



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomolecolari e
Biotecnologiche

XXIII Ciclo

Dir. Prof. Bruno Masala

**Studi funzionali del fattore di
trascrizione DcE2F di *Daucus carota*
tramite sovraespressione in piantine
transgeniche di *Arabidopsis thaliana***

Tutor:

Prof. Diego Albani

Tesi di Dottorato di:

Dr. Lara Perrotta

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

Indice

Abstract	1
Lista abbreviazioni	3
1. Introduzione	5
1.1. Il ciclo cellulare	5
1.2. Controllo del ciclo cellulare	7
<i>1.2.1. Il pathway RBR/E2F</i>	8
<i>1.2.2. I fattori E2F animali</i>	9
<i>1.2.3. I fattori E2F vegetali</i>	12
<i>1.2.4. Il gene DcE2F</i>	16
<i>1.2.5. I geni target dei fattori E2F</i>	17
1.3. Endoreduplicazione	22
1.4. Regolazione dello sviluppo della pianta	25
<i>1.4.1. Il controllo ormonale dello sviluppo</i>	26
<i>1.4.2. Fattori di trascrizione e sviluppo</i>	28
<i>1.4.3. Il link tra regolazione del ciclo cellulare e regolazione dello sviluppo</i>	29
2. Scopo del lavoro	32
3. Materiali e metodi	33
3.1. Materiale biologico	33
<i>3.1.1. Ceppi batterici e condizioni di crescita</i>	33
<i>3.1.2. Materiale vegetale e condizioni di crescita</i>	34
3.2. Costruzione dei vettori pCAMBIA-DcE2F e pCAMBIA-DcE2F-AtDP	36
3.3. Costruzione dei vettori pCAMBIA-Strep-AtE2F e pCAMBIA-Strep-AtE2F-AtDP	43
3.4. Trasformazione e selezione delle colonie batteriche	51
<i>3.4.1. Trasformazione delle cellule di Escherichia coli</i>	51
<i>3.4.2. Trasformazione delle cellule di Agrobacterium tumefaciens</i>	51
3.4. Trasformazione piantine di Arabidopsis thaliana mediante Floral dipping	52

Lara Perrotta

iii

Studi funzionali del fattore di trascrizione DcE2F di *Daucus carota* tramite sovraespressione in piantine transgeniche di *Arabidopsis thaliana*

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Università degli Studi di Sassari

3.5. Estrazione DNA genomico da cellule vegetali	53
3.6. Saggio istochimico per l'attività della β-glucuronidasi	54
3.7. Isolamento di linee omozigoti a singolo inserto	55
3.8. Analisi fenotipica	55
3.8.1. <i>Analisi fenotipica dei germogli mediante stereoscopio</i>	<i>55</i>
3.8.2. <i>Analisi dei cotiledoni mediante microscopio ottico DIC</i>	<i>56</i>
3.8.3. <i>Analisi delle radici primarie mediante microscopio ottico DIC.....</i>	<i>56</i>
3.9. Studio sulla germinabilità	57
3.10. Studi quantitativi di espressione dei transgeni	57
3.10.1. <i>Estrazione RNA totale da tessuto vegetale</i>	<i>57</i>
3.10.2. <i>Retrotrascrizione</i>	<i>60</i>
3.10.3. <i>Real-Time PCR</i>	<i>62</i>
4. Risultati	64
4.1. Isolamento di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore DcE2F con o senza i fattori AtDP	64
4.1.1. <i>Selezione ed analisi fenotipica macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore DcE2F</i>	<i>64</i>
4.1.2. <i>Isolamento delle linee omozigoti sovraesprimenti il fattore DcE2F</i>	<i>68</i>
4.1.3. <i>Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme alla proteina AtDPa.</i>	<i>70</i>
4.1.4. <i>Analisi della segregazione dei transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso DcE2F/ AtDPa.....</i>	<i>74</i>
4.1.5. <i>Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme alla proteina AtDPb</i>	<i>77</i>
4.1.6. <i>Analisi della segregazione dei transgeni sulle linee T2</i>	

