

Pathway fotoperiodico

Modello “EXTERNAL COINCIDENCE”

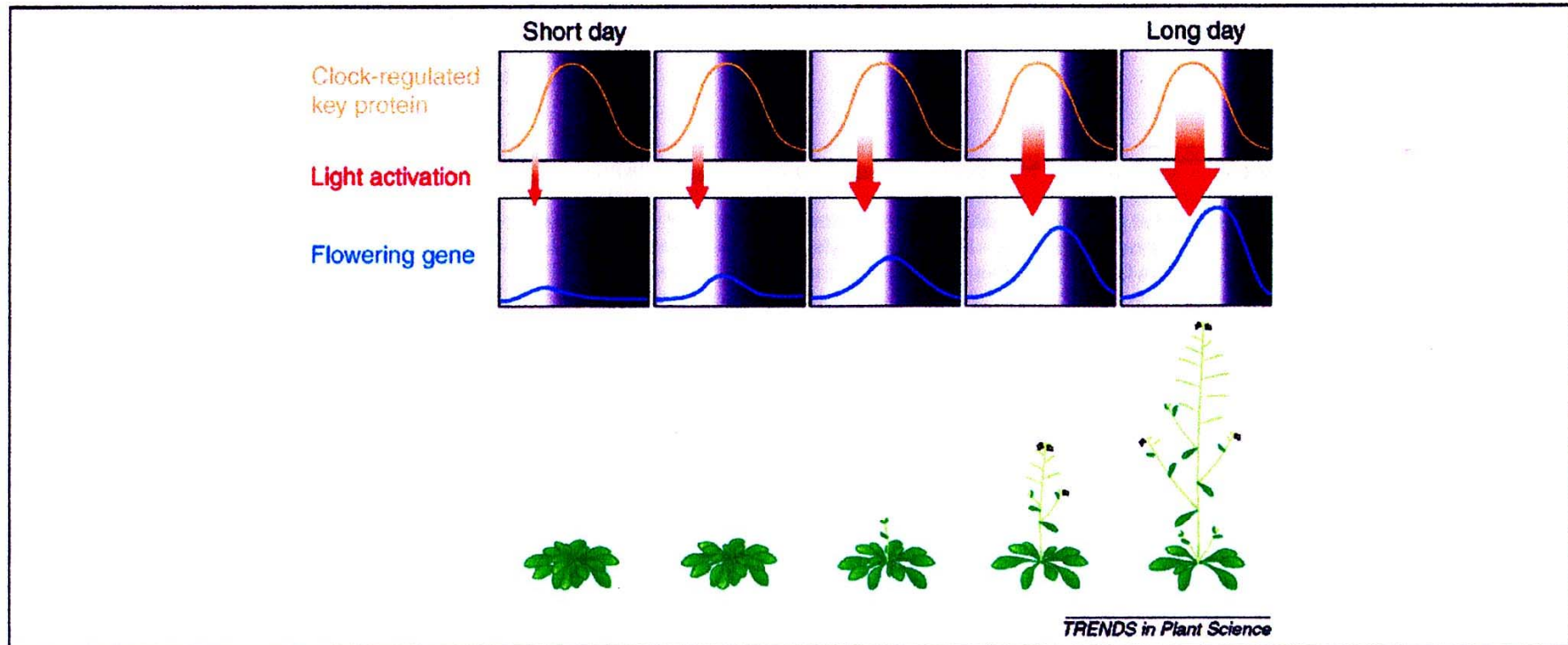


Figure 1. The external coincidence model: an example of the photoperiodic flowering response in long-day (LD) plants. The function of the clock-regulated key regulator, which induces the expression of the flowering gene, is regulated by light, therefore, flowering will be accelerated when the late-afternoon expression of the key regulator and the presence of daylight coincide.

EXTERNAL COINCIDENCE:

L'orologio circadiano genera una fase **inducibile dalla luce** durante il ciclo giorno/notte

La fioritura si ha quando una particolare durata del giorno espone le piante alla luce durante la fase inducibile

L'interazione tra il ritmo circadiano e la luce avviene a livello della trascrizione del gene **CONSTANS (CO)** e della stabilità della proteina espressa

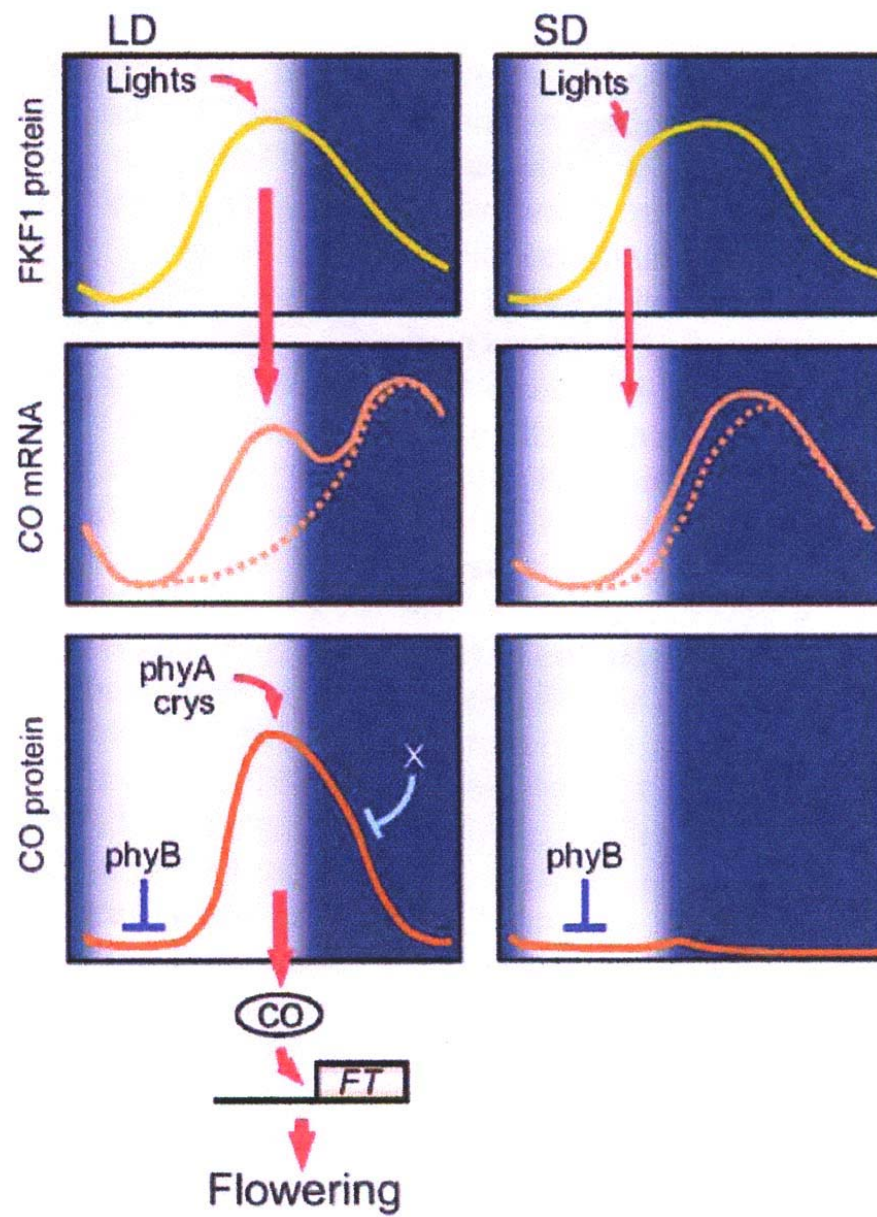
CONSTANTS promuove la fioritura inducendo direttamente la trascrizione del gene **FLOWERING LOCUS T (FT)**

FT è un gene **FPI**

Nel normale ciclo giorno/notte il mRNA di CO mostra un ritmo giornaliero

- In condizioni di SD si hanno elevati livelli di CO mRNA solo di notte
- In condizioni di LD elevati livelli di CO mRNA si raggiungono alla fine del periodo di luce e durante la notte
- I livelli di CO mRNA determinano la **FASE INDUCIBILE** dalla luce e si ha fioritura in condizioni di LD perché solo così le piante sono esposte alla luce quando CO è espresso in maniera elevata

Condizione non sufficiente



Ulteriore livello di regolazione basato sulla attivazione post-trascrizionale della proteina CO da parte della luce

Piante transgeniche 35S::CO

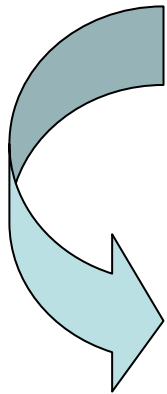
Livelli di CO mRNA alti in condizioni di luce e di buio

Livelli di proteina CO elevati alla luce ma bassi al buio
(degradazione tramite il proteosoma)

Ritmo giornaliero di espressione

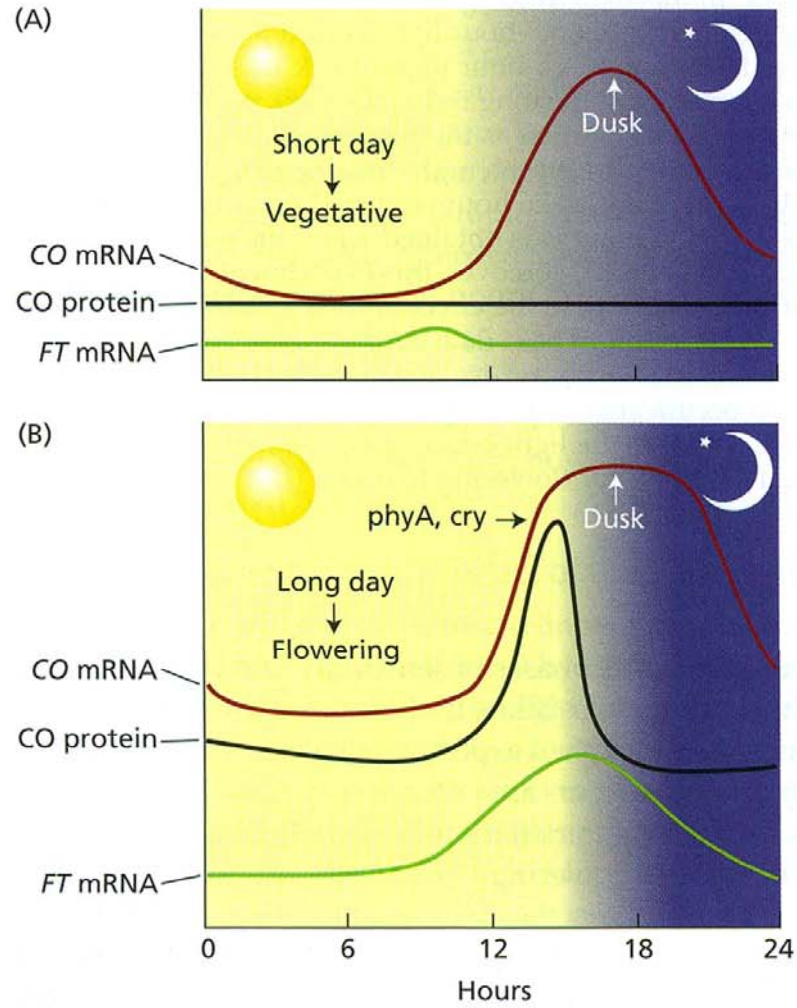
In LD la proteina CO si accumula alla fine del giorno

Deve esserci COINCIDENZA tra l'accumulo di mRNA del gene CO e la luce del giorno

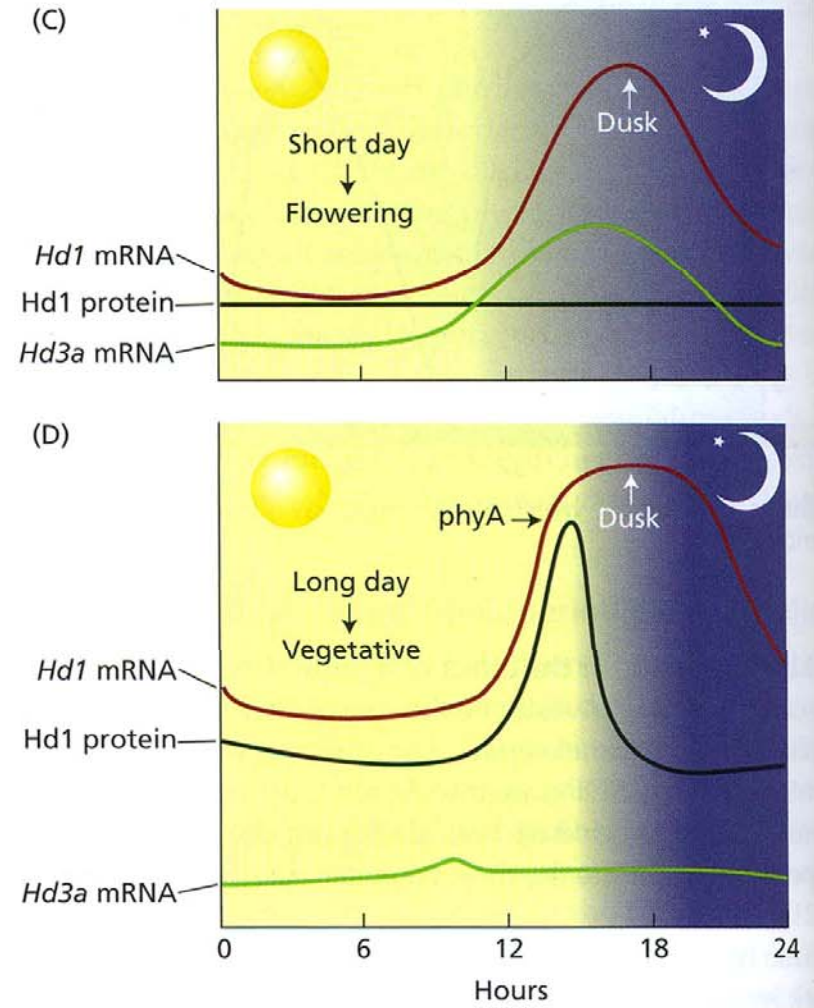


In modo da consentire l'accumulo della proteina CO

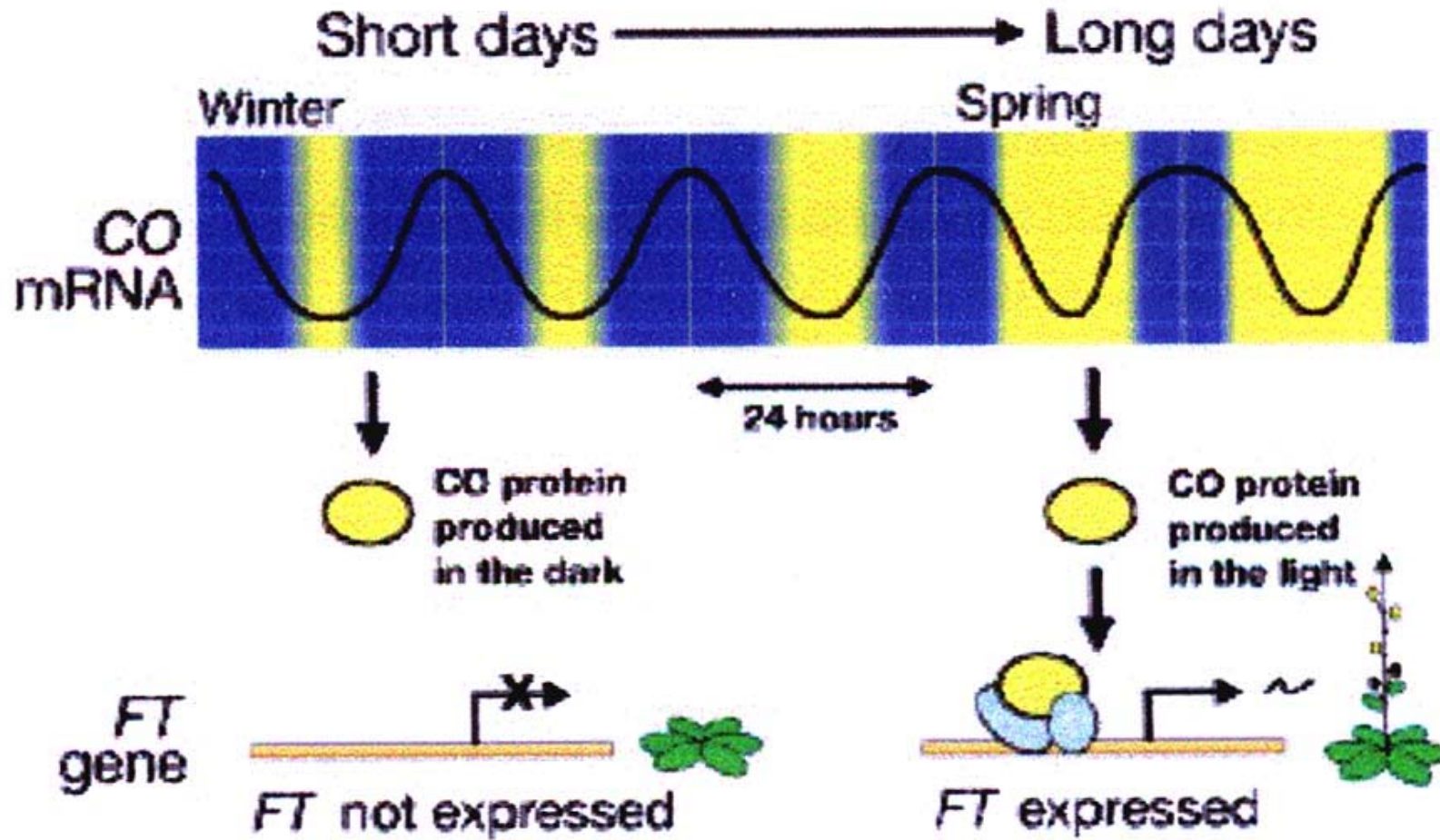
Arabidopsis



Rice



Fioritura di Arabidopsis in condizioni di LD



Come viene generato il ritmo giornaliero dei livelli di trascrizione di CO?

Da un mutante a fioritura ritardata in LD identificato il gene

FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX (FKF1)

FKF1

- contiene un dominio di fotoricezione simile a quello della fototropina
- mostra un ritmo diurno di espressione con picco alla fine del giorno
- contiene un motivo F-box

FKF1 potrebbe agire come un fotorecettore in grado di attivare la trascrizione di CO mediando la degradazione di un repressore

Come viene generato il ritmo giornaliero dei livelli della proteina CO?

PhyB promuove la riduzione dei livelli di CO al mattino

PhyA e criptocromi stabilizzano la proteina CO alla fine del giorno

PhyA e criptocromi stabilizzano CO in risposta alla luce rosso lontano o blu continua

Durante la notte CO è degradato secondo un meccanismo indipendente

COINCIDENZA ESTERNA

In condizioni di LD l'espressione di CO coincide con la luce al tramonto e al pomeriggio

Questo promuove l'espressione del gene **FLOWERING LOCUS T**

(CO non contiene un DNA binding domain interagisce con altri fattori di trascrizione HAP5, 2, 3 formando un complesso in grado di legarsi agli elementi CCAAT-)

CO integra l'orologio endogeno con il segnale luminoso

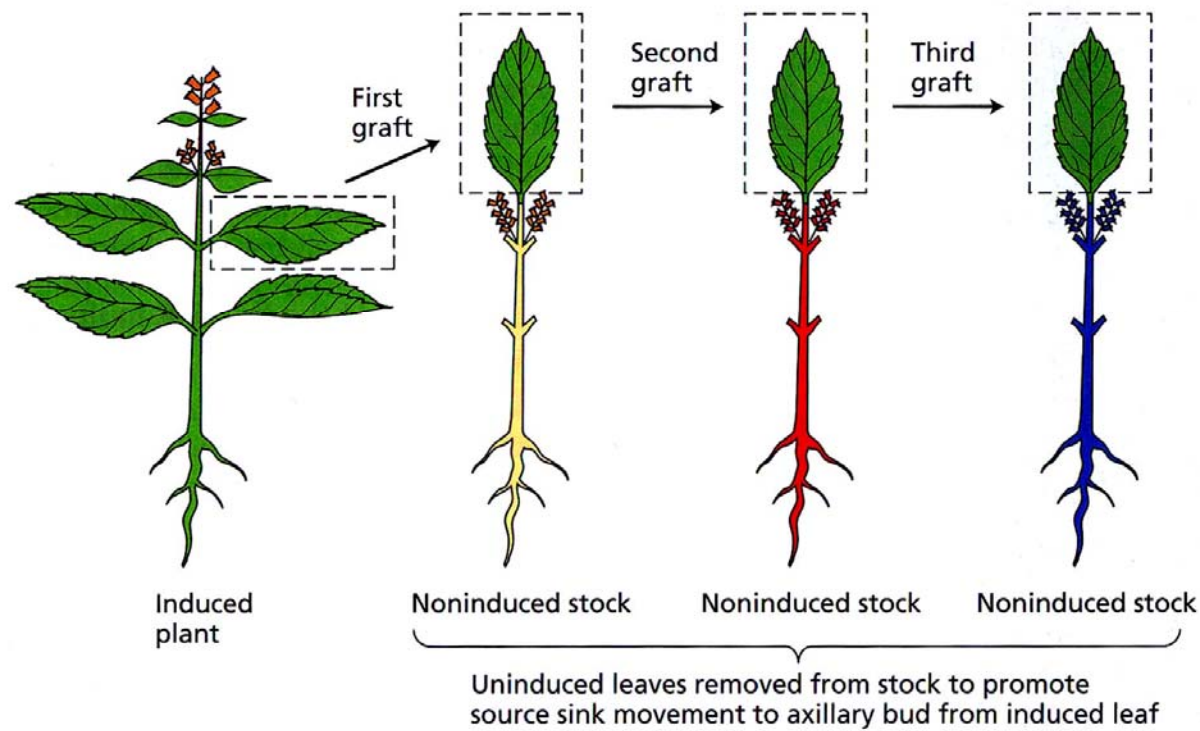
CO mRNA viene espresso con un ritmo circadiano e la proteina è stabilizzata da segnali luminosi al pomeriggio e al tramonto (PHYA CRY2)

Il segnale fotoperiodico è percepito nelle foglie e trasmesso all'apice meristematico



IPOTESI DEL “FLORIGENO”

(B) Grafting of induced leaf to uninduced shoot causes flowering in multiple grafts in *Perilla*.

