

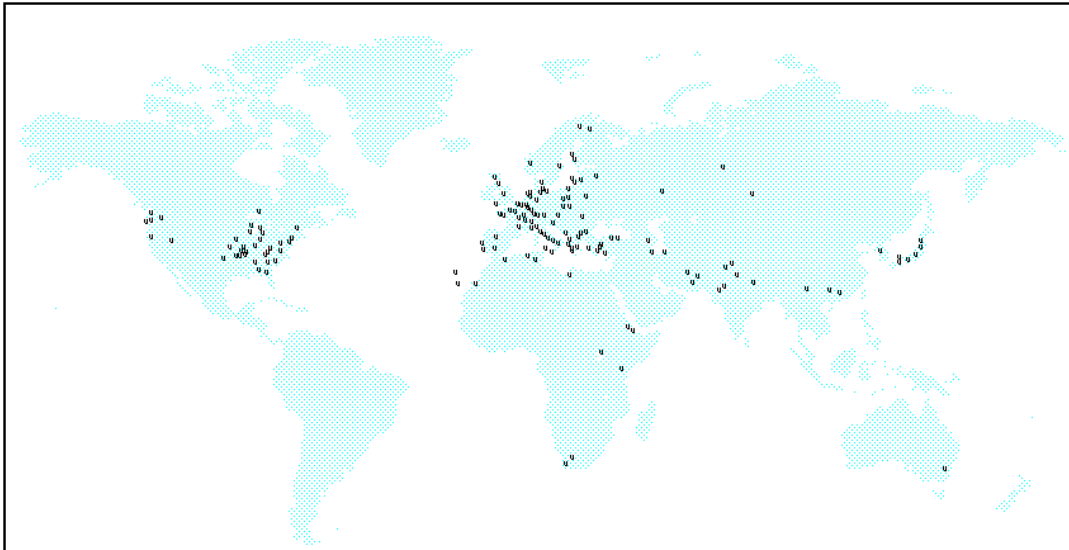
Arabidopsis thaliana

Pianta modello

Arabidopsis thaliana è stata scoperta da Johannes Thal nel sedicesimo secolo. Proposta come pianta modello già da Laibach nel 1943 e studiata più in dettaglio da Redei nel 1970

Origine Europa

Distribuita in Europa, Asia, Nord-America



Geographical distribution of ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.





Ciclo vitale: 6 settimane

I germogli si formano dopo 3 settimane dalla germinazione

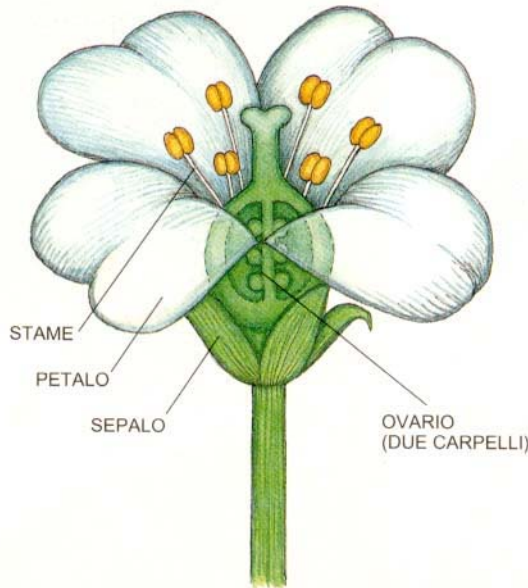
Rosetta: Ø 2-10 cm (a seconda delle condizioni di crescita)

Produce infiorescenze

4 sepali

4 petali

6 stami (2 corti, 4 lunghi)



I fiori maturi sono lunghi
approssimativamente 2-3
mm e larghi 0.5-1 mm

Autofecondazione

(cross-fecondazione possibile
in laboratorio applicando il
polline sulla superficie dello
stigma)

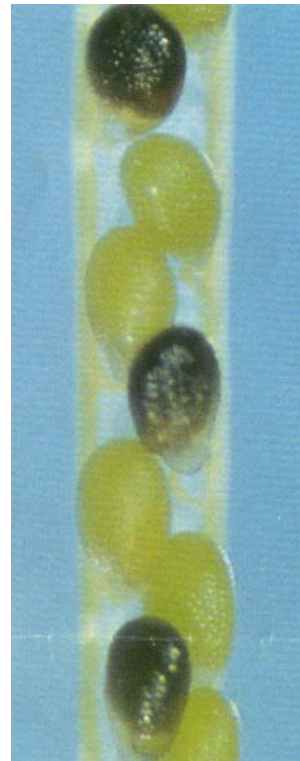
In seguito a fecondazione
gli ovari si allungano in
frutti chiamati **silique**



Può contenere a maturità
(dopo 2 settimane dalla
fecondazione)

30-60 semi

Un seme pesa 20 μg ed è lungo
poche centinaia di μm



L'importanza dei sistemi modello

Puya raimondii è un pessimo sistema modello: fiorisce ogni 100 anni e raggiunge i 10 metri di altezza. Non si conosce nulla della sua genetica e del suo genoma.



Arabidopsis thaliana è un buon sistema modello: fiorisce dopo 1 mese, raggiunge i 30-50 centimetri di altezza e cresce bene in laboratorio.

Arabidopsis pianta modello

PERCHE'?



GENOMA PICCOLO

5 cromosomi

contenuto aploide 125 Mb

→ circa 26200 geni

→ 35% geni unici



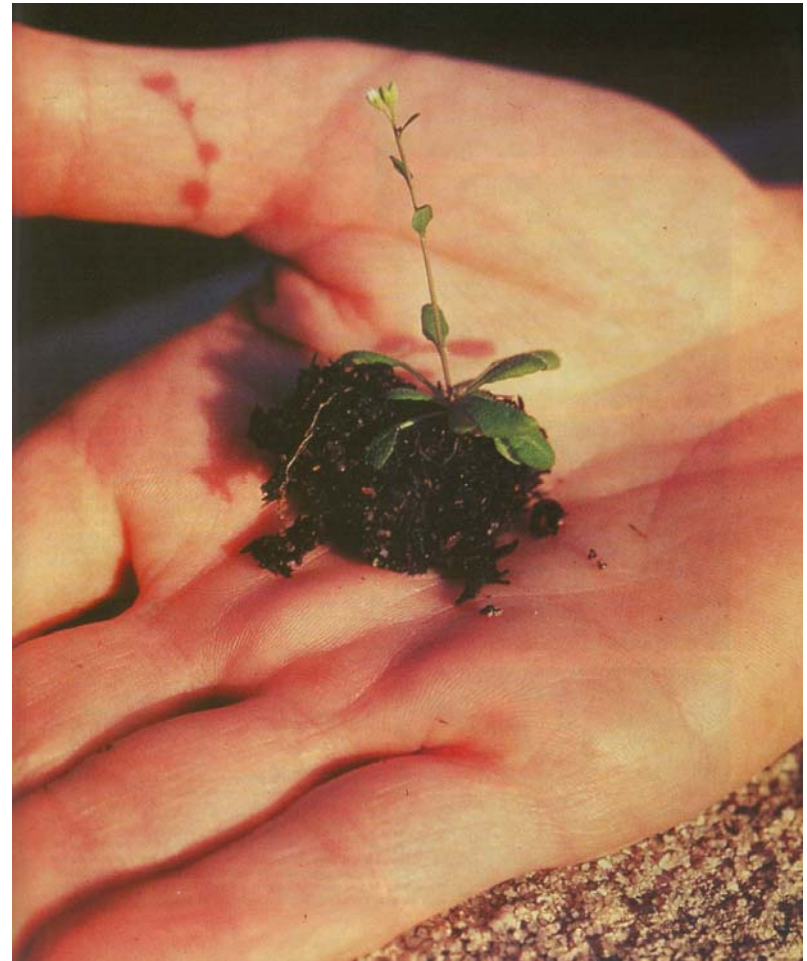
RAPIDO CICLO VITALE

6 settimane da seme a seme



PICCOLE DIMENSIONI

facile coltivazione in spazi ristretti
10000 semi possono germinare in una
singola piastra Petri
1 pianta cresce in 1 cm²





Da una pianta si possono ottenere
> 5000 semi



facilmente trasformabile con
alta efficienza

QUINDI:

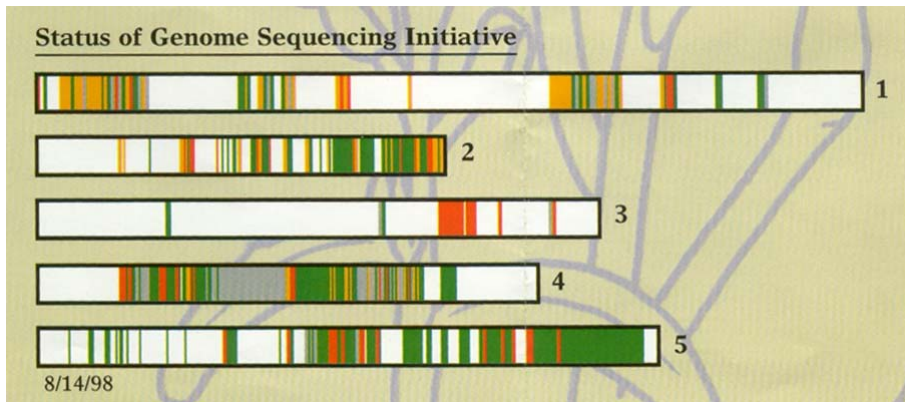
- ampia disponibilità di banche YAC, BAC, etc.
- disponibilità di marcatori molecolari e genetici
- numerose collezioni di mutanti chimico/fisici
- numerose collezioni di mutanti inserzionali