	<i>sovraesprimenti il complesso DcE2F/AtDPb</i>	80
4.2.	Isolamento di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti i fattori AtE2Fa o AtE2Fb, con o senza i fattori AtDP	82
4.2.1.	<i>Selezione ed analisi fenotipica macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore AtE2Fa</i>	82
4.2.2.	<i>Isolamento delle linee omozigoti sovraesprimenti il fattore AtE2Fa</i>	85
4.2.3.	<i>Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore AtE2Fa insieme alla proteina AtDPa</i>	86
4.2.4.	<i>Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fa/AtDPa</i>	88
4.2.5.	<i>Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore AtE2Fa insieme alla proteina AtDPb</i>	88
4.2.6.	<i>Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fa/AtDPb</i>	92
4.2.7.	<i>Selezione ed analisi fenotipica macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore AtE2Fb</i>	93
4.2.8.	<i>Isolamento delle linee omozigoti sovraesprimenti il fattore AtE2Fb</i>	95
4.2.9.	<i>Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore AtE2Fb insieme alla proteina AtDPa</i>	97
4.2.10.	<i>Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fb/AtDPa</i>	99
4.2.11.	<i>Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di <i>Arabidopsis thaliana</i> sovraesprimenti il fattore AtE2Fb</i>	

insieme alla proteina AtDPb	100
4.2.12. <i>Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fb/AtDPb</i>	102
4.3. Studio dei livelli di espressione dei transgeni	104
4.4. Caratterizzazione fenotipica dettagliata delle linee omozigoti sovraesprimenti DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb	109
4.4.1. <i>Analisi della dimensione dei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb</i>	109
4.4.2 <i>Analisi del numero di cellule epidermiche nei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti i fattori DcE2F, AtE2Fa ed AtE2Fb</i>	113
4.4.3. <i>Misurazione dell'area delle cellule epidermiche nei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti i fattori DcE2F, AtE2Fa ed AtE2Fb</i>	118
4.4.4. <i>Osservazione mediante microscopio a contrasto per interferenza differenziale (DIC) dei meristemi radicali delle piantine sovraesprimenti i fattori DcE2F, AtE2Fa ed AtE2Fb</i>	120
4.4.4.1. <i>Analisi del tessuto meristematico epidermico radicale</i>	120
4.4.4.2. <i>Analisi del tessuto meristematico corticale radicale</i> ...	126
4.4.4.3. <i>Analisi del tessuto meristematico della stele nei meristemi radicali</i>	133
4.4.4.4. <i>Analisi delle dimensioni dei meristemi radicali</i>	139
4.4.5. <i>Misurazione delle radici primarie delle piantine sovraesprimenti i fattori DcE2F, AtE2Fa ed AtE2Fb</i>	141
4.4.6. <i>Studio sulla germinabilità dei semi delle piantine sovraesprimenti i fattori DcE2F, AtE2Fa ed AtE2Fb</i>	142
5. Discussione	144
6. Bibliografia	154
7. Ringraziamenti	170

Abstract

The E2F transcription factors are key components of the RB/E2F pathway which controls the G1/S transition of the cell cycle and is conserved in animals and plants. The E2Fs can be divided into different classes which have been shown to act as activators or repressors of E2F-dependent genes. Moreover, plant and animal E2Fs are known to regulate other cellular functions in addition to cell cycle progression. In this study we describe the effects of over-expressing in *Arabidopsis* the DcE2F factor from carrot (*Daucus carota*), one of the first plant E2F factors to be isolated and characterized. DcE2F transactivates a reporter gene in transient assays, but the functional role of this protein *in planta* was not defined. Here we show that the over-expression of DcE2F in transgenic *Arabidopsis* plants causes effects that are similar to those observed when over-expressing the activating AtE2F proteins (AtE2Fa or AtE2Fb) of *Arabidopsis thaliana*. These results indicate that DcE2F can promote cell proliferation and can modify embryo and plant development, but also reveal some new aspects about the activating E2Fs of *Arabidopsis*.

