson *et* al., 2006) combinandosi con diversi metodi tra cui "microarray", analisi seriale dell'espressione genica (SAGE) (Datson *et* al., 1999), "454-sequencing cDNA" (Margulies *et* al., 2005). Quest'ultimi sono lo strumento più appropriato per l'analisi del trascrittoma nelle specie di cui non sono disponibili Chip microarray o collezioni di cDNA.

Il primo uso sistematico di librerie di riferimento, trasferite su membrane con la tecnica dei microarray, è stato diffuso nei laboratori europei negli anni '80. La meccanizzazione della tecnica fu utilizzata per la produzione di microarray ad alta densità ed in grandi quantità per l'analisi di interi genomi. Le procedure sperimentali davano la possibilità di creare "fingerprinting" genomici, sequenziamenti basati su ibridazione con oligo, "screening" di ibridazione ad alta densità, mappature ad alta risoluzione e catalogazione di sequenze espresse. Si è venuto poi a creare con il tempo, un sistema di librerie di riferimento ad alta densità, RLDB, che si sono andate man mano ad arricchire in informazioni con il sequenziamento e la conoscenza sempre più risolutiva dei genomi (Vente *et* al., 1999). Per la tecnologia microarray, la piattaforma Affymetrix è stata la prima a riportare un'elevata riproducibilità, sensibilità

e specificità (www.affymetrix.com). La tecnica SAGE si basa sull'analisi comparativa e quantitativa dell' espressione di migliaia di geni attraverso la produzione di piccole sequenze espresse tag (EST) da 13 a 26 bp (Matsumura et al., 2005). Il metodo superSAGE array, che è basato su oligonucleotidi di 26 bp direttamente sintetizzati sul vetrino, è stato usato per analizzare cellule "catturate" con LCM quali, ad esempio, cellule epidermiche di riso infettate dal fungo fitopatogeno Magnaporthe grisea (Matsumura et al., 2005). Una libreria superSAGE è stata generata da cellule di riso implicate nella morte cellulare programmata del coleoptile (Nakazono et al., 2007). La tecnologia "454-sequencing" è un metodo di sequenziamento parallelo, sviluppato recentemente, che ha la capacità di seguenziare 25 milioni di basi in 4 ore risultando 100 volte più veloce del metodo di seguenziamento tradizionale (Margulies et al., 2005). Emrich e collaboratori (2007) hanno usato guesto metodo ottenendo più di 260.000 EST dalle cellule del meristema apicale di mais (SAM) raccolte tramite LCM. Più di 5.000 EST (circa il 13% del totale) erano preferenzialmente espresse nelle cellule SAM rispetto alla plantula. Le EST sovraespresse includevano fattori di trascrizione, fattori di rimodellamento della cromatina, componenti del sistema di silenziamento genico e circa 900 geni con funzione sconosciuta. Il cDNA derivato dalle cellule raccolte con LCM, sequenziato tramite la tecnica "454-sequencing EST", ha consentito di identificare nuovi geni espressi nelle SAM (Ohtsu et al., 2007). Infatti, approssimativamente 30% delle 454-SAM EST non corrisponde a nessuna delle 648.000 EST di mais conosciute. Questo dimostra che la combinazione LCM e sequenziamento veloce fornisce informazioni per i trascritti rari e/o tessuto specifici e dimostra il grande vantaggo di guesto tipo di piattaforma per lo studio dei trascrittomi (Ohtsu et al., 2007).

Studi di profili trascrizionali hanno mostrato che centinaia di trascritti sono espressi differenzialmente tra cellule specializzate e possono essere specifici solo di uno o pochi tipi cellulari (Honys e Twell, 2003; Birnbaum et al., 2003). Ad esempio, profili trascrizionali del polline in maturazione di Arabidopsis mostravano che circa 650-850 trascritti sono specificamente espressi nel polline, a diversi stadi di sviluppo, a confronto con i profili di altri organi dello sporofito (Honys e Twell, 2004). Tessuti vascolari raccolti da coleoptili di mais tramite LCM evidenziavano che il 3% dei trascritti è espresso preferenzialmente nei tessuti vascolari a confronto con cellule epidermiche (Nakazono et al., 2003). Utilizzando l'approccio LCM-microarray, su cellule sinciziali di radici di soia infettate dal nematode Heterodera alvcines Klink e collaboratori (2007) hanno identificato geni differenzialmente espressi nelle cellule sinciziali rispetto alle cellule non infette. In cellule sinciziali, formate durante l' interazione compatibile con il nematode, erano espressi geni come le proibitine, le allene ossido ciclasi e la catena y della ATP sintasi mentre nell' interazione incompatibile erano espressi altri tipi di geni codificanti lipossigenasi (LOX), proteine dello shock termico (HSP 70) e superossido dismutasi (SOD).

La tecnica LCM è stata usata anche per prelevare organelli cellulari come singoli cloroplasti da *Nicotiana tabacum* (Meimberg *et al.*, 2003) o per isolare i cromosomi sessuali in *Silene* (Scutt *et al.*, 1997). Oltre alle applicazioni sopra menzionate, sono in corso studi per ottenere da cellule "catturate" con LCM profili proteici e metabolici (Schnable *et al.*, 2004).

#### 1.5 SCOPI E CONTENUTI DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di analizzare il trascrittoma nei microsporociti di Arabidopsis thaliana per identificare i geni coinvolti nel processo meiotico la cui espressione è regolata dall'acetilazione istonica. A tale scopo nel progetto di dottorato è stata messa a punto la tecnica del Laser Capture Microdissection (LCM) sulle cellule madri del polline (microsporociti) in meiosi. L' LCM è stata combinata con i microarray per ottenere il profilo trascrizionale dei microsporociti nel mutante meiotic chromosome condensation (mcc) a confronto con il controllo C24_{RD29A:LUC}. Il mutante inserzionale mcc, proveniente da "enhancer activation tagging", isolato presso l'istituto CNR di Genetica Vegetale di Portici, sovraesprime una putativa acetilasi istonica (GCN5-like N-acetiltransferasi). In tale mutante è stato dimostrato che l' acetilazione istonica ha un ruolo in meiosi ed, in particolare, nella condensazione e segregazione dei cromosomi, oltrechè nella distribuzione dei chiasmi. La tecnologia LCM ha consentito di indagare se nel mutante mcc l' aumento di acetilazione degli istoni influenzava anche l' espressione genica e se ciò avveniva relativamente ad un set di geni durante la meiosi. Il presente progetto di dottorato ha evidenziato che 150 geni erano differenzialmente espressi durante la meiosi del mutante ed, in particolare, alcune classi di geni quali quelli del ciclo cellulare, dei fattori di trascrizione, della condensazione dei cromosomi, della proteolisi mediata dall' ubiquitina, della ricombinazione meiotica oltre a quelli con funzione sconosciuta. La tecnica LCM combinata ai microarray si è dimostrata valida per determinare il "trascription profiling" dei microsporociti e si può prevedere che possa essere estesa anche ad altre specie vegetali di interesse agronomico. Tale tecnologia prevede come step principali il criosezionamento, la microdissezione laser a cattura (LCM), l' amplificazione e la biotinilazione dell' RNA e l'analisi microarray (GeneChip Affymetrix, ATH1). Il lavoro di tesi si è svolto principalmente presso l'istituto CNR di Genetica Vegetale di Portici mentre la microdissezione delle cellule e l'analisi microarray sono state effettuate presso il laboratorio Gene Core Expression (GE.CO.) in collaborazione con il Dott. De Luca del Centro di Ricerche Genetiche IRGS, Biogem, di Ariano Irpino (AV).

# 2. MATERIALI E METODI

#### 2.1 Materiale genetico

Nella presente tesi di dottorato è stato utilizzato l' ecotipo C24 di *Arabidopsis thaliana* per l' ottimizzazione delle procedure di isolamento dei meiociti tramite LCM. Il mutante "enhanced activaction tagged" *mcc* precedentemente isolato e caratterizzato (Perrella *et al.* 2006, 2008) e la linea C24 omozigote per il gene reporter RD29A::LUC, di seguito indicata come C24_{RAD29A::LUC} (Ishitani *et al.*, 1997), sono stati utilizzati per le analisi LMM. Il genotipo C24_{RAD29A::LUC} è stato utilizzato come controllo. La semina in vitro, il trapianto in suolo e l' allevamento in ambiente controllato (16/8 ore luce/buio a 22°C/18°C) sono state eseguite secondo protocolli standard, come descritto da Weigel e Glazebrook (2002). Il campionamento per l' esperimento microarray ha previsto la raccolta alla fioritura di infiorescenze dallo stelo principale di venti differenti piante e la loro ripartizione in tre repliche biologiche.

#### 2.2 Isolamento di microsporociti da Arabidopsis thaliana

#### 2.2.1 Preparazione istologica delle infiorescenze

Le sezioni istologiche incluse in paraffina sono stato ottenute utilizzando il protocollo di Kerk e collaboratori (2003) con le seguenti modifiche: la durata della fissazione in Carnoy è stata di 24 ore ed i tempi di disidratazione dei campioni in etanolo a concentrazioni crescenti e in etanolo:xilene sono stati ridotti ad 1 ora così come il trattamento con paraffina liquida.

La preparazione delle criosezioni mediante inclusione dei tessuti in TissueTek O.C.T. (Miles Inc, IN, USA) è stata effettuata seguendo il protocollo di Nakazono e collaboratori (2003) con le seguenti modifiche: il tempo di fissazione in Carnoy è stato di 2 ore e alla soluzione crioprotettiva di saccarosio al 30% è stato aggiunto l' RNA Later (Qiagen, CA, USA).

I tessuti sono stati sezionati a 8 µm con il microtomo 2040 (Reichert Jung, NY, USA) o con il criostato CM1850 (Leica, Germania) e montati sui vetrini SuperFrost Plus (Menzel GmbH & Co KG, Germania) o sui vetrini PolysineTM (Menzel GmbH & Co KG, Germania). Le sezioni criosezionate sono state mantenute a -80°C fino all' eliminazione dell' O.C.T. mentre quelle in paraffina a temperatura ambiente. Per I' eliminazione della paraffina e la disidratazione delle sezioni sono stati effettuati passaggi successivi in xilene per 2 volte, in etanolo a concentrazioni crescenti dal 70% (v/v) al 100% per 2 volte ciascuno ed infine in xilene per 2 volte. I trattamenti in etanolo erano di 20 sec e quelli in xilene di 5 min. Per l' eliminazione dell'O.C.T. e la disidratazione delle sezioni congelate, i campioni sono stati trattati con passaggi successivi in etanolo 70% (v/v), H₂O-DEPC, etanolo 95% (v/v), etanolo 100% (v/v), e xilene per 10 min. I trattamenti in etanolo e H2O-DEPC erano di 20 sec per 2 volte. Le sezioni sono state mantenute a temperatura ambiente fino al loro uso per LCM (max entro 2 ore).

#### 2.2.2 Colorazione delle sezioni istologiche

Per l' identificazione dello stadio meiotico le criosezioni sono state trattate con diversi coloranti: Ematossilina di Mayer e soluzione alcolica di Eosina (0,5%), Ematossilina di Harrys ed Eosina (0,5%), Carminio Acetico 2%, Cresyl Violet 0,5% in tampone sodio acetato 0,1M (colorazione di Nissl), Methyl Green 1% in tampone sodio acetato 0,1M seguendo i protocolli standard (Sharma e Sharma, 1980). La colorazione con l' HistoGene LCM Frozen Section Staining kit (Arcturus, CA, USA) è stata effettuata secondo il protocollo descritto dalla casa produttrice.

Per le colorazioni da visualizzare in fluorescenza è stato usato il fluorocromo 4'-6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) alla concentrazione di 10 µg/ml.

Le osservazioni in campo chiaro e in fluorescenza sono state eseguite con il microscopio Leica HC e con il sistema di analisi di immagine utilizzando la TV camera digitale a colori DC300F ed il software di acquisizione Leica IM1000 (Leica, Germania).

#### 2.2.3 Laser Capture Microdissection (LCM)

Per l' isolamento dei microsporociti è stato usato il sistema PixCell II LCM (Arcturus, CA, USA). I parametri del raggio laser utilizzati sono stati i seguenti: diametro di 7,5 µm, potenza di 90-100 mW e durata dell' impulso di 1,5 ms. Ogni impulso laser ha consentito la cattura di 2 microsporociti. Il numero di meiociti isolati in ciascun esperimento è stato calcolato moltiplicando il numero di impulsi laser per la resa di cattura. Le cellule somatiche sono state rimosse con l'uso del CapSure® Clean-up pads (Arcturus, CA, USA) secondo le procedure indicate dalla casa produttrice.

#### 2.3 Estrazione dell' RNA

L' RNA totale è stato estratto dai campioni LCM utilizzando il PicoPure[®] RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) seguendo il protocollo della casa produttrice. L' RNA è stato trattato con RNase-free DNase I (Invitrogen, CA, USA) come indicato dal manuale. La concentrazione dell' RNA è stata misurata mediante spettrofotometro Nanodrop[®] ND-1000 (Agilent Technologies, CA, USA). L' integrità dell' RNA estratto è stata valutata mediante il Bioanalyser 2100 Agilent utilizzando la "New Series II RNA 6000 assays" (RNA 6000 nano assay kit; RNA 6000 pico assay kit) (Agilent Technologies, CA, USA).