PROGETTO AGI

Arabidopsis Genome Initiative

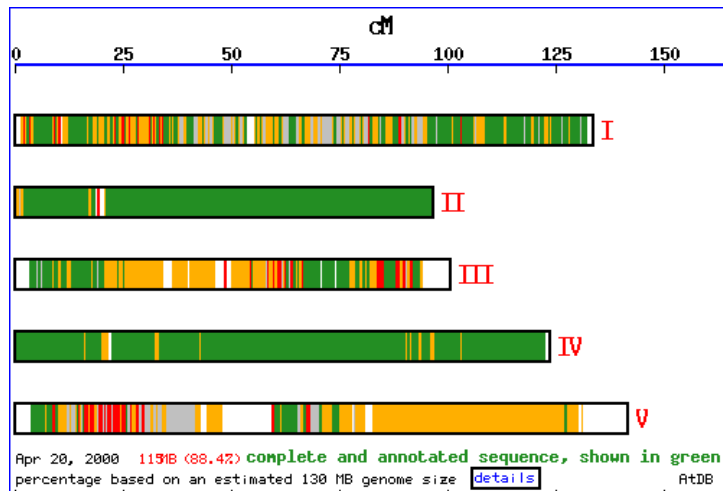
1996 INIZIO PROGETTO

DICEMBRE 2000
SEQUENZIAMENTO COMPLETATO



1998

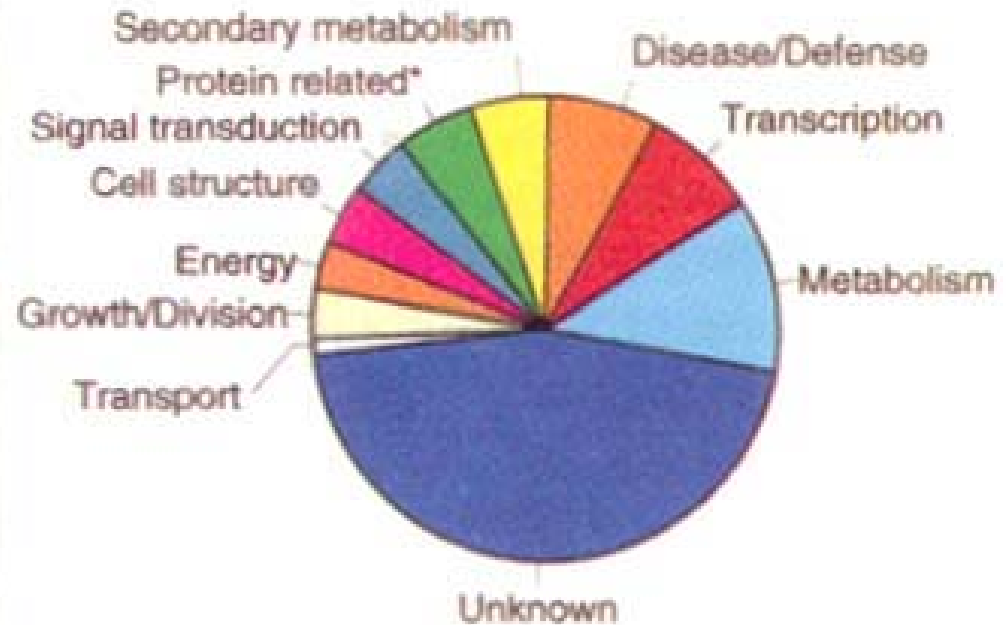
verifica dei cloni
library in preparazione o
sequenza in atto
sequenze preliminari
rilasciate in banca dati
sequenze complete
rilasciate in banca dati



Maggio
2000

Conoscere la sequenza di un gene non sempre significa conoscere anche la funzione di quel gene

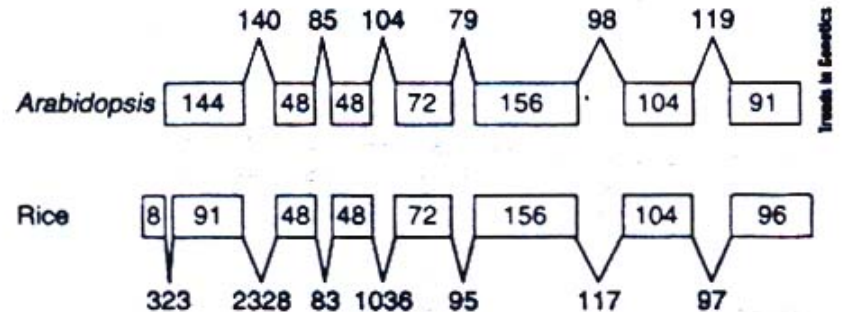
Il 54% dei geni può essere assegnato a una determinata categoria funzionale sulla base della similarità con proteine e motivi noti



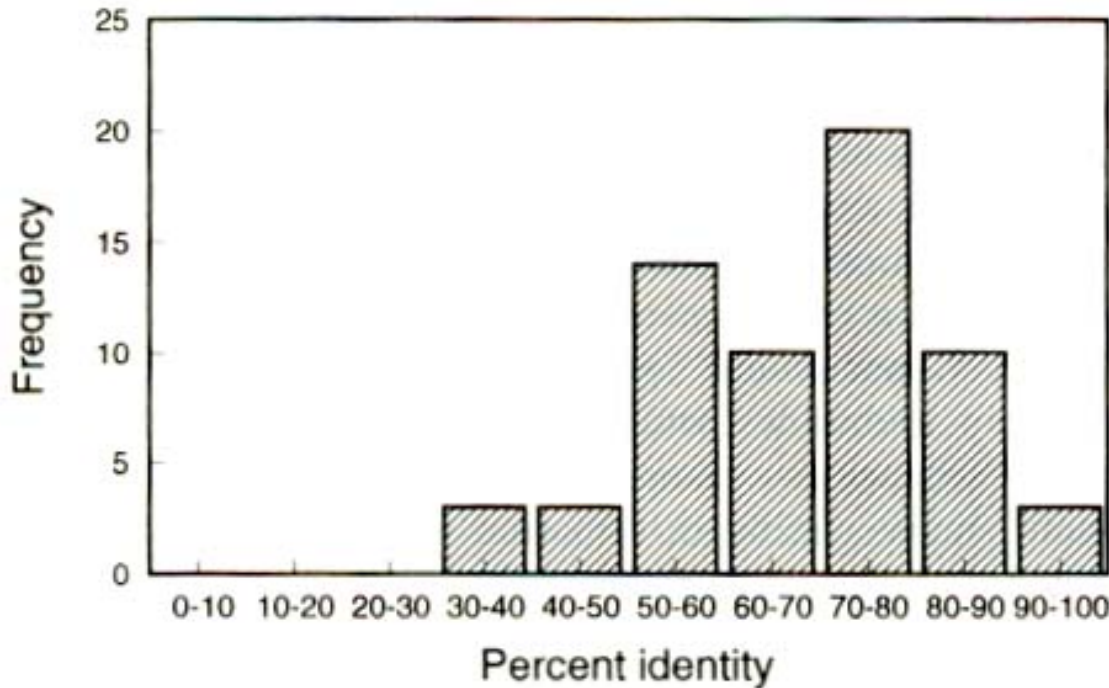
In *Arabidopsis* i geni sono distribuiti in tutto il genoma.
Nei cereali sono raggruppati in cluster (gene space) che sono separati da zone di DNA prive di geni.

Il 35% dei geni è costituito da geni unici

In *Arabidopsis* i geni contengono
in media 5 introni con
dimensione media di 160 bp



Le conoscenze ottenute con *Arabidopsis* sono utili anche per la comprensione della funzione di geni di altre specie



**Identità di sequenza tra
proteine di riso e *Arabidopsis***
(64 proteine di funzione nota scelte
a caso)

OBIETTIVI FUTURI

- Determinare la funzione di tutti i geni di *Arabidopsis* (circa 2010)
- Determinare la funzione dei geni di riso, il più piccolo tra i cereali (sequenza completata nel 2002)
- Sequenza di *Medicago truncatula* come sistema modello per la biologia dei legumi
- Sequenza di regioni selezionate ricche in geni di piante con genomi particolarmente grandi (mais, frumento)

Come si studia la funzione di un gene?

GENETICA TRADIZIONALE



Clonare un gene che è associato a un particolare fenotipo mutante o ad una particolare funzione

fenotipo mutante



gene

GENETICA INVERSA



Determinare la funzione di un gene, la cui sequenza è nota, generando un corrispondente mutante knockout ed analizzandone il fenotipo

gene

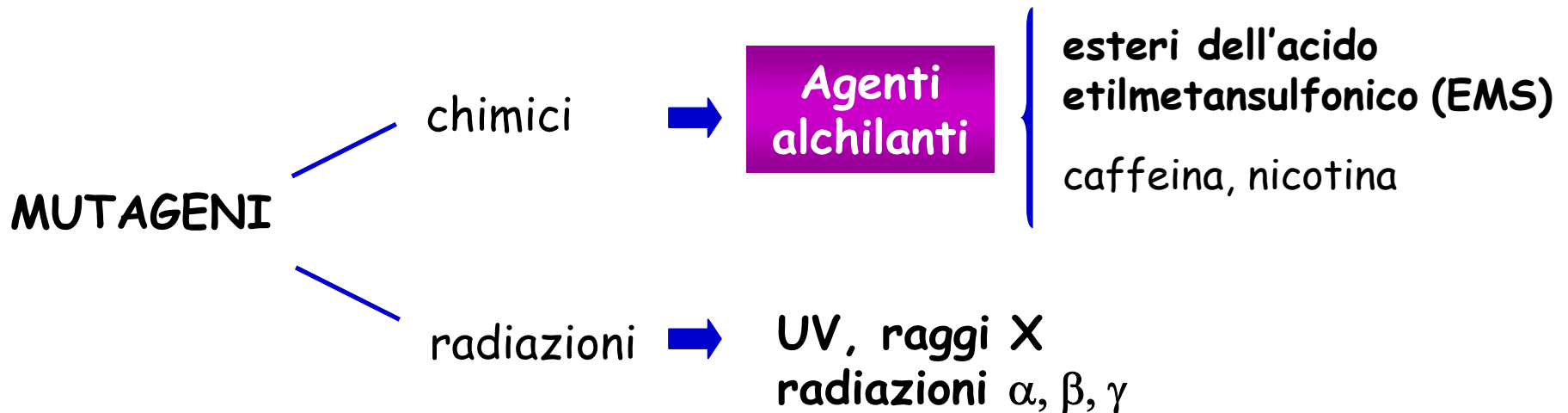


mutante knockout



fenotipo

MUTAGENESI può essere condotta direttamente sui semi.
Ogni seme contiene poche cellule che daranno luogo alla pianta matura.
Una mutazione indotta in una di queste cellule (seme M1) è replicata nella progenie (forma eterozigote in un settore della pianta matura);
i fiori formati da questo settore mutante, attraverso autofecondazione, produrranno semi M2, 1/4 dei quali saranno omozigoti.