Lista abbreviazioni utilizzate in questo studio

ABC,	ATP Binding Cassette
ANT,	AINTEGUMENTA
AUX1,	Auxina Permeasi 1
BY-2,	cellule di tabacco Bright Yellow-2
BR,	Brassinosteroidi
CDK,	Chinasi Ciclina Dipendente (Cyclin Dependent Kinase)
CAK,	Chinasi attivanti le CDK
CDC,	Cell Division Cycle
CENH3,	proteina istone H3 centromero-specifica
ChIP,	Immunoprecipitazione della Cromatina
Cyc,	Ciclina
DIC,	Differential Interference Contrast
DAG,	giorni dopo la germinazione
GA,	Acido Gibberellico
GRF,	Fattori regolatori della crescita
HDAC,	Istone Deacetilasi
IAA,	Acido Indol-Acetico
ICK,	Chinasi inibitrici delle CDK
KRP,	proteina Kip-related
MCM,	Mini-Chromosome Maintenance
MIF,	Mitosis Induction Factor
ORC,	Origin Recognition Complex
PCNA,	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PGP,	Glicoproteine P
PCR	Reazione di Polimerizzazione a Catena
PPM,	Plant Preservative Mixture
pRB,	proteina Retinoblastoma
RAM,	meristema radicale (Root Apical Meristem)
RNR,	Ribonucleotide reduttasi
SAM,	meristema apicale (Shoot Apical Meristem)

1. Introduzione

1.1. Il ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è un processo finemente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati che portano alla divisione di una cellula in due cellule figlie geneticamente identiche. La sua regolazione è alla base dell'accrescimento e dello sviluppo di tutti gli organismi viventi, e comprenderne il meccanismo è di cruciale importanza, poiché difetti in questo processo possono portare ad alterazioni nello sviluppo e, nel caso di organismi animali, alla formazione di cellule tumorali.

Il meccanismo generale del ciclo cellulare segue una strategia comune per tutti gli eucarioti, e viene suddiviso essenzialmente in 4 fasi (Fig.1): la fase S, durante la quale la cellula duplica il materiale genetico; la fase M, nella quale i cromosomi duplicati vengono suddivisi nelle due cellule figlie (mitosi) attraverso la divisione fisica del citoplasma della cellula (citocinesi); l'intervallo tra la sintesi di DNA e la mitosi, chiamato G2 (gap 2), durante il quale la cellula continua il suo accrescimento e la sintesi dei materiali citoplasmatici (organelli e macromolecole) e si prepara ad entrare in mitosi; l'intervallo tra la mitosi e l'inizio della successiva sintesi di DNA, chiamato G1 (gap 1), durante il quale la cellula svolge tutte le sue normali funzioni metaboliche. In tarda fase G1 le cellule decidono se continuare a dividersi, ed iniziare nuovamente la fase S, o andare incontro al differenziamento ed entrare in uno stato di quiescenza detto G0, il quale può durare per tutta la vita della cellula, come nei neuroni, oppure in altri casi può essere reversibile in risposta a segnali molecolari.

Il corretto funzionamento di questi processi è regolato principalmente da due punti di controllo: il checkpoint G1/S, nel quale la cellula controlla che tutto sia pronto per la sintesi del DNA; e il checkpoint G2/M, dove la cellula controlla se tutto è pronto per entrare in mitosi. Un altro checkpoint durante la metafase controlla che la cellula sia pronta a dividersi. Tali controlli avvengono ad opera di proteine quali le cicline e le chinasi ciclina dipendenti (CDK) che agiscono su vari targets inclusa la proteina soppressore di tumore Retinoblastoma (Rb).

Quest'ultima è in grado di regolare l'attività dei fattori di trascrizione E2F che sono implicati nella trascrizione di geni codificanti gli enzimi necessari per la sintesi di nuovo DNA.