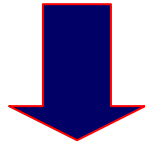


CO è espresso nel sistema vascolare delle foglie (cellule compagne del floema) e induce l'espressione di *FT* nello stesso tessuto

CO promuove fioritura se espresso nelle foglie ma non se espresso nel SAM

FT promuove fioritura sia se espresso nelle foglie che nel SAM

Ciò potrebbe indicare che il florigeno si genera a valle di *CO*



FT florigeno esso stesso o determina la sintesi del florigeno

FLOWERING LOCUS T (FT)

Mutante *ft* ritarda la fioritura in LD mentre è poco influenzato in SD



***FT* regola la via fotoperiodica**

La mutazione *ft* rafforza il fenotipo *lfy* e sopprime la fioritura precoce del fenotipo 35S::LFY indicando che i due geni sono su due ramificazioni della via fotoperiodica

FT mRNA aumenta durante la crescita vegetativa in LD e raggiunge il massimo appena prima della transizione florale

Espressione di FT costitutiva accelera la fioritura sia in LD che SD.
effetto additivo con espressione costitutiva di *LFY*

FT::GUS espressione primaria nel floema di foglie e radici

FT codifica per una proteina omologa alle Phosphatidylethanolamine binding proteins (PEBP) e alle Raf kinase inhibitor protein (RKIP) animali

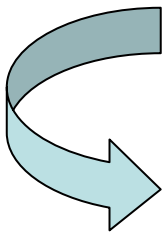
FT mRNA può migrare dalle foglie al SAM (ed anche la proteina)

Piante transgeniche HSp::FT

dopo heat shock su singola foglia: mRNA FT traslocato dalla foglia al SAM

dove viene espressa la proteina FT

FT si lega al fattore di trascrizione FD (bZIP) espresso nel SAM

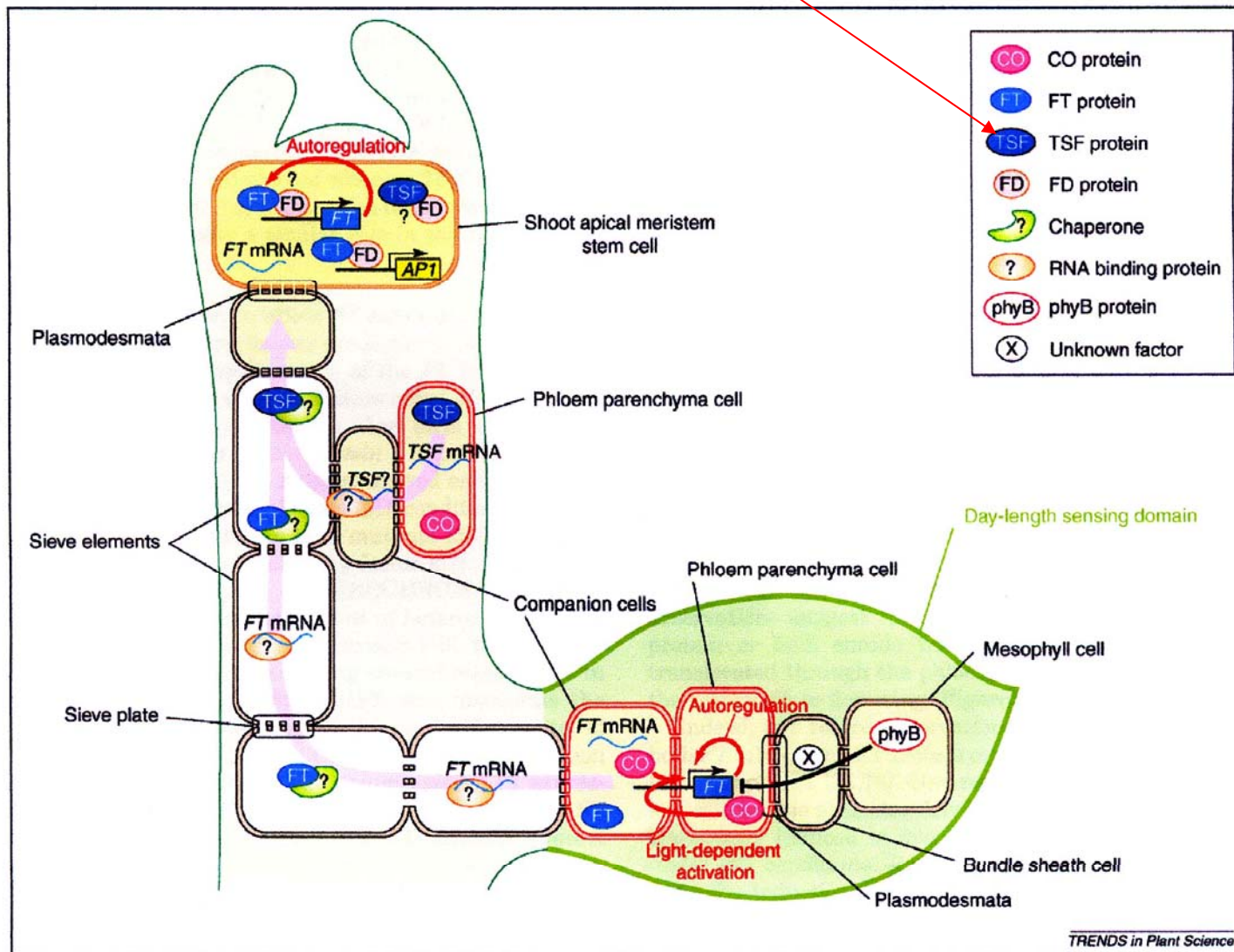


Il complesso FT/FD attiva la trascrizione del gene **APETALA1**

FT è un gene Integratore dei Pathways Fiorali (FPI)

AP1 è un gene di identità meristematica (FMI)

(TWIN SISTER OF FT)



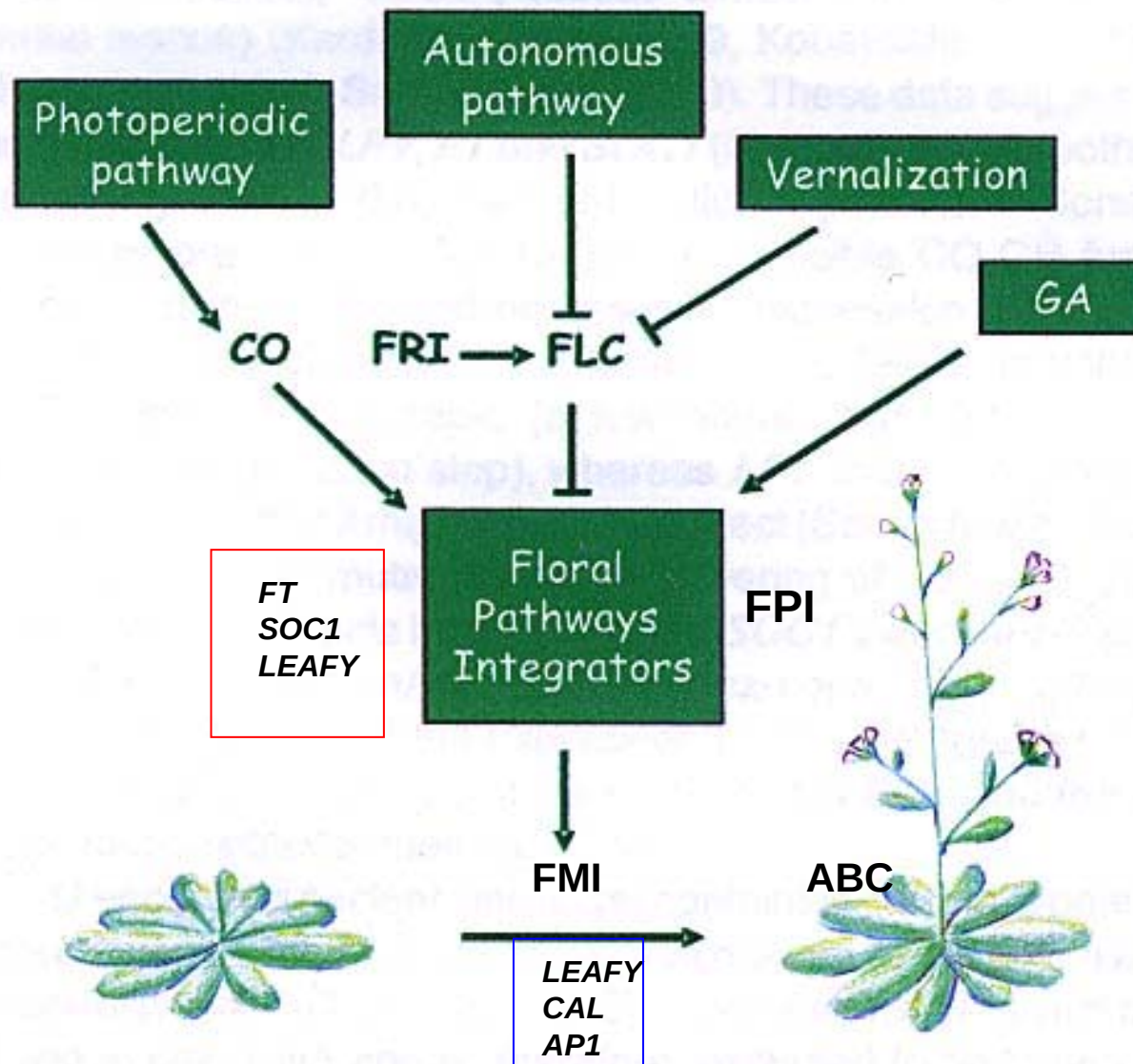
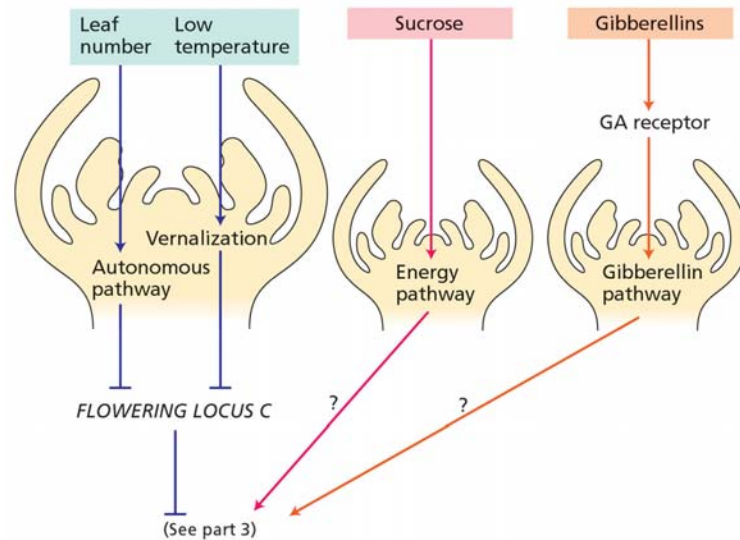


Fig. 1. Main pathways reaching Floral Pathways Integrators



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.32 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Autonomo/Vernalizzazione: la fioritura ha luogo in risposta ad un segnale endogeno (numero di foglie) o a un periodo di basse temperature

In entrambi i pathways viene ridotta l'espressione del repressore della fioritura

FLOWERING LOCUS C (FLC)

FLC è un **inibitore** dell'espressione di *LEAFY*

GIBBERELLINE: determinano la fioritura precoce in assenza di condizioni fotoperiodiche induttive (giorno corto per Arabidopsis)

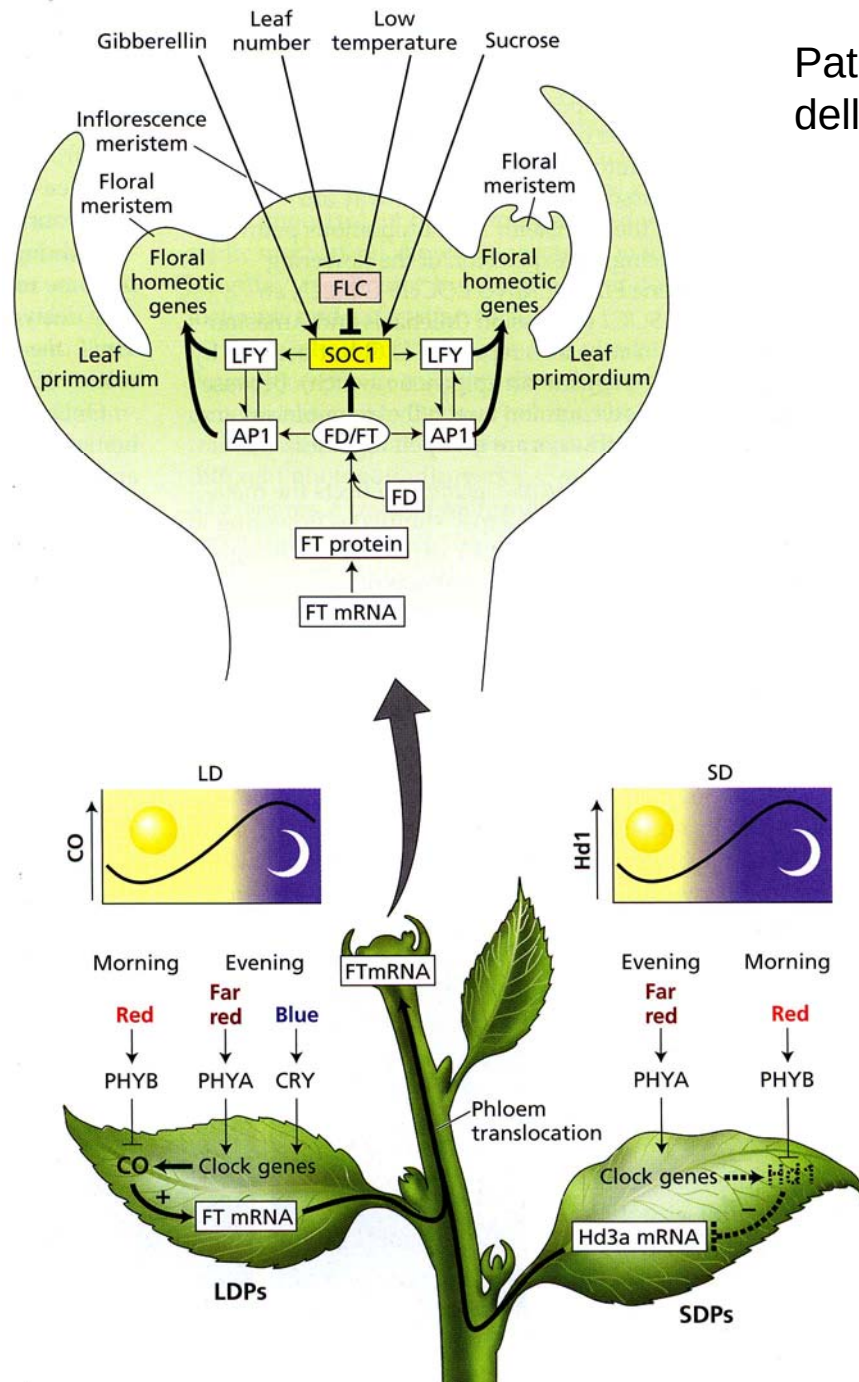
meccanismo non noto

promozione della espressione di LEAFY

Interazione con SOC1

SACCAROSIO: stimola la fioritura mediante un incremento dell'espressione di LEAFY secondo un meccanismo non noto

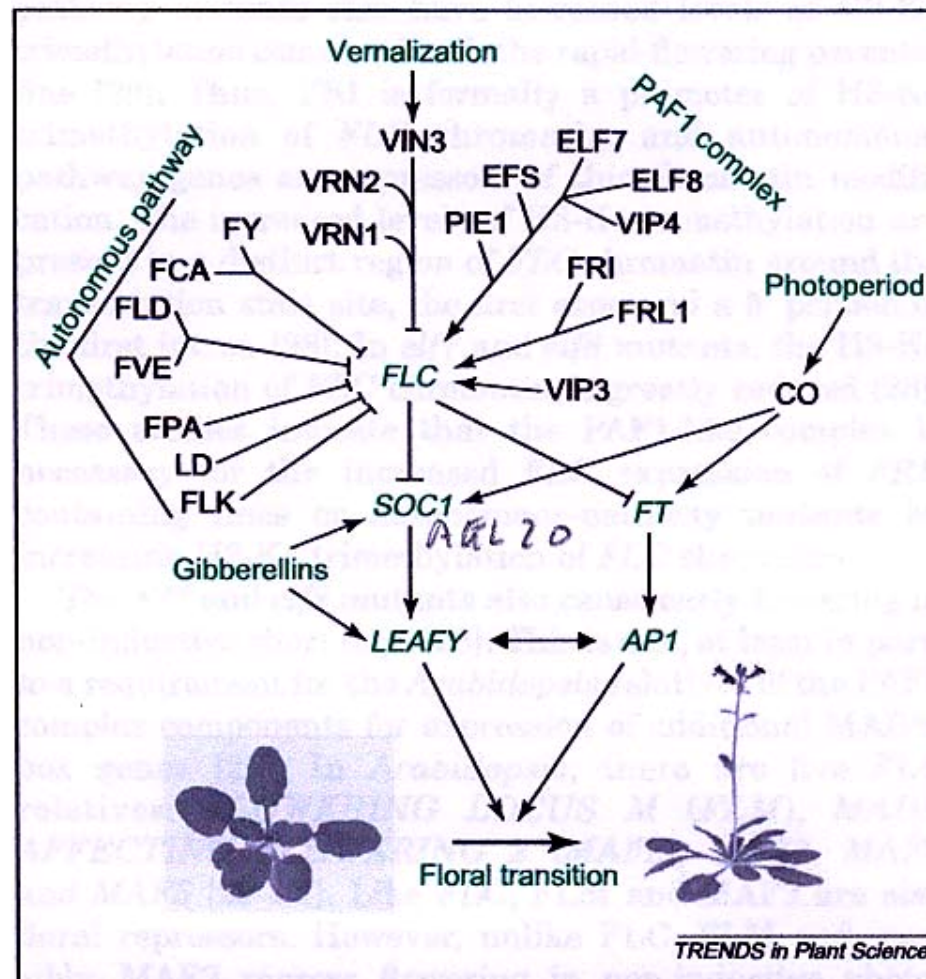
Pathways per l'induzione della fioritura in arabidopsis



pathway AUTONOMO e VERNALIZZAZIONE

Regolazione di FLC (inibitore della fioritura)

L'espressione di *FLC* è controllata da numerosi geni



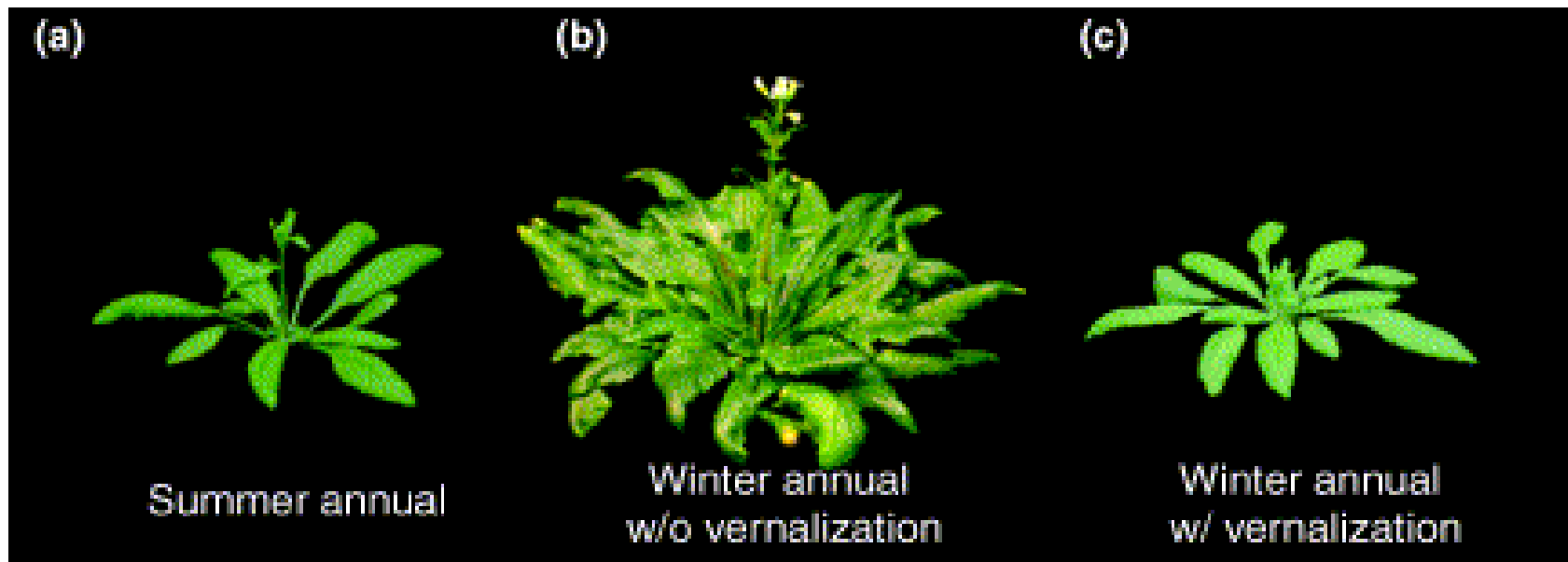
Esistono diverse varietà di arabidopsis in quanto al tempo di fioritura

a fioritura tardiva, con vernalizzazione (invernale annuale)

(germinano in estate e fioriscono in primavera)

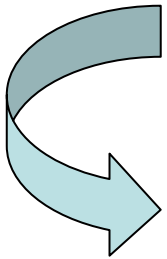
a fioritura precoce (estiva annuale)

(germinano e fioriscono nella stessa estate)



Per scoprire i geni della Vernalizzazione, incrociate varietà annuali invernali con varietà annuali estive

Analizzata la progenie



la differenza a livello molecolare è determinata dalla variazione allelica di

FRIGIDA (FRI)