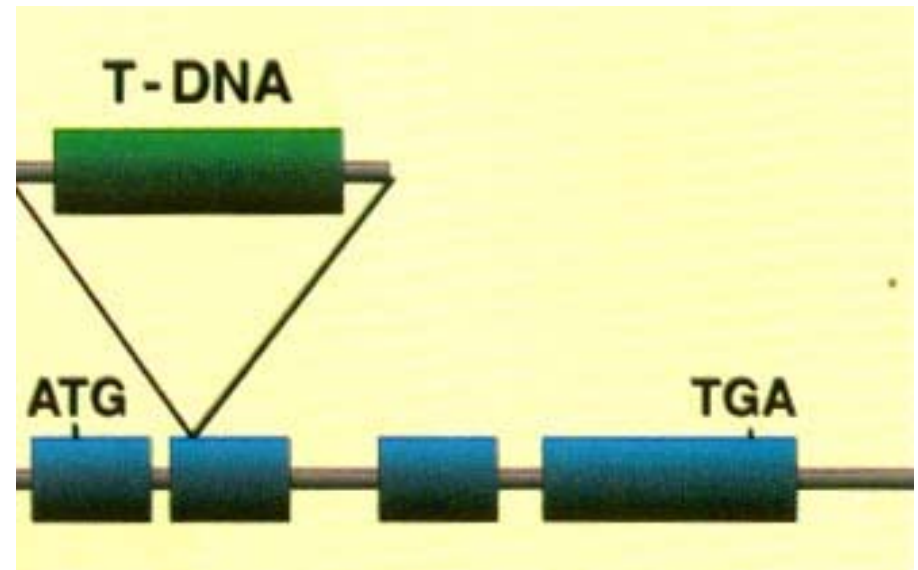


EMS alchila le G → la G alchilata si appaia con T invece che con C

MUTAGENESI PER INSERZIONE

→ TRASPOSONI

→ T-DNA



Negli ultimi 25 anni sono stati identificati diverse migliaia di mutanti di *Arabidopsis*

- Crescita e sviluppo della pianta
- Sviluppo del fiore
- Senescenza
- Germinazione
- Metabolismo
- Vie di trasduzione del segnale
- Risposte agli ormoni
- Risposte ai patogeni

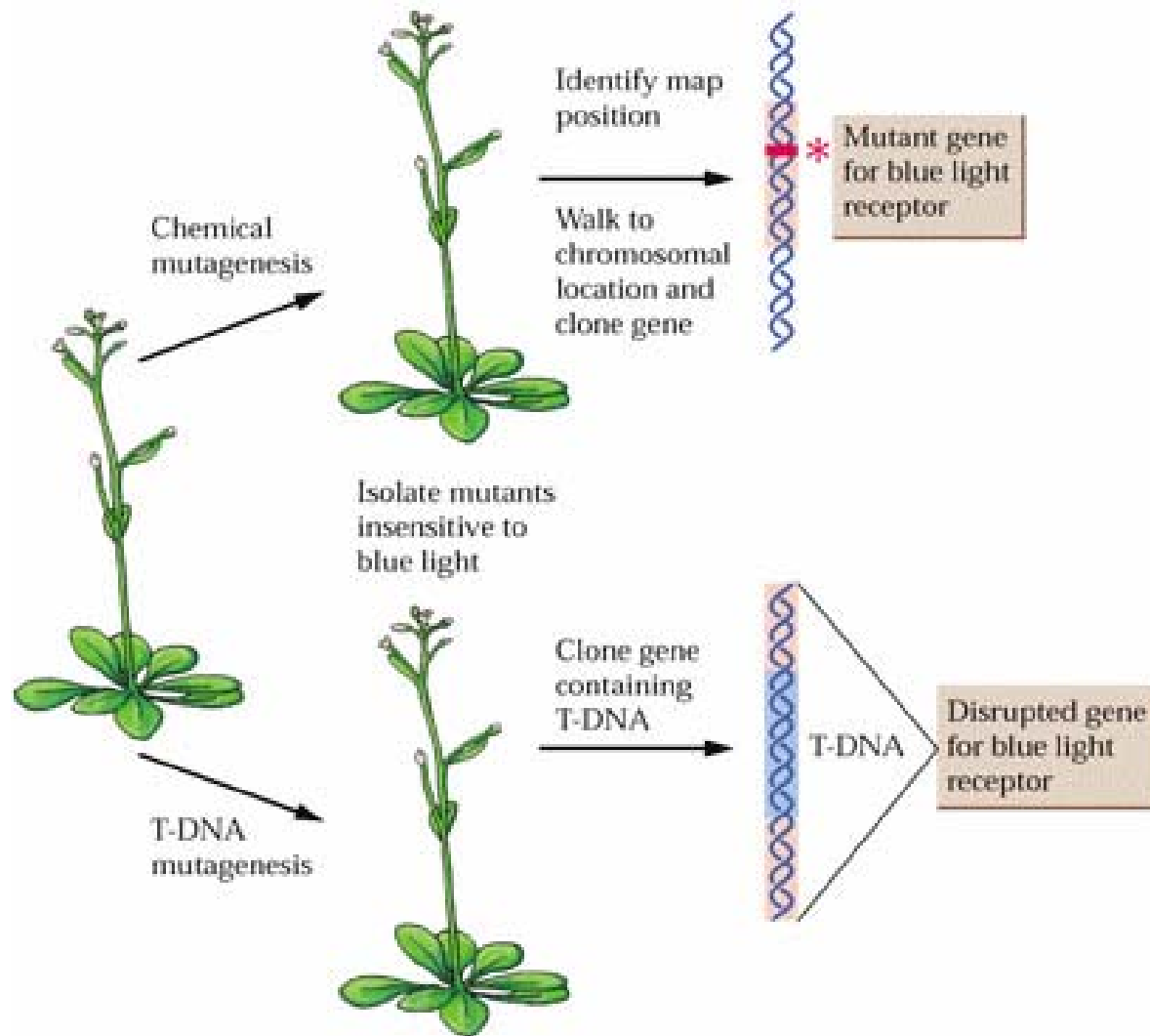
Se la mutazione è stata ottenuta per inserzione

il DNA inserito, oltre a creare la mutazione,
"etichetta" il gene di interesse
permettendone una più facile identificazione



gene tagging

confronto tra mutagenesi chimica e mutagenesi per inserzione



Transposon tagging

elementi trasponibili di mais funzionanti anche in Arabidopsis

Suppressor-mutator (Enhancer) - abbreviato Spm (o En)
Activator/Dissociation - abbreviato Ac/Ds

Il gene per la trasposasi e l'elemento non-autonomo sono introdotti separatamente.

L'incrocio tra linee omozigoti contenenti i due elementi dà inizio alla mutagenesi.

Per ottenere linee stabili, la progenie F1 viene autofecondata e si recupera la progenie F2 che ha ereditato l'elemento trasponibile, ma ha perso il gene per la trasposasi attraverso la segregazione

sia con il transposon tagging che con il T-DNA tagging è possibile selezionare le piante in cui è avvenuta l'inserzione se si usa un MARCATORE DI SELEZIONE (resistenza ad un antibiotico o ad un erbicida) associato all'elemento trasponibile o al T-DNA

Vantaggi del transposon tagging

- Il trasposone si integra come singola copia, mentre il T-DNA può avere un pattern di integrazione più complesso
- L'elemento trasposto può essere ri-mobilizzato dal sito di inserzione (reversione della mutazione); il T-DNA una volta integrato nel genoma è stabile

COME SI SELEZIONA UN MUTANTE?

analisi del fenotipo

Come facciamo a essere sicuri che il fenotipo mutante osservato sia dovuto alla mutazione indotta?

Uso di marcatori associati al T-DNA o al trasposone

- resistenza ad antibiotici
- resistenza ad erbicidi



analisi di segregazione del fenotipo mutante e del marcatore

Strategia di isolamento di mutanti

Trasformazione con
T-DNA



T0

Raccolta semi T1

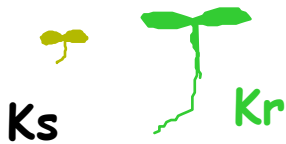
Selezione in serra
dei trasformanti T1

Autoimpollinazione

Raccolta semi T2

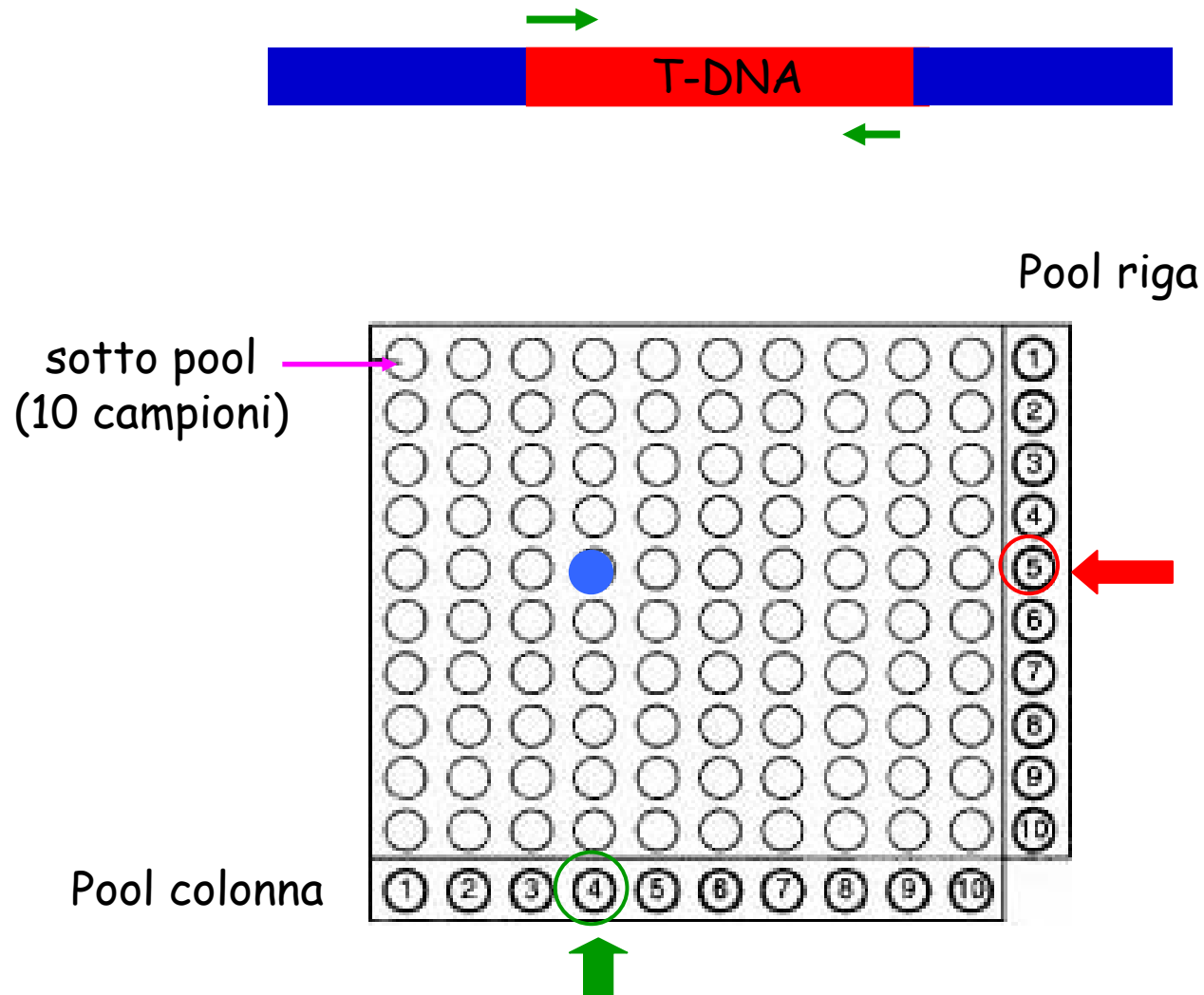
Analisi *in vitro*
delle plantule
Kan resistenti

T2



- Analisi dei mutanti Kan resistenti
- Propagazione delle piante

Determinazione della presenza del T-DNA mediante PCR



COME SI IDENTIFICA UN GENE
MUTATO MEDIANTE INSERZIONE CON
T-DNA O TRASPOSONE?