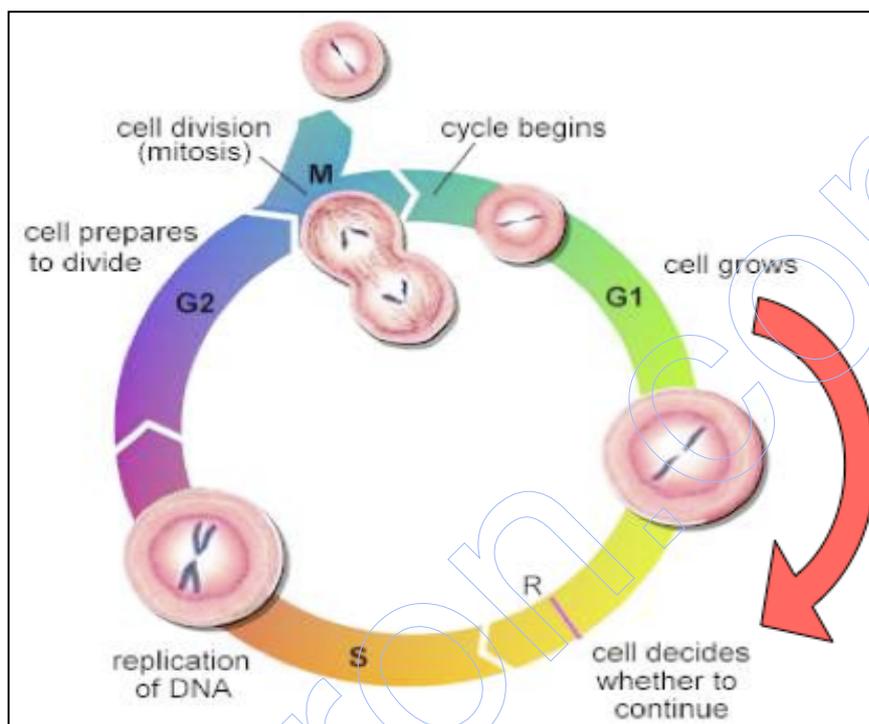


Figura 1. Rappresentazione schematica del ciclo cellulare eucariotico.

Il meccanismo generale è altamente conservato in animali e piante, ma alcune caratteristiche sono tipiche delle cellule vegetali. Per esempio, alcune cellule vegetali non vanno incontro a citocinesi fra una replicazione e l'altra di DNA, diventando poliploidi. Questo fenomeno è noto come endoreduplicazione, ed è molto comune nel Regno vegetale (Inzé, 2007).

Gli organismi animali e vegetali rispondono diversamente ai vari stimoli ambientali. Mentre gli animali rispondono all'ambiente circostante mediante adattamenti fisiologici e comportamentali che non alterano in maniera sostanziale il loro piano di sviluppo e differenziamento, le piante, in quanto organismi sessili, hanno elaborato meccanismi di risposta ai cambiamenti ambientali che possono

alterare drasticamente sia il loro tasso di crescita sia l'architettura generale dell'individuo (Huntley and Murray, 1999). Infatti, nelle piante l'organogenesi avviene principalmente post-embrionicamente e le cellule vegetali, in quanto circondate da una parete cellulare rigida, non possono migrare durante lo sviluppo per cui la loro posizione è essenzialmente determinata dal processo proliferativo (Beemster et al., 2003). Inoltre, molte cellule vegetali sono totipotenti e possono riprogrammare la loro capacità di de-differenziarsi e proliferare anche dopo avere completato il loro differenziamento.

La proliferazione delle cellule vegetali avviene principalmente in regioni situate ai poli opposti della pianta, nel meristema apicale del germoglio (SAM, shoot apical meristem) e nel meristema apicale radicale (RAM, root apical meristem), ed è strettamente collegata con la crescita dell'intera pianta in risposta a fattori di crescita, di sviluppo e ambientali. Adiacenti ai meristemi apicali sono presenti le zone di espansione ed allungamento in cui le cellule cessano di dividersi, ma si espandono aumentando notevolmente le loro dimensioni prima di completare il loro differenziamento.