#### 2.4 Analisi microarray

#### 2.4.1 Amplificazione RNA, marcatura con biotina del cRNA e ibridazione

L' RNA è stato amplificato e marcato seguendo le procedure indicate dal "Two-Cycle Eukaryotic Target Labelling Assay" descritte nel GeneChip Expression Analysis Technical Manual ad eccezione dell' aggiunta della proteina T4gp32 (4µg) (USB, Italia) nella reazione di retrotrascrizione del primo filamento di cDNA. In breve, 40 ng di RNA totale sono stati utilizzati nella reazione di retrotrascrizione (Two-Cycle cDNA Synthesis Kit, Affymetrix) per la sintesi del cDNA. Il cDNA è stato utilizzato per la trascrizione *in vitro* del cRNA con MEGAscript T7 kit (Ambion Inc./Applied Biosystem, CA, USA). Il cRNA è stato utilizzato per il secondo ciclo di retrotrascrizione del cDNA (Two-Cycle cDNA Synthesis Kit, Affymetrix) e per la sintesi del cRNA biotinilato (GeneChip IVT Labeling kit). La resa in cRNA è stata stimata utilizzando il fluorometro QuBit (Invitrogen, CA, USA) seguendo il protocollo della casa produttrice.

La distribuzione dei pesi molecolari del cRNA (5 µg) è stata stimata mediante elettroforesi su gel al 1% di agarosio in condizioni denaturanti (Sambrook e Russel, 2001) utilizzando il marcatore "RNA CenturyTM–Plus Markers" (Ambion Inc./Applied Biosystem, CA, USA). 15 µg di cRNA marcato e frammentato sono stati utilizzati per l' ibridazione dei Chip Affymetrix Arabidopsis ATH1 (Santa Clara, CA, USA), seguendo le procedure indicate dall' "Eukaryotic Target Hybridization Assay" descritte nel GeneChip Expression Analysis Technical Manual. Il lavaggio di post-ibridazione e di doppia colorazione dei chip è stato effettuato con il protocollo FS450 ed è stata utilizzata la Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450. Per la scansione degli array è stato utilizzato l' Affymetrix GeneChip Scanner 3000 che ha generato le immagini digitali in formato DAT.

#### 2.4.2 Analisi dei dati e classificazione funzionale dei geni

I file DAT sono stati analizzati con il programma GCOS 1.4 (Affymetrix Inc.) normalizzando i dati mediante l'algoritmo "Robust Multialignment Algorithm" (RMA). La normalizzazione è stata effettuata per ciascun chip al 50° percentile e per ogni gene al valore mediano. I valori di espressione ottenuti sono stati analizzati usando il programma GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies, USA) ed i risultati sono stati filtrati selezionando i geni con un "fold-change" > 1,5.

Sono state eseguite analisi della varianza ANOVA utilizzando un valore di p < 0,05. L'analisi di raggruppamento in "cluster" dei geni differenzialmente espressi è stata ottenuta con l'algoritmo "k-means". Il calcolo degli indici di arricchimento delle classi geniche annotate in Gene Ontology (GO) (<u>www.geneontology.org</u>) è stato effettuato utilizzando il programma DAVID (<u>http://david.abcc.ncifcrf.gov</u>) così come descritto da Borges e collaboratori (2008).

#### 2.5 Analisi RT-PCR

L'analisi semiquantitativa RT-PCR è stata eseguita utilizzando il sistema "SuperscriptTM One-Step RT-PCR" (Invitrogen, CA, USA) allestendo una reazione di RT-PCR con 20 ng di RNA totale con i primer DMC1F 5'-ggagggaatggaaaagtg-3' e DMC1R 5'-gcaacgttgaactcctctgcaat-3' disegnati sul gene *DMC1* ed i primer ATA7F 5'-tggtagtagcgttcttggtc-3' e ATA7R 5'-tggtgtttctgaactgagaac-3 disegnati sul gene *ATA7.* I cicli di amplificazione sono quelli suggeriti dal protocollo descritto dalla casa produttrice. I prodotti della reazione di RT-PCR sono stati separati su gel ad alta risoluzione al 2% di agarosio (Sambrook e Russell, 2001).

#### 2.6 Analisi Real Time-PCR quantitativa

L' analisi Real Time-gPCR è stata condotta con il cDNA ottenuto da 1 µg di cRNA dei microsporociti tramite il kit Superscript[™] II RNase H reverse transcriptase con il poly(T) primer (volume finale 20 μL) (Invitrogen, CA, USA) e il kit "Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX" (Invitrogen, CA, USA). La reazione di amplificazione è avvenuta in piastre da 96 pozzetti (Applied, Biosystems, CA, USA) ed è stata allestita in un volume finale di 25 μL, con 12,5 μL di SYBR® Green, 0,5 μL di 10 µM primer, forward e reverse, e 0,2 µL di cDNA. Il ciclo di amplificazione è quello suggerito dal software "ABI Prism 7900 Sequence Detection System" (versione 2.3) stabilendo la Temperatura di Melting (TM) sulla base dei primer utilizzati. Le seguenze dei primer utilizzati sono riportate nella tabella 1. I primer sono stati disegnati utilizzando il software ABI Prism Primer Express (versione 2.0) (Applied Biosystems, CA, USA). I dati di espressione sono stati analizzati con il software RQ manager (versione 1.2) (Applied Biosystems, CA, USA). In particolare, utilizzando come controllo endogeno l'amplicone per la fosforibosil-adenosina transferasi (APT) che permette di normalizzare la guantità di mRNA del gene target, e il genotipo C24_{RAD29A⁺LUC} come calibratore, è stato possibile calcolare l'indice RQ che quantifica i livelli di trascritto del gene considerato.

Gene	Sequenza primer
ΑΡΤ	F 5'-atttgttcccatgagaagcc-3' R 5'-cacctacgtgcatctcaatcgt-3'
RAD51	F 5'-tggtctcattcgtgcaccaa-3' R 5'-tgaagccgaagctgaaggaa-3'
HDA7	F 5'-agctggtgatccgtttggtaca-3' R 5'-cccccaagatcatgagaggaa-3'
CYCB2;4	F 5'-cgagaaagatggttgctttcca-3' R 5'-tggttcagttcttgcagccatga-3'
PP2A	F 5'-tccctttgttggcaagtcagtt-3' R 5'-atcgcggattgagtgaacctt-3'
ASK1	F 5'-caagatcctcgccaaggtgat-3' R 5'-agatcgtcatcggaggtagcag-3'
DMT	F 5'-tcgtggaaaaactgcgtcct-3' R 5'-gcggatcggtgatggaaat-3'
RPT1A	F 5'- gaactgcgaaagagacatccgt-3' R 5'- cgtacattcctgcttcagtgca-3'

 Tabella 1. Primer utilizzati negli esperimenti di Real Time-qPCR

# 3. RISULTATI

#### 3.1 Definizione della tecnica Laser Capture Microdissection (LCM) per il prelievo dei microsporociti in arabidopsis

Allo scopo di studiare il trascrittoma dei microsporociti del mutante iperacetilato *mcc* di *Arabidopsis thaliana* attraverso l'approccio del Laser Microdissection Microarray (LMM), nella presente tesi è stata messa a punto la tecnica per l'isolamento di cellule madri del polline (microsporociti) dal genotipo C24.

#### 3.1.1 Analisi morfologica e cito-istologica delle infiorescenze

Al fine di prelevare le cellule in pre-meiosi e meiosi sono stati individuati gli stadi del boccio fiorale e dell' antera corrispondenti alla microsporogenesi. Dall' osservazione della morfologia dei bocci fiorali, dall'analisi istologica della sezione trasversale degli stessi e dei cromosomi colorati con il DAPI è risultato che la meiosi maschile avviene in C24 allo stadio 9 del fiore e allo stadio 6 dell' antera, mentre la pre-meiosi durante lo stadio 5 dell' antera, così come descritto da Smyth e collaboratori (1990) e Sanders e collaboratori (1999), rispettivamente, per gli ecotipi Landsberg erecta e Wassilewskija. Durante la microsporogenesi il fiore si presenta completamente chiuso e l'intera infiorescenza prelevata per l'analisi ha una lunghezza di 0,5 cm. L' antera durante la pre-meiosi presenta 4 logge ben definite, le cellule che compongono i diversi tessuti sono differenziate (ie. epidermide, tappeto) e tra queste sono visibili le cellule madri del polline (fig. 4 a). In meiosi l'antera presenta invece una maggiore dimensione, il tappeto è vacuolato, lo strato di cellule che compone il "middle layer" è degenerato e sono visibili i microsporociti (fig. 4 b-c). La meiosi risulta terminata e sono osservabili le tetradi durante lo stadio 7 dell' antera (fig. 4 d):



Figura 4. Stadi di sviluppo dell'antera del genotipo C24 individuati tramite colorazione DAPI. Le cellule madri del polline (PMC) in premeiosi e in telofase, e le tetradi (Td) sono indicati.

#### 3.1.2 Preparazione dei tessuti per LCM

La preparazione istologica delle infiorescenze di *Arabidopsis*, da sottoporre ad LCM, ha previsto il confronto tra il metodo della criosezione e quello della paraffina. Nella tabella 2 è riportato il tempo di preparazione dei campioni nelle diverse fasi precedenti al taglio delle sezioni con criostato e microtomo. I risultati ottenuti hanno indicato che il tempo di processamento dei campioni era minore se l'inclusione avveniva mediante O.C.T. Inoltre è stato osservato che la fissazione in Carnoy era idonea in entrambe le metodologie e che l' integrità della morfologia dei tessuti (fig. 5) nelle sezioni istologiche, era conservata e paragonabile nei due metodi. Nei preparati criosezionati è stato osservato che l' infiltrazione in una soluzione di saccarosio al 30% delle infiorescenze prima della loro inclusione era in grado di garantire la crioprotezione del tessuto necessaria durante la fase di congelamento del campione. I dati di letteratura indicano inoltre che il criosezionamento almeno nei tessuti somatici è in grado di determinare una maggiore resa in RNA rispetto al processamento mediante paraffina (Huang *et al.*, 2002).

	Criosezioni ore	Paraffina ore
A) Fissazione con soluzione di Carnoy	2	24
B) Infiltrazione con saccarosio	2,5	0
C) Inclusione	0,5	16
durata A+B+C	5	40

**Tabella 2.** Tempo richiesto per la preparazione delle sezioni istologiche delle infiorescenze di *Arabidopsis* mediante criosezione o inclusione in paraffina.



Figura 5. Sezioni di infiorescenze di *Arabidopsis* ottenute mediante inclusione (a) in paraffina e taglio con microtomo, e (b) in O.C.T e taglio con criostato.

#### 3.1.3 Saggi di colorazione delle criosezioni

Per facilitare l'osservazione dei microsporociti e la loro cattura tramite LCM, le criosezioni sono state soggette a colorazione utilizzando diversi preparati commerciali idonei ad effettuare analisi al microscopio in campo chiaro e compatibili con il metodo LMM per l' ottenimento di RNA. L' analisi ha consentito di determinare che la migliore colorazione si otteneva con "HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit" (Arcturus, CA, USA), ma che questa non risultava comunque accentuare la definizione dei meiociti all'interno dell'antera rispetto ad una sezione non sottoposta a colorazione (fig. 6). I dati di letteratura indicano inoltre che la colorazione dei tessuti determina una minore resa in RNA estratto da cellule di mammifero (Huang *et al.,* 2002). Per garantire una buona resa in RNA si è quindi proceduto alla cattura di meiociti per riconoscimento posizionale di questi su sezioni di infiorescenze non colorate. In questo caso la posizione e l'identificazione dei meiociti nell'antera era confermata tramite colorazione DAPI delle prime due sezioni presenti sullo stesso vetrino. Le sezioni colorate mediante DAPI sono state escluse dalla cattura dei meiociti.



**Figura 6.** Sezioni di antere di *Arabidopsis* sottoposte a diverse colorazioni a confronto con una non colorata. Le sezioni colorate sono state osservate con il vetrino coprioggetto e con Entellan (Merck, Svizzera) mentre quella non colorata è stata disidratata e osservata direttamente con il microscopio del sistema LCM.

#### 3.1.4 Cattura dei microsporociti tramite LCM

La dimensione ridotta dei microsporociti, la loro contiguità con le cellule somatiche e la presenza della parete cellulare complicano notevolmente la cattura dei meiociti con LCM. L' efficienza della cattura è determinata dalla presenza di spazi vuoti nella sezione istologica dovuta alla rimozione delle cellule in seguito ad impulso laser. Al fine di aumentare l' efficienza, di annullare o rendere minima la presenza di cellule del tappeto tra le cellule isolate sono stati saggiati diversi parametri del raggio laser quali, diametro, durata e potenza e diversi tipi di vetrini su cui erano state fissate le sezioni istologiche. Nella tabella 3 sono riportate le prove di cattura dei meiociti effettuate variando la tipologia dei vetrini ("superfrost" e "polysine") e la durata dell' impulso del raggio laser (0,5 ms, 1 ms, 1,5 ms), mantenendo invece costante la potenza (100 mW) e il diametro del raggio laser (7,5  $\mu$ m). I risultati ottenuti hanno indicato che esiste una relazione diretta tra la durata dell'impulso, la specificità e l'efficienza di cattura. In particolare, quest'ultima aumenta con l'aumentare dell'impulso ma la specificità diminuisce. L'utilizzazione dei vetrini "superfrost", che migliorano l'aderenza delle sezioni al supporto tramite interazione elettrostatica, non ha consentito di ottenere la massima efficienza di cattura, che è invece raggiunta con i vetrini polysine; tuttavia ha permesso di mantenere più basso il livello di contaminazione. Nella figura 7 è mostrata l' immagine di una sezione di antera sottoposta ad LCM.