FLOWERING LOCUS (FLC)

annuali invernali hanno alleli dominanti di *FRI* e *FLC*

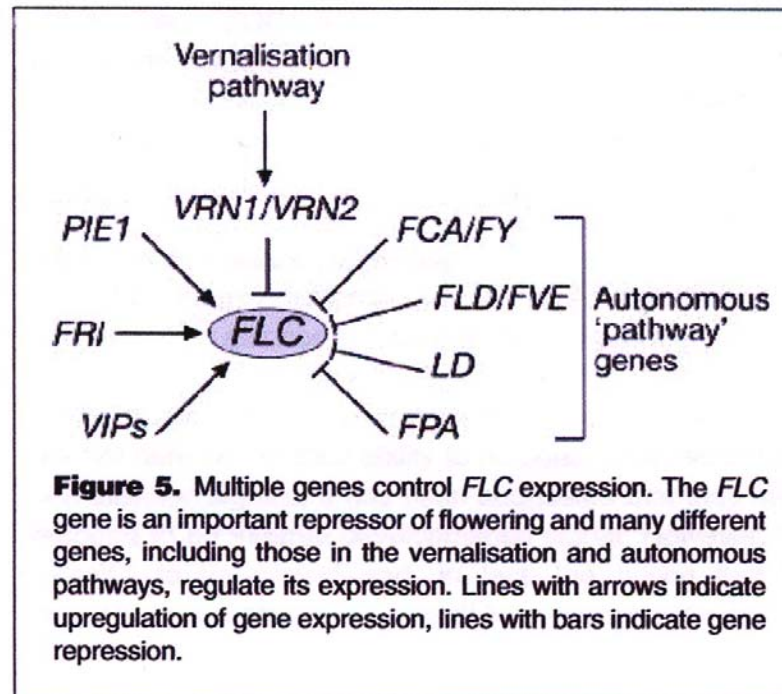
varietà precoci hanno alleli *fri* non funzionali o *flc* deboli

FRI e *FLC* agiscono sinergicamente

I pathways Vernalizzazione e Autonomo riducono livelli di FLC rimuovendo la repressione della fioritura mediata da FLC

Il quale agisce principalmente inibendo FT e SOC1

FRI è un modulatore positivo della espressione di FLC

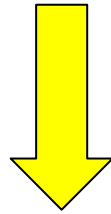


REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE DI *FLC*

Meccanismo epigenetico

La ipermetilazione H3-K4 della cromatina di *FLC* è associata con il ritardo della fioritura nelle varietà invernali-annuali di *Arabidopsis*

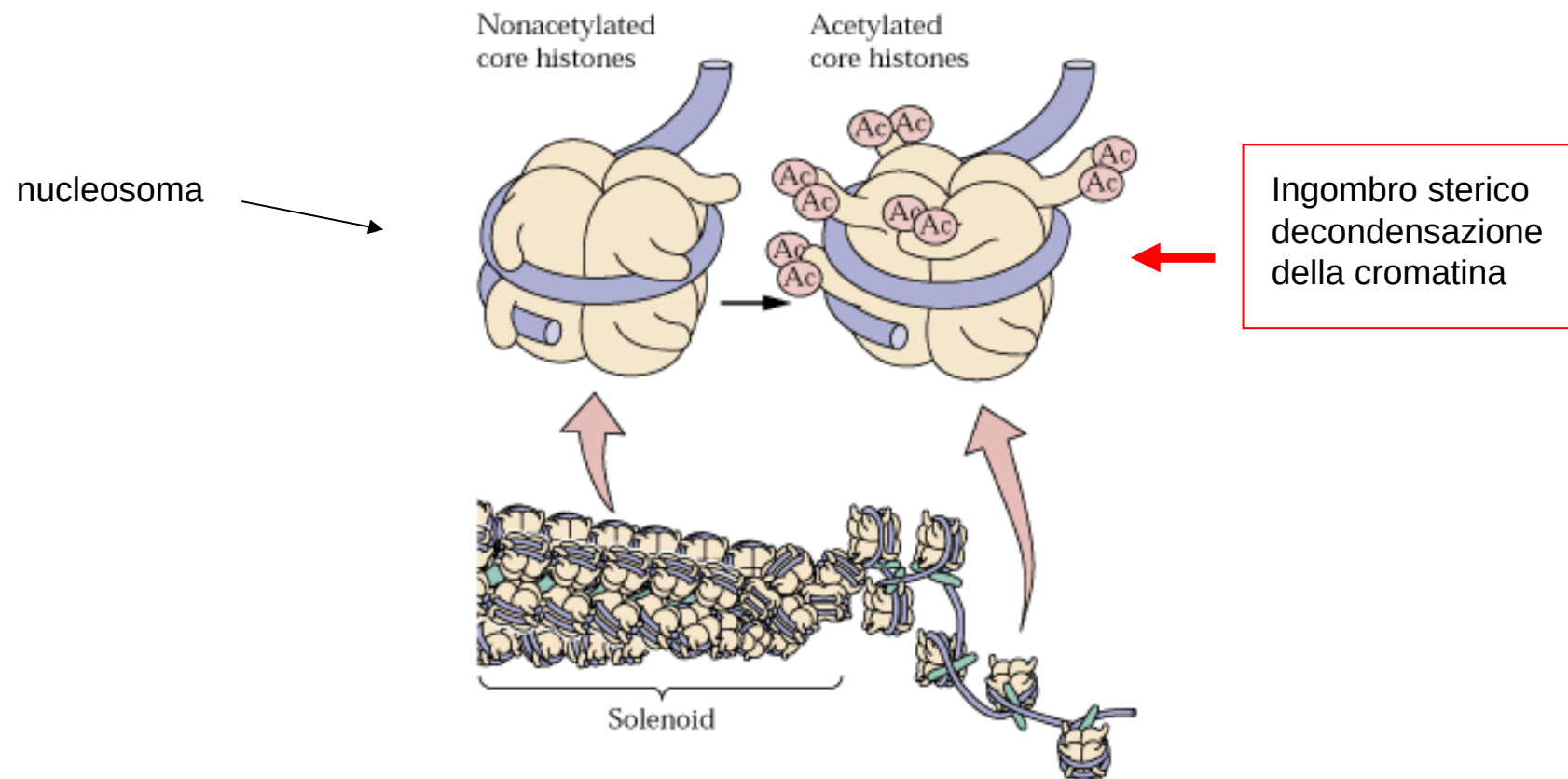
**Caratterizzati alcuni repressori e attivatori di *FLC*
all'interno dei pathways AUTONOMO, VERNALIZZAZIONE (e FRI)**



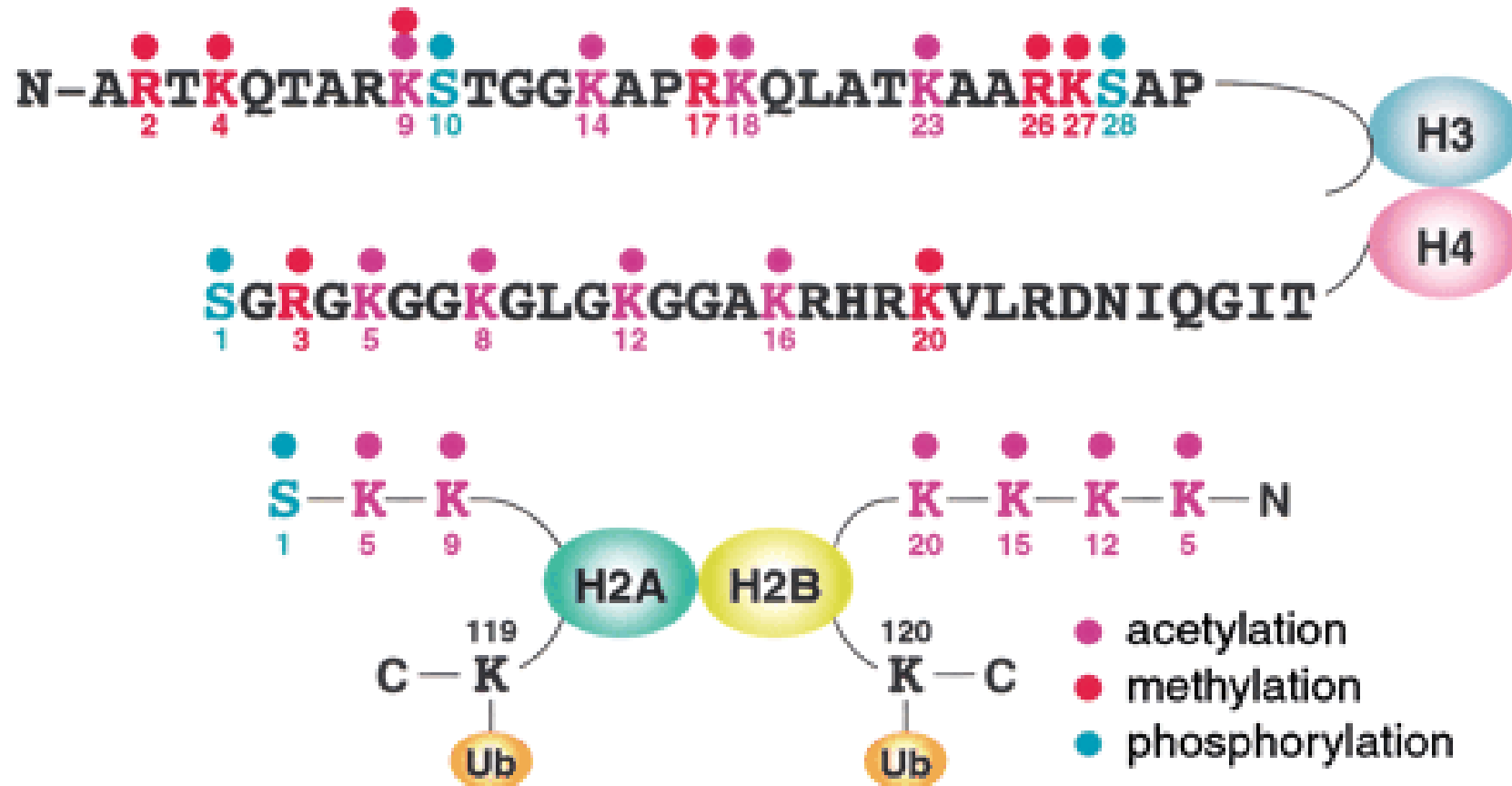
**Agiscono mediante modificazione
covalente della cromatina di *FLC***

Modificazioni covalenti della cromatina come metilazione e acetilazione di residui specifici di specifici istoni costituiscono il “codice istonico”

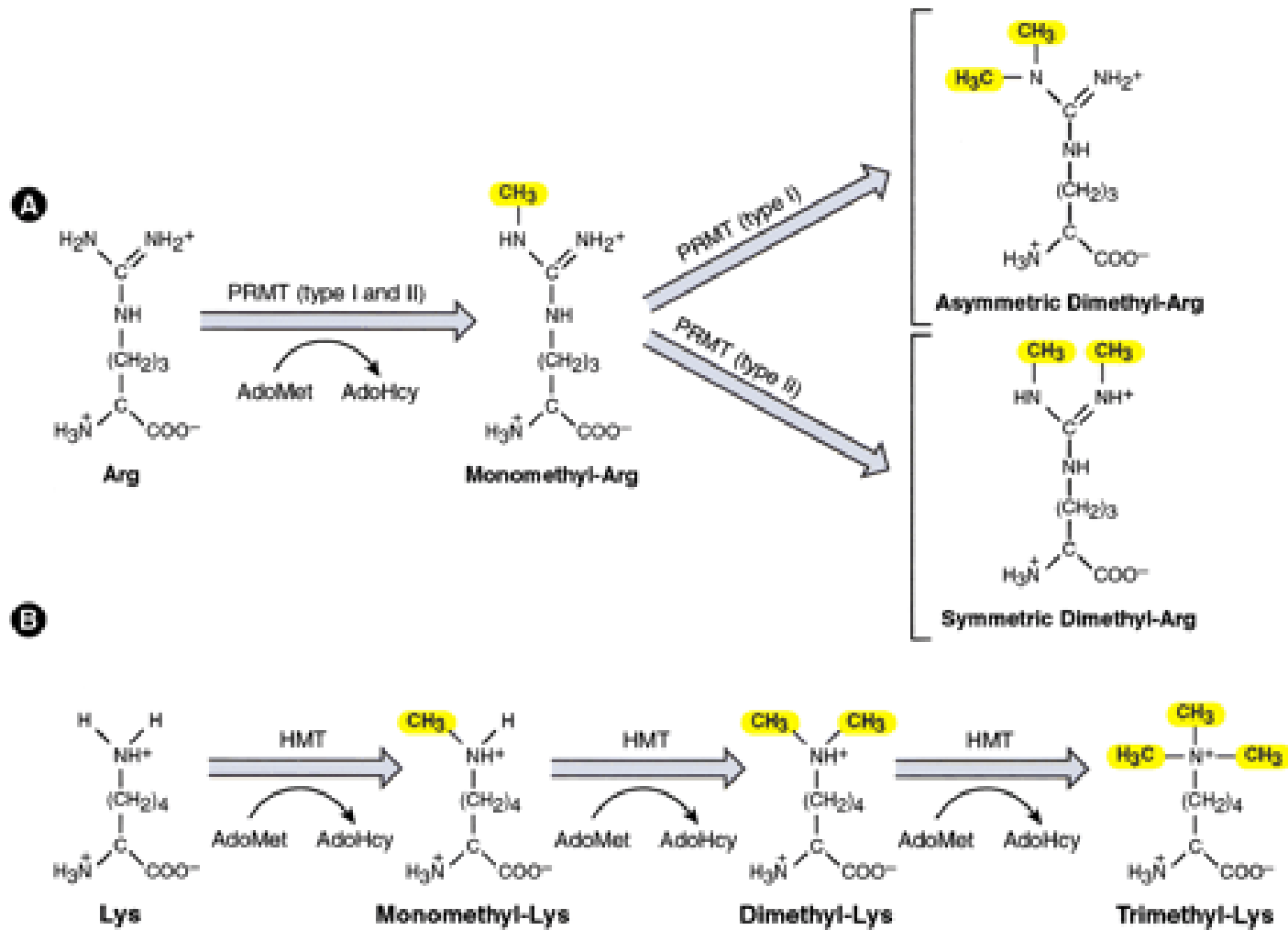
Fornisce un livello ulteriore di controllo della trascrizione genica che affianca quello esercitato dai fattori di trascrizione

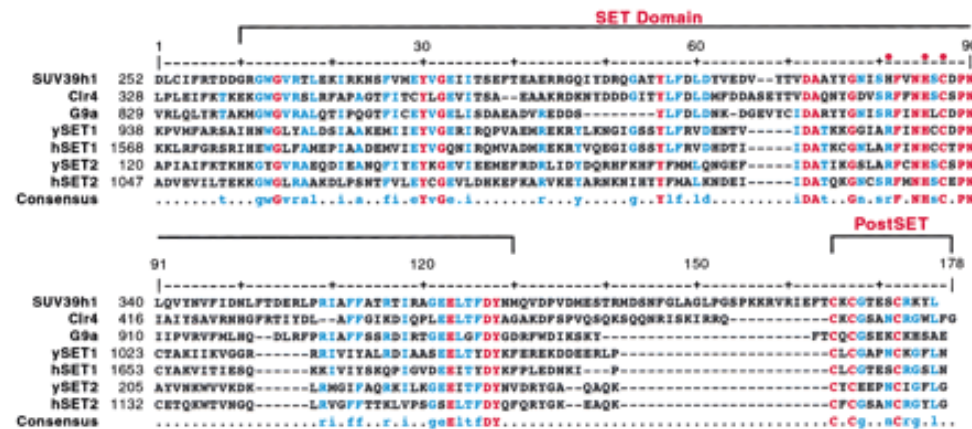


MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI di H3 e H4

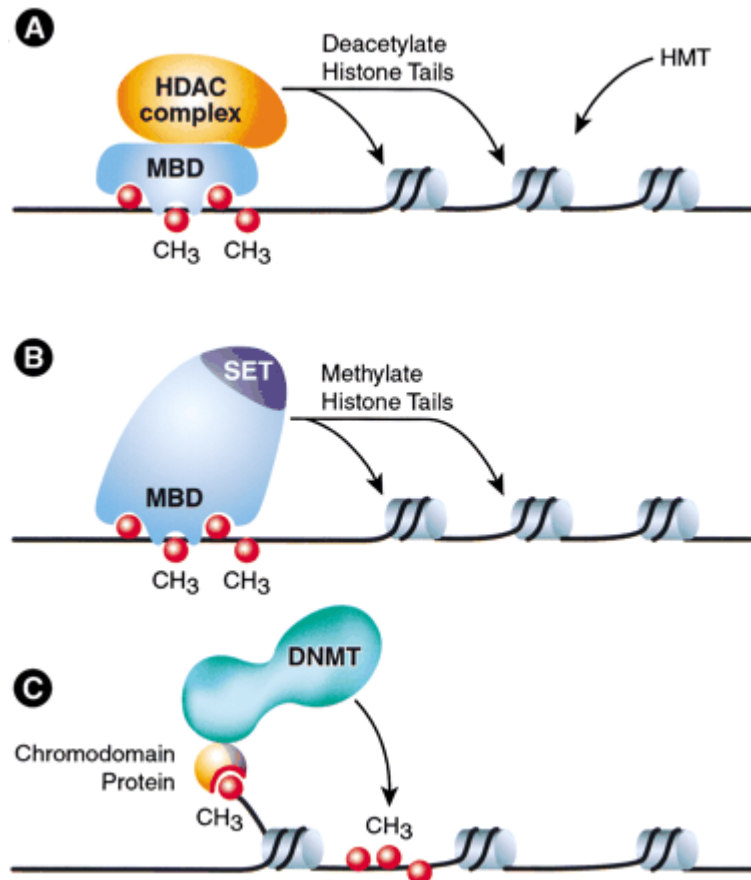


Famiglia delle Histone Methyltransferases

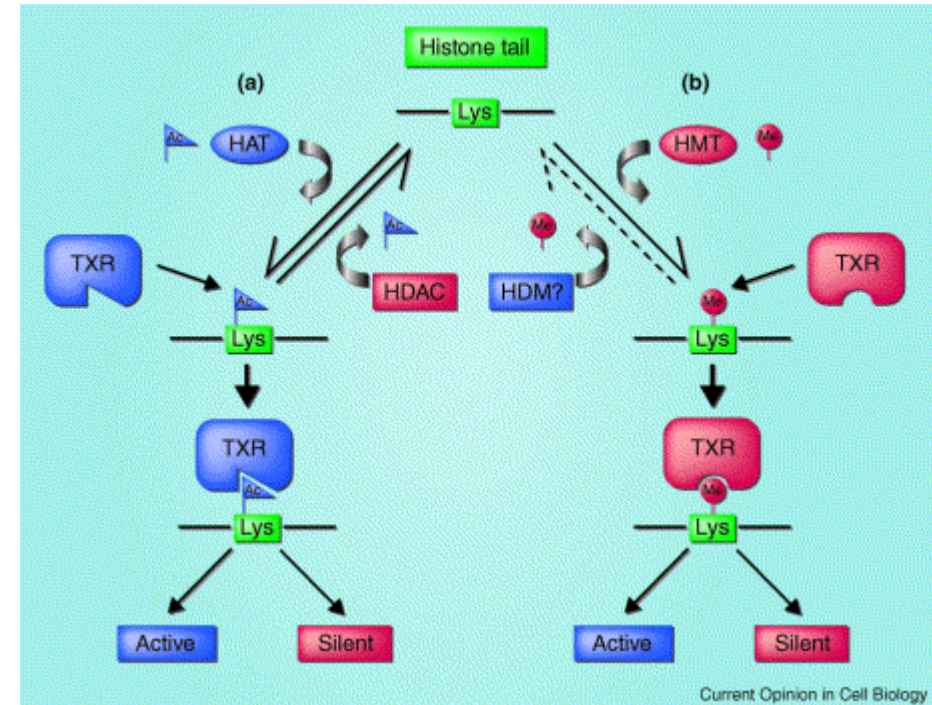
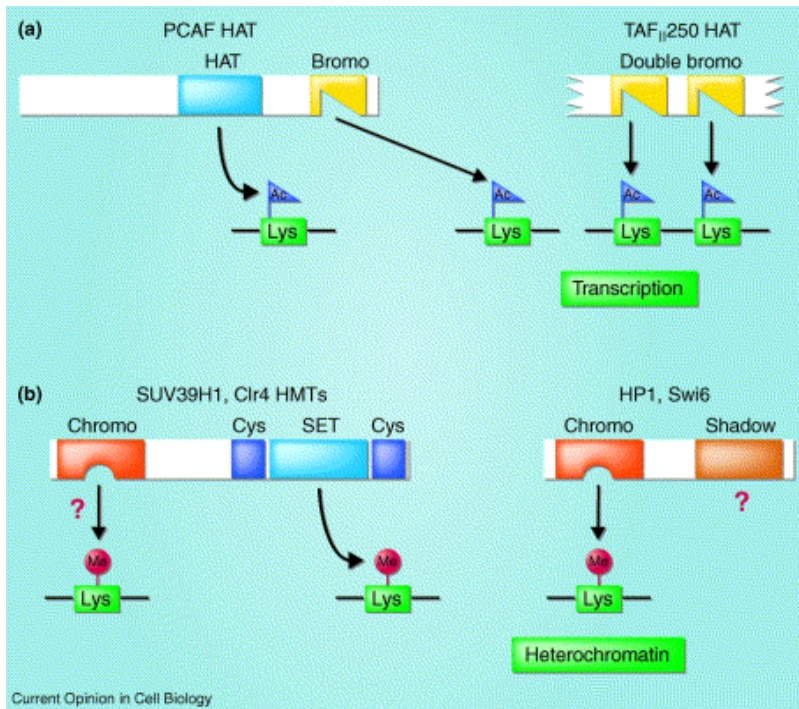




DOMINIO SET



Models depicting the relationship between DNA methylation, histone deacetylation, and histone methylation. (A) Methyl-CpG-binding proteins recruit HDAC complex to deacetylate histone so that the histone tails will be suitable for subsequent methylation by HMTs. (B) In chromatin domains where histones are hypoacetylated, the MBD domain-containing HMTs may bind directly and methylate the histones. (C) Methylated histone tails may recruit DNMTs to methylate DNA for long-term gene silencing.