1.2. Controllo del ciclo cellulare

Lo studio del ciclo cellulare nei vegetali superiori ha fatto notevoli progressi, grazie anche all'isolamento di geni vegetali codificanti per cicline, chinasi ciclina dipendenti (CDK), chinasi attivanti le CDK (CAK), proteine inibitrici delle CDK (ICK o KRP), proteine Retinoblastoma-related (pRBR) e fattori di trascrizione E2F (Dewitte and Murray, 2003). Queste scoperte hanno rivelato una notevole conservazione dei principali elementi di controllo sia nelle piante che in cellule animali, dimostrando come, anche nelle cellule vegetali, le CDK e le proteine a loro associate siano dei regolatori cruciali che controllano l'attività di vari geni coinvolti nella replicazione del DNA e nella mitosi.

1.2.1. Il pathway RBR/E2F

La presenza di un pathway Retinoblastoma/E2F in cellule vegetali ha dimostrato che il controllo della transizione G1/S nelle piante superiori e negli animali presenta marcate analogie e dipende in gran parte dalla regolazione concertata dell'attività dei fattori di trascrizione E2F. Sorprendentemente, questa conservazione del pathway Retinoblastoma/E2F non si riscontra nei lieviti e nei funghi, anche se il loro ciclo cellulare è comunque regolato da cicline e CDK.

Il termine E2F deriva dalla sua iniziale identificazione come fattore implicato nell'attivazione del promotore del gene *E2* dell'Adenovirus umano (adenovirus E2 promoter-binding factor; Kovessi et al., 1987). Il sito di legame per E2F presente nel promotore E2 è stato identificato come "TTTCGCGC" e sequenze simili sono state identificate in promotori di un vasto numero di geni cellulari (Fig. 2). La maggior parte di questi geni sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare (cdk2 e cdk4, ciclina A, D ed E) o nella sintesi del DNA (PCNA, DNA polimerasi α , ribonucleotide reductasi) (Menges et al., 2002). Diversi meccanismi, sia trascrizionali che post-trascrizionali, controllano l'accumulo e l'attività dei fattori E2F.

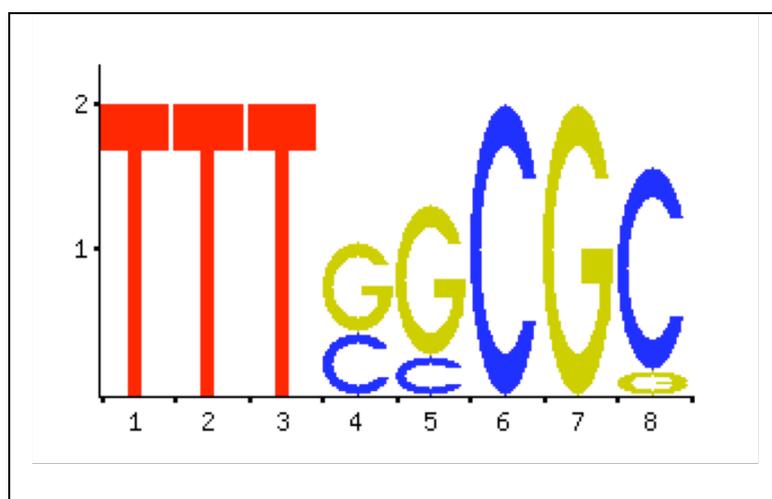


Figura 2. Il sito consenso E2F.