Durata del	Vetrini superfrost		Vetrini polysine 1		Vetrini polysine 2	
raggio laser (ms)	Efficienza di cattura	Presenza Cellule	Efficienza di cattura	Presenza Cellule	Efficienza di cattura	Presenza Cellule
	(%)	somatiche (%)	(%)	somatiche (%)	(%)	somatiche (%)
0,5	40	0	40	0	40	0
1,0	70	7	100	30	90	18
1,5	80	8	-	_	100	20

**Tabella 3.** Efficienza di cattura e presenza di cellule somatiche adiacenti ai microsporociti relativi a tre diversi tempi di applicazione dell'impulso laser. Le sezioni di infiorescenze di arabidopsis sono fissate su due differenti supporti e disidratati in xilene per 10 (superfrost e polysine1) o per 20 minuti (polysine2).



Figura 7. Esempi di cattura di microsporociti con LCM. Fotografia di una sezione di antera prima (a) e dopo la cattura (b), e dei meiociti isolati (c).

#### 3.1.5 Quantità, qualità e specificità dell' RNA

Per determinare il numero di microsporociti da isolare per ottenere la quantità di RNA sufficiente per l'analisi microarray (cfr. par 3.2.1) sono stati condotti esperimenti di estrazione e quantificazione di RNA a partire da campioni con diverso numero di cellule isolate con LCM. I risultati ottenuti hanno indicato che è necessario utilizzare circa 1200 cellule per ottenere una resa in RNA pari a 5-10 ng/μL. La qualità dell' RNA estratto da tali cellule è stata valutata (cfr. Materiale e Metodi, par. 2.4) in base al rapporto 28S/18S delle sub-unità ribosomiali e al parametro "RNA Integrity Number" (RIN). In seguito alla valutazione della qualità dell' RNA si è ritenuto indispensabile l' utilizzo dell' RNA Later (Qiagen) che è in grado di stabilizzare l' RNA direttamente nei tessuti (Kihara *et* al., 2005) (fig. 8). Mediante l'analisi RT-PCR dei

geni *DMC1* e *ATA7* (fig. 9), espressi rispettivamente, nei meiociti in profase I e nel tappeto (Klimyuk e Jones, 1997; Zhao *et* al., 2002), è stato confermato che i microsporociti sono stati isolati allo stadio meiotico di interesse ma che nella fase di cattura delle cellule si ha contaminazione con cellule somatiche.

marcatore	4	5	marcatore	4	5
	RIN	28S/ 18S		RIN	28S/ 18S
Camp. 4	N/A	0	Camp. 4	6.2	0.9
Camp. 5	N/A	0	Camp. 5	6.1	1.05
(a)			(b)		

Figura 8. Immagine dei "gel" virtuali, dei valori di RIN ("RNA Integrity Number") e del rapporto 28S/18S determinati mediante il Bionalyser 2100 (Agilent) dell' RNA estratto da due campioni di meiociti isolati con LCM in assenza (a) o presenza (b) di RNA Later.



**Figura 9.** Analisi di espressione RT-PCR dei geni *ATA7* e *DMC1* in cellule di *Arabidopsis* isolate con LCM. La quantità di RNA nelle reazioni non è stata normalizzata.

# 3.2 Microarray per l'identificazione di geni differenzialmente espressi nel mutante *mcc* di arabidopsis

Il protocollo definito per l' isolamento di meiociti e l' estrazione di RNA totale dalle cellule catturate tramite LCM dal genotipo C24 è stato applicato al mutante *mcc* e al controllo C24_{RD29A:LUC}.

#### 3.2.1 Amplificazione dell' RNA

L' RNA totale dei microsporociti isolati con LCM dai genotipi *mcc* (LCM-mcc) e C24_{RD29A:LUC} (LCM-C), è stato amplificato usando la T7-polimerasi. Al fine di ottimizzare le condizioni di amplificazione e dei microarray l' RNA è stato isolato da tre repliche biologiche costituite in media da 1117 cellule per LCM-mcc e da 1493 cellule per LCM-C (tab. 4). La resa media dell' RNA estratto da LCM-mcc e LCM-C è stato di 118 ng e di 63 ng rispettivamente; dopo il secondo ciclo di amplificazione l' RNA amplificato (cRNA) ottenuto è stato in media di 33  $\mu$ g e di 28  $\mu$ g (tab. 4). L' RNA è stato amplificato di almeno 40000 volte.

		No	Pasa		Secondo Ci	clo Amplificazione
Esperimento	Genotipo	Cellule	RNA(ng)	RNA/cell(pg)	Resa(µg)	Amplificazione*
1	LCM-C	1493,3	63,3	42,2	27,9	47392,7
2	LCM-mcc	1116,7	118,3	107,9	32,9	41584,1
*Calcolata sull'ipotesi che l' RNA poly(A+) è l' 1% dell'RNA totale (Sugiura e Takeda, 2000).						

Tabella 4. Rese dell' RNA amplificato da meiociti catturati con LCM

Il range dei pesi molecolari del cRNA è simile tra le cellule LCM-mcc e LCM- C ed è compreso tra 200 bp e 800 bp. (fig. 10). L' integrità dell' amplificato è stata inoltre valutata durante l'esperimento microarray calcolando il rapporto di espressione delle porzioni 3' e 5' dei geni controllo GADPH e  $\beta$ -actina presenti sui chip che è risultato compreso tra i valori 1 e 2, inferiore al limite massimo di riferimento indicato dall' Affymetrix (n = 6).



Figura 10. Analisi dell' RNA amplificato (cRNA) mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) in condizioni denaturanti.

#### 3.2.2 Analisi Microarray

L' analisi dei profili di trascrizione dei microsporociti è stata effettuata per determinare se l' iperacetilazione istonica causa una modulazione dell' espressione genica nei meiociti di *mcc*. L' analisi microarray è stata svolta presso i laboratori del centro di ricerche genetiche Biogem (Ariano Irpino, AV), in collaborazione con il gruppo del Dott. P. De Luca. Sono stati utilizzati gli array Affymetrix GeneChip ATH1, su cui sono rappresentati 22.392 differenti geni di arabidopsis. Sono stati ibridati sei GeneChip ATH1, effettuando tre repliche biologiche di *mcc* e di C24_{RD29A:LUC}. Dall'analisi t-test ( p<0,05) dei dati normalizzati e filtrati (fold change > 1,5), è risultato che lo 0,66% dei geni rappresentati sul chip mostrava un profilo di espressione alterato. La tabella 5 mostra l'elenco dei 150 geni differenzialmente espressi nel mutante *mcc*. È indicata in tabella la descrizione del gene e il livello di espressione determinato dall' analisi microarray.

FC	Regolazione	Descrizione
2,003	down	acyl-protein thioesterase-related [Arabidopsis thaliana]
1,996	down	605 ribosom al protein L8 (RP L8B) [Arabidopsis thaliana]
1,010	down	Mub R transposable element - like protein (Arabidopais trailana)
1,797	down	partnogenesis-related thaumatin tamily protein (Arabidopsis thaliana)
1 723	down	protesse minitorizeeu storagempiù transfer protein (LTF)
1 711	dowo	John on ware for some
1.701	down	AT MYRL 2 (Arabidopsis m vb-like 2)
1.678	down	F-box family protein-related (Arabidopsis thaliana)
1,655	down	sene scence-associated protein-related
1,654	down	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
1,641	down	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
1,626	down	AtM1/AtM1YB101/M1YB101 (myb domain protein 101)
1,626	down	Uncharacterized mitochondrial protein AtMg00540
1,620	down	epsin N-term inal homology (ENTH) domain-containing protein / clathrin assem bly protein-related
1,618	down	actin-depolymerizing factor, putative [Arabidopsis thaliana]
1,617	down	AT ATH2 (ABC2 homolog 2)
1,611	down	universal stress protein (USP) family protein
1,606	down	SCPL23 (serine carboxypeptidase-like 23) serine carboxypeptidase
1,602	down	cysteine synthiase, putative / O-acetylserine (thio) J-yase, putative / O-acetylserine suimydrylase, putative
1,000	down	m rotor (myo domani protein roz), DNA binding zranscription ador
1,595	down	sublina se naminy protein adhesive/proline-rich protein homolog [Arabidopsis thaliana]
1,594	down	DNA (cytosine-5-)-methyltransterase, putative
1,594	down	transferase, transferring glycosyl groups (Arabidopsis thaliana)
1,578	down	proline-rich family protein
1,577	down	peroxisomal biogenesis factor 11 family protein /PEX11
1,571	down	le othin: cholesterol a cytransterase tamily protein / LACT tamily
1,564	down	NAC1 (Arabidopsis NAC domain containing protein 21, Arabidopsis NAC domain containing protein 22); transcription factor
1,504	down	alexase resistance protein (NDS-LKK Class), putative regulater of ohymnegyna condeporting (RCC1) fem illumentein (king finger protein related
1,561	down	regulator of isomosome contensator (cccr) ranny protein / zinc inger protein-reated
1.557	down	CYP 964 (cytochield), bit Similary 96, subfamily A, polypertide 1); oxygen binding (Arabidopsis thaliana)
1.551	down	En/Spm-like transposon protein [Arabidopsisthaliana]
1 546	dowo	hydroxymroline, rich glyconrotein family protein
1 544	down	CIPK25 (CRL JNTERACTING PROTEIN KINASE 25)
1.543	down	em broo-abundant protein-related [Arabidoo sis thaliana]
1,540	down	Unknown
1,539	down	AMP-binding protein, putative
1,529	down	hom eobox-leucine zipper protein 17 (HB-17)
1,527	down	exportin-related [Arabidopsisthaliana]
1,527	down	glycosyl hydrolase family 1 protein [Arabidopsis thaliana]
1,522	down	proton-dependent oligopeptide transport (POT)
1,518	down	m yo family transcription factor [Arabidopiss thaliana]
1,517	down	MAPRIKN16 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 16)
1,515	down	LAC1 (Laccase 1), copper ion binding / oxforeductase
1,511	down	protoropio-responsive re-instruminy protein (Arabitopiss tranana)
1.505	down	PAPI (PHYTOCHAROME-ASSOCIATED PROTEIN 1) transcription factor
1,504	down	oxidoreductase. 20G-Fe(II) oxydenase family protein
7,776	up	AT LP-3 (Arabidopsis thaumatin-like protein 3)
6,764	up	NIP 7;1 /NLM 6/NLM8 (NOD 26-like intrinsic protein 7;1); water channel
6,290	up	QRT3 (QUARTET 3) [Arabidopsis thaliana]
4,928	up	oxygen binding (P450 family protein) [Arabidopsis thaliana]
4,336	up	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)
4,303	up	nodulin MtN3 family protein [Arabidopsis thaliana]
3,990	up	oxidoreductase family protein [Arabidopsis thaliana]
3,878	up	4-courn aratecoA ligase tamily protein / 4-courn aroycoA synthase tamily protein
3,819	up	wie ⊑4o (matematie neα, em bryolarrest 4o), nyαrolase, hydrolyzing U-glycosyl com poundis [Arabidopsis thallana] auktie as family wratein [Arabidopsis thaliana]
3,810	up	subura se rammy protein (Prabloupsis (maintina) AT AL (AR ABIDODESIS TADE TIM 1): avidoradurtase [Arabidoneis thelispe]
3,700	up	Ar An (ArcAbib On Ston Fand From Fr), usual caladase (Arcabiaupsis (Naliana) RPT18 (regulatory particle triple, 8:18), 8TP ase
3,425	up UD	SIP1:1 (SMALL AND BASIC INTRINSIC PROTEIN 1A)
3,295	up	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
3,194	up	signal peptide peptidase family protein
3,129	up	dihydrofla von ol 4-reductase family / dihydrok aempferol 4-reductase family protein
2,983	up	chalcone and stilbene synthase family protein
2,964	up	similar to aluminum-induced protein-like protein [Thellungiella halophila]
2,935	up	BXL2 (BETA-XYLOSIDASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds

FC	Regolazione	Descrizione
2,278	_ up	MATE efflux family protein [Arabidopsis thaliana]
2,209	up	PBF1 (20S proteasom e beta subunit F1); peptidase
2,102	up	UBC30 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 30); ubiquitin-protein ligase
2,087	up	ACLB-2 (ATP -citrate lyase B-2) [Arabidopsis thaliana]
2,055	up	histone H3.2 [Arabidopsisthaliana]
2,055	up	nodulin MtN3 family protein
2,001	up	IAR4 (IAA-conjugate-resistant 4); pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)
1,986	up	cytochrome P450 family protein [Arabidopsis thaliana]
1,946	up	peroxidase, putative [Arabidopsis thaliana]
1,915	up	SIN-like family protein [Arabidopsis thaliana]
1,911	up	histone H2A, putative [Arabidopsis thaliana]
1,907	up	fiber protein Fb34 [Gossypium barbadense]
1,898	up	transporter-related [Arabidopsis thaliana]
1,876	up	AAA-type ATP ase family protein [Arabidopsis thaliana]
1,874	up	unknown
1,871	up	strictosidine synthase family protein [Arabidopsis thaliana]
1,849	up	PDF1 (65 KD A REGULATOR Y SUBUNIT OF PROTEIN PHOSPHATASE 2A)
1,842	up	ubiquinol-cytochrome C reductase U Q C R X /Q C R 9-like family protein
1,829	up	CYC1 (CYCLIN 1); cyclin-dependent protein kinase regulator
1,808	up	VAP 27-1 (VAMP/SYNAPTOBREVIN-ASSOCIATED PROTEIN 27-1)
1,789	up	PBG1 (20S proteasom e beta subunit G1); peptidase
1,783	up	AR S27A (AR ABIDOP SIS RIBOSOMAL PROTEIN S27); structural constituent of ribosom e
1,762	up	ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit, mitochondrial / Rieske iron-sulfur protein, putative
1,755	up	unknown
1,754	up	AC T7 (actin 7)[Arabidopsis thaliana]
1,750	up	integral mem brane family protein
1,748	up	KAS III (3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE III)
1,742	up	3'-5' exonuclease dom ain-containing protein /K hom ology dom ain-containing/KH dom ain-containing protein
1,740	up	ATRAD 51C
1,727	up	AtRABG3a; GTP binding [Arabidopsis thaliana]
1,716	up	aldose 1-epimerase family protein [Arabidopsis thaliana]
1,697	up	CDC 25 [Arabidopsis thaliana]
1,677	up	SAD1 (SUPERSENSITIVE TO ABA AND DR OUGHT 1) [Arabidopsis thaliana]
2,930	up	Ubiquitin thioesterase otubain-like (Ubiquitin-specific-processing protease otubain-like) (Deubiquitinating enzyme otubain-like)
2,926	up	SKP1 (ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE); ubiquitin-protein ligase
2,887	up	AT GP AT1/GP AT1 (GLYCEROL-3-PHOSP HATE ACYLTRANSFERASE 1); 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase/ acyltra
2,818	up	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)
2,801	up	elongation factor 1-alpha / EF-1-alpha [Arabidopsis thaliana]
2,756	up	AT A20 (Arabidopsis thaliana anther 20)
2,739	up	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase putative / beta-fructosidase, putative
2,689	up	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)
2,649	up	isocitrate dehydrogenase, putative /NADP + isocitrate dehydrogenase
2,609	up	HDA7 (HISTONE DEACETYLASE7); historie deacetylase
2,683	up	ABC transporter family protein
2,531	up	rubber elongation factor (REF) family protein
2,493	up	THIS (TRANSCRIPTION FACTOR IFB)
2,435	up	NADH-ubiquinone oxidoreductase-related
2,412	up	GAPC (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT)
2,377	up	giyoosyi nyarolase tamiiy 17 protein
2,288	up	nitrate transporter (NTP2)
2,281	up	ALITIYAZZU (Arabidupsis thaliana mYAZZ homologue D)

FC I	Regolazione	Descrizione
1,673	up	dehydrogenase, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)].
1,668	up	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase-related
1,648	up	AGE30, DNA binding / transcription factor
1,645	up	GAUT6 (Galacturonosyltransferase 6)
1,640	up	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kD a subunit, mitochondrial
1,630	up	ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative
1,627	up	transcription factor IIB (TFIIB) family protein
1,620	up	oxidoreductase, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and in
1,619	up	ATPDR9/PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9); ATPase, coupled to transmem brane movement of substances
1,619	up	HTA1 (Histone H2A) /RAT5 (RESISTANT TO AGROBACTERIUM TRANSFORMATION 5)
1,614	up	psbF photosystem II protein VI [ Arabidopsis thaliana ]
1,613	up	EIF4G (EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4G)
1,609	up	CYCB2;4 (CYCLIN B2;4); cyclin-dependent protein kinase regulator
1,609	up	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
1,606	up	unknown
1,591	up	m olybdopterin biosynthesis MoaE fam ily protein [Arabidopsis thaliana]
1,587	up	ATRSP31 (ARGININE/SERINE-RICH SPLICING FACTOR 31)
1,584	up	splicing factor, putative
1,572	up	putative transmembrane protein
1,556	up	
1,552	up	ATRANGAP1 (RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN 1); nucleic acid binding
1,550	up	VEP1 (VEIN PATTERNING 1); binding / catalytic [Arabidopsis thaliana]
1,544	up	m alate dehydrogenase, cytosolic, putative [Arabidopsis thaliana]
1,533	up	EMB2759 (EMBRYO DEFECTIVE 2759)
1,532	up	VAMP7B (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 7B)
1,526	up	ATPTR3/PTR3 (PEPTIDE TRANSPORTER PROTEIN 3); transporter
1,526	up	integral membrane family protein
1,518	up	strictosidine synthase fam ily protein [Arabidopsis thaliana] (path way auxine)
1,507	up	Acetyltransferase; catalyzes trichothecene 3-0-acetylation, suggesting a possible role in trichothecene biosynthesis
1,503	up	translocon-associated protein alpha (TRAP alpha) family protein

**Tabella 5.** Elenco dei geni differenzialmente espressi (p-value<0,05 e fold-change 1,5 in scala lineare) nel mutante iperacetilato di Arabidopsis thaliana mcc.</th>

Il 68% dei geni è risultato sovraespresso, mentre il 32% sottoespresso. In figura 11 sono mostrate le categorie delle funzioni molecolari individuate per i geni differenzialmente espressi. Dalla classificazione secondo le annotazioni depositate in Gene Ontology (GO) (www.geneontology.org) è emerso che la più alta percentuale dei geni ha attività catalitica o che è coinvolta nella formazione di legami con altre molecole. Inoltre sono stati individuati geni delle categorie di regolazione dell' attività di trascrizione e dell' attività enzimatica. Questa ultima classe funzionale non è stata ritrovata per i geni sottoespressi.



Figura 11. Rappresentazione schematica delle funzioni molecolari definite da Gene Ontology dei geni sovra e sotto espressi in *mcc*. Sono indicati il numero e la percentuale relativa dei geni presenti in ciascuna categoria.

Il programma bioinformatico DAVID, sviluppato dal NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) ha consentito di individuare diversi cluster genici. Cinque cluster sono stati messi in evidenza e sono mostrati in tabella 6. I valori di indice di arricchimento più alti si sono avuti per i cluster dei geni coinvolti nella risposta agli stimoli ormonali e chimici e per i fattori di trascrizione. Nei meiociti di mcc, infatti, sono risultati differenzialmente espressi geni coinvolti nel meccanismo di trasduzione del segnale, come per esempio quelli codificanti per una GTPasi, per la proteina di legame alla GTPasi RCC1, per una MAPKKK e una serina treonina fosfatasi PP2A. Per quanto riguarda i fattori di trascrizione sono risultati differenziamente espressi quattro geni appartenenti alla famiglia MYB, due alla famiglia TFIIB, due appartenenti alla superfamiglia dei fattori HD "Homeodomain", ed uno della famiglia "basic Helix-Loop-Helix" (bHLH). Un' altra classe di geni differenzialmente espressi sono quelli coinvolti in meccanismi catalitici, come quelli del pathway di proteolisi mediata dall' ubiquitina, ovvero due componenti del proteasoma 20S, due geni codificanti per enzimi ubiquitina ligasi ed un gene codificante per una AAA-ATPasi, RPT1A, che fa parte della subunità di regolazione 19S del proteasoma 26S. Sono sovra rappresentati anche il cluster dell' organizzazione e biogenesi dei cromosomi e quello del ciclo cellulare. Geni codificanti per l'istone H3.3, per la proteina HTA1 (membro della famiglia H2A) e per una putativa proteina istonica H2A sono compresi nel primo cluster mentre due cicline di tipo B (CYCB1;1 e CYCB2;4) e la Chinasi Ciclina Dipendente CDC25 sono compresi nel secondo cluster.

Cluster	Annotazione	Enrichment score
1	Risposta a stimoli ormonali, chimici e fattori	2,11
	di trascrizione	
2	Attività aciltransferasica	1,75
3	Metabolismo dei lipidi	1,49
4	Risposta a stress	1,38
5	Trasporto peptidico	1,12
6	Ciclo cellulare	1,02
7	Organizzazione dei cromosomi e biogenesi	0,79
8	Attività ossido-reduttasica	0,35

Tabella 6. Classificazione funzionale, secondo l'indice di arricchimento del programma DAVID<br/>dei geni diversamente espressi nei meiociti di mcc. Le annotazioni Gene Ontology<br/>dei geni sono state raggruppate secondo l'indice di arricchimento rispetto a tutti i<br/>geni presenti sull'array ATH1. I termini delle annotazioni associati ad ogni cluster<br/>sono stati selezionati manualmente.

Nella figura 12 è riportato il raggruppamento in cinque cluster dei geni differenzialmente epressi effettuato mediante l'algoritmo K-means del programma GeneSpring 7.3 (MacQueen, 1967). I geni appartenenti ad uno stesso cluster hanno un andamento dei valori di espressione simili. Questa analisi consente di identificare geni che potrebbero presentare uno stesso meccanismo di regolazione dell'espressione.



Figura 12. Raggruppamento per K-means dei 150 geni in 5 cluster. Per ogni cluster è riportato il numero di geni contenuto.

#### 3.2.3 Analisi Real Time-PCR quantitativa

Per la conferma dei dati di espressione genica ottenuti dai microarray, è stato selezionato un gruppo di geni differenzialmente espressi nei meiociti di *mcc*. La validazione dei dati è stata condotta mediante Real Time-qPCR con il cRNA utilizzato per l'ibridazione dei Genechip ATH1.

In tabella 7 sono riportati i sette geni su cui è stata condotta l'analisi. Questi sono stati scelti in base alle loro putative funzioni biologiche in meiosi e per la buona rappresentatività in ognuno dei cinque cluster (tab. 7; fig. 12). L'analisi di espressione ha confermato i risultati dei microarray per sei dei sette geni per i quali i valori di espressione ottenuti dalle due metodologie sono concordi (tab. 7). In figura 13 sono mostrati i livelli di espressione relativa dei geni analizzati.

			Valori di espressione	
Geni	Numero ID AGI	Cluster	Real Time	Microarray
RAD51	At2g45280	K1	+1,5±0,21	+1,7
CYCB2;4	At1g76310	K1	+3,6±0,14	+1,6
DMT	At4g08990	K2	+10,6±0,10	-1,5
ASK1	At1g75950	K3	+2,8±0,51	+2,9
HDA7	At5g35600	K3	+2,1±0,52	+2,6
PDF1	At3g25800	K4	+1,9±0,10	+1,8
RPT1A	At1g53750	K5	+2,4±0,11	+3,7

**Tabella 7.** Sono indicati i cluster di appartenenza ed i valori di Fold Change ± la deviazione standard di 7 geni identificati attraverso gli esperimenti di microarray e validati mediante Real Time-qPCR.



**Figura 13.** Analisi di espressione mediante Real Time-qPCR dei geni *ASK1, RAD51, HDA7, PDF1, CYCB2;4* e *RPT1A*. Sono rappresentati la media e la deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti e di 9 repliche totali. Al genotipo controllo C24_{RD29A:LUC} è stato assegnato il valore 1.

# 4. DISCUSSIONE

#### 4.1 La strategia LMM (Laser Microdissection Microarray)

Nella presente tesi di dottorato è stato confrontato il trascrittoma dei microsporociti del mutante *meiotic chromosome condensation (mcc)* di *Arabidopsis thaliana* e del controllo C24_{RAD29A:LUC}. La tecnica del Laser Capture Microdissection (LCM) ha consentito per la prima volta di isolare microsporociti in pianta e l' analisi microarray di popolazioni di un singolo tipo cellulare, si è rivelata utile per l' individuazione di geni espressi nei meiociti regolati da uno stato di iperacetilazione istonica.

#### 4.2 Lo stato di acetilazione della cromatina influenza la trascrizione

Le variazioni di espressione osservate in *mcc* sono state determinate dall' iperacetilazione istonica mediata dall' aumento di espressione di una putativa acetiltransferasi istonica nei bocci fiorali del mutante.

Ci sono diversi esempi in letteratura in cui i cambiamenti nello stato dell' acetilazione istonica causano una variazione dei livelli di espressione genica. Nei mutanti gcn5 e ada2b di Arabidopsis thaliana, in cui si ha un' alterazione nella formazione dei complessi acetiltransferasici ADA e SAGA, è stato osservato che il 5% degli 8.200 geni presenti su chip microarray (Affymetrix) risultava differenzialmente espresso (Vlachonasios et al., 2003). La mutazione nel gene HISTONE DEACETYLASE 1 (ATHD1) di Arabidopsis thaliana, ha determinato la variazione di circa il 7% del trascrittoma (Tian et al., 2004). Un simile risultato è stato osservato anche in cellule staminali embrionali di topo in cui il gene HDAC1, codificante per una deacetilasi istonica, era stato mutato (Zupkovitz et al., 2006). Il gene Flowering Locus D (FLD) che regola la transizione alla fase riproduttiva in arabidopsis reprime l'espressione del locus Flowering Locus C (FLC), attraverso un meccanismo di deacetilazione istonica (He et al., 2003). In lievito GCN5, coinvolto nell' acetilazione dell' istone H3, attiva la trascrizione del gene IME2, la cui espressione è richiesta per la replicazione del DNA in meiosi, per la ricombinazione e la formazione di spore. Il gene RPD3, che codifica per una deacetilasi dell' istone H4, diversamente da GCN5, media la repressione dell' espressione di IME2 durante la crescita vegetativa (Burgess et al., 1999). Come atteso dai dati presenti in letteratura anche nel mutante mcc si è osservata un' alterazione del trascrittoma ed, in particolare, 150 geni sono risultati differenzialmente espressi durante la meiosi. Le principali classi geniche interessate da questo cambiamento sono state quelle della struttura della cromatina, della proteolisi mediata dall' ubiquitina, del ciclo cellulare, dei fattori di trascrizione, del segnale di trasduzione oltre a quelli con funzione sconosciuta. Di seguito si riportano i processi biologici e molecolari nei guali si può ipotizzare che l'acetilazione istonica abbia un ruolo chiave.