Identificare le sequenze fiancheggianti il DNA inserito

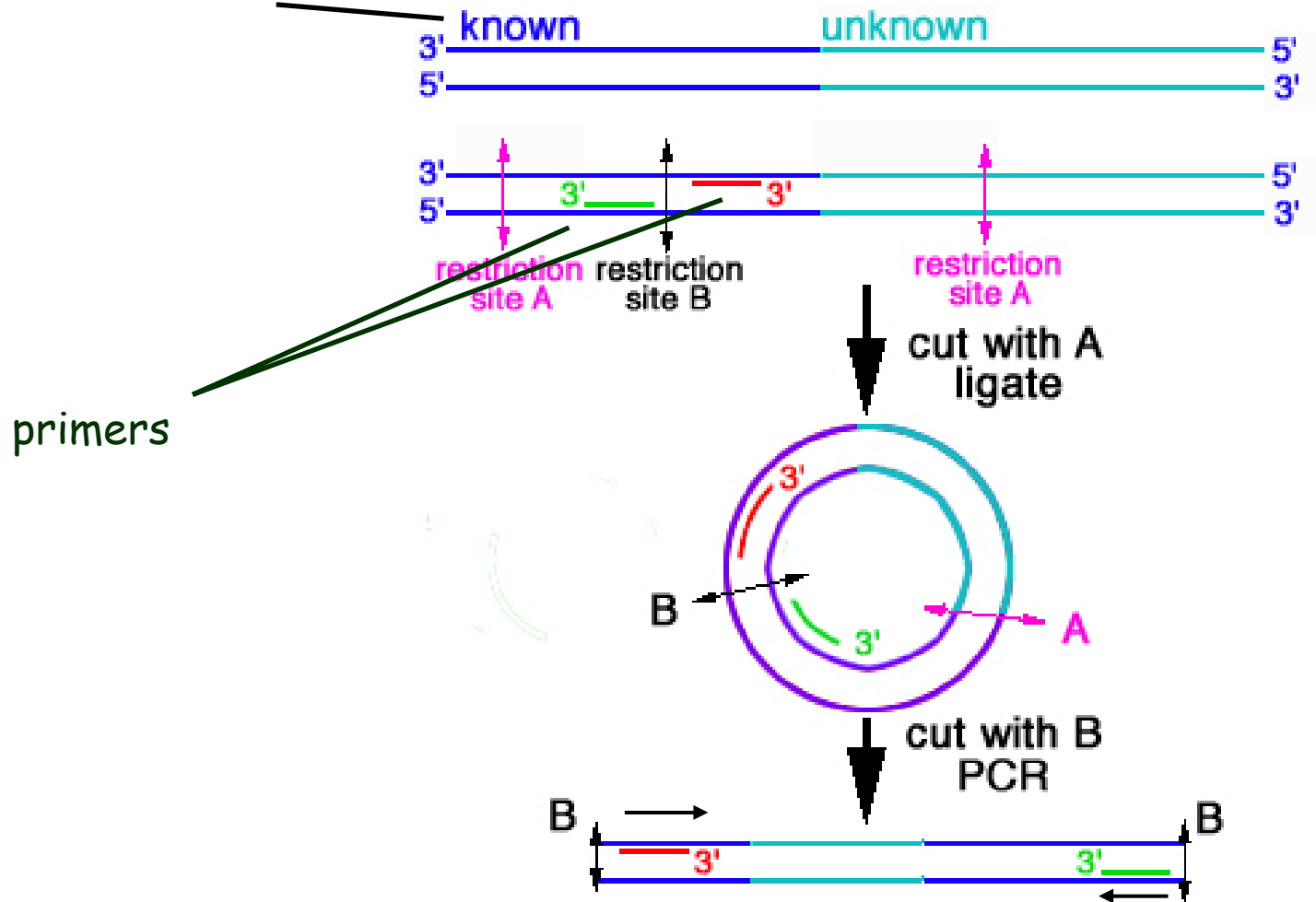


- analisi delle sequenze in banca dati
- eventuale omologia con geni noti

PCR inversa

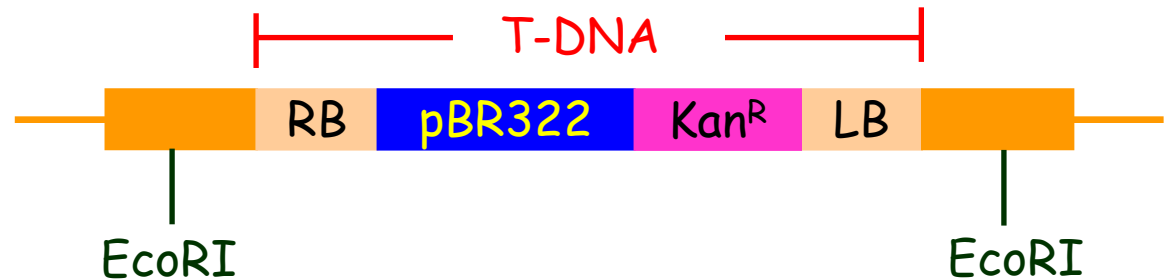
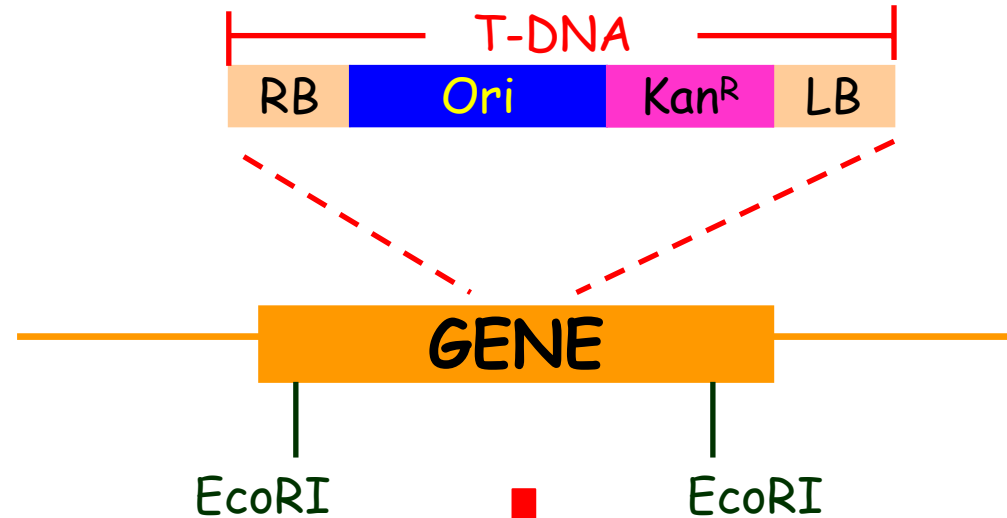
Identificazione delle
sequenze fiancheggianti

T-DNA o DS

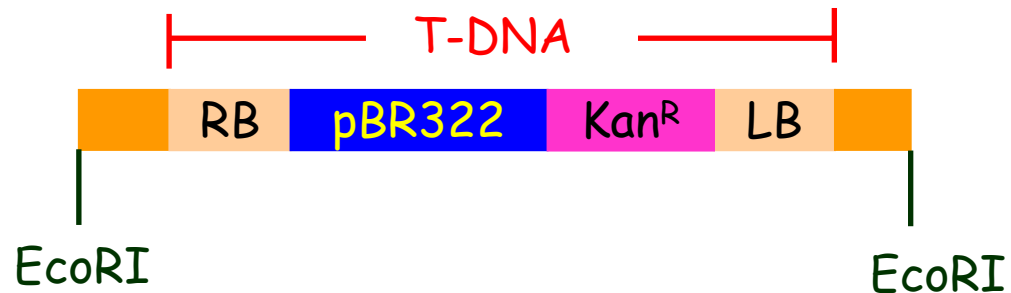


Identificazione
delle sequenze
fiancheggianti

Recupero del
plasmide



Digestione con EcoRI



genetica tradizionale

**Recupero del
plasmide**



Ligazione



Trasformazione E. coli



**Su terreno selettivo contenente Kanamicina
cresceranno solo le colonie che hanno
acquisito il plasmide**

**Da queste sarà possibile recuperare il
plasmide e sequenziarlo**

Identificazione di un gene tramite COMPLEMENTAZIONE FUNZIONALE

Un gene vegetale ripristina il fenotipo wild type in un ceppo di lievito mutante

Isolamento del mutante di lievito che è carente del carattere di interesse



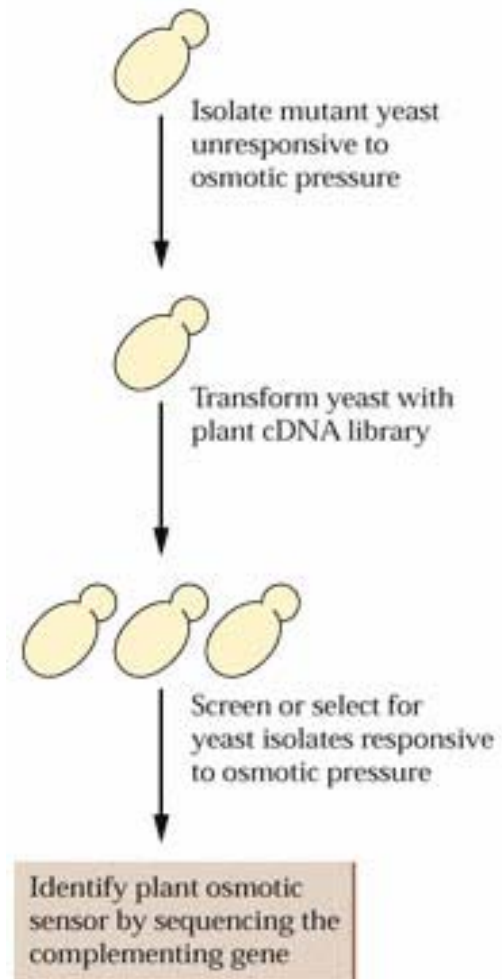
Trasformazione con una libreria di cDNA di pianta