H3-K9 metilazione



Repressione della trascrizione

H3-K4 metilazione



evolativamente molto conservata
e associata a geni trascritti

In lievito ed in Drosophila la TRIMETILAZIONE dell'ISTONE 3 (H3) sulla LISINA 4 (H3-K4) è associata a geni trascritti

In lievito il fattore 1 associato alla RNA polimerasi II (PAF1) si associa alla RNA pol II durante la trascrizione e lega una H3-K4 metiltransferasi (SET1)

SET1 determina la H3-K4 metilazione delle regioni 5' di geni trascritti

Nella ricerca di mutanti di arabidopsis per la transizione
fioritura ritardata/ fioritura precoce a causa della attenuazione
della espressione di *FLC*

Identificati ortologhi dei componenti di PAF1 di lievito

PAF1complex: PAF1, CTR9 LEO1,
CDC73, RTF1

EARLY FLOWERING7
(*ELF7*)

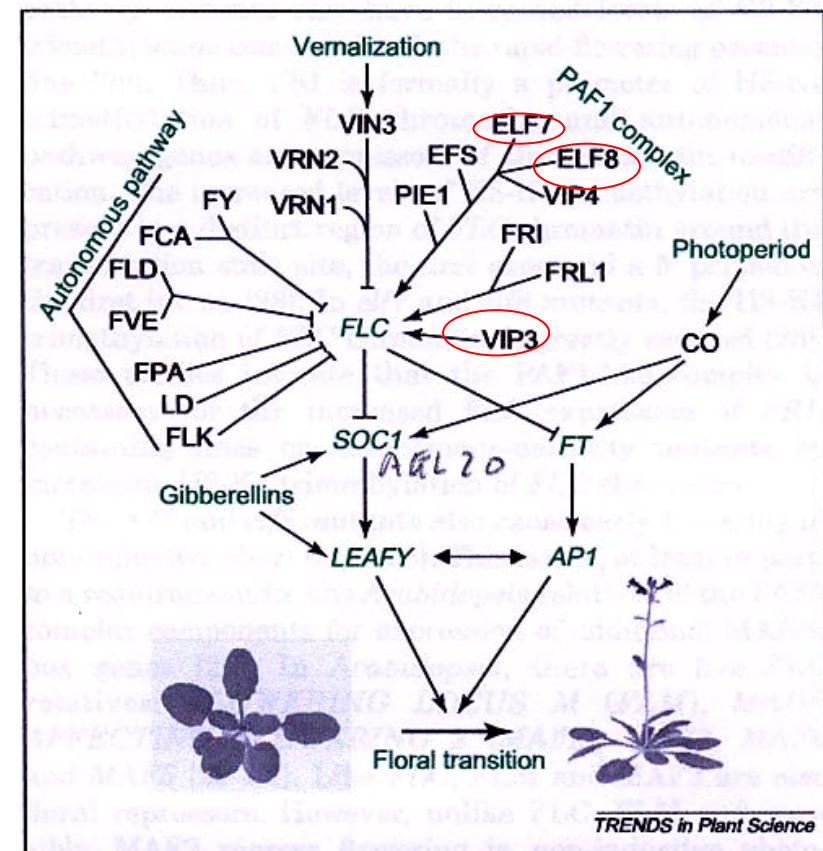
PAF1

EARLY FLOWERING8
(*ELF8*)

CTR9

**VERNALIZATION
INDEPENDANCE** (*VIP4*)

LEO1



I mutanti *elf7,elf8, vip4* sono a fioritura precoce

In questi mutanti si ha una ridotta espressione di *FLC* dovuta al mancato funzionamento del complesso *PAF1* che media la H3-K4 metilazione della regione della cromatina in cui si trova il gene *FLC*

In varietà annuali invernali di *arabidopsis* contenenti l'allele *FRI* la cromatina di *FLC* ha elevati livelli di H3-K4 metilazione in confronto a specie precoci che hanno un allele *FRI* non funzionante

Mutanti a fioritura ritardata della via AUTONOMA hanno livelli più elevati di H3-K4 metilazione in confronto alle varietà parentali a fioritura precoce



FRI* è un promotore della H3-K4 metilazione di *FLC* e i geni della via AUTONOMA agiscono reprimendo la metilazione di *FLC

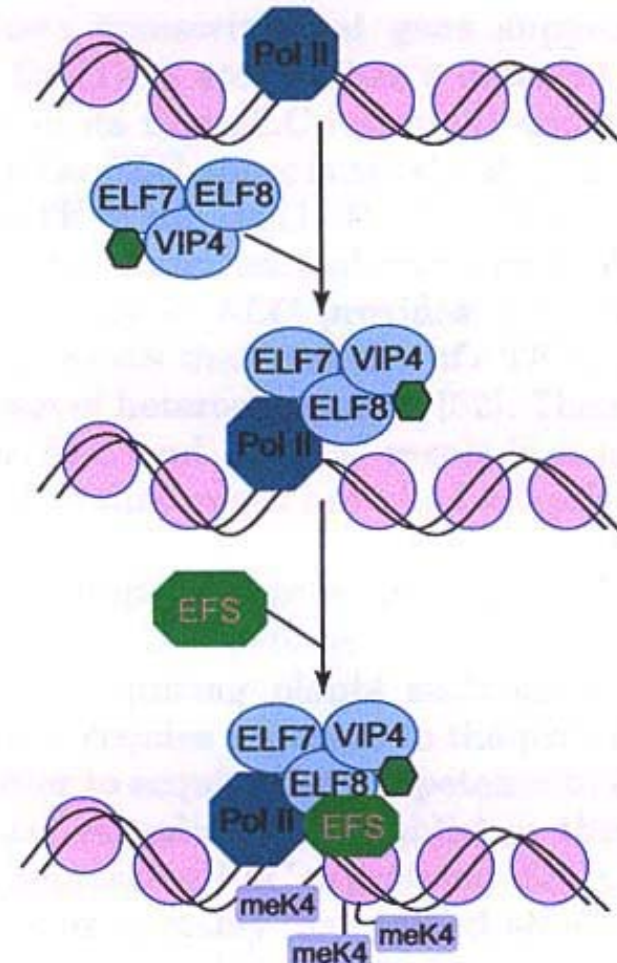
SET1 è l' unica H3-K4 metiltransferasi di lievito

In arabidopsis parecchie H3-K4 transferasi potenziali

Il mutante *early flowering in short days (efs)* come *elf7*, *elf8* , fiorisce in SD, non manifesta il ritardo di fioritura indotto da FRI, ha ridotti livelli di espressione di *FLC*

EFS è omologa a *SET1*

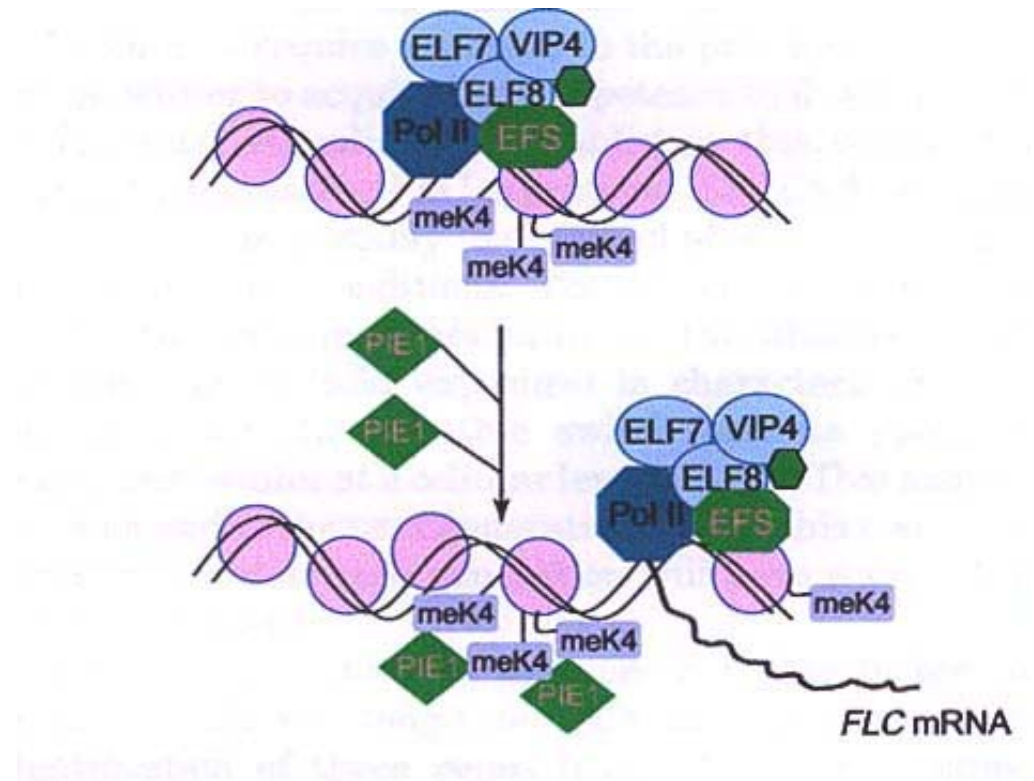
Complessi *PAF1* di arabidopsis associano *EFS* per la H3-K4 metilazione di regioni della cromatina di *FLC*



In lievito *ISW1p* (ATP hydrolyzing chromatin-remodeling protein)
si lega a H3-K4 di- e tri- metilati

In *Arabidopsis* *PIE1* omologo a *ISW1p*

Necessario per l'espressione di *FLC*
pie1 simile a *efs*, *elf7*, *elf8*



PIE1 si associa a H3-K4 trimetilati e determina il rimodellamento della cromatina
di *FLC*

Il complesso PAF1 like di arabidopsis è necessario per avere alti livelli di espressione di FLC

PAF1 agisce incrementando la trimetilazione H3-K4 della regione della cromatina in cui si trova il gene FLC

Varietà annuali invernali di arabidopsis che contengono l'allele dominante FRI hanno livelli più elevati di H3-K4 trimetilazione rispetto alle varietà estive

FRI promotore della H3-K4 trimetilazione di FLC

Variazioni naturali dell'allele *FLC* determinano il comportamento a fioritura precoce di alcune varietà di *arabidopsis*

La varietà *Ler* ha un allele funzionale *FRI* ma ha bassi livelli di mRNA *FLC* ed è a fioritura precoce

FLC non è UP-regolato da *FRI*

L'allele di *FLC* presenta nella varietà *Ler* a una inserzione TE (1.2kb: Mutator-like transposable element) responsabile dell'insensibilità di *FLC* a *FRI*

L'inserzione TE rende *FLC* soggetto a modificazioni repressive della cromatina mediate da siRNA generati da sequenze TE correlate in altre regioni del genoma



metilazione H3-K9 e K27

della regione della cromatina di *FLC* che include l'inserzione TE e l'introne a valle

VIA AUTONOMA

Repressione dell'espressione di *FLC*

Alcuni componenti della via autonoma reprimono l'espressione di *FLC* mediante **deacetilazione degli istoni**

Via AUTONOMA:
FLOWERING LOCUS D (FLD)
FPA
FVE
LUMINIDEPENDENS (LD)
FLOWERING LOCUS K (FLK)

FVE, *FLD* codificano per proteine omologhe a componenti del complesso HDAC (Istone deacetilasi) di mammifero

FLC in mutanti *fld* o *fve* ha elevati livelli di acetilazione degli istoni H3 e H4

Acetilazione degli istoni:
modificazione della cromatina che influenza la trascrizione

Nei mammiferi

H3 e H4 iperacetilazione in genere associata a geni espressi

Ipoacetilazione associata a geni non espressi

Una regione di 295bp nel primo introne di FLC media la deacetilazione degli istoni del locus *FLC*

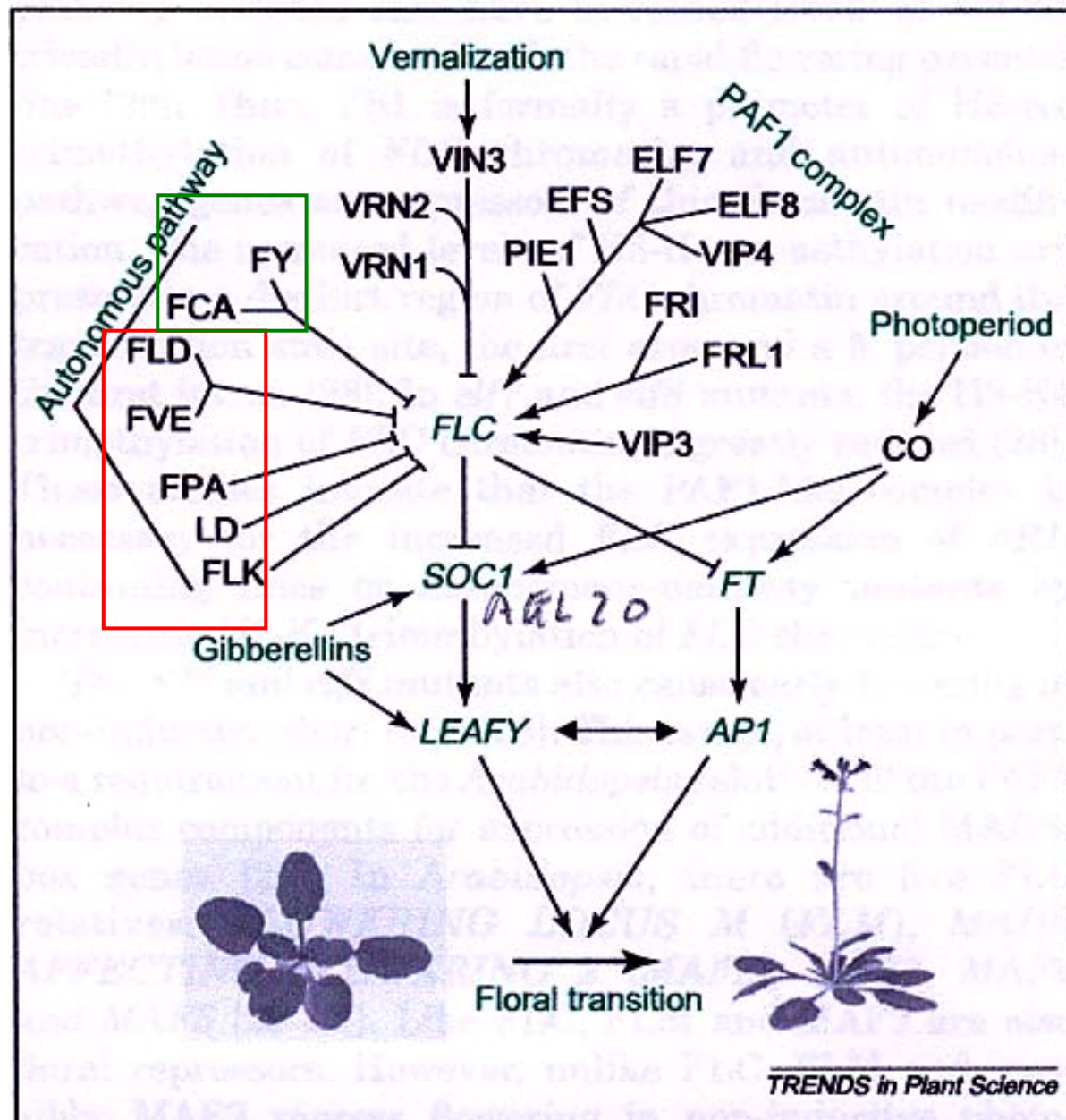
La delezione di questa regione previene la deacetilazione di FLC e ne determina la sovraespressione

flc trasformato con *flc* delete

flc trasformato con *FLC*



Figure 3. A 295-bp *cis*-regulatory region in the first intron of *FLC* mediates histone deacetylation of *FLC* locus. Deletion of this region prevents deacetylation of *FLC* chromatin and upregulates *FLC* expression [15], thus causing extremely late flowering (as found in the plant on the right). On the left is an *flc* plant transformed with a wild-type *FLC* transgene (i.e. without the 295-bp deletion), and this transgene is repressed, similar to the native *FLC*, by FLD, FVE and other autonomous regulators.



Nel pathway AUTONOMO probabilmente agiscono diverse vie indipendenti

FCA/FY funzionano insieme nell'inibire la trascrizione di FLC determinando la posizione del sito di poliadenilazione del mRNA

FCA: è una RNA binding protein con dominio WW (interazione prot/prot)

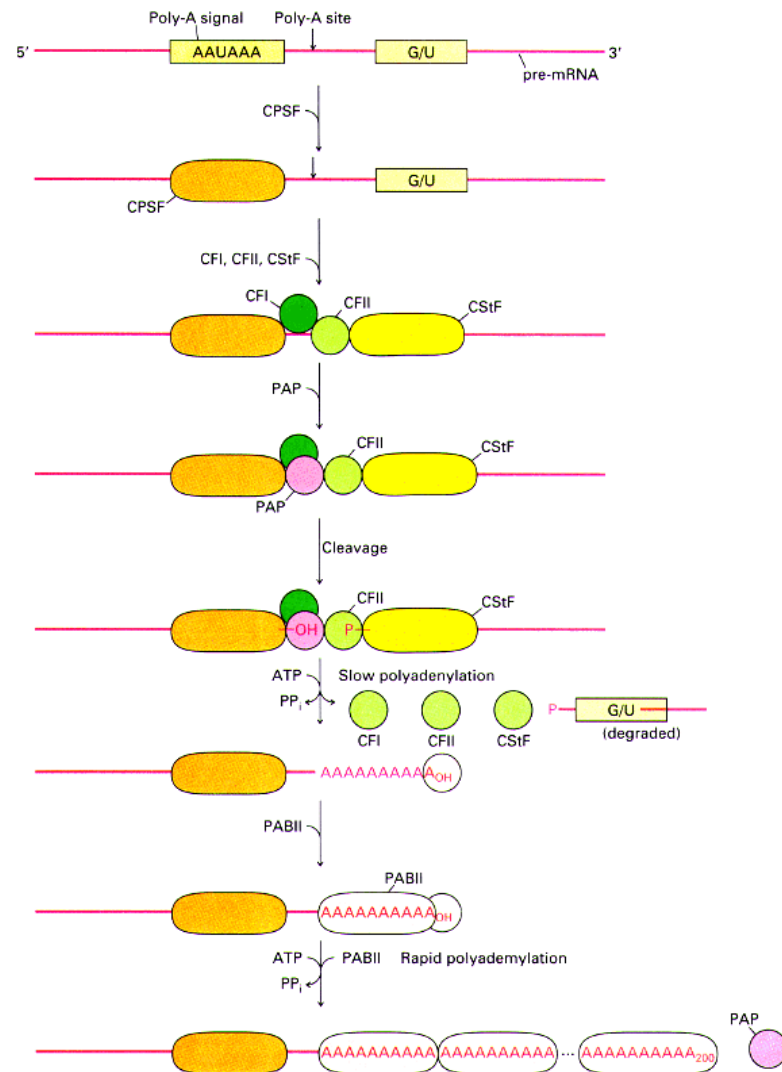
FY: è un fattore di poliadenilazione

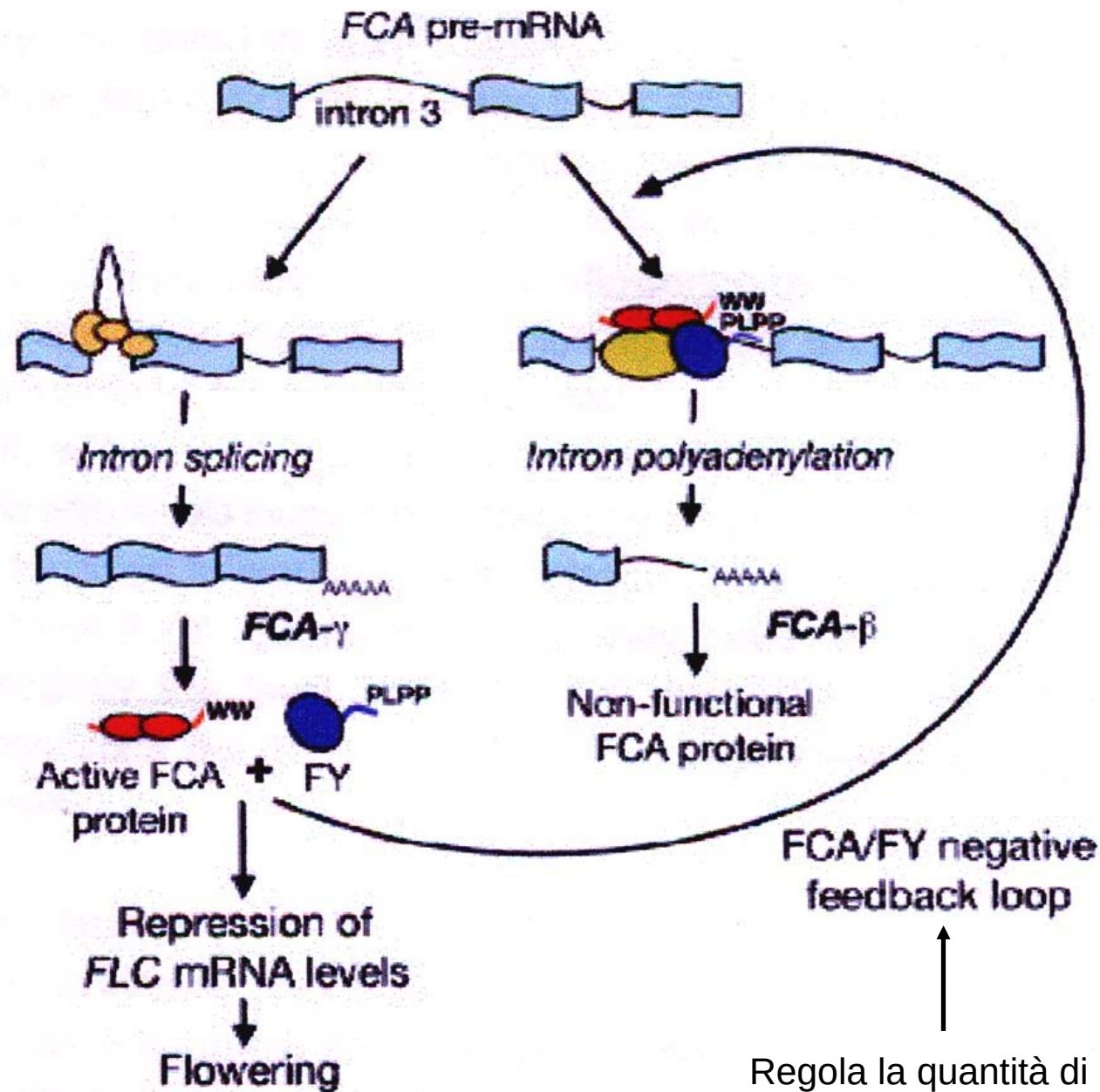
FCA e FY interagiscono (dominio WW)

Modification of the 3'-ends of eukaryotic mRNAs is called polyadenylation

Polyadenylation is the addition of several hundred A nucleotides to the 3' ends of mRNAs. All eukaryotic mRNAs destined to get a poly A tail contain the sequence AAUAAA about 11-30 nucleotides upstream to where the tail is added.

AAUAAA is recognized by an endonuclease that cuts the RNA allowing the tail to be added by a specific enzyme: polyA polymerase.