#### 4.2.1 Dinamica e struttura della cromatina

La dinamica di condensazione dei cromosomi, processo di fondamentale importanza per la meiosi, è fortemente influenzata dallo stato di acetilazione delle proteine istoniche. L' azione svolta dalle acetilasi (HAT) e deacetilasi (HDAC) determina un equilibrio dinamico tra stato acetilato e deacetilato della cromatina che cambia durante le diverse fasi della meiosi. Ad esempio, negli oociti di topo gli istoni H3 e H4, acetilati in profase I, sono successivamente sottoposti ad intensa deacetilazione (Kim *et* al., 2003; Sarmento *et* al., 2004). Gli effetti delle mutazioni o della tricostatina che compromettono la deacetilazione si hanno sulla progressione meiotica, la ricombinazione e la segregazione dei cromosomi (cfr. Introduzione, par. 1.2).

Nel mutante *mcc,* analizzato in questa tesi, la deacetilasi HDA7 è risultata sovraespressa ed è ipotizzabile che la sua induzione sia richiesta per ristabilire i livelli normali di acetilazione istonica alterati dalla sovraespressione del gene *MCC* e, quindi, ripristinare la struttura della cromatina.

In mcc sono sovraespressi anche geni codificanti la variante istonica H3.3, una putativa proteina istonica H2A e la proteina HTA1 (membro della famiglia H2A). E' noto che le cellule animali della linea germinale hanno un numero elevato di varianti istoniche (Kimmins e Sassone-Corsi, 2005). H3.3 è una variante che viene inclusa nella cromatina durante la meiosi ed è apparentemente associata all'eucromatina. La variante H3 conosciuta come CENP-A nell'uomo e HTR12 in arabidopsis è presente nei nucleosomi a livello dei centromeri, sia nelle cellule mitotiche che meiotiche, ed è considerata come il segnale epigenetico che conferisce l' identità centromerica (Morris e Moazed, 2007; Talbert et al., 2002). Gli istoni H2A e H2B hanno varianti specifiche nei testicoli umani e sono caratterizzate da siti addizionali per la fosforilazione alla coda N-terminale (Kimmins e Sassone-Corsi, 2005). Non è noto se simili varianti istoniche sono incorporate anche nella meiosi delle piante. Nel genoma di arabidopsis sono presenti 15 geni che codificano per l'istone H3, di cui cinque codificano per la variante H3.1, tre per la variante H3.3 e cinque per proteine H3.3-like. In drosophila e' stato dimostrato che la variante istonica H3.3 è coinvolta nel pathway di assemblaggio degli istoni indipendente dalla replicazione (RI) ed è associata alla cromatina trascrizionalmente attiva (Ahmad e Henikoff, 2002). Infatti nel pathway RI la sostituzione dell'istone H3 con H3.3 innesca l'attivazione dei geni silenziati (Ahmad e Henikoff, 2002). La sovraespressione di H3.3 evidenziata nella presente ricerca potrebbe essere la causa dell'induzione di alcuni dei geni identificati nell' esperimento microarray la cui espressione non dipenderebbe direttamente dalla proteina MCC.

Analogamente ad *HDA7* la sovraespressione delle varianti istoniche nel mutante *mcc* è spiegabile nell'ambito di un possibile processo messo in atto per ristabilire il livello di base di acetilazione istonica.

#### 4.2.2 La proteolisi mediata dall' ubiquitina

Il processo che controlla il turnover proteico attraverso la proteolisi mediata dall' ubiquitina è un processo fondamentale nella regolazione della maggior parte delle attività metaboliche cellulari. Il suo coinvolgimento è stato riscontrato nella transizione dalla fase G1 alla fase S e nel passaggio da metafase ad anafase tramite il Complesso di Promozione dell'Anafase/Ciclosoma (APC/C) (Hershko, 1997), oltre che negli eventi di gametogenesi e fertilizzazione (Sakai *et* al., 2004). Nei meiociti del mutante *mcc*, due geni codificanti per due componenti del proteasoma 20S, due geni ubiquitina ligasi ed un gene RPT1A sono risultati sovraespressi. La subunità 20S del proteasoma rappresenta la porzione con funzione di degradazione del complesso multi enzimatico noto come proteasoma 26S mentre RPT1A è una AAA-ATPase che fa parte della subunità 19S del proteasoma che ha anche la funzione di regolare l'ingresso delle proteine che saranno degradate (Kurepa e Smalle, 2008).

Recenti studi compiuti sulle funzioni delle acetilasi/deacetilasi hanno dimostrato che questi enzimi sono coinvolti nella regolazione della stabilità proteica possedendo una funzione di ubiquitinazione intrinseca oppure come componenti dei complessi proteolitici. In mammifero è stato dimostrato che l' acetilazione del fattore trascrizionale E2F-1 ad opera del complesso acetiltransferasico p300/CBP ne promuove la degradazione (Galbiati *et al.*, 2005), così come avviene per il fattore trascrizionale HIF-1 $\alpha$  dei geni che rispondono all' ipossia (Lee *et al.*, 2004). Evidenze simili non sono ancora state riscontrate in pianta; tuttavia, un'ipotesi plausibile, per spiegare l'aumento di espressione dei geni coinvolti nel pathway di proteolisi mediato dall'ubiquitina, riscontrato nei meiociti del mutante *mcc*, potrebbe essere la necessità di degradare le proteine istoniche destabilizzate dall'aumento di acetilazione causato dalla sovraespressione di *MCC*.

La subunità 19S del proteasoma oltre ad avere un ruolo nella degradazione proteica è coinvolta nella trascrizione dipendente dall' RNA polimerasi II (Pol-II) (Ferdous *et al.*, 2002). È stato infatti dimostrato che la subunità 19S interagisce direttamente con il complesso di acetilazione SAGA favorendone il legame alla cromatina (Baker e Grant, 2007) nella regione codificante dei geni trascritti. Durante la fase di elongazione della trascrizione, SAGA interagisce con la coda C-terminale di Pol-II acetilando i nucleosomi nella regione trascritta. L' esclusione dei nucleosomi mediata dall'acetilazione garantirebbe alla Pol-II la massima processività (Baker e Grant, 2007). Questi dati indicano una correlazione tra il proteasoma, l' acetilazione istonica e la trascrizione rafforzando l' ipotesi che MCC potrebbe indirettamente modificare l' espressione di alcuni geni nel mutante.

Un altro gene che è risultato sovraespresso nei meiociti di *mcc* è il gene *ASK1* di arabidopsis, omologo del gene umano e di lievito *SKP1* del complesso ubiquitina ligasi Skp1-Cullin-F-box (SCF). Studi sul mutante *ask1* di arabidopsis hanno dimostrato che la proteina è coinvolta in meiosi, nell' appaiamento e nella separazione dei cromosomi omologhi e nella formazione del complesso sinaptinemale (Wang *et al.*, 2004). Yang e collaboratori (2006) hanno ipotizzato che alcune proteine sono degradate in meiosi attraverso il processo proteolitico ubiquitina-dipendente. Poiché tale processo sembra particolarmente attivo nella meiosi del mutante *mcc*, l' espressione di *ASK1* è coerente con il comportamento degli altri componenti. La coniugazione dei monomeri di ubiquitina sulle proteine bersaglio della degradazione è catalizzata dal complesso ubiquitina ligasi E3

(SCF) mentre il riconoscimento specifico della proteina avviene attraverso le proteine F-box (Lechner *et* al., 2006). In *mcc* oltre ad *ASK1* è differenzialmente espresso un gene codificante una proteina F-box indicando che MCC potrebbe essere in grado di influenzare la degradazione di proteine in modo specifico.

#### 4.2.3 Il ciclo cellulare

I componenti del ciclo cellulare sono ampiamente conservati tra gli organismi eucariotici (Mironov et al., 1999). L' espressione alternata di combinazioni distinte di Chinasi Dipendenti da Cicline (CDKs) e di cicline sono necessarie per la progressione attraverso le differenti fasi del ciclo cellulare e della meiosi (Gutierrez, 2005; De Veylder et al., 2007). Nei microsporociti di mcc sono risultate sovraespresse due cicline di tipo B (CYCB1;1 e CYCB2;4) ed un gene che codifica per una CDC25 che in lievito è coinvolta nella progressione del ciclo cellulare e nella sporulazione (Hartwell LH et al., 1973; Dawes e Calvert, 1984). La sovraespressione di AthCDC25 in Schizosaccharomyces pombe induce la riduzione della dimensione delle cellule in mitosi (Sorrell et al., 2003) ma non è ancora nota la sua funzione nel ciclo cellulare in pianta. L'espressione ectopica della ciclina AthCYCB1;1 in arabidopsis accelera la proliferazione delle cellule di radice indicando che questa ciclina è coinvolta nella divisione cellulare in pianta (Doerner et al., 1996), mentre nessuna caratterizzazione è stata condotta sulla ciclina CYCB2;4. Generalmente in arabidopsis le cicline della classe B sono coinvolte nella fase G2 o nella transizione G2/M. Dalle evidenze riportate in letteratura in cui alcune cicline sono essenziali per la fase S di sintesi del DNA in premeiosi (Stuart e Wittenberg, 1998;), per la ricombinazione (Borde et al., 2000; Henderson et al., 2006) e per la progressione attraverso la fase di pachitene durante la meiosi I (Shuster e Byers, 1989) in lievito, sarà interessante indagare sulla funzione meiotica delle cicline sopra riportate in arabidopsis.

#### 4.2.4 Fattori di trascrizione

La regolazione dell'espressione genica a livello della trascrizione influenza o controlla molti processi biologici in una cellula o in un organismo, come ad esempio la progressione del ciclo cellulare, il bilanciamento metabolico e fisiologico e le risposte all'ambiente (Riechmann *et al.*, 2000). I fattori trascrizionali sono definiti generalmente come proteine che hanno capacità di legame al DNA in maniera specifica e sono capaci di attivare o reprimere la trascrizione. Oltre il 5% del genoma di arabidopsis codifica per fattori di trascrizione. Nei meiociti di *mcc* sono risultati differenzialmente espressi quattro fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia MYB, due alla famiglia TFIIB, due alla superfamiglia dei fattori HD ed in particolare un "homeobox-leucine zip" (HD-Zip) ed il fattore WUSCHEL (Ariel *et al.*, 2007), una proteina della famiglia "basic Helix-Loop-Helix" (bHLH) ed una della famiglia MADS-box. Le proteine MYB possono essere classificate in tre sottofamiglie in relazione al numero di ripetizioni del dominio MYB: MYB3R, R2R3MYB ed MYB1R-like. Dei quattro fattori di trascrizione MYB ritrovati sotto espressi nei meiociti di *mcc* due

appartengono alla sottoclasse R2R3-MYB (MYB101 e MYB107) e due a MYB1Rlike (MYBL2 e il locus At3g11280). I geni MYB di guest'ultima classe sono stati poco studiati dal punto di vista funzionale ma alcuni di essi sono coinvolti nel mantenimento del ciclo circadiano (Schaffer et al., 1998; Wuang e Tobin, 1998; Green e Tobin, 1999; Alabadi et al., 2001; Mizoguchi et al., 2002; Kuno et al., 2003) e nel controllo della morfogenesi cellulare (Kirik et al., 1996; Wada et al., 1997; Lee e Schiefelbein, 2002). In particolare il fattore MYBL2 regola la trascrizione di geni della biosintesi degli antociani (Matsui et al., 2008), dei flavonoidi (Dubos et al., 2008) e la formazione dei tricomi in arabidopsis (Kirik et al., 1996; Sawa, 2002). Per quanto riguarda i fattori R2R3MYB è stato riportato il loro coinvolgimento in numerosi processi come la regolazione del metabolismo secondario (Borevitz et al., 2000; Jin et al., 200; Nesi et al., 2001; Baudry et al., 2004), della morfogenesi cellulare (Payne et al., 1999; Lee e Schiefelbein, 1999, 2001; Higginson et al., 2003), della formazione dei meristemi, dello sviluppo fiorale e del seme (Kirik et al., 1998; Li et al., 1999; Timmermans et al., 1999; Penfield et al., 2001; Schmitz et al., 2002; Shin et al., 2002; Steiner-Lange, 2003), del controllo del ciclo cellulare (Ito et al., 2001; Araki et al., 2004), nelle risposte a diversi stress biotici (Sugimoto et al., 2000; Vailleau et al., 2002) ed abiotici (Hemm et al., 2001; Stockinger et al., 2001; Abe et al., 2003; Denekamp e Smeekens, 2003; Nagaoka e Takano, 2003) e nei pathway di segnalazione della luce e degli ormoni (Ballesteros et al., 2001; Gòmez-Cadenas et al., 2001; Gocal et al., 2001; Seo et al., 2003; Newman et al., 2004). In letteratura non sono riportate le funzioni biologiche del fattore MYB101, che risulta regolato dalla luce ed inducibile da GABA (Quaedvlieg et al., 1996; Gocal et al., 1999), e del fattore MYB107 che risulta attivato in risposta a trattamento con acido salicilico (Yanhui et al., 2006).