Identificazione delle colonie che complementano



Sequenziamento del cDNA di interesse



genetica inversa

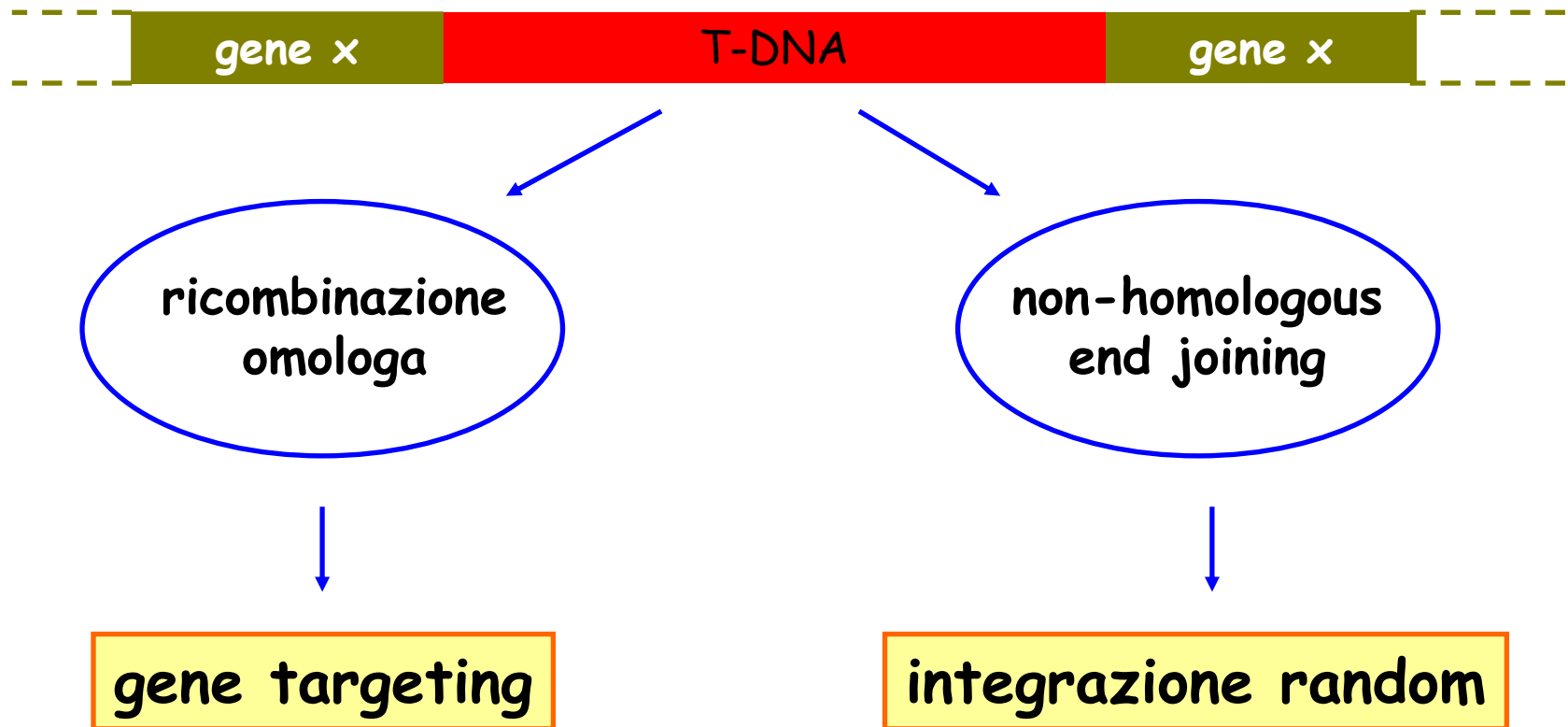
SEQUENZA DEL GENE NOTA

NON NOTA LA FUNZIONE



mutare uno specifico gene e vedere l'effetto della mutazione allo scopo di capire la funzione del gene

genetica inversa

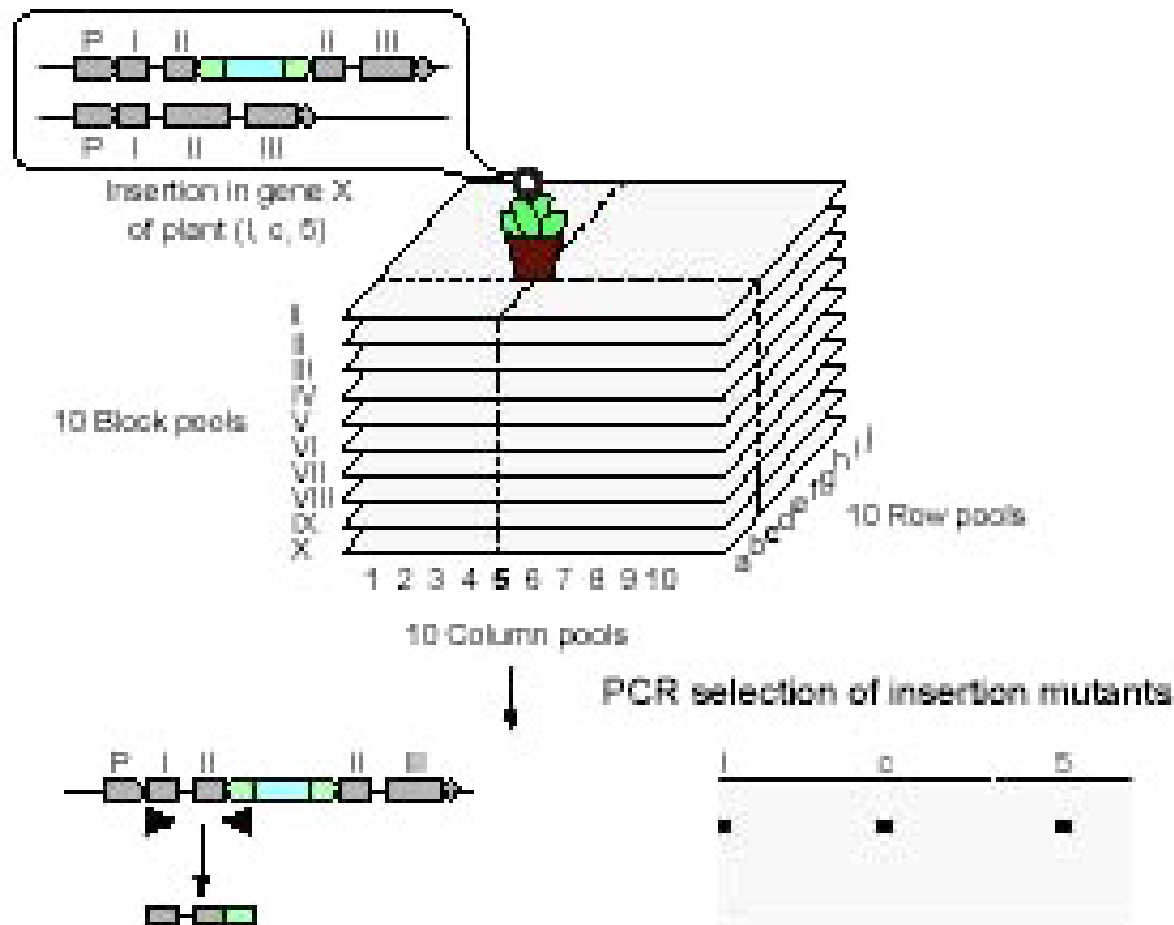


Nelle piante è molto difficile il gene targeting perché non avviene ricombinazione omologa

quindi:

- **mutazione dei semi**
- **ricerca del mutante con lo specifico gene mutato**

Identificazione di un mutante di inserzione in un determinato gene X la cui sequenza è nota



Mutazioni

LOSS OF FUNCTION

Il fenotipo deriva dalla perdita dell'espressione del gene
RECESSIVE

GAIN OF FUNCTION

Permettono di acquisire una nuova funzione assente nel fenotipo wild type
DOMINANTI

IDENTIFICAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DELL'ETILENE

Risposta tripla

- Ridotto allungamento del fusto (e della radice)
- Aumento dell'accrescimento laterale (rigonfiamento)
- Accrescimento orizzontale anormale

In Arabidopsis: curvatura accentuata del gancio apicale

Selezione dei mutanti analizzando il
fenotipo in presenza o in assenza
dell'ormone

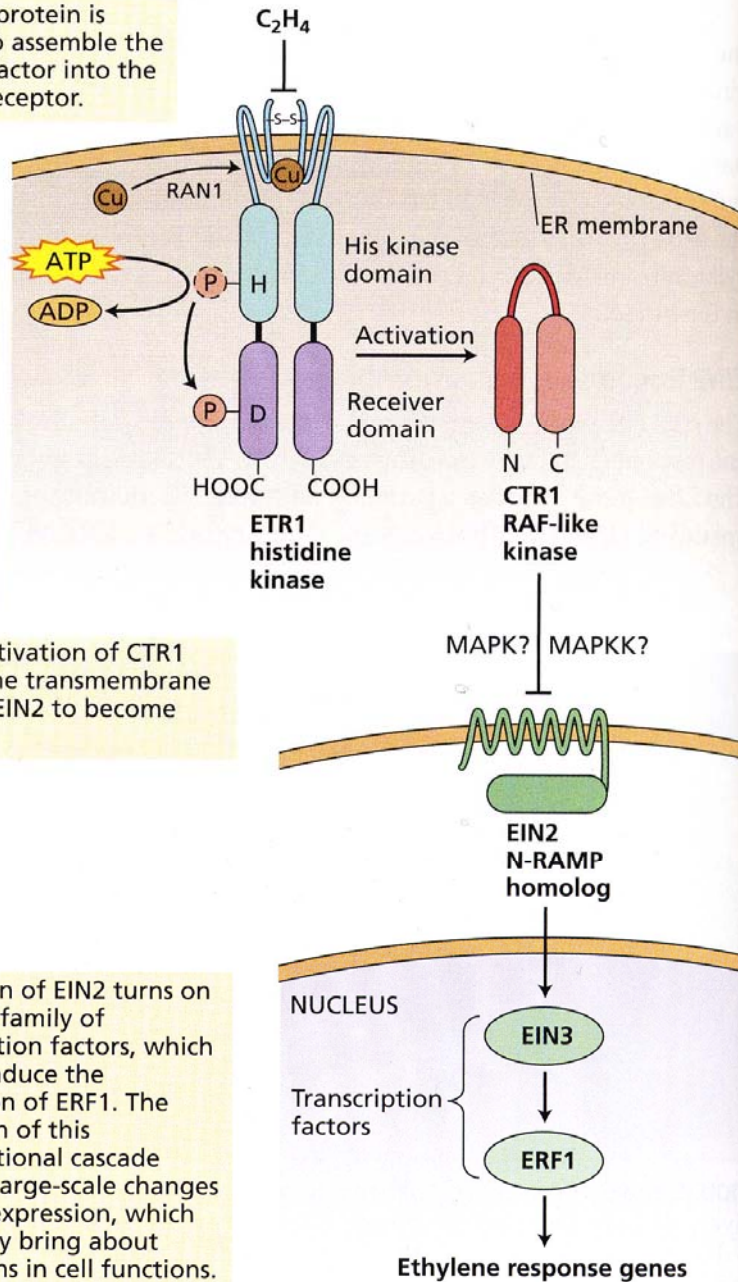
Trasduzione del segnale indotto dall'etilene

The RAN1 protein is required to assemble the copper cofactor into the ethylene receptor.