Lara Perrotta

Studi funzionali del fattore di trascrizione DcE2F di *Daucus carota* tramite sovraespressione in piantine transgeniche di *Arabidopsis thaliana*

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Università degli Studi di Sassari

In cellule bloccate in fase G0 e durante l'inizio della fase G1 i tipici fattori E2F sono legati da proteine della famiglia del Retinoblastoma (pRB) che, reclutando repressori generali della trascrizione quali le deacetilasi istoniche o le metiltrasferasi istoniche, determinano un blocco della trascrizione dei geni regolati dai fattori E2F. In tarda fase G1 la pRB viene fosforilata da parte di kinasi ciclina-dipendenti (CDK) e perde così la sua affinità per gli E2F che a questo punto diventano capaci di attivare l'espressione di geni che portano all'entrata in fase S, quindi all'inizio della replicazione del DNA (Fig. 3).

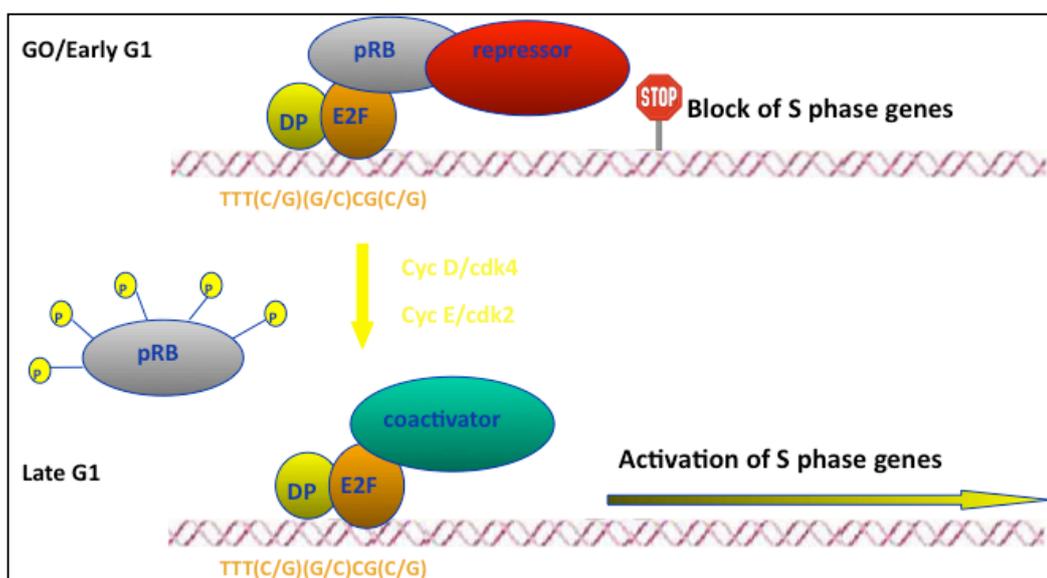


Figura 3. Meccanismo generale del pathway pRb/E2F.

1.2.2. I fattori E2F animali

In cellule di mammifero sono stati identificati otto fattori E2F (E2F1-8), sei dei quali necessitano di partners chiamati DP (DP1 o DP2) per il legame con il DNA (Dimova and Dyson, 2005; Christensen et al., 2005). I DP e gli E2F possiedono omologhe regioni di legame al DNA e la loro interazione crea eterodimeri con alta affinità di legame per elementi E2F canonici. Alcune caratteristiche degli E2F di

mammifero, come per esempio la loro struttura primaria, la necessità o meno di formare complessi con i DP, la loro affinità per diversi membri della famiglia pRB, il loro pattern di espressione e la loro capacità di attivare o reprimere l'espressione di alcuni geni target E2F, permettono di suddividere questa famiglia in sottogruppi (Christensen et al., 2005). Gli E2F1-6 sono detti tipici grazie alla presenza di un dominio di dimerizzazione con proteine DP ed una regione chiamata "Marked box" altamente conservata (Fig. 4). E2F7 ed E2F8 sono invece considerati atipici.