Regola la quantità di FCA
e quindi il tempo di fioritura

ABAP1: un recettore dell'ABA
(orzo);

è omologa a FCA

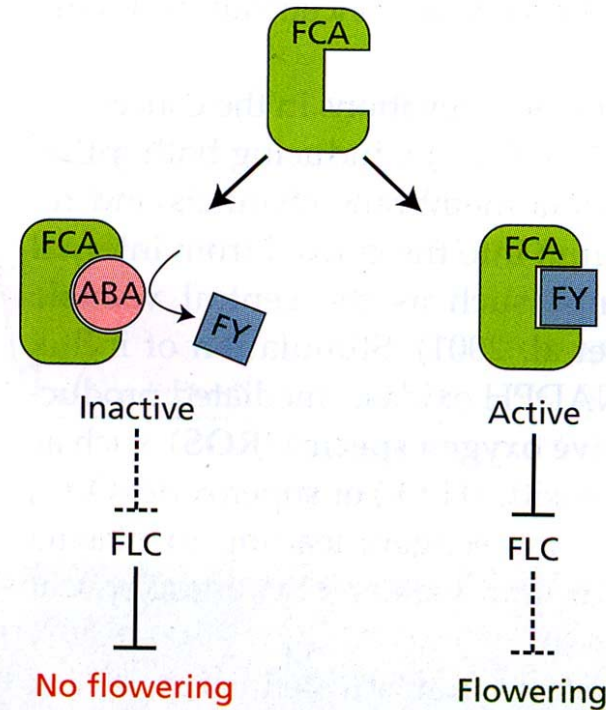
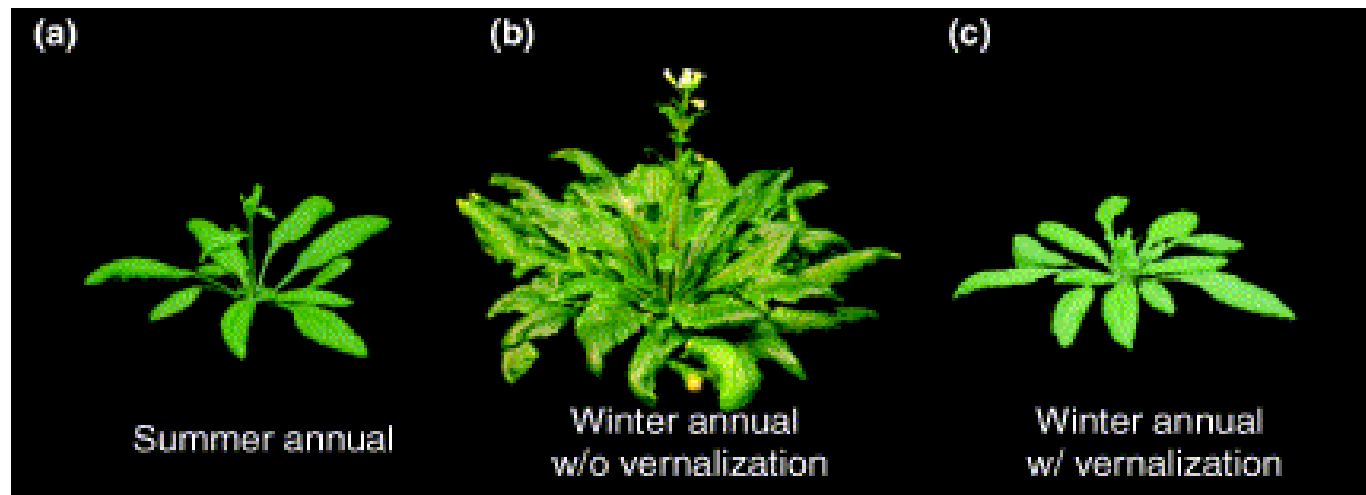


FIGURE 23.9 A model of ABA interaction with one of its receptors, FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN A (FCA), in Arabidopsis. ABA-binding to FCA inhibits its activity as a repressor of the production of FLOWERING LOCUS C (FLC), which is itself a repressor of flowering. In the absence of ABA, FCA forms an active complex with FLOWERING LOCUS Y (FY), which represses the FLC, permitting flowering to occur. Solid arrows indicate positive regulation, solid bars indicate repression, and dotted bars indicate de-repressed steps.

VERNALIZZAZIONE

Repressione dell'espressione di *FLC*



Current Opinion in Plant Biology

Identificati tre geni coinvolti

VERNALIZATION1 (VRN1)

VERNALIZATION2 (VRN2)

VERNALIZATION INSENSITIVE (VIN3)

Risposta alla vernalizzazione (6 settimane a 4 °C)

	-VRN	+VRN
<i>FRI FLC</i>		
<i>fri FLC</i>		
<i>FRI flc</i>		
<i>FRI FLC</i> <i>vrn</i>		
<i>fri FLC</i> <i>fca</i>		

Studi recenti dimostrano che la vernalizzazione determina modificazioni della cromatina che convertono la cromatina

di *FLC* in eterocromatina, inattiva nella trascrizione

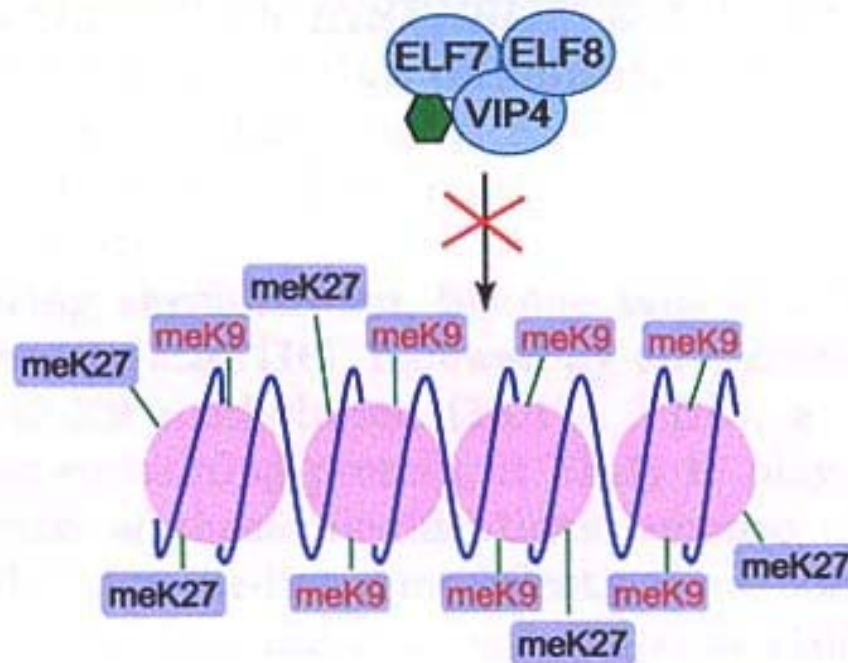
Durante la vernalizzazione le code degli istoni della cromatina di *FLC* vengono deacetilate e in seguito si ha un aumento della H3-K9 e K27 metilazione

La modificazione è mantenuta con il ritorno a temperature più elevate

Metilazioni K9 e K27 dell'H3 sono associate a repressione della trascrizione

Formazione di etero cromatina

(b) *FLC* locus after vernalization



VIN3 : proteina homeodomain; si pensa medi la deacetilazione; è indotta dall'esposizione a basse T; dà inizio alla regolazione di *FLC*

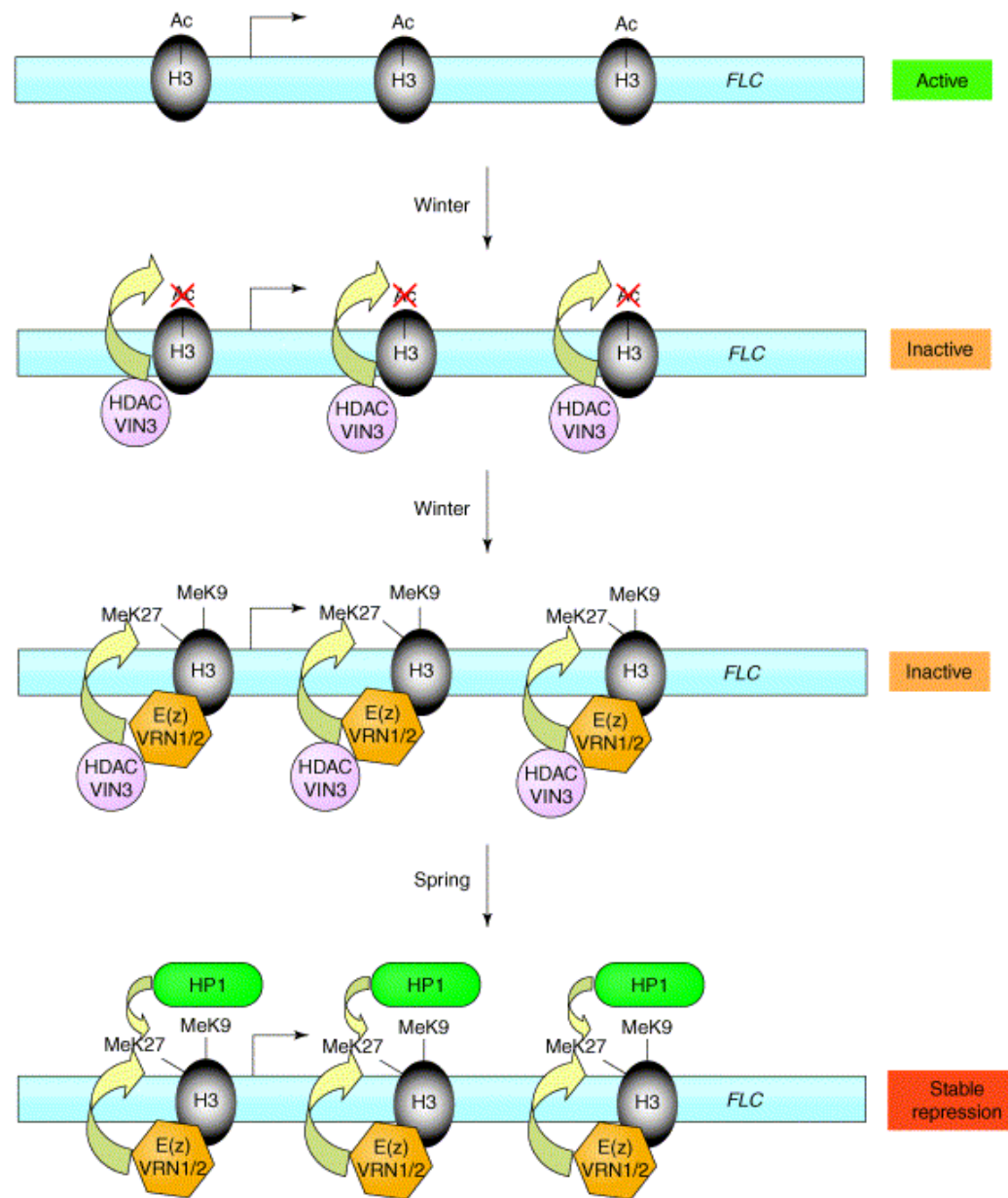
VRN2: omologa a alle proteine "Polycomb di *Drosophila* soppressori di Zeste-12"; si pensa sia componente del complesso Polycomb Repressore" che media la H3-K27 metilazione della cromatina di *FLC* cui segue la H3-K9 metilazione

VRN1: è una proteina contenente un dominio B3 di DNA binding; è richiesta per la H3-K9 metilazione

Nei mutanti *vrn1* e *vrn2* *FLC* è represso al freddo ma la repressione non è stabile a T più elevate

Nei mutanti *vin3* non si ha repressione di *FLC*

Modello per la repressione della espressione di *FLC* da VERNALIZZAZIONE



MEMORIA EPIGENETICA

La stabilità mitotica dello stato vernalizzato in assenza del segnale (freddo) è un esempio caratteristico di un interruttore EPIGENETICO, che consente alla pianta di “conservare memoria “ dell’inverno a livello cellulare.

Questa “memoria” non verrà trasmessa alla generazione successiva in modo che la nuova pianta conservi la necessità dell’esposizione alle basse temperature (VERNALIZZAZIONE) per fiorire.

REGOLAZIONE DA PARTE DELLE GIBBERELLINE (GA)

GA cruciali nell'indurre la fioritura in condizioni di SD non induttive;
prima della fioritura si ha brusco aumento delle GA nel SAM,
forse trasportate dalle foglie

Mutante biosintetico *ga1* estremo ritardo nella fioritura in SD

GA determinano UP-regolazione di *LFY*

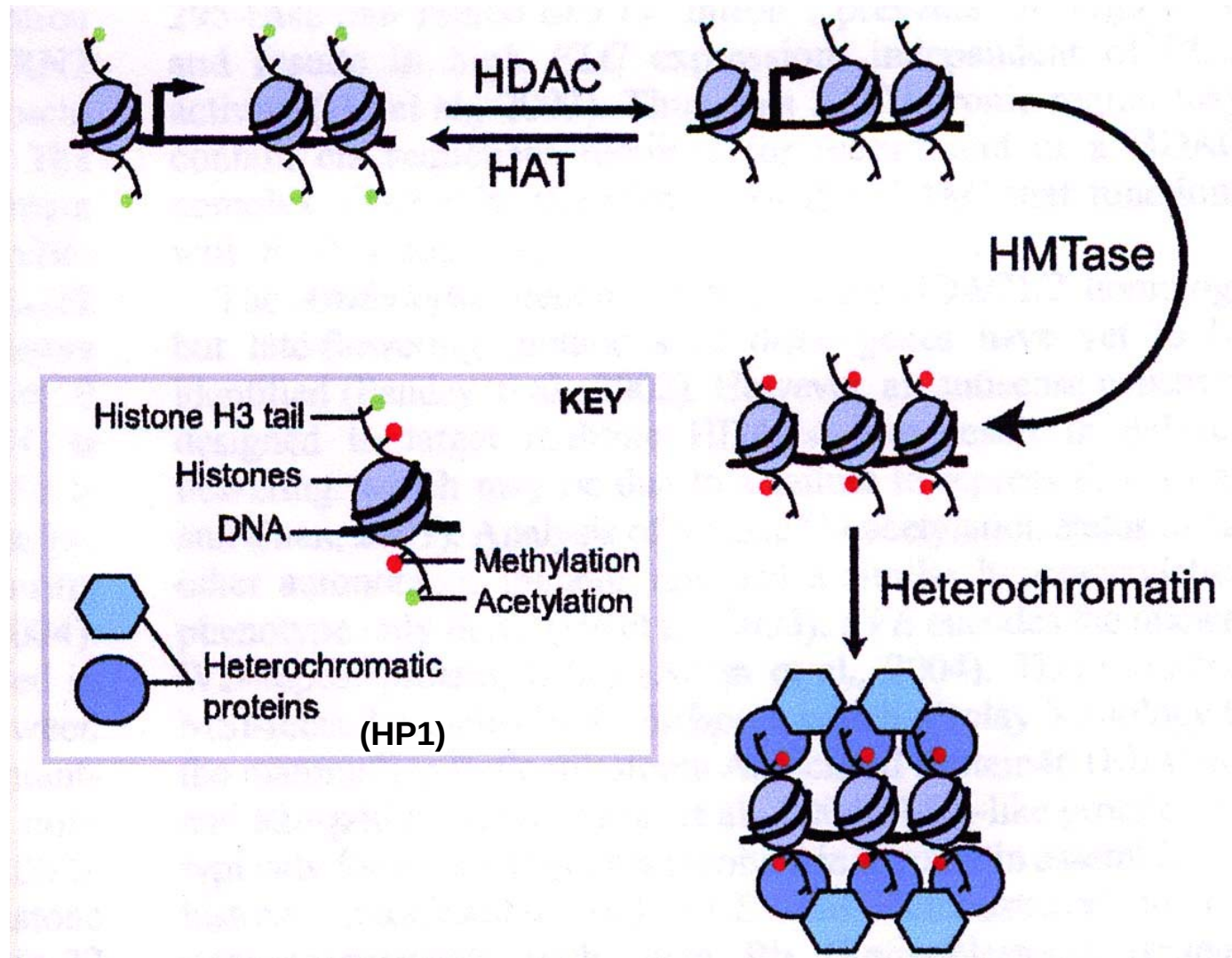
espressione di *LFY* molto ridotta in *ga1* in SD

Trovato un elemento cis- nel promotore di *LFY* che risponde a GA ma non al fotoperiodo

L'elemento cis ha omologia con binding sites per fattori MYB e interagisce in vitro con AtMYB33

GA coinvolte anche nell'induzione di *SOC1* e forse FT

CODICE ISTRONICO



Codice Istonico

Modificazioni post trascrizionali su N-terminali di H3 e H4

Acetilazione, fosforilazione, metilazione ubiquitinazione, SUMOilazione
ADP-ribosilazione

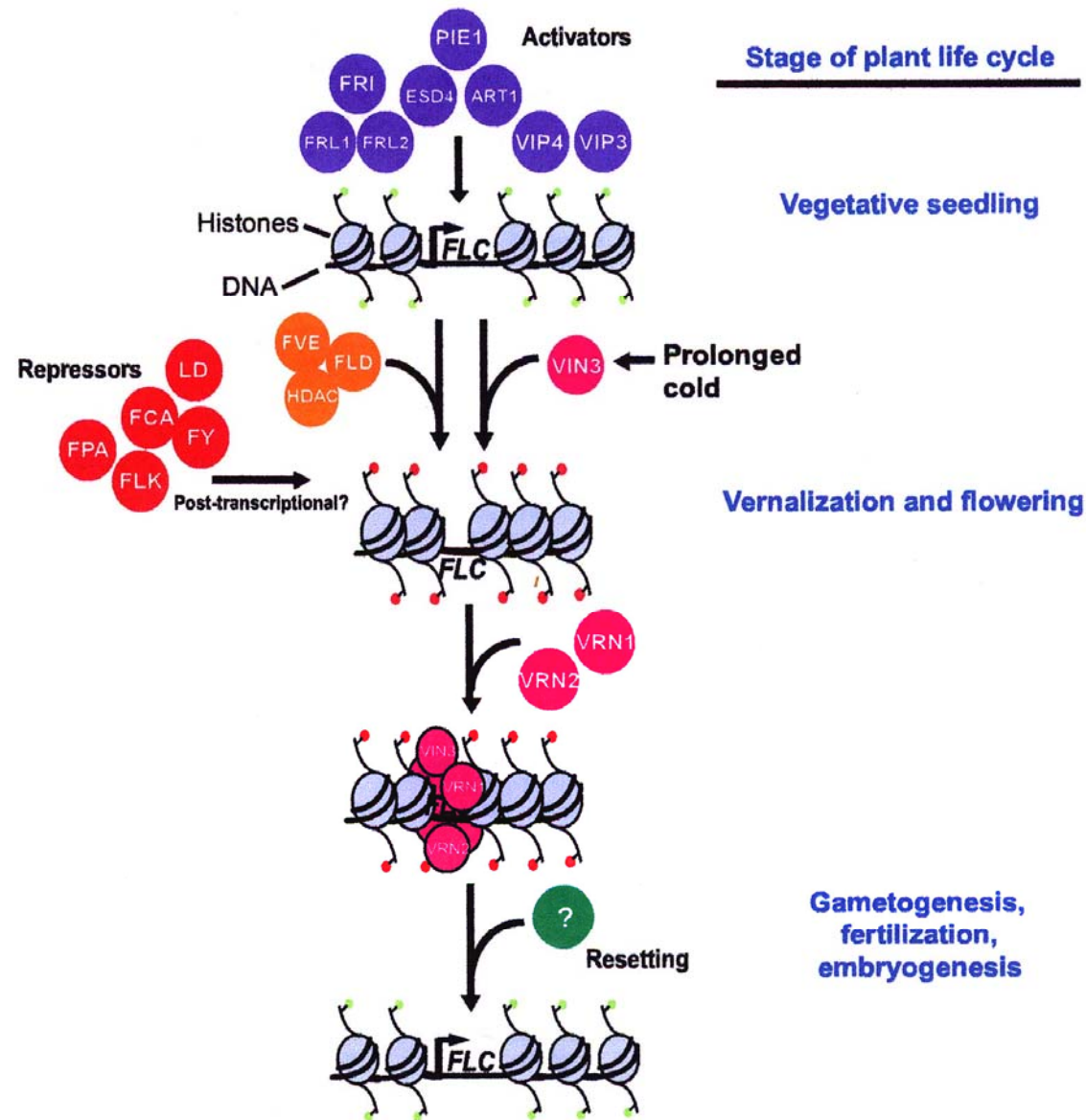
H3: K4, K9, K27, K36 metilate da HMTasi (mono, di e trimetilazione)

Metilazione K9, K27 : repressione (eterocromatina)
determina il legame delle proteine chromodomain HP1 e POLYCOMB

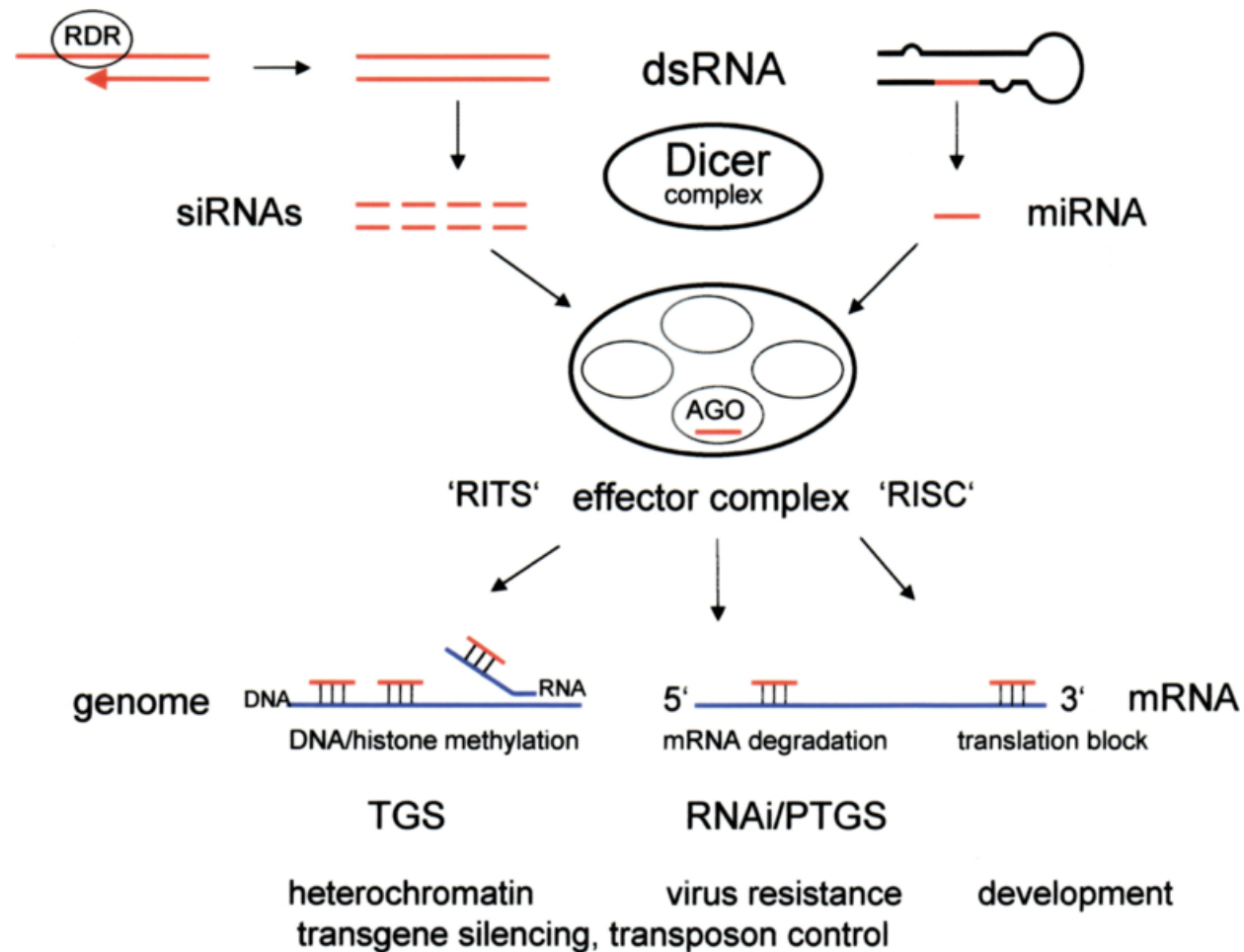
Metilazione K4: attivazione

metilazione/acetilazione K9 mutualmente esclusiva (HAT/HADC)

Fig. 3. Model for the regulation of the floral repressor *FLC* throughout the *Arabidopsis* life cycle. During seedling growth, a group of genes encode proteins that function as activators of *FLC* expression (shown in purple); these genes include *FRI*, *FRL1*, *FRL2*, *ESD4*, *ART1*, *PIE1*, *VIP3* and *VIP4*. These proteins may maintain *FLC* chromatin in an active state (indicated by an open structure and the presence of active histone tail modifications shown in green). The autonomous pathway functions antagonistically to the activators to repress *FLC* expression. The RNA-binding proteins *FCA*, *FPA* and *FLK*, and the polyadenylation factor *FY*, may function post-transcriptionally to achieve this and are shown in red. The *FVE*/*FLD* proteins act with a putative histone deacetylase (*HDAC*; all shown in orange) to promote an inactive *FLC* chromatin state, represented by a closed structure with inactive histone tail modifications (red). *FLC* is also repressed by exposure to long periods of cold (vernalization). The proteins acting in the vernalization pathway are shown in pink. Prolonged cold induces *VIN3* expression, which promotes an inactive *FLC* chromatin state. Subsequently, the *VRN1* and *VRN2* proteins are recruited to *FLC*, and are required for the methylation of *FLC* histones and the maintenance of silencing. These marks may promote the association of silencing factors with *FLC* chromatin that reinforce its repression. During meiosis, gametogenesis or early embryogenesis, *FLC* repression is overcome, thus resetting its expression in the next generation.