In the absence of ethylene, ETR1 and the other ethylene receptors activate the kinase activity of CTR1. This leads to a repression of the ethylene response pathway, possibly through a MAP kinase cascade. The binding of ethylene to the ETR1 dimer results in its inactivation, which causes CTR1 to become inactive.

The inactivation of CTR1 allows the transmembrane protein EIN2 to become active.

Activation of EIN2 turns on the EIN3 family of transcription factors, which in turn induce the expression of ERF1. The activation of this transcriptional cascade leads to large-scale changes in gene expression, which ultimately bring about alterations in cell functions.



Mutante *etr1* (ethylene-resistant 1) insensibile all'etilene

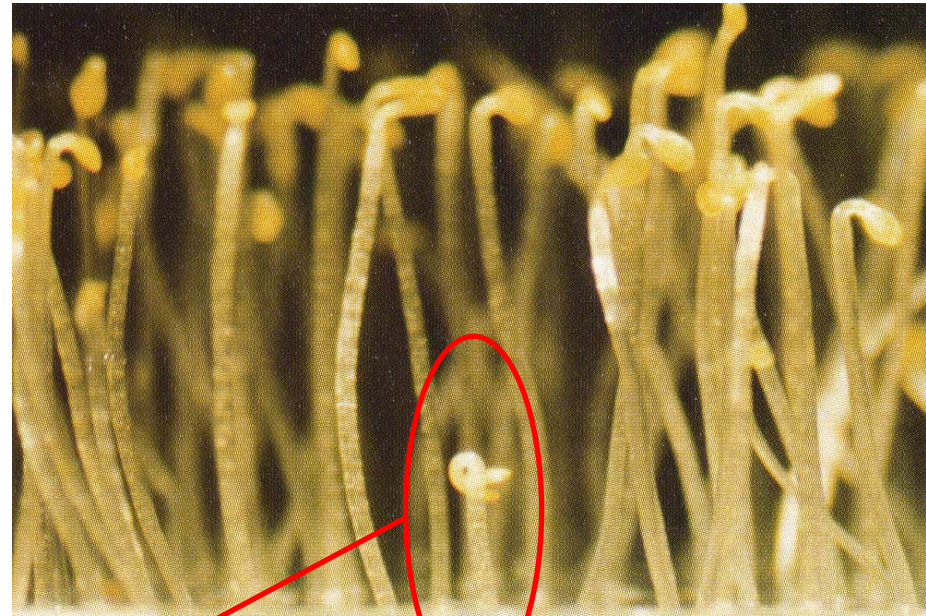
Dopo aver mutagenizzato (EMS)
le piantine di *Arabidopsis* erano
cresciute 3 giorni al buio in
presenza di etilene

Il mutante non mostra risposta
tripla in presenza di etilene



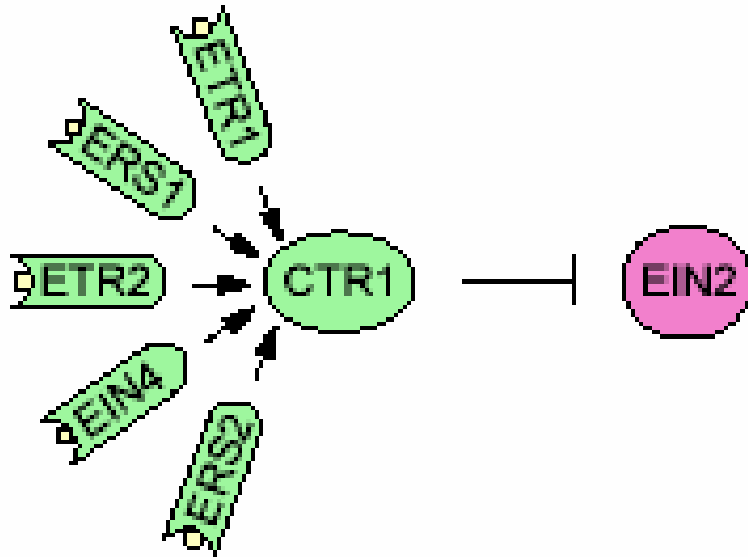
Mutante *ctr1* (constitutive triple response 1)

Dopo aver mutagenizzato (EMS) le
piantine di *Arabidopsis* erano
cresciute 3 giorni al buio in
presenza di aria



Il mutante mostra risposta tripla
anche in assenza di etilene

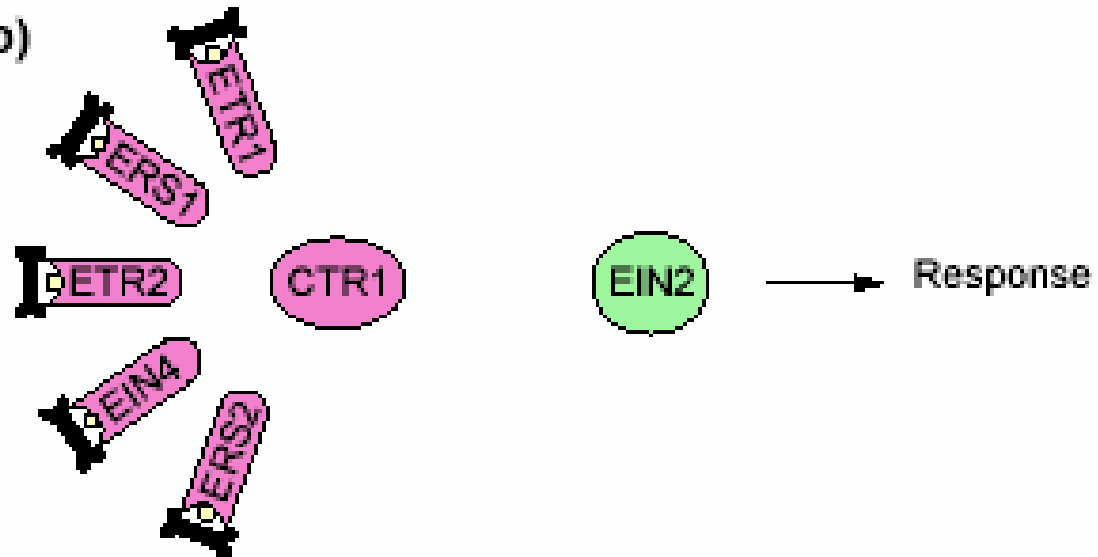
(a)

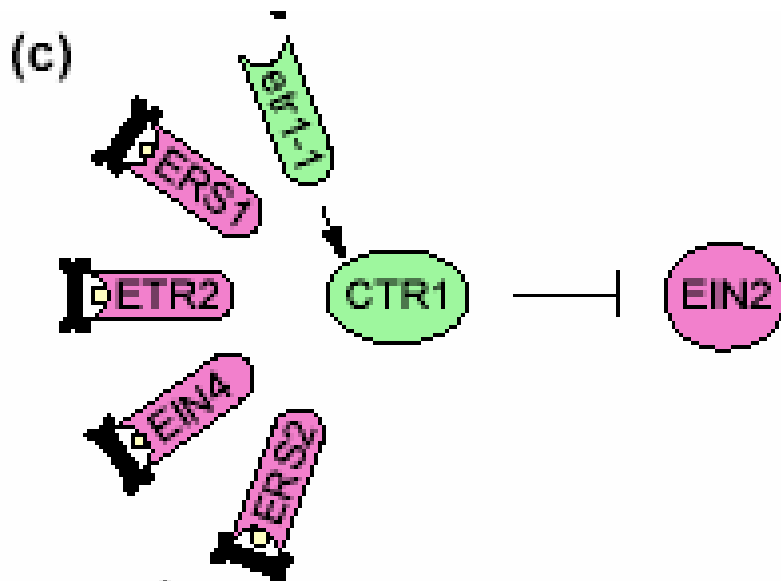


In **assenza di etilene** il recettore
è attivo su CTR1,
CTR1 attivato inibisce EIN2
NON SI HA RISPOSTA TRIPLA

In **presenza di etilene** il
recettore viene inibito,
CTR1 non è attivato e
non inibisce EIN2
RISPOSTA TRIPLA

(b)