I fattori di trascrizione della famiglia MADS sono stati identificati in un primo momento come regolatori dell' identità degli organi fiorali e quindi anche in altri processi dello sviluppo come l' identità dei meristemi, lo sviluppo delle radici, la deiscenza dei frutti e il tempo di fioritura (Riechmann e Meyerovitz, 1997; Theissen et al., 2000). In generale i MADS box possono essere di tipo I, ossia codificati da geni con uno o due esoni o di tipo II codificati da geni che hanno sempre più di cinque esoni e che generalmente presentano oltre al dominio N terminale MADS, comune anche al tipo I, tre domini addizionali definiti I-, K- e Cdomain (Munster et la., 1997). Nell'ambito dei MADS di tipo I sono presenti i tre sottogruppi M $\alpha$ , M $\beta$  e M $\gamma$  mentre nel tipo II i due sottogruppi MIKC^c e M $\delta$ . Quest' ultimo presenta solo sei geni che si differenziano dai MKC^c per l'assenza del dominio K chiaramente identificabile e per la struttura genica molto più complessa (Kofuji et al., 2003; Martinez-Castilla e Alvarez-Buylla, 2003; Nam et al., 2004). Nei meiociti di mcc è risultato sovraespresso il fattore AGL30 del gruppo M\delta. Verelst e collaboratori (2007) hanno approfonditamente studiato i fattori MADS in arabidopsis e tra questi anche AGL30 che risulta far parte di un gruppo di geni MADS-M₈ espressi quasi esclusivamente in polline trinucleato. In particolare gli autori hanno dimostrato che la proteina AGL30 dimerizza con altri due fattori MADS, AGL66 e AGL104, e che i mutanti ag/66 e ag/104 non mostrano alterazioni fenotipiche a livello sporofitico, della fertilità e della germinabilità pollinica ma che il polline del doppio mutante agl66/agl104 non germina in vitro, dimostrando guindi che i complessi AGL30/66 e AGL30/104 formati sono tra loro ridondanti.

I fattori di trascrizione TFIIB, at2g41630 e at3g57370, sono risultati sovra espressi nei meiociti di *mcc*. La proteina TFIIB è una componenete del complesso trascrizionale deputata all' espressione dei geni trascritti dalla RNA polimerasi II. In particolare TFIIB stabilizza il complesso DNA-proteina determinato dall' associazione con TFIID, con "TATA binding protein" (TBP) e con i "TBP associated factors" (TAF) (Imamura *et* al., 2008).

I fattori trascrizionali Basic helix-loop-helix (bHLH) svolgono numerose funzioni nella regolazione della proliferazione cellulare e differenziamento cellulare negli organismi animali mentre in pianta è stato dimostrato che regolano la biosintesi degli antociani in mais (Heim *et al.*, 2003) e il differenziamento dei tricomi in arabidopsis (Payne *et al.*, 2000). L' unica evidenza relativa al bHLH sovraespresso nei meiociti di *mcc* riguarda la sua espressione specifica in infiorescenze e silique di arabidopsis.

I fattori HD rappresentano un'ampia famiglia di regolatori della trascrizione caratterizzati dal dominio HD. I membri di guesta superfamiglia si differenziano sia per la sequenza codificante l' HD, sia per la sua lunghezza e localizzazione nella proteina e per l'associazione con altri domini. Sulla base di queste differenze le proteine vegetali con dominio HD sono suddivise in 6 famiglie: HDzip, PHD finger, BELL, ZF-HD, WOX, KNOX. Questi fattori trascrizionali sono dei regolatori chiave implicati nella determinazione del destino cellulare e del differenziamento sia in pianta che in animali (Deveaux et al., 2008). Il pattern di espressione dei geni WOX in diversi organi vegetali e in diversi tipi cellulari suggerisce un loro importante ruolo durante l'organogenesi. In letteratura è riportato che il gene WUS, appartenente alla famiglia WOX, è espresso in una regione molto ristretta del meristema apicale e controlla il destino delle cellule meristematiche (Nardmann e Werr, 2006; Gallois et al., 2004; Park et al., 2005; Kamiya et al., 2003; Wurschum et al., 2006; Zuo et al., 2002). Inoltre Bertrand e collaboratori (2003) hanno evidenzato che il gene WUS è sovraespresso a seguito della mutazione del gene AtGNC5 e presenta un pattern di localizzazione dell'espressione esteso in tutto il meristema apicale della infiorescenza primaria. Quest' alterazione causa la trasformazione omeotica degli organi del fiore e la produzione ectopica dei carpelli in atgcn5. Nei meiociti di mcc è stata osservata la sottoespressione di WUS; tuttavia l' alterazione dello sviluppo fiorale (assenza di petali, formazione di extracarpelli) osservato talvolta nel mutante mcc suggerisce che questo gene possa essere differenzialmente espresso anche in altri tessuti. Un ulteriore fattore di trascrizione sottoespresso in meiociti di mcc è PAP1 che appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali AUX/IAA ed è coinvolto nella trasduzione del segnale indotta dal fitocromo A (PHYA) (Yang et al., 2002).

Poiché per la maggioranza dei fattori di trascrizione sopra descritti non è noto se abbiano una specifica funzione in meiosi e siano influenzati dall'acetilazione istonica sarà di notevole interesse effettuare ulteriori indagini.

# 5. CONCLUSIONI

La ricerca svolta durante il dottorato ha riguardato l' analisi del trascrittoma nei microsporociti di *Arabidopsis thaliana* ai fini dell' identificazione dei geni coinvolti nel processo meiotico la cui espressione è regolata dall' acetilazione istonica. A tale scopo è stata messa a punto la microdissezione laser a cattura (LCM) sui meiociti maschili. L' LCM combinata con i microarray (LMM) è stata applicata nel mutante *meiotic chromosome condensation (mcc)* e nel wild type per ottenere il profilo trascrizionale dei microsporociti. Il mutante inserzionale *mcc*, proveniente da "enhancer activation tagging", isolato presso l'Istituto CNR di Genetica Vegetale di Portici, sovraesprime una putativa acetilasi istonica (GCN5-like N-acetiltransferasi). In tale mutante era stato dimostrato che l'acetilazione istonica ha un ruolo in meiosi ed, in particolare, nella condensazione e segregazione dei cromosomi, oltrechè nella distribuzione dei chiasmi. E' stata usata la tecnologia LMM per indagare se nel mutante *mcc* l'aumento di acetilazione degli istoni influenzava anche l'espressione genica e se ciò avveniva relativamente ad un set di geni durante la meiosi.

I principali risultati del progetto di dottorato hanno evidenziato che:

- La tecnica Laser Microdissection Microarray (LMM) è valida per determinare il "trascription profiling" di microsporociti. Tale tecnologia può essere estesa anche ad altre specie vegetali di interesse agronomico.
- L'aumento dell' acetilazione degli istoni influenza l'espressione genica durante la meiosi.
- Centocinquanta geni sono differenzialmente espressi nei microsporociti del mutante mcc. Alcune classi di geni quali quelli del ciclo cellulare, dei fattori di trascrizione, della condensazione dei cromosomi, della proteolisi mediata dall' ubiquitina, della ricombinazione meiotica e di trasduzione del segnale sono di particolare interesse biologico. Sei geni, rappresentativi di alcune classi sopra citate, hanno confermato i dati di espressione dei microarray.

I risultati di questa tesi contribuiscono a formulare nuove ipotesi di lavoro al fine di chiarire la regolazione del processo meiotico in pianta.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. Plant Cell 15: 63-78.

AGI (The *Arabidopsis* Genome Initiative) (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408: 796-814.

Ahmad K, Henikoff S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. Mol Cell. 9: 1191-1200.

Akiyama, T., Nagata, M., and Aoki, F. (2006) Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. PNAS 103: 7339-7344.

Alabadi D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Mas P., Kay S.A. (2001) Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the Arabidopsis circadian clock. Science 293: 880-883.

Allfrey V.G., Faulkner R., Mirsky A.E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. PNAS 51: 786-794.

An W., Kim J., Roeder R.G. (2004) Ordered kooperative functions of PRMY, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. Cell 117:1-20.

Araki S., Ito M., Soyano T., Nishihama R., Machida Y. (2004) Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. J Biol Chem. 279: 32979-88.

Ariel F.D., Manavella P.A., Dezar C.A., Chan R.L. (2007) The true story of the HD-Zip family. Trends in Plant Science 12: 419-426.

Baker S.P., Grant P.A. (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. Oncogene 26: 5329–5340.

Ballesteros M.L., Bolle C., Lois, L.M. Moore, J.M. Vielle-Calzada, J.P. Grossniklaus, U., Chua N.H. (2001) LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. Gen. Dev. 15: 2613-2625.

Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B., Lepiniec L. (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Plant J. 39: 366-80.

Behringer F.J., Medford J.I. (1992) A plasmid rescue technique for the recovery of plant DNA disruped by T-DNA insertion. Plant Mol. Biol. Report 10: 190-198.

Benhamed M., Bertrand C., Servet C., Zhou D-X. (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 Interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. Plant Cell 18: 2893-2903.

Bertrand C., Bergounioux C., Domenichini S., Delarue M., Zhou D.X. (2003) Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. Chem. 278: 28246-28251.

Birnbaum K., Shasha D.E., Wang J.Y., Jung J.W., Lambert G.M. (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. Science 302: 1956-1960.

Borde V., Goldman A.S.H., Lichten M. (2000) Direct Coupling Between Meiotic DNA Replication and Recombination Initiation. Science 290: 806-809.

Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 12: 2383-2394.

Brandt S., Kloska S., Altman T., Kehr J. (2002) Using array hybridization to monitor gene expression at the single cell level. J Exp Bot 53: 2315-2323.

Burgemeister R. (2005) New aspects of laser microdissection in research and routine. J. Histochem. Cytochem. 53: 409-412.

Burgess S.M, Ajimura M., Kleckner N. (1999) GCN5-dependent histone H3 acetylation and RPD3-dependent histone H4 deacetylation have distinct, opposing effects on IME2 transcription, during meiosis and during vegetative growth, in budding yeast. PNAS 8:6835-6840.

Calvert G.R., Dawes I.W. (1984) Cell size control of development in Saccharomyces cerevisiae. Nature 312: 61 – 63.

Casson S., Spencer M., Walker K., Lindsey K. (2005) Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of Arabidopsis. Plant J. 42: 111–123.

Choy J.S., Tobe B.T.D., Huh J.H., Kron S.J. (2001) Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression. Journal of Biological Chemistry 276: 43653-43662.

Cimini D., Mattiuzzo M., Torosantucci L., Degrassi F. (2003) Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. Molecular Biology of the Cell 14: 3821-3833.

Consiglio F., Carputo D., Frusciante L., Monti L.M., Conicella C. (2007) Meiotic mutations and crop improvement. Plant Breeding Rev 6: 163-214.

Cornea A., Mungenast A. (2002) Comparison of current equipment. Methods Enzymol. 356: 3-12.

Corona D.F.V., Clapier C.R., Becker P.B., Tamkun J.W. (2001) Modulation of ISWI function by site-specific histone acetylation. EMBO reports 3: 242-247.

Corona D.F.V., Siriaco G., Armstrong J.A., Snarskaya N., McClymont S.A., Scott M.P., Tamkun J.W. (2007) ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly in vivo. PLoS Biol. 5: 2011-2021.

Datson N.A., Van der Perk-de Jong J., Van den Berg M.P., de Kloet E.R., Vreugdenhil E. (1999) MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. Nucleic Acids Res. 27: 1300-1307.

De La Fuente R., Viveiros M.M., Burns K.H., Adashi E.Y., Matzuk M.M., Eppig J.J. (2004) Major chromatin remodeling in the germinal vescicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterocromatin function. Developmental Biology 275: 447-458.

Demura T., Tashiro G., Horiguchi G., Kishimoto N., Kubo M., Matsuoka N., Minami A., Nagata M., Nakamura K., Okamura Y. (2002) Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programm during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. PNAS 99: 15794-15799.

Denekamp M., Smeekens S.C. (2003) Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. Plant Physiol. 132: 1415-1423.

Deveaux Y., Toffano-Nioche C., Claisse G., Thareau V., Morin H., Laufs P., Moreau H., Kreis M., Lecharny A. (2008) Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in Arabidopsis. BMC Evolutionary Biology 291: 1-19.

Doerner P., Jorgensen J.E., You R., Steppuhn J., Lamb C. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. Nature 380: 520–523.

Dubos C., Le Gourrierec J., Baudry A., Huep G., Lanet E., Debeaujon I.,. Routaboul J.M, Alboresi A., Weisshaar B., Lepiniec L. (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Plant Journal 55: 940-953.

Ehrig T., Abdulkadir S.A., Dintzis S.M., Milbrandt J., Watson M.A. (2001) Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. J. Mol. Diagn. 3: 22–25.

Ekwall K., Olsson T., Turner B.M., Cranston G., Allshire R.C. (1997) Transient inhibition of histone deacetylation altrers the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. Cell 91: 1021-1032.

Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., Chuaqui R.F., Zhuang Z., Goldstein S.R., Weiss R.A., Liotta L.A. (1996) Laser Capture Microdissection. Science 274: 998-1001.

Emrich J.S., Barbazuk W.B., Li L., Schnable P.S. (2007) Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. Genome 17: 69-73.

Feldmann K.A. (1992) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: seed infection/transformation. p.274-289. In: C. Koncz, NH Chua and J Schell (eds.), Methods in *Arabidopsis* research. World Scientific Publishing/Continental Press, Singapore.

Ferdous A., Kodadek T., Johnston S.A. (2002) A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. Biochemistry 22: 12798-12805.

Galbiati L., Mendoza-Maldonado R., Gutierrez M.I., Giacca M. (2005) Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. Cell Cycle 4: 930-939.

Gallois J.L., Nora F.R., Mizukami Y., Sablowski R. (2004) WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. Gen. Dev. 18: 375-380.

Gash A., Aoyama T., Foster R., Chua N.H. (1992) Gene isolation with the Polymerase Chain Reaction. In: C. Koncz, NH Chua and J Schell (eds.), Methods in *Arabidopsis* research. World Scientific Publishing/Continental Press, Singapore.

Gillespie J.W., Best C.J., Bichsel V.E., Cole K.A., Greenhut S.F. (2002) Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. Am. J. Pathol. 160: 449-457.

Gocal G.F., Poole A.T., Gubler F., Watts R.J., Blundell C., King R.W. (1999) Longday up-regulation of a GAMYB gene during Lolium temulentum inflorescence formation. Plant Physiol. 119: 1271-1278.

Gocal G.F., Sheldon C.C., Gubler F., Moritz T., Bagnall D.J., MacMillan C.P., Li S.F., Parish R.W., Dennis, E.S., Weigel D., King R.W. (2001) GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. 1270: 1682-1693.

Gómez-Cadenas A., Zentella R., Walker-Simmons, M.K., Ho T.H. (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. Plant Cell 13: 667-79.

Green R.M., Tobin E.M. (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in Arabidopsis results in altered clock-regulated gene expression. PNAS 96: 4176-4179.

Grunstein M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature 389: 349-352.

Hansen J.C., Tse C. e Wolffe A.P. (1998) Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. Biochemistry 37: 17637-17641.

Hartwell L.H., Mortimer R.K., Culotti J., M. Culotti (1973) Genetic control of the cell division cycle in yeast: v. genetic analysis of *cdc* mutants. Genetics 74: 267-286.

He Y., Scott D.S., Amasino R.M. (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. Science 302: 1751-1753.

Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. Mol. Biol. Evol. 20: 735-747.

Hemm M.R., Herrmann K.M., Chapple C. (2001) AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. Trends Plant Sci. 6: 135-136.

Henderson I.R., Lu Z.X., Johnson C., Meyers L., Green B.C., Jacobsen S.E. (2006) Dissecting Arabidopsis DICER function in small RNA processing, gene silencing, and DNA methylation patterning. Nat. Gen. 38: 721–725.

Hershko A. (1997) Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. Curr Opin Cell Biol. 9: 788-799.

Higginson T., Li S.F., Parish R.W. (2003) AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in Arabidopsis thaliana. Plant J. 35: 177-192.

Honys D., Twell D. (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. Genome Biology 85: 1-13.

Honys D., Twell D. (2003) Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. Plant Physiol. 132: 640-652.

Huang L.E., Luzzi V., Ehrig T., Holtschlag V., Watson M.A. (2002) Optimized tissue processing and staining for laser capture microdissection and nucleic acid retrieval. Methods Enzymol. 356: 49-62.

Jenewein T., Allis C.D. (2001) Translating the histone code. Science 293: 1074-1079.

Jin H., Cominelli E., Bailey P., Parr A., Mehrtens F., Jones J., Tonelli C., Weisshaar B., Martin C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV protecting sunscreens in Arabidopsis. EMBO J. 19: 6150-6161.

Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y, Matsuoka M. (2003) Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. Plant J. 35: 429-441.

Karrer E.E., Lincoln J.E., Hogenhout S., Bennett A.B., Bostock R.M., Martineau B., Lucas W.J., Gilchrist D.G., Alexander D. (1995) In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA library. PNAS 92: 3814-3818.

Kerk N.M., Ceserani T., Tausta S.L., Sussex I.M., Nelson T.M. (2003) Laser capture microdissection of cells from plant tissues. Plant Physiol 132: 27-35.

Kihara A. H., Moriscot A. S., Ferreira P. J., Hamassaki D. E. (2005) Protecting RNA in fixed tissue: An alternative method for LCM users. Journal of Neuroscience Methods 148: 103–107.

Kim J-M., Liu H., Tazaki M., Nagata M., Aoki F. (2003) Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. The journal of Cell Biology 162: 37-46.

Kimmins S., P. Sassone-Corsi . (2005) Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells. Nature 434: 583-589.

Kirik V., Bäumlein H. (1996) A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat. Gene 183: 109-113.

Kirik V., Kolle K., Wohlfarth T., Misera S., Bäumlein H. (1998) Ectopic expression of a novel MYB gene modifies the architecture of the Arabidopsis inflorescence. Plant Mol Biol. 37: 819-827.

Klimyuk V.I., Jones J.D.G. (1997) AtDMC1, the Arabidopsis homologue of the yeast DMC1 gene: Characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. Plant J. 11: 1-14.

Klink V.P., Overall C.C., Alkharouf N.W., MacDonald M.H., Metthews B.F. (2007) Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (Glycine max) roots infected by the soybean cyst nematode (Heterodera glycines). Planta 226: 1389-1409.

Kofuji R., Sumikawa N., Yamasaki M., Kondo K., Ueda K., Ito M., Hasebe M (2003) Evolution and divergence of the MADS-box gene family based on genome-wide expression analyses. Mol Biol Evol. 20: 1963-1977.

Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. Cell 128: 693-705.

Kundu T.K., Palhan V.B., Wang Z., An W., Cole P.A., Roeder R.G. (2000) Activatordependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. Mol Cell 6: 551-561.

Kuno N., Moller S.G., Shinomura T., Xu X.M., Chua N.-H., Furuya M. (2003) The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in Arabidopsis. Plant Cell 15: 2476-2488.

Kuo M.H., Allis C.D. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioassays 20: 615-626.

Kurepa J., Smalle A. (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. Biochimie 90: 324-335.

lamamura S., Hanaoka M., Tanaka K. (2008) The plant-specific TFIIB-related protein, pBrp, is a general transcription factor for RNA polymerase I. EMBO J. 27: 2317-2327.

Inada N., Wildermuth M.C. (2005) Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of Arabidopsis mature leaf. Planta 221: 9–16.

Ishitani M., Xiong L., Steveson B., Zhu J.K. (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interaction and convergence of abscissic acid-dependent and abscissic-independent pathway. Plant Cell 9: 1935-1949.

Ivanovska I., Orr-Weaver T.L. (2006) Histone modifications and the chromatin scaffold for meiotic chromosome architecture. Cell Cycle 5: 2064-2071.

Ito M., Araki S., Matsunaga S., Itoh T., Nishihama R., Machida Y., Doonan J.H., Watanabe A., (2001) G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. Plant Cell 13: 1891-1905.

Lechner E., Achard P., Vansiri A., Potuschak T., Geneschik P. (2006) F-box proteins everywhere. Current Opinion in Plant Biology 9: 631-638.

Lee M.M., Schiefelbein J. (1999) WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. Cell 99: 473-483.

Lee M.M., Schiefelbein J. (2001) Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in Arabidopsis. Development 128: 1539-1546.

Lee M.M., Schiefelbein J. (2002) Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. Plant Cell 14: 611-618.

Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H., Kim K.W. (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. Experimental and Molecular Medicine 36: 1-12.

Li S.F., Higginson T., Parish R.W. (1999) A novel MYB-related gene from Arabidopsis thaliana expressed in developing anthers. Plant Cell. Physiol. 40: 343-347.

Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T., Whittier R.F. (1995) Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by Thermal Asimmetric Interlaced PCR. Plant J. 8: 457-463.

Lohr D., Kovavic R.T., Van Holde K.E. (1977) Quantitative analysis of the digestion of yeast chromatin by staphylococcal nuclease. Biochemistry 16: 463-471.

Magnaghi-Jaulin L., Jaulin C. (2006) Histone deacetylase activity is necessary for chromosome condensation during meiotic maturation in Xenopus laevis. Chromosome Research 14: 319-332.

Margulies M., Egholm M., Altman W.E. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437: 376-380.

Martinez-Castilla L.P., Alvarez-Buylla E.R (2003) Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. PNAS 100: 13407–13412.

Matsui K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. (2008) AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. Plant J. 55: 954-967.

Matsumura H., Ito A., Saitoh H., Winter P., Kahl G., Reuter M., Krüger D.H., Terauchi R. (2005) SuperSAGE. Cellular Microbiology 7: 11-18.

Meimberg H., Thalhammer S., Brachmann A., Muller B., Eichacker L.A., Heckl W.M., Heubl G. (2003) Selection of chloroplasts by laser microbeam microdissection for single-chloroplast PCR. BioTechniques 34: 1238-1243.

Mercier R., Grelon M., Vezon D., Horlow C., Pelletier G. (2001) How to characterize meiotic functions in plants? Biochimie 3: 1023-1028.

Mieczkowski, P.A., Dominska, M., Buck, M.J., Lieb, J.D., and Petes, T.D. (2007) Loss of a histone deacetylase dramatically alters the genomic distribution of Spo11p-catalyzed DNA breaks in Saccharomyces cerevisiae. PNAS 104: 3955-3960.

Mironov V.V., De Veylder L., Van Montagu M., Inze D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. Plant Cell. 11: 509-22.

Mizoguchi T., Wheatley K., Hanzawa Y., Wright L., Mizoguchi M., Song H.R., Carre I.A., Coupland G. (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. Dev Cell. 2: 629-641.

Morris C.A., Moazed D. (2007) Centromere Assembly and Propagation. Cell 128: 647-650.

Münster T., Pahnke J., Di Rosa A., Kim J.T., Martin W., Saedler H., Theissen G. (1997) Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. PNAS 94: 2415–2420.

Nagaoka S., Takano T. (2003) Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis. J Exp Bot. 54: 2231-2237.

Nakazono M., Qiu F., Borsuk L.A., Schnable P.S. (2003) Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. Plant Cell 15: 583–596.

Nam J., Kim J., Lee S., An G., Ma H., Nei M. (2004) Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. PNAS 101: 1910–1915.

Nardmann J., Werr W. (2006) The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of WUS orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. Mol Biol Evol. 23: 2492-2504.

Nelson T.M., Tausta S.L., Gandotra N., Liu T. (2006) Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 181-201.

Nesi N., Jond C., Debeaujon I., Caboche M., Lepiniec L. (2001) The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. Plant Cell 13: 2099-2114.

Newman LJ., Perazza D.E., Juda L., Campbell M.M. (2004) Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the det3 mutant phenotype. Plant J. 37: 239-50.

Ohtsu K., Smith M.B., Emrich S.J., Borsuk L.A., Zhou R., Chen T., Zhang X., Timmermans M.C.P., Beck J., Buckner B., Janick- Buckner D., Nettleton D., Scanlon M.J., Schnable P.S. (2007) Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize. Plant J 52: 391-404.

Ohyama H., Mahadevappa M., Luukkaa H., Todd R., Warrington J.A., Wong D.T.W. (2002) Use of laser capture microdissection-generated targets for hybridization of high-density oligonucleotide arrays. Methods Enzymol. 356: 323–333.

Park S.O., Zheng Z., Oppenheimer D.G., Hauser B.A. (2005) The PRETTY FEW SEEDS2 gene encodes an Arabidopsis homeodomain protein that regulates ovule development. Development 132: 841-849.

Pandey R., Muller A., Napoli C.A., Selinger D.A., Pikaard C.S., Richards E.J., Bender J., Mount D.W., Jorgensen R.A. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggest functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. Nucleic Acids Research 30: 5036-5055.

Pawlowski W.P. e Cande W.Z. (2005) Coordinating the events of the meiotic prophase. Trends in Cell Biology 15: 674-681.

Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1.Genetics 156:1349-1362.

Payne C.T., Clement J., Arnold D., Lioyd A. (1999) Heterologous *MYB* genes distinct from *GL1* enhance trichome production when overexpressed in Nicotiana tabacum. Development 126: 671-682.

Penfield S., Meissner R.C., Shoue D.A., Carpita N.C., Bevan M.W. (2001) *MYB61* is required for mucilage deposition and extrusion in the Arabidopsis seed coat. Plant Cell 13: 2777-2791.

Perrella G. (2008) Isolamento di geni coinvolti nella riproduzione delle piante e analisi funzionale. Tesi di Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica-XX ciclo. Università degli Studi di Napoli Federico II.

Perrella G., Cremona G., Consiglio F., Errico A., Bressan R.A., Conicella C. (2006) Screening for mutations affecting sexual reproduction after activation tagging in Arabidopsis Thaliana. J Appl Genet 47: 109-111.

Peters J.L., Cnudde F., Gerats T. (2003) Forward genetics and map-based cloning approaches. Trends Plant Sci 8: 484-491.

Primig M., Williams R.M., Winzeler E.A., Tevzadze G.G., Conway A.R., Hwang S.Y., Davies R.W., Esposito R.E. (2000) The core meiotic transcriptome in budding yeasts. Nat. Gen. 26: 415-423.