Regolazione mediante miRNA e siRNA

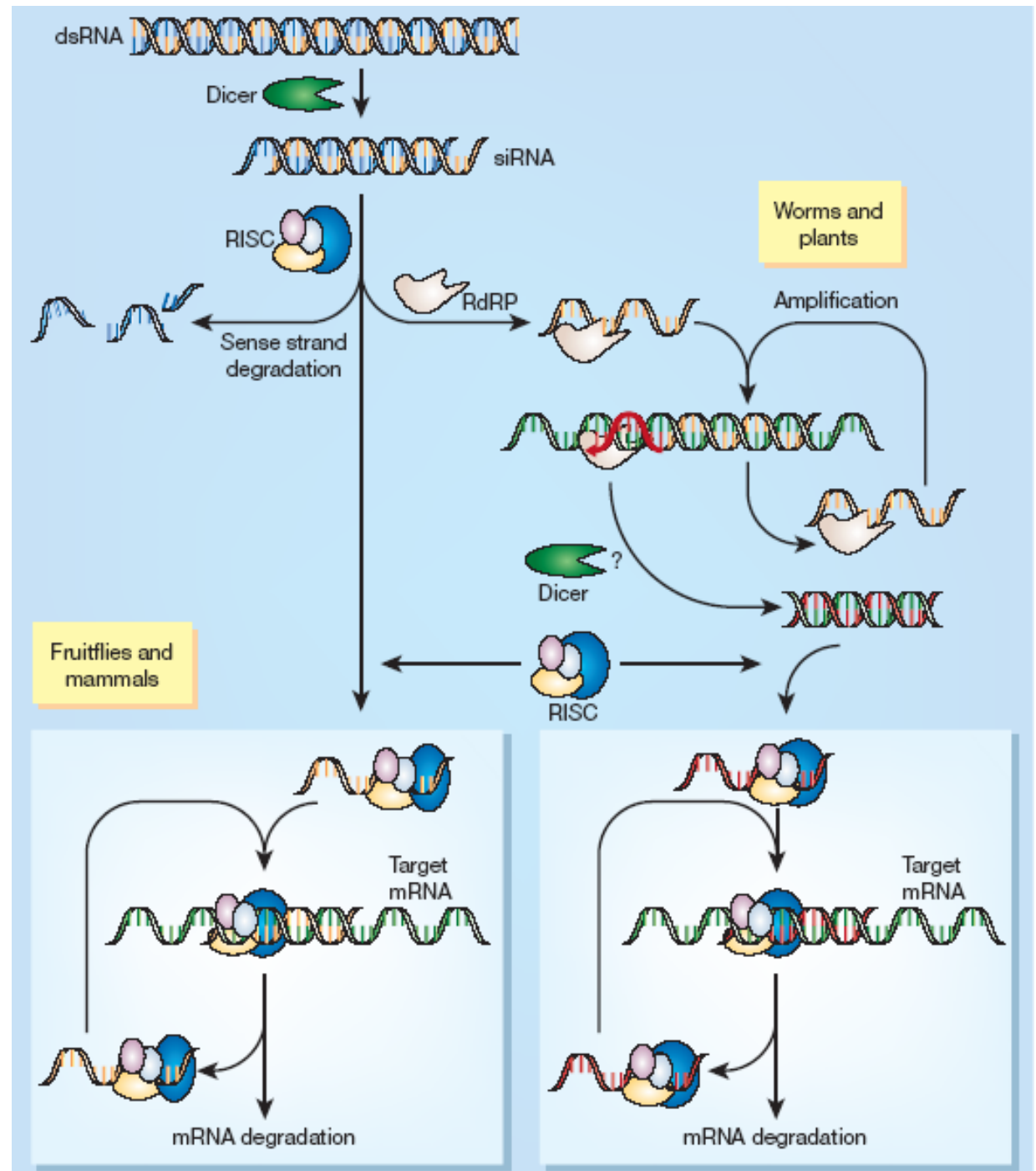


meccanismo dell'RNAi

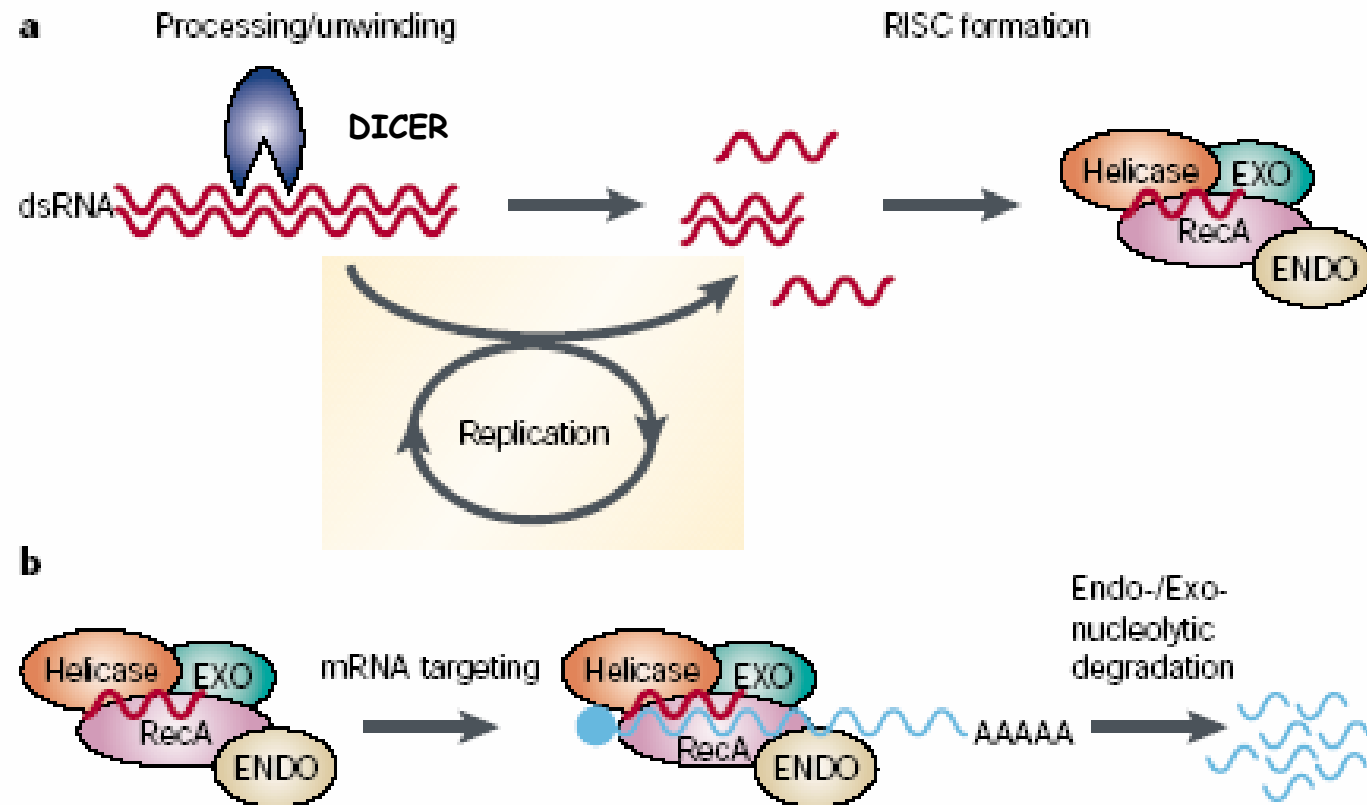
da un RNA a doppio filamento si formano degli **short interfering RNA (siRNA)** ad opera dell'enzima DICER che ha un dominio RNAsi III

RISC: RNA-induced silencing complex

RdRP: RNA-dependent RNA polymerase
E' responsabile di un meccanismo di amplificazione

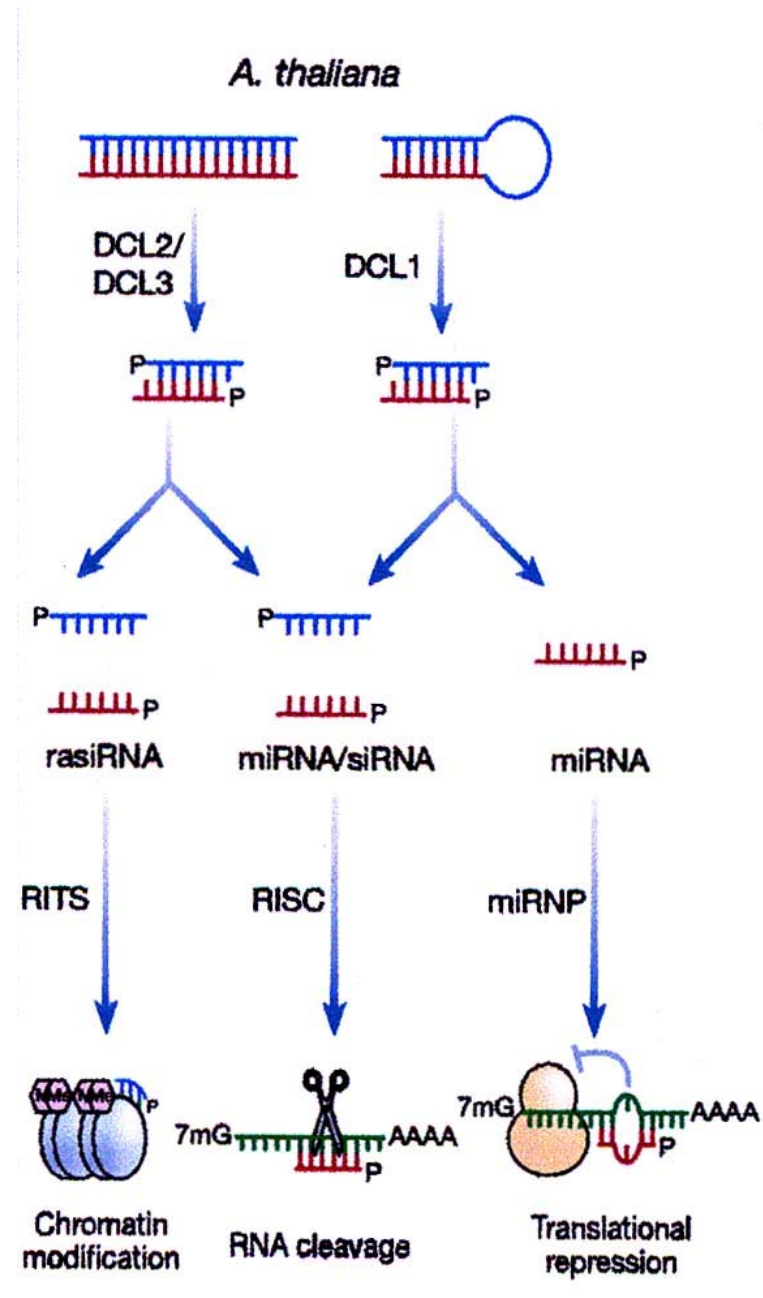


meccanismo dell'RNAi



In Arabidopsis sono state identificate proteine DICER-like e proteine ARGONAUTE che fanno parte del RISC

Nelle piante
tre meccanismi

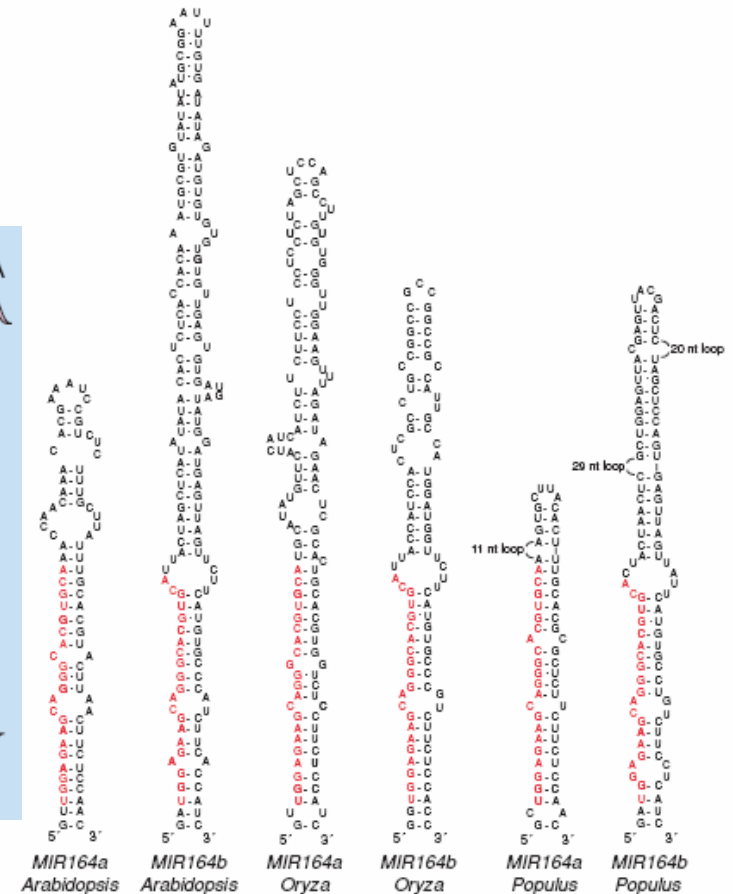
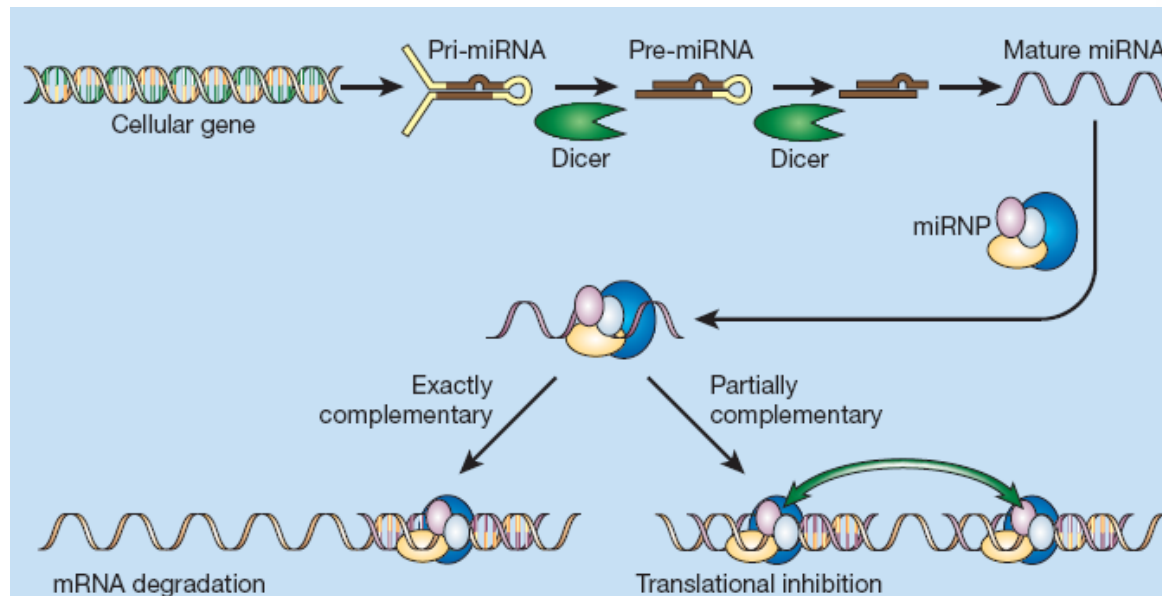


MicroRNA (miRNA)

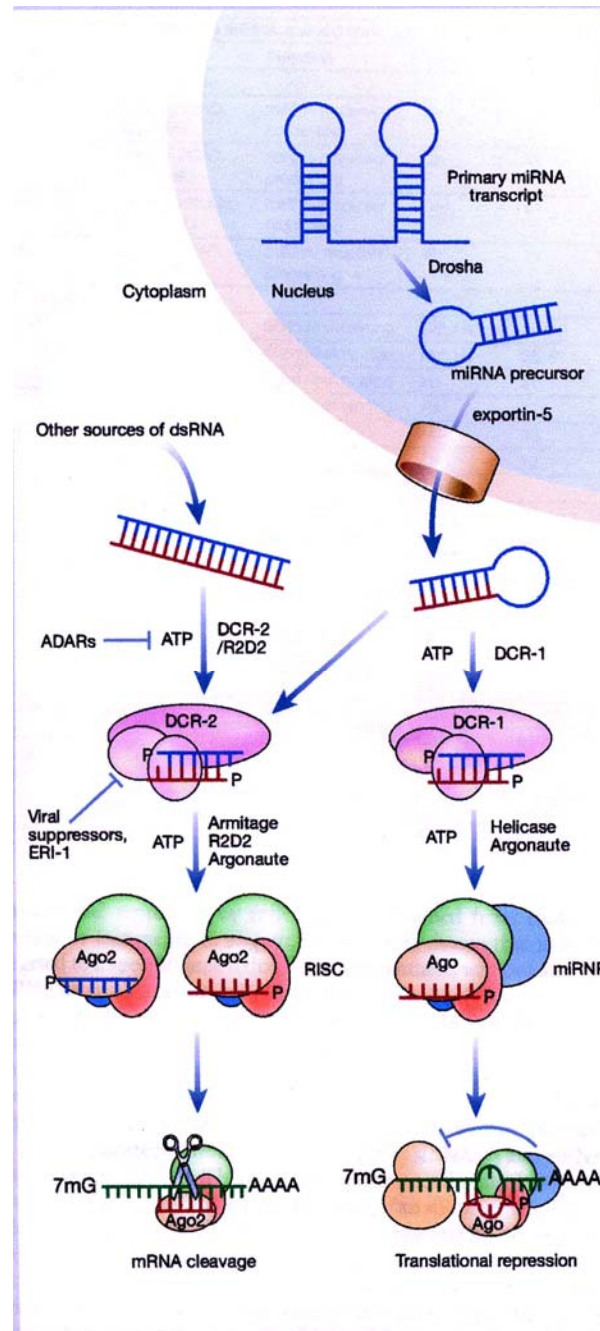
Una classe di RNA di circa 22nt codificati dal genoma che appaiandosi a mRNA endogeni ne determina la degradazione o impedisce la traduzione