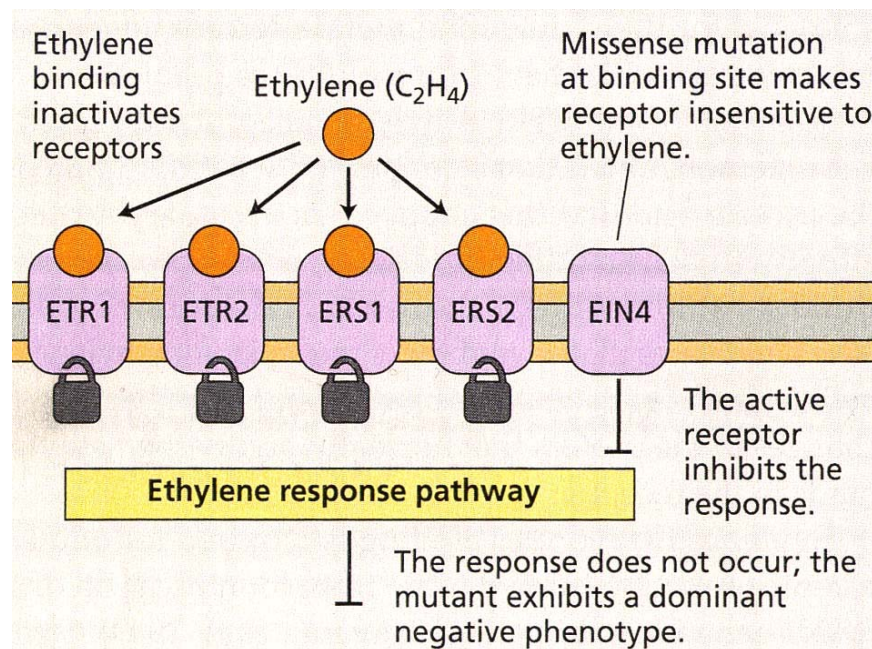


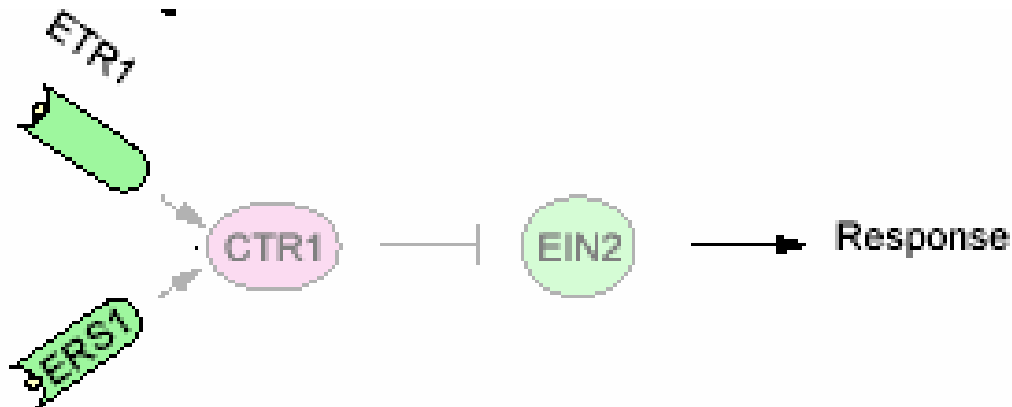
Mutante *etr1*

ETR1 mutato è insensibile all'etilene e attiva CTR1 anche in sua presenza

**NON SI HA RISPOSTA
TRIPLA ANCHE IN PRESENZA
DI C_2H_4**

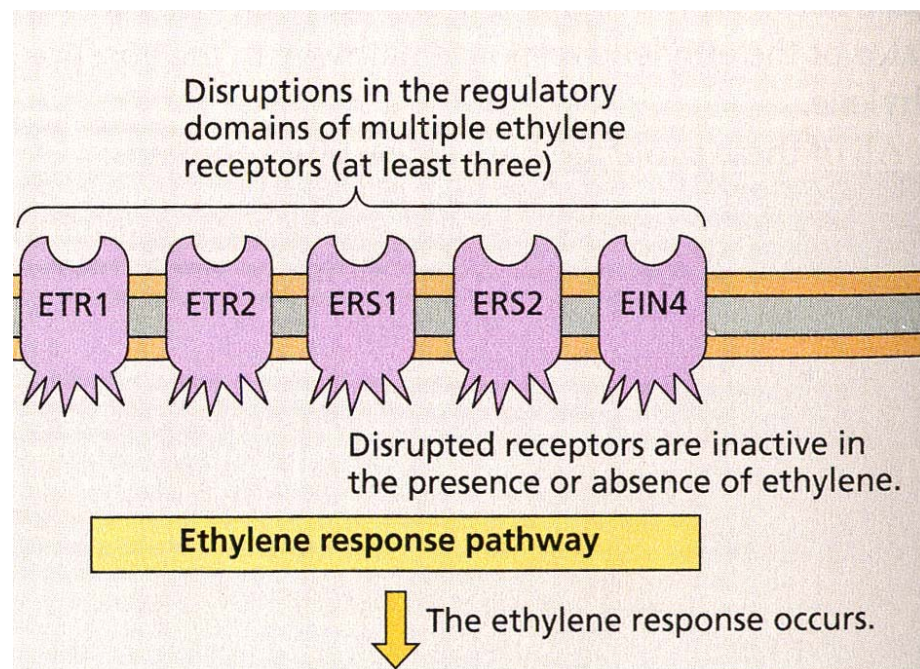
mutazione gain of function





Fenotipo a risposta costitutiva

La mutazione loss of function dei recettori dell'etilene produce una risposta costitutiva in presenza e in assenza di etilene, infatti CTR1 è sempre in uno stato inattivo



ANALISI EPISTATICA

Permette di determinare la posizione di un componente rispetto ad un altro in una via di trasduzione di un segnale cellulare

Una mutazione si definisce epistatica se può mascherare il fenotipo indotto da un'altra mutazione sostituendolo con il proprio

Le 2 mutazioni devono avere fenotipi chiaramente distinti

- insensibilità ad un ormone
- risposta costitutiva in assenza dell'ormone

Se le mutazioni conferiscono segnali opposti la mutazione epistatica sarà geneticamente "downstream"

Il mutante *ctr1* è epistatico rispetto al mutante *etr1*, infatti il doppio mutante *etr1/ctr1* presenta il fenotipo costitutivo di *ctr1*

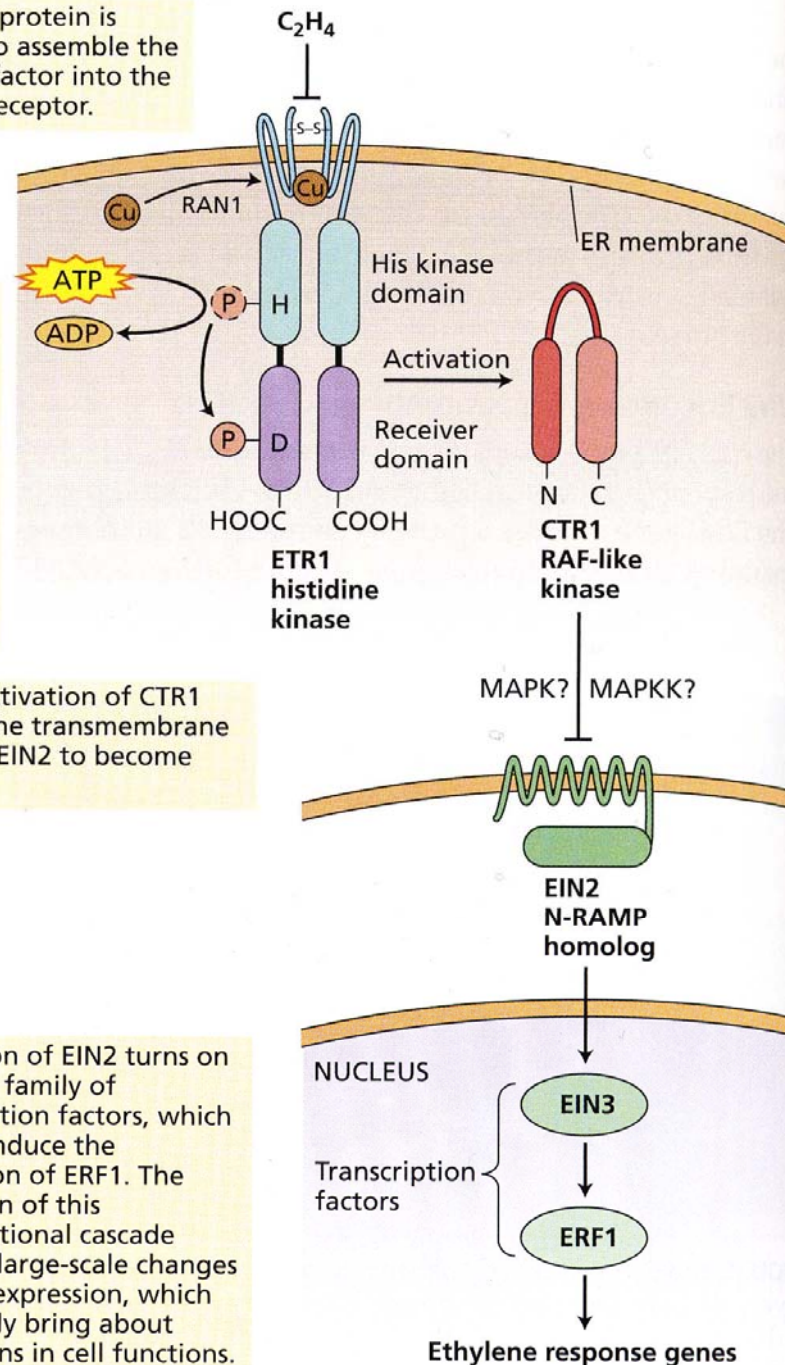
CTR1 si trova a valle di ETR1

The RAN1 protein is required to assemble the copper cofactor into the ethylene receptor.

In the absence of ethylene, ETR1 and the other ethylene receptors activate the kinase activity of CTR1. This leads to a repression of the ethylene response pathway, possibly through a MAP kinase cascade. The binding of ethylene to the ETR1 dimer results in its inactivation, which causes CTR1 to become inactive.

The inactivation of CTR1 allows the transmembrane protein EIN2 to become active.

Activation of EIN2 turns on the EIN3 family of transcription factors, which in turn induce the expression of ERF1. The activation of this transcriptional cascade leads to large-scale changes in gene expression, which ultimately bring about alterations in cell functions.