Quaedvlieg N., Dockx J., Keultjes G., Kock P., Wilmering J., Weisbeek P., Smeekens S. (1996) Identification of a light-regulated MYB gene from an Arabidopsis transcription factor gene collection. Plant Molecular Biology 32: 987-993.

Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (2002) Biologia delle piante. Zanichelli. 6a ed.

Ricci A.R., Genereaux J., Brandl C.J. (2002) Components of SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of ARG1 in rich medium. Mol Cell Biol 22: 4033-4042.

Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K., Yu G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290: 2105-2110.

Riechmann JL, Meyerowitz EM. (1997) MADS domain proteins in plant development. Biol Chem. 378: 1079-1101.

Ronceret R., Sheehan M.J., Pawlowski W.P. (2007) Chromosome dynamics in meiosis. In: Cell Division Control in Plants (D.P.S. Verma and Z. Hong, eds.). Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 103-124.

Roth S.Y., Denu J.M., Allis C. D. (2001) Histone Acetyltransferases. Ann Rev Biochem 70: 81-120.

Sambrook J., Russell D.W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. CSHL Press.

Sanders P.M., Bui A.Q., Weterings K., McIntire K.N., Hsu Y.C., Lee P.Y., Truong M.H., Beals P.B., Goldberg R.B. (1999) Anther development defects in *Arabidopsis thaliana* male sterile mutants. Sex Plant Reprod. 11: 297-322.

Sarmento O.F., Digilio L.C., Wang Y., Perlin J., Herr J.C., Allis D., Coonrod S.A. (2004) Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. Journal of Cell Science 117: 4449-4459.

Sawa S. (2002) Overexpression of the AtmybL2 gene represses trichome development in Arabidopsis. DNA Research 9: 31-34.

Schmitz G., Tillmann E., Carriero F., Fiore C., Theres K. (2002) The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. PNAS 99: 1064-1069.

Schnable P.S., Hochholdinger F., Nakazono M. (2004) Global expression profiling applied to plant development. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 50–56.

Scutt C.P., Kamisugi Y., Sakai F., Gilmartin P.M. (1997) Laser isolation of plant sex chromosomes: studies on the DNA composition of the X and Y sex chromosomes of Silene latifolia. Genome 40: 705–715.

Seo H.S., Yang J.Y., Ishikawa M., Bolle C., Ballesteros M.L., Chua N.H. (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. Nature 424: 995-999.

Shaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carre I.A., Coupland G. (1998). The late elongated hypocotyls mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. Cell 93: 1219-1229.

Sharma A.K., Sharma A. (1980) Chromosome Techniques: Theory and Practice. Butterworth & Co (Publishers).

Shin B., Choi G., Yi H., Yan S., Cho, I., Kim J., Lee S., Paek N.C., Kim, J.H., Song P.S., Choi G. (2002) AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. Plant J. 30: 23-32.

Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J-M., Pazin M. J., Davie J.R., and Peterson C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. Science 311: 844-847.

Shuster E. O., Byers B. (1989) Pachytene Arrest and Other Meiotic Effects of the Start Mutations in Saccharomyes cerevisiae. Genetics 123: 29-43.

Smith C.M., Gafken P.R., Zhang Z., Gottschling D.E., Smith J.B., and Smith D.L. (2003) Mass spectrometric quantification of acetylation at specific lysines within the amino-terminal tail of histone H4. Anal.Biochem. 316: 23-33.

Smith D.R., Bowman J.L., Mayerowitz E.M. (1990) Early flower development in Arabidopsis. Plant Cell 2: 755-767.

Sorrell D. A., Chrimes D., Dickinson J. R., Rogers H. J, Francis D. (2003) The Arabidopsis CDC25 induces a short cell length when overexpressed in fission yeast: evidence for cell cycle function. New Phytologist 165 : 425 – 428.

Steiner-Lange S., Unte U.S., Eckstein L., Yang C., Wilson Z.A., Schmelzer E., Dekker K., Saedler H. (2003) Disruption of Arabidopsis thaliana MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. Plant J. 34: 519-528.

Stevens R., Grelon M., Vezon D., Oh J., Meyer P., Perennes C., Domenichini S., Bergounioux C. (2004) A *CDC45* homolog in Arabidopsis is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing. Plant Cell 16: 99-113.

Stockinger E.J., Mao Y., Regier M.K., Triezenberg S.J., Thomashow M.F. (2001) Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. Nucleic Acids Res 29: 1524–1533.

Strhal B.D., Allis D. (2000) The language of covalent histone modifications. Nature 403: 41-45.

Stuart D. e Wittenberg C. (1998). CLB5 and CLB6 are required for premeiotic DNA replication and activation of the meiotic S/M checkpoint. Gen Dev 12: 2698-2710.

Sugimoto K., Takeda S., Hirochika H. (2000) *MYB*-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes. Plant Cell 12: 2511-2528.

Taddei A., Maison C., Roche D., Almouzni O. (2001) Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. Nat. Cell Biol. 3: 114-119.

Talbert P. B., Masuelli R., Tyagi A. P., Comai L., Henikoff S. (2002) Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. Plant Cell 14: 1053–1066.

Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim J.T., Münster T., Winter K.U., Saedler H. (2000) A short history of MADS-box genes in plants. Plant Mol Biol 42: 115–149.

Tian L., Wang J., Fong M.P., Chen M., Cao H., Gelvin S.B., Chen Z.J. (2003) Genetic control of developmental changes induced by disruption of Arabidopsis histone deacetylase 1 (AtHD1) expression. Genetics 165: 399-409.

Timmermans M.C., Hudson A., Becraft P.W., Nelson T. (1999) ROUGH SHEATH: a MYB protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primodia. Science 284: 151-153.

Turner B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. Bioassays 22: 836-845.

Vailleau F., Daniel X., Tronchet M., Montillet J.L., Triantaphylides C., Roby, D. (2002) A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. PNAS 99: 10179-10184.

Vente A., Korn B. (1999) Distribution and early development of microarray technology in Europe. Nat. Gen. 22: 22-31.

Vlachonasios K.E., Thomashow M.F., Triezenberg S.J. (2003) Disruption mutations of ADA2b GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression. Plant Cell 15: 626-638.

Wada T., Tachibana T., Shimura Y., Okada K. (1997) Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC. Science 277: 1113-1116.

Wade P.A., Pruss D., Wolffe A.P. (1997) Trends Biochem Sci 22: 128-132.

Wang Q., Yin S., Ai J-S., Liang C-G., Hou Y., Chen D-Y., Schatten H., Sun Q-Y. (2006) Histone deacetylation is required for orderly meiosis. Cell Cycle 5: 766-774.

Wang Y., Wu H., Liang G., Yang M. (2004) Defects in nucleolar migration and synapsis in male prophase I in the ask1–1 mutant of Arabidopsis. Sex Plant Reprod. 16:273–282.

Wang Z.Y., Tobin E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell 93: 1207-1217.

Weigel D., Glazerbrook J. (2002) *Arabidopsis*: A Laboratory Manual. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wu K., Tian L., Malik K., Brown D., Miki B. (2000) Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in Arabidopsis thaliana. Plant J 22: 19-27.

Würschum T, Gross-Hardt R, Laux T. (2006) APETALA2 regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. Plant Cell. 18: 295-307.

Yamada T., Mizuno K-I., Hirota K., Kon N., Wahls W.P., Hartsuiker E., Murofushi H., Shibata T., Ohta K. (2004) Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. EMBO J 23: 1792-1803.

Yang X., Timofejeva L., Ma H., Makaroff A. (2006) The Arabidopsis SKP1 homolog ASK1 controls meiotic chromosome remodeling and release of chromatin from the nuclear membrane and nucleolus. Journal of Cell Science 119: 3754-3763.

Yang X.J., Seto E. (2003) Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. Curr Op Genet Dev 13: 143-153.

Yang S., Choi G., Kim J., Yi H., Lee J., Hahn T-R., Shin B., Cho I., Choi G. (2002). PAP1/IAA26, a phytochrome interacting protein belonging to AUX/IAA family members, regulates PHYA-induced CHS expression through HY5. 13TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH.

Zhao D.Z., Wang G.F., Speal B., Ma H. (2002) The EXCESS MICROSPOROCYTES gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the Arabidopsis anther. Gen. Dev. 16: 2021-2031.

Zeng L., Zhou M.M. (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. FEBS letters 513:124-128.

Zickler D., Kleckner N. (1998) The leptotene-zygotene transitiontion of meiosis. Annu. Rev. Genet. 32: 619–697.

Zupkovitz G., Tischler J., Posch M., Sadzak I., Ramsauer K., Egger G., Grausenburger R., Schweifer N., Chiocca S., Decker T., Seiser C. (2006) Negative and Positive Regulation of Gene Expression by Mouse Histone Deacetylase 1. Mol Cell Biol 26: 7913-7928.

#### APPENDICE

- Barra L., Consiglio F., De Luca P., Mithbaokar P., Conicella C. 2006. Perspectives of using laser capture microdissection technology to investigate plant meiosis. Gordon Research Conference on "Meiosis", June 11-16, 2006, Colby-Sawyer College, New London (NH, USA).
- Barra L., Consiglio F., De Luca P., Di Lauro R., Mithbaokar P., Monti L.M., Conicella C. 2006. Prospettive di utilizzazione del Laser Capture Microdissection per lo studio della meiosi in pianta. Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita, Facoltà di Medicina e Chirurgia, di Farmacia, di Medicina Veterinaria e Agraria. Napoli, June 15-16, 2006, p. 153.
- Barra L., Consiglio F., De Luca P., Di Lauro R., Mithbaokar P., Conicella C. 2006. Towards the use of laser capture microdissection for investigating plant meiosis. 50th Annual Congress of Italian Society of Agricultural Genetics, September 10-14, 2006, Ischia (Italy). ISBN 88-900622-7-4.
- 4. Barra L., Consiglio F., De Luca P., Mercadante G., Conicella C. 2007. Definizione della metodologia basata sull'impiego del <u>Laser Capture</u> <u>Microdissection (LCM) per la "cattura" dei meiociti di pianta. XIII Giornate</u> Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Facoltà di Medicina e Chirurgia, di Farmacia, di Medicina Veterinaria e Agraria dell'Università di Napoli "Federico II". Napoli, 20-21 settembre 2007.
- Barra L., Consiglio F., Conicella C. 2007. Identificazione di determinanti meiotici in *Arabidopsis thaliana*. VI Corso estivo di approfondimento sulla Genetica Vegetale "Sviluppo della pianta: genetica ed implicazioni nel miglioramento" Pacognano (Vico Equense, Napoli), 13-15 giugno 2007, p. 2.
- Barra L., Consiglio F., De Luca P., Mercadante G., Conicella C. 2007. Settingup of laser microdissection for capturing plant male meiocytes. 51st Annual Congress of Italian Society of Agricultural Genetics (SIGA), September 23-26, 2007, Riva del Garda (TN, Italy). ISBN 978-88-900622-7-8.
- Barra L., Consiglio F., Mercadante G., Amendola E., Zoppoli P., De Luca P., Conicella C. 2008. Meiocyte-specific expression profiling in a histone hyperacetylated mutant of Arabidopsis. Gordon Research Conference on "Meiosis", June 8-13, 2008, Colby-Sawyer College, New London (NH, USA).
  - Perrella G., Consiglio F., Aiese-Cigliano R., Barra L., Cremona G., Sanchez-Moran E., Paino M., Errico A., Bressan A., Franklin F.C.H., Conicella C. Histon hyperacetilation affects meiotic chromosome condensation, segregation, and chiasma distribution in Arabidopsis (In preparazione).

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare alcune persone che sono state determinanti per la riuscita di questo impegnativo percorso:

Il professor Luigi Monti e la dottoressa Clara Conicella per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di dottorato sotto la loro supervisione; il dottor Pasquale De Luca dell'Istituto di Ricerca Biogem, di Ariano Irpino, presso cui ho svolto una parte di questo progetto di ricerca.

Un ringraziamento al gruppo di ricerca presso il quale ho lavorato, in particolare alla dottoressa Federica Consiglio, per l' impegno, la cura e la premura profuse soprattutto in quest' ultimo periodo, al dottor Riccardo Aiese-Cigliano per la calorosa disponibilità, alla dottoressa Sara Cremona per essere stata un valido sostegno materiale e morale oltre che una grande amica ed infine al dottor Giorgio Perrella, sempre pronto per una parola di conforto anche se a chilometri di distanza, grazie di cuore.

Ringrazio i ragazzi del castello, in particolare Ciro Trombetta e Alessandra Iodice, per il tempo passato insieme e per l'affetto dimostratomi, inoltre tutti quelli che lavorano al DiSSPAPA e al CNR, con cui mi sono confrontata per un consiglio o un suggerimento.

Ancora un grazie alla dottoressa Viviana Sasso, dell'Istituto Biogem, che mi ha accolto con grande affetto, facendomi sentire come a casa.

Volevo poi sinceramente ringraziare gli amici di sempre e quelli conosciuti più di recente per esserci stati ed averlo sempre scelto, grazie a Valentina Mele, Francesca Cerciello, Giovanna Aliperta, Donata Iandolo, Eduardo Ammendola solo per citarne alcuni.

Ed infine un grazie ai miei genitori e ai miei nonni in particolare, per essere stati dei compagni di vita, con i quali, nonostante la differenza generazionale, ho sempre potuto confrontarmi sentendomi fortunata per questo. Grazie infinite.