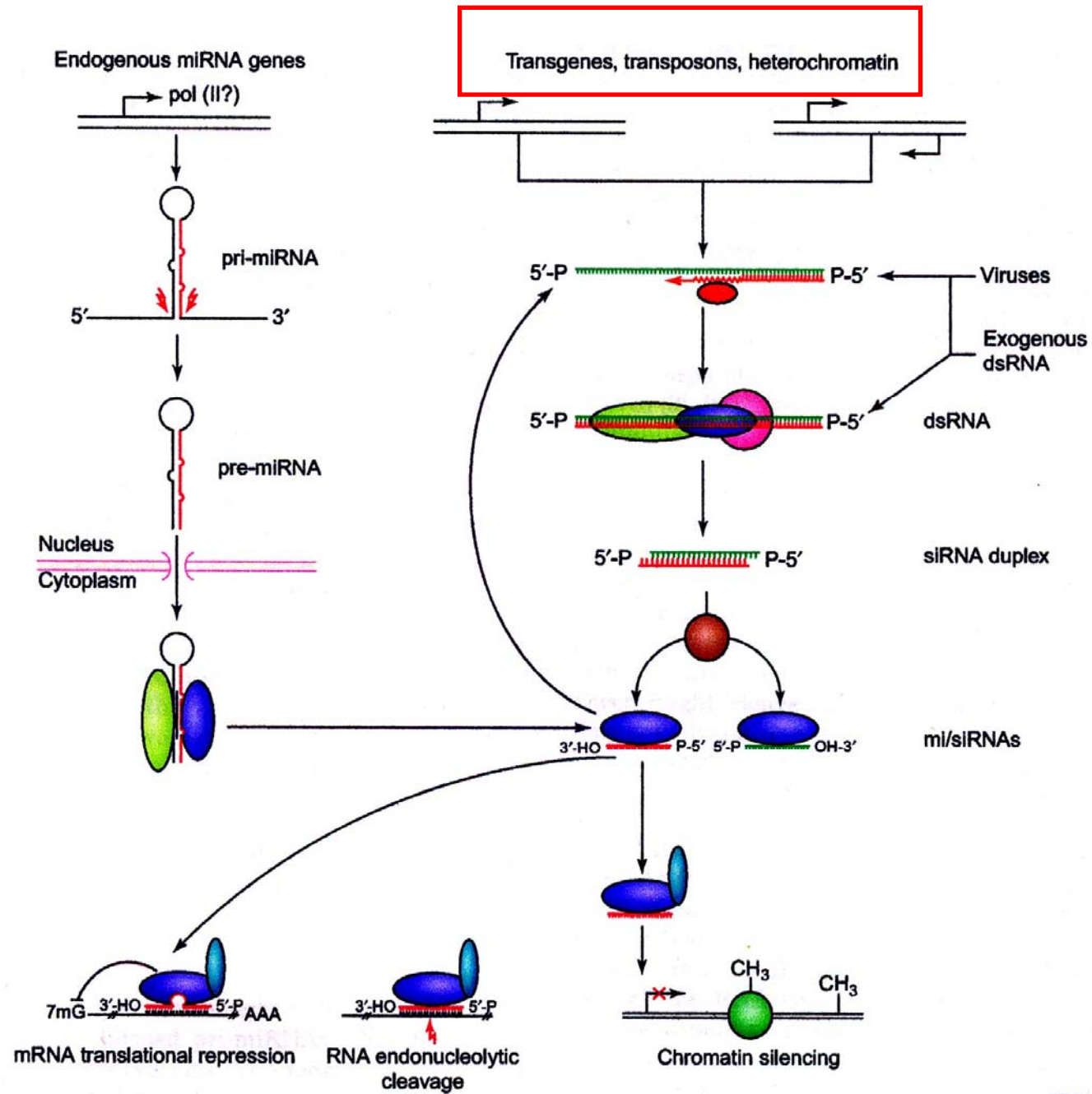


Regolazione dell'espressione genica



miRNA vegetali





Variazioni naturali dell'allele *FLC* determinano il comportamento a fioritura precoce di alcune varietà di *arabidopsis*

La varietà *Ler* ha un allele funzionale *FRI* ma ha bassi livelli di mRNA *FLC* ed è a fioritura precoce

FLC non è UP-regolato da *FRI*

L'allele di *FLC* presenta nella varietà *Ler* a una inserzione TE (1.2kb: Mutator-like transposable element) responsabile dell'insensibilità di *FLC* a *FRI*

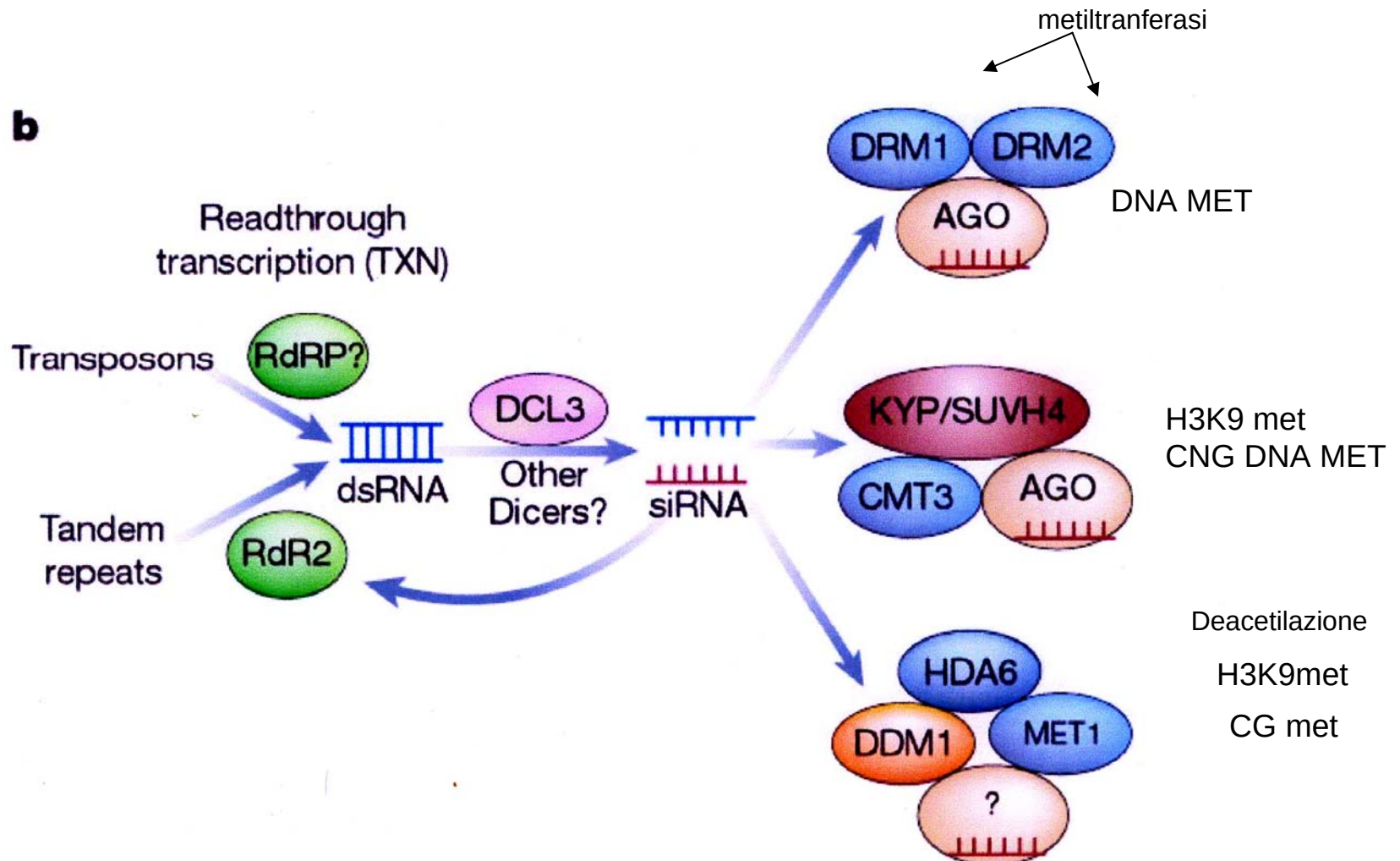
L'inserzione TE rende *FLC* soggetto a modificazioni repressive della cromatina mediate da siRNA generati da sequenze TE correlate in altre regioni del genoma



metilazione H3-K9 e K27

della regione della cromatina di *FLC* che include l'inserzione TE e l'introne a valle

Modificazioni della eterocromatina dirette da siRNA



Tandem repeats: brevi sequenze di DNA ripetute testa/coda che si addensano nelle zone di eterocromatina centromeriche

In lievito la stabilità della eterocromatina delle regioni centromeriche è regolata da specifici RNA che si originano come trascritti bidirezionali delle ripetizioni centromeriche e sono poi elaborati dal sistema dell'RNAi (DCR1, AGO1, RdRP)

Relazione tra metilazione del DNA e dell'istone 3 (H3)

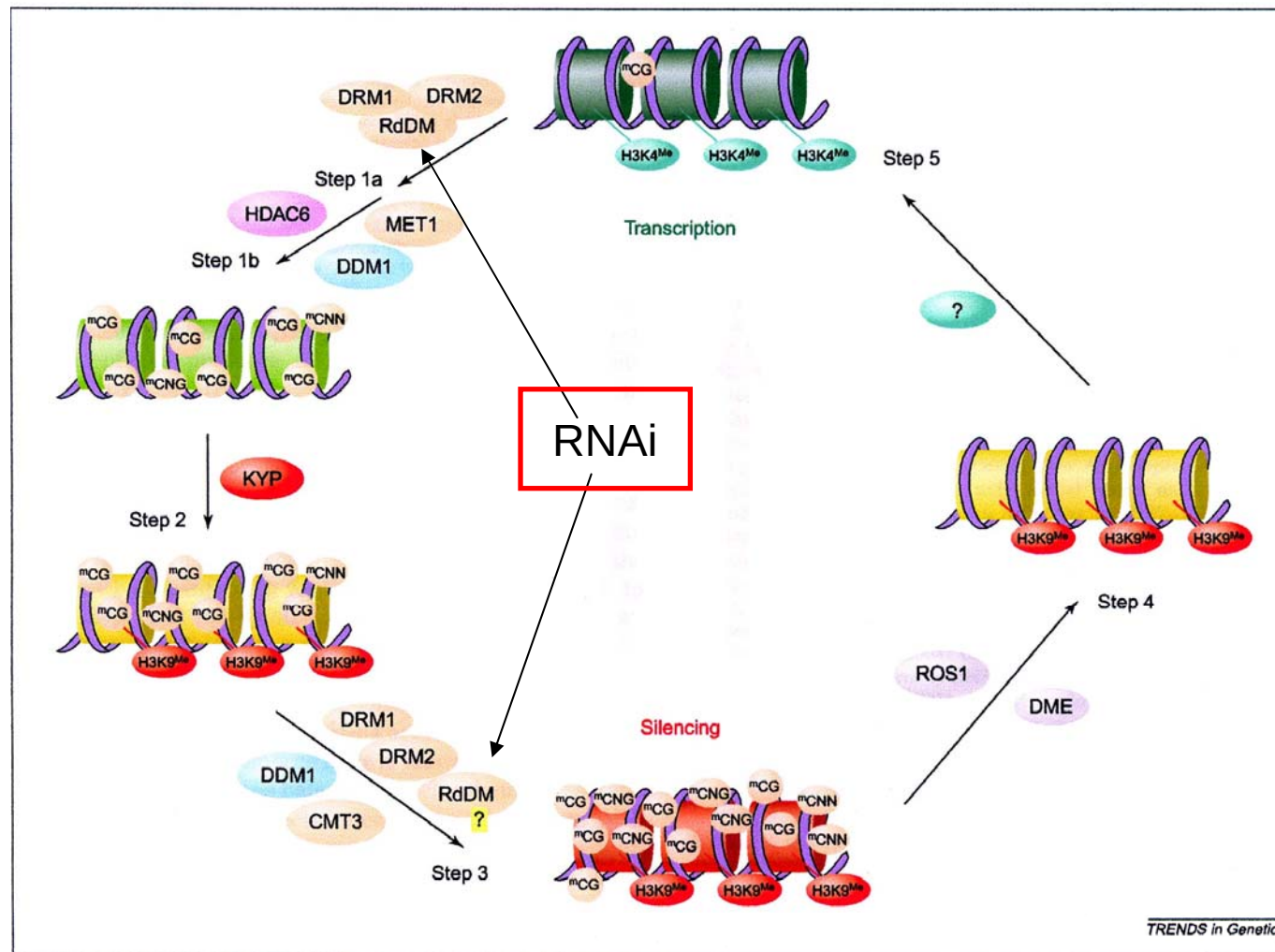


Figure 1. The simplified model of the interplay between DNA and histone 3 methylation in relation to gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. Actively transcribed locus (at the top) associated with hypomethylated DNA and histone H3 methylated in lysine 4 (H3K4^{Me}, possible residual DNA methylation at CNG and CNN not shown). Gene silencing steps (next to the arrowheads) are shown progressing in counter-clockwise direction: Step 1a and Step 1b lead to the establishment and maintenance of the initial DNA methylation at CG sites (mCG; requiring activities of MET1, which encodes a cytosine methyltransferase, and DDM1) together with progressive CG hypermethylation possibly mediated by RNA-directed DNA methylation (RdDM). This step results in hypermethylation of the DNA mainly in CG sequences. Step 2: nucleosomes with CG methylated DNA are modified by H3K9 specific HMT (in *Arabidopsis* KYP1). Step 3: the chromatin with CG hypermethylated DNA and H3K9^{Me} is recognized by a set of DNA methyltransferases (CMT3, DRM1, and DRM 2 with DRM1 as a minor player) and DNA is hypermethylated at CNG and CNN sites. This step requires DDM1 and might also involve RdDM. The outcome of step 3 is gene silencing. Step 4 is a first putative step back towards transcriptional activity as a result of DNA demethylation by methyl C specific glycosylase(s) ROS1 and DME (with more general activity of ROS1 as compared with DME, which has been associated with parental imprinting). Step 5: reversion of H3K9^{Me} possibly by histone replacement with histone variant (not shown) or with H3 followed by methylation of its lysine 4 by putative H3K4 HMT. Abbreviations: CMT3, CHROMOMETHYLASE3; DDM1, decrease in DNA methylation 1; DME, demeter; HDAC, histone deacetylases; HMT, histone methyltransferase; KYP, KRYPTONITE.

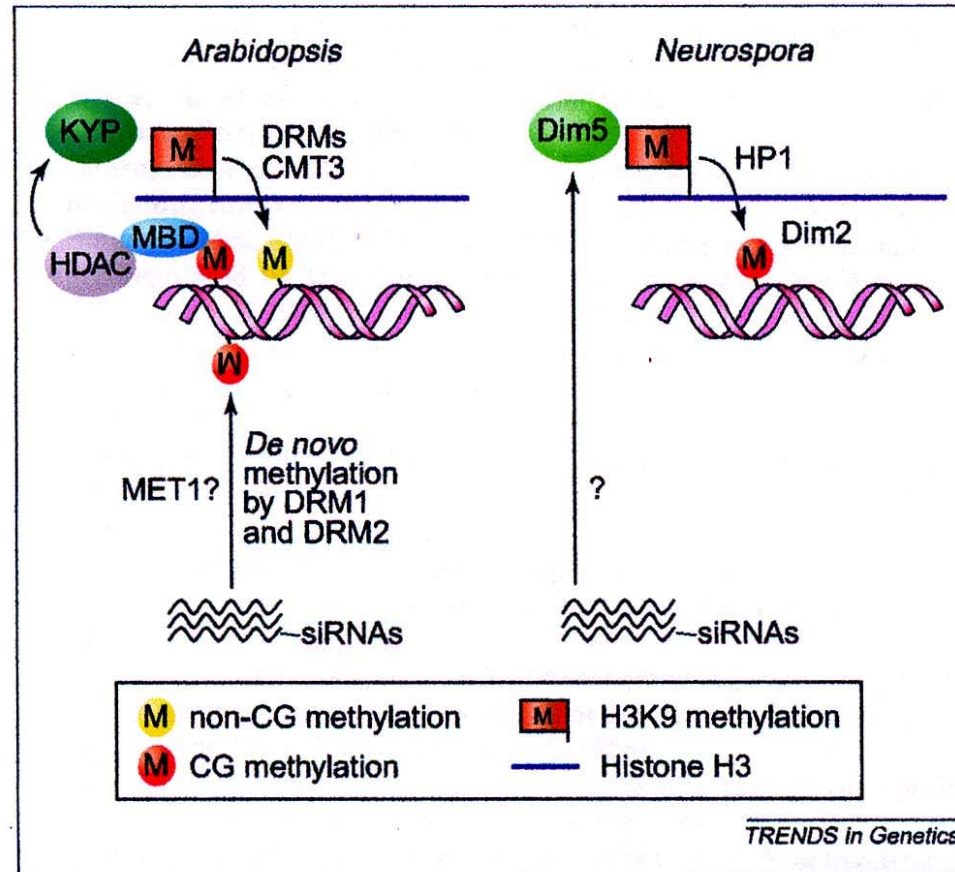
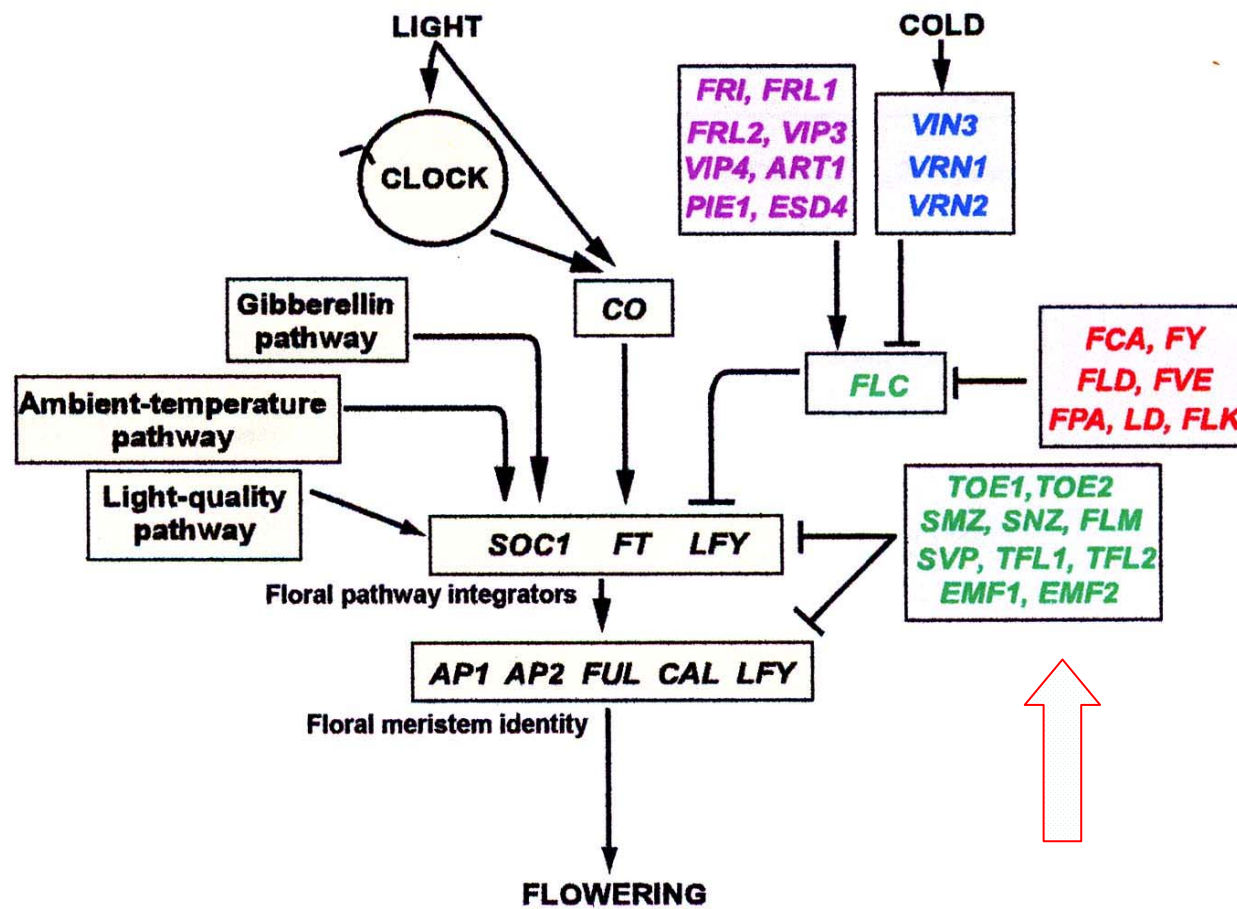


Figure 2. Schematic comparison of the relationships between methylation of DNA and H3K9^{Me} in *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. Small interfering RNAs (siRNA) might trigger the *de novo* methylation of DNA in *Arabidopsis* by domain rearranged methyltransferase family (DRMs); the involvement of MET1 is unknown. The cytosine methylation (5mC) that is recognized by proteins containing methyl cytosine binding domains (MBDs) might cause deacetylation of H3K9 by histone deacetylase (HDAC), followed by H3K9^{Me} by KRYPTONITE (KYP), which might then cause non-CG methylation by CHROMOMETHYLASE3 (CMT3) or DRMs. In *Neurospora*, siRNAs might influence H3K9^{Me} by directing DIM-5 histone methyltransferase (HMT), which guides DIM-2 for DNA methylation. HP1 in *Neurospora* can act as an adaptor between H3K9^{Me} and DNA methylation.