Studio dell'espressione dei geni

DIFFERENTIAL DISPLAY



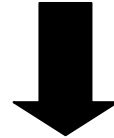
→ mRNA → Trascrizione inversa



→ mRNA → Trascrizione inversa

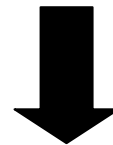


Trascrizione inversa



1° filamento di cDNA

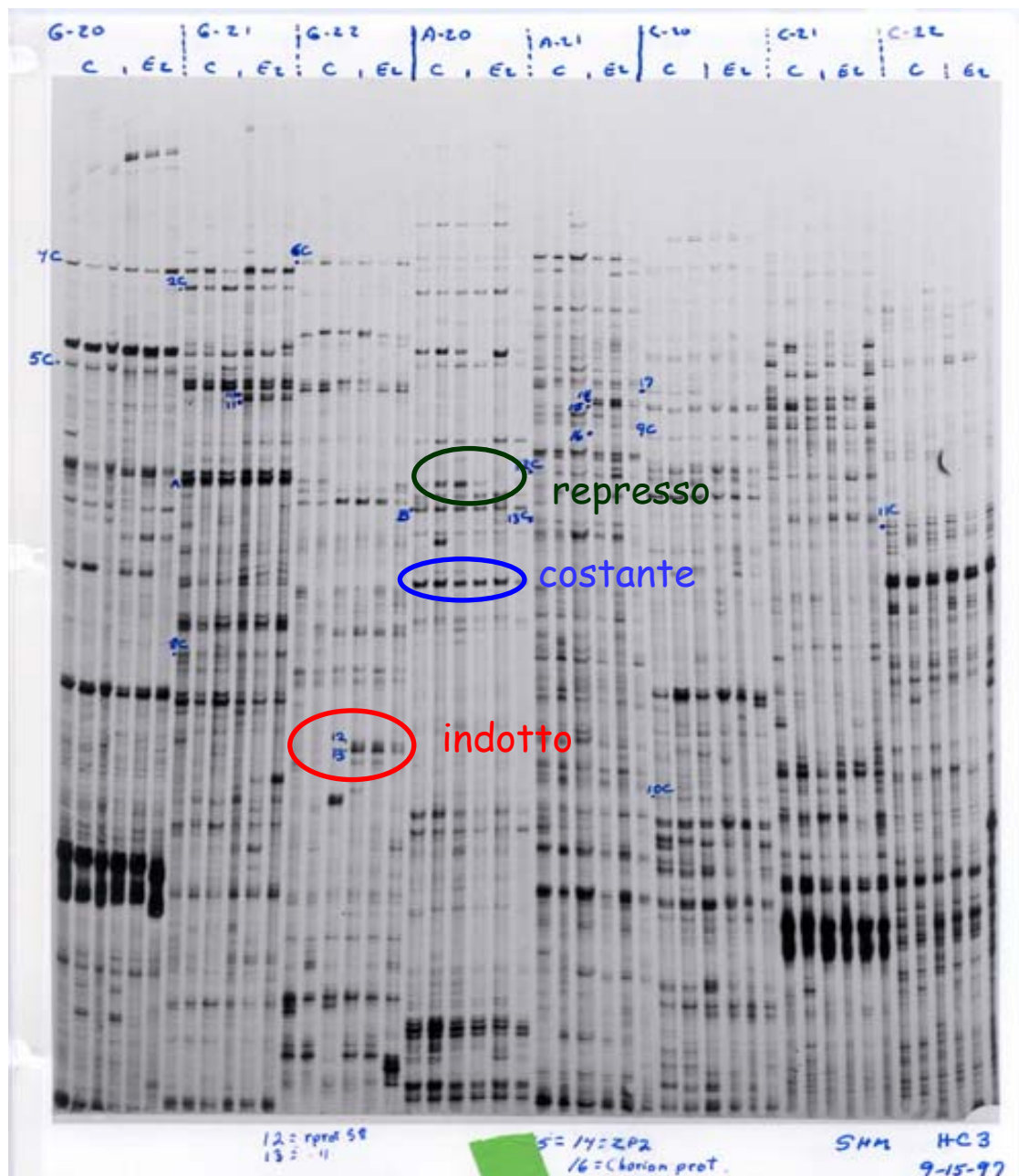
random primers
(miscela)



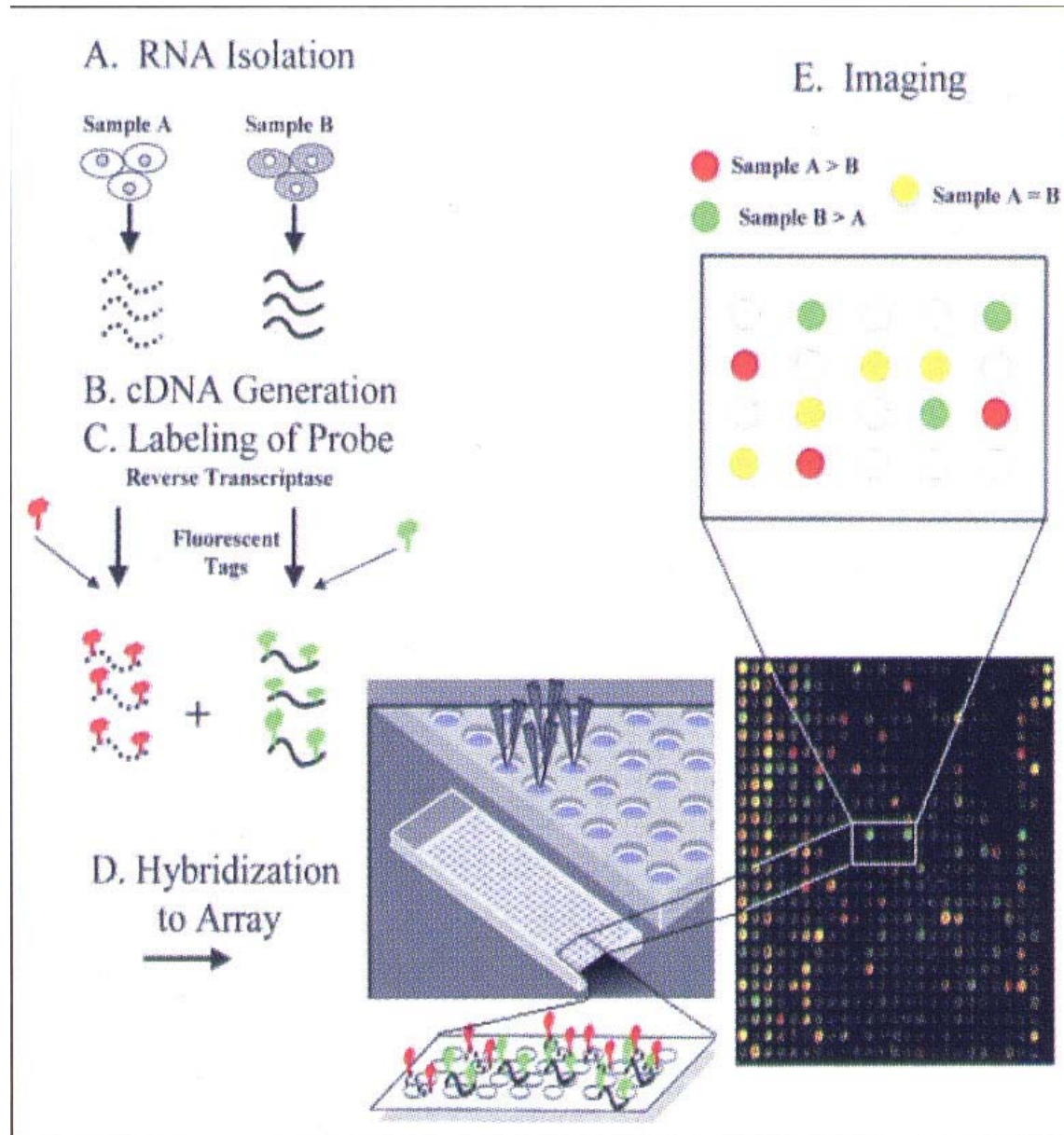
PCR



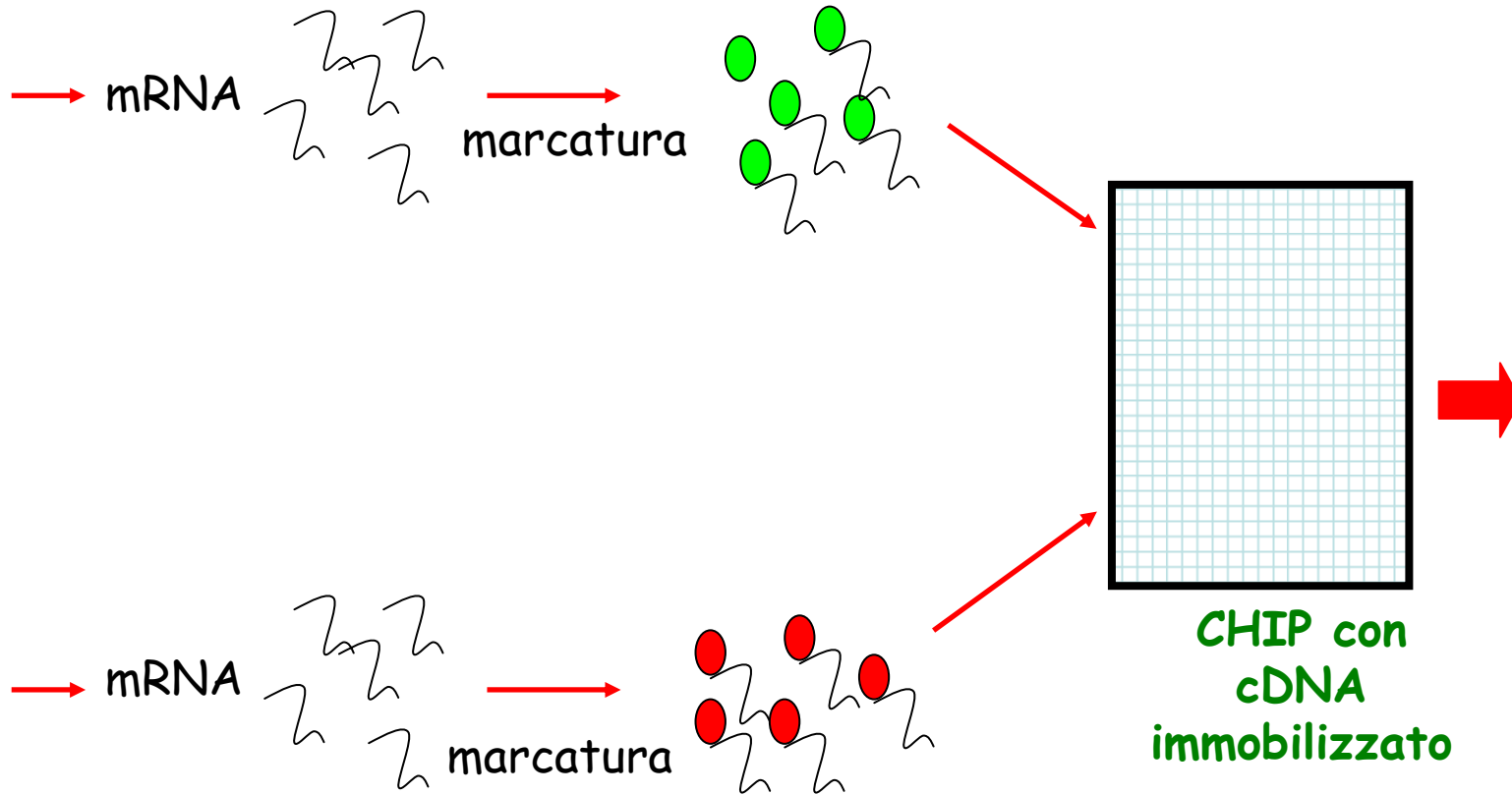
separazione dei frammenti in elettroforesi



DNA Microarray



DNA Microarray



maggiore è il numero dei
geni immobilizzati sul chip
migliore è il risultato