Regolazione da miRNA

SMZ, SNZ, TOE TOE2 (AP2-like):

Codificano proteine omologhe al prodotto di AP2 (gene di identità di organo)

Geni AP2-like: repressori a valle di CO ma a monte di LEAFY
(se overespressi ritardano la fioritura in LD)

Gene EAT

codifica un microRNA, miR172

L'overespressione accelera la fioritura e difetti nel fiore simili a mutanti *ap2*

miR172 ha sequenze complementari ai geni AP2-like e ne regola l'espressione a livello della traduzione

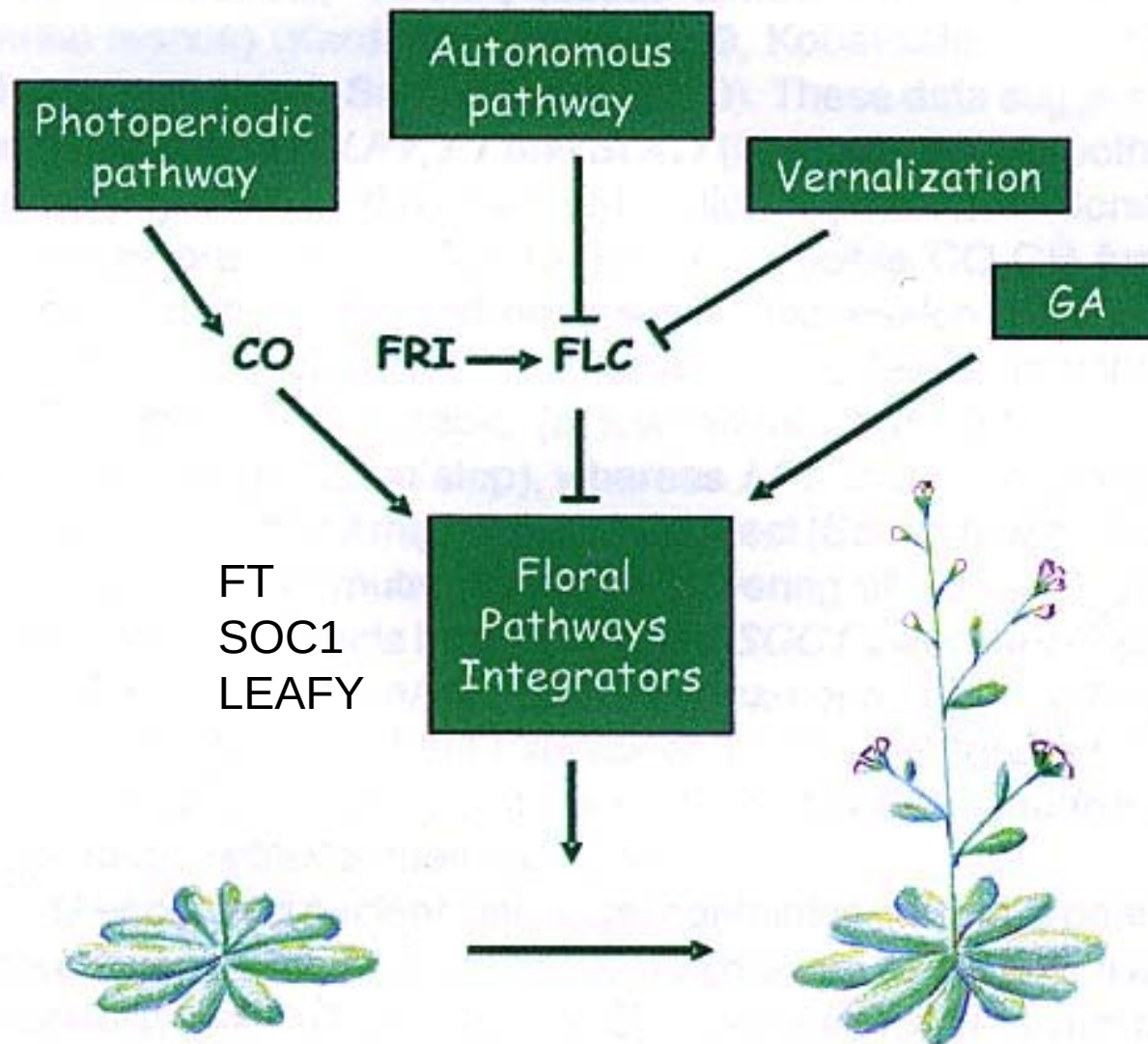


Fig. 1. Main pathways reaching Floral Pathways Integrators

TUTTI e quattro i pathways

convergono verso alcuni geni in grado di integrare gli stimoli provenienti dalle diverse vie

Tali geni sono detti: **Floral Pathway Integrators (FPI):**

- ✓ ***FLOWERING LOCUS T (FT)***
- ✓ ***SUPPRESSOR OF CO OVEREXPRESSION (SOC1)***
/AGAMOUS like 20 (AGL20) (MADS box)
- ✓ ***LEAFY*** (considerato anche gene di identità meristemica)

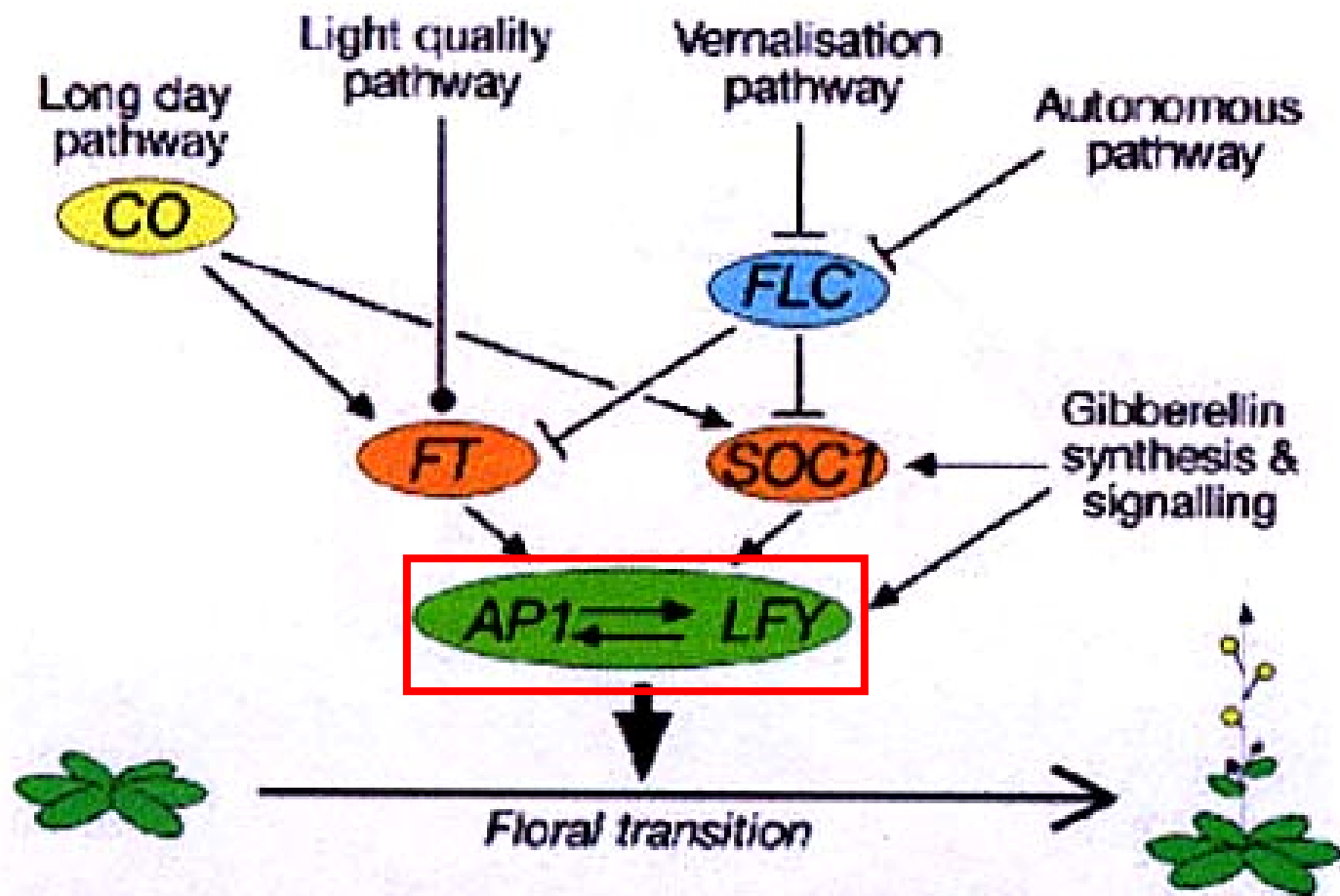
I GENI FPI fungono da connettori tra le vie di induzione fiorali e i geni di identità meristemica (FMI), i quali poi determinano l'espressione delle funzioni ABC (D) e quindi lo sviluppo del fiore

GENI FMI: *LEAFY (LFY)*

CAULIFLOWER (CAL)

APETALA1 (AP1)

(è anche un gene ABC)



LEAFY (LFY):

La sua espressione precede la transizione florale ed è massima nei giovani meristemi fiorali

Piante costitutive per *LFY* fioriscono precocemente

Mutanti *lfy* sviluppano foglie e germogli invece di fiori

LFY nel meristema florale contribuisce alla formazione delle gemme fiorali
Inducendo *AP1* e *CAL*

LFY codifica per un nuovo tipo di fattori di trascrizione esclusivi delle piante

Localizzato nel nucleo e nei plasmodesmi

LFY* si lega a elementi *cis* nel promotore di *AP1* e *AGAMOUS

Attività modulata dal fotoperiodo (piante costitutive *LFY* fioriscono più tardi
in SD che in LD)

SUPPRESSOR OF CO OVEREXPRESSION (SOC1)

AGAMOUS-like 20 (AGL20)

Codifica per un fattore MADS box

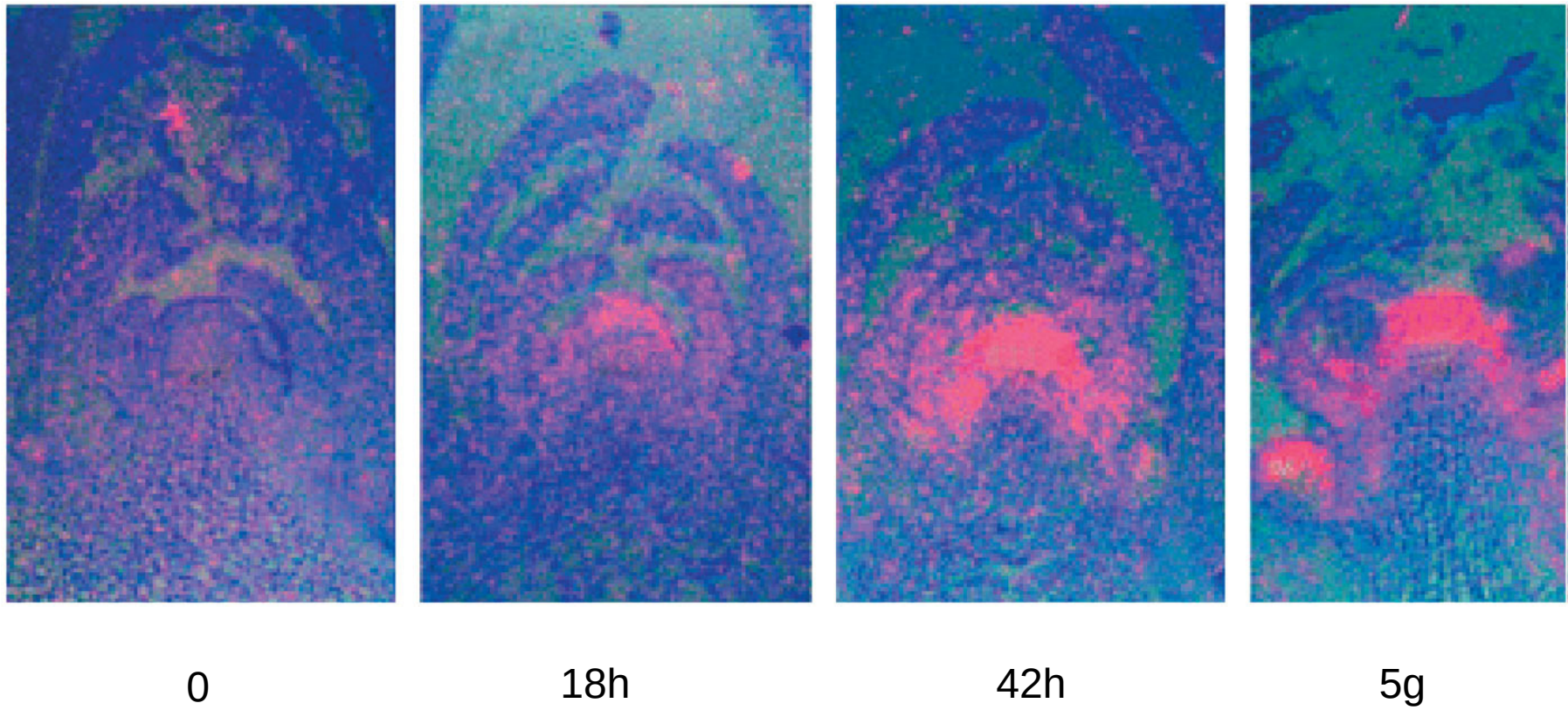
Mutanti *soc1* ritardano la fioritura in LD e SD

SOC1 espresso prevalentemente nelle foglie e nel SAM

L'espressione aumenta con il tempo ed ha un picco immediatamente prima della transizione fiorale

SOC1 assente nel meristema fiorale allo stadio 1 e riappare negli stadi successivi, nella zona centrale

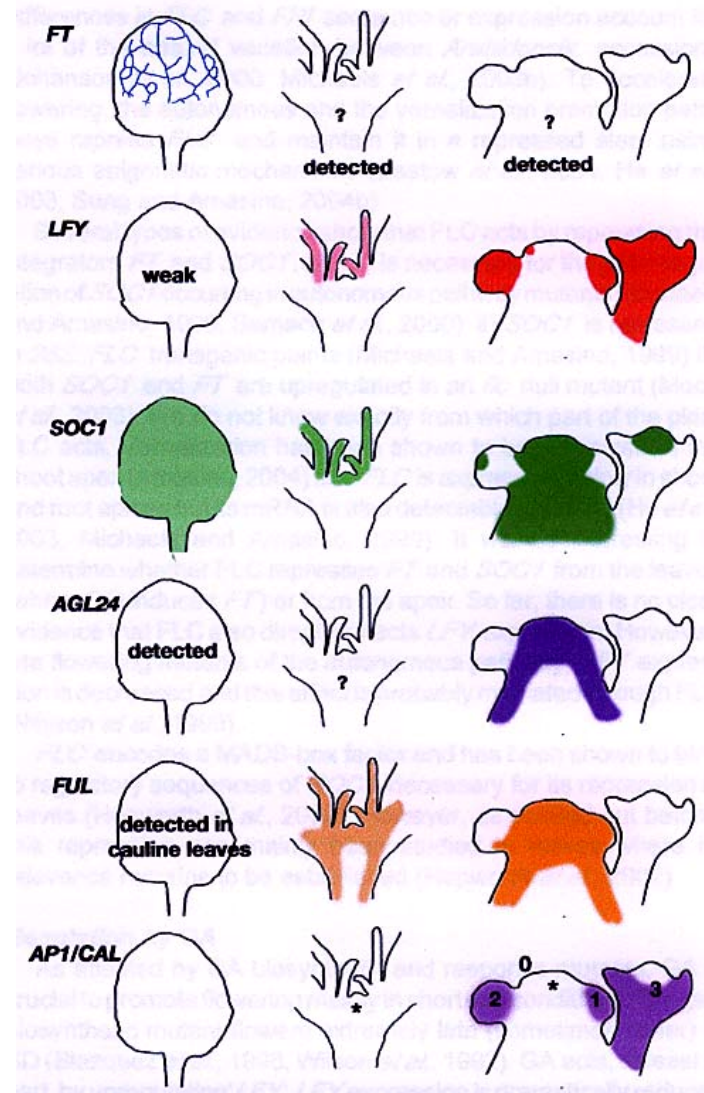
I



Aumento dell'espressione di SOC1 nel SAM di arabidopsis durante condizioni induttive LD

Pattern di espressione dei geni FPI ed altri regolatori durante la transizione fiorale

Arabidopsis floral pathway integrators 587



I geni FPI sono influenzati non soltanto dalle quattro vie regolative ma interagiscono tra di loro secondo modalità in larga parte ancora da scoprire, formando un intricato network regolativo

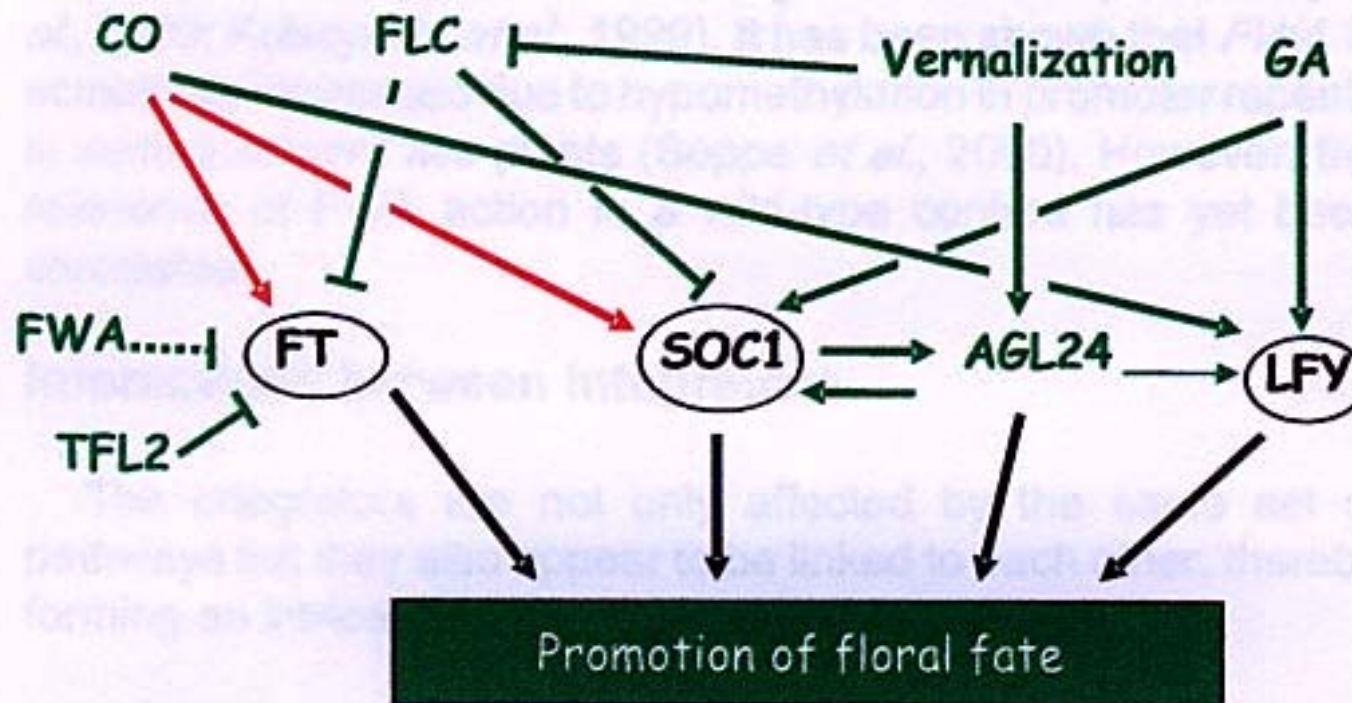
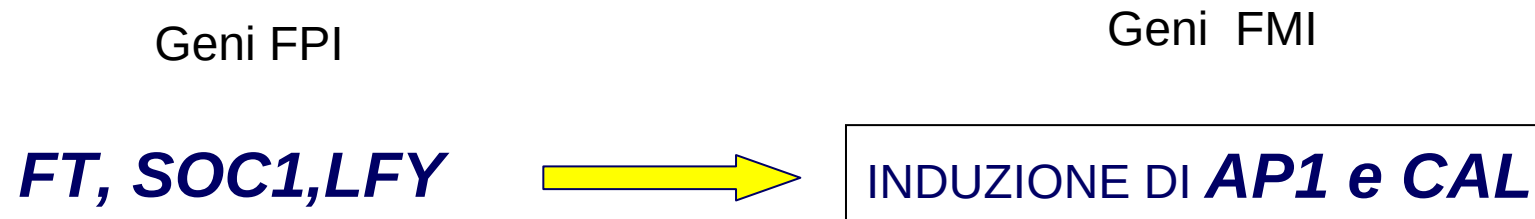


Fig. 3. Gene regulatory network around Floral Pathway Integrators. Red arrows represent direct interactions, dashed arrows represent post-transcriptional regulation and plain arrows represent transcriptional regulation. Floral Pathway Integrators are circled.

A valle dei geni integratori (*FPI*)

L'attivazione di *FT*, *SOC1* e *LFY* determina la fioritura

L'espressione costitutiva di coppie di tali geni è un potente induttore della fioritura



L'overespressione di *AP1* non efficace come overexpr di *SOC1* o *LFY/FT*



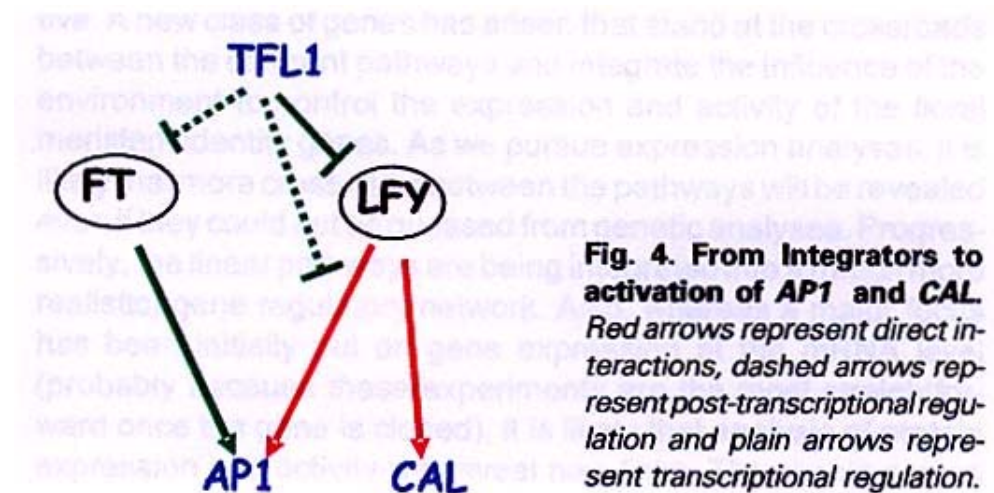
Necessari altri eventi molecolari non identificati

REGOLAZIONE di *AP1/CAL* da *LFY*

AP1 e *CAL* espressi nello stadio 1 del meristema florale

Dimostrato il binding in vitro di *LFY* a sequenze regolative di *AP1* e *CAL* mediante immunoprecipitazione della cromatina

LFY interagisce direttamente con *AP1* e *CAL*

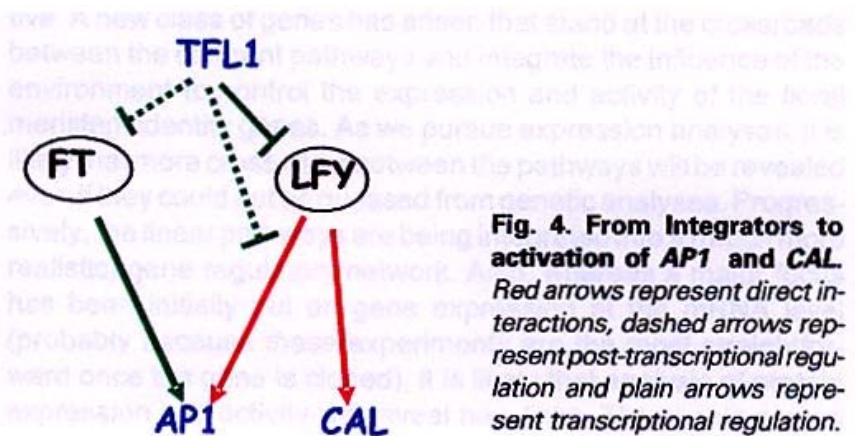


REGOLAZIONE DI *AP1* da *FT*

AP1 può essere indotto indipendentemente da *LFY*

Mutante *lfy*: *AP1* espresso
doppio mutante *lfy ft*: *AP1* non espresso
FT è in grado di indurre *AP1*
meccanismo non noto

(*TFL1* omologo di *FT*)



In vivo sia *FT* che *LFY* sembrano necessari per l'induzione di *AP1*

FT e *LFY* agiscono in maniera sinergica