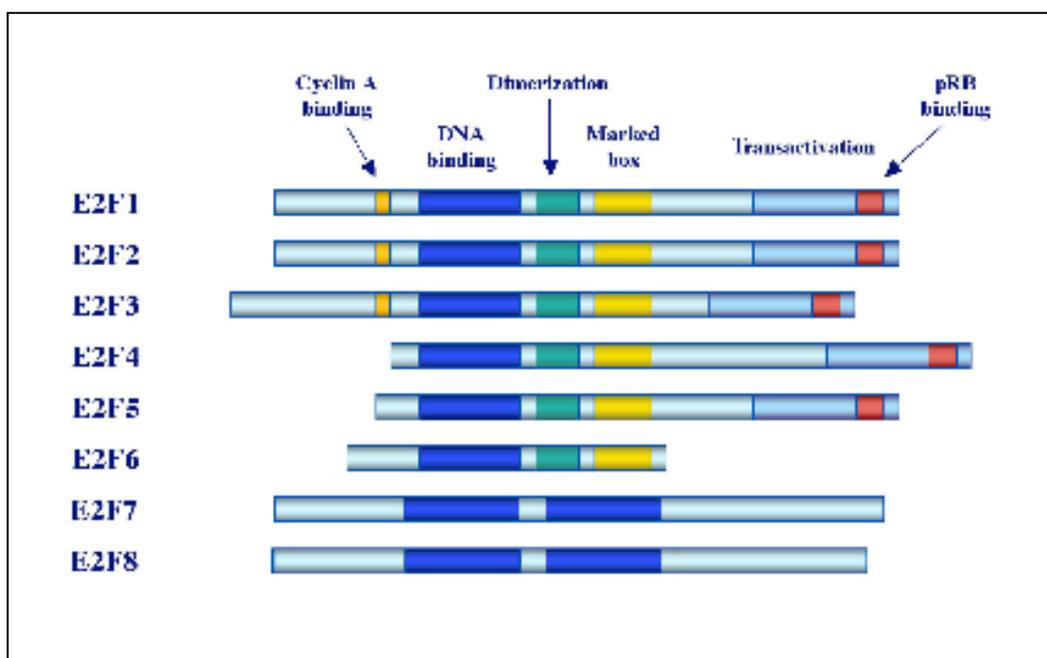


Figura 4. Schema generale rappresentante i domini conservati dei membri della famiglia E2F di mammifero.

I fattori E2F1-3 sono detti anche attivatori, poichè sono capaci di promuovere l'espressione di alcuni geni target E2F durante la transizione G1/S, e la loro sovraespressione può promuovere il rientro nel ciclo cellulare di cellule quiescenti (Attwooll et al., 2004). Gli E2F4-6 sono invece capaci di reprimere l'attività di

specifici geni target. Questo ruolo bivalente nel controllo della trascrizione genica deriva dalle capacità di alcuni E2F di interagire con co-attivatori, come CBP e p300, o con repressori generali della trascrizione quali l'istone deacetilasi HDAC1, che viene legata ai complessi E2F tramite un'interazione con pRB. Ciò ha potuto chiarire come gli E2F siano regolatori sia positivi che negativi della proliferazione cellulare e siano capaci di agire sia da oncogeni che da soppressori tumorali. I fattori atipici E2F7 e 8 sono di più recente identificazione (de Bruin et al., 2003; Christensen et al., 2005), scoperti in seguito all'identificazione degli E2F atipici vegetali (Mariconti et al., 2002). Questi E2F vengono considerati atipici per la loro mancanza di un dominio di legame con le proteine DP, possiedono un doppio dominio di legame al DNA e mancano anche del cosiddetto "Marked box" e del dominio C-terminale di transattivazione. Questi fattori possono competere con gli E2F tipici per il legame al DNA, e si pensa che possano agire da inibitori della trascrizioni di alcuni geni target E2F.

I dati emersi finora mettono in evidenza come gli E2F svolgano molteplici funzioni e, come suggerito dall'ampia gamma di geni che subiscono cambiamenti di espressione in seguito all'attivazione di E2F1, E2F2 ed E2F3 in linee cellulari umane, essi sono coinvolti nel differenziamento, nello sviluppo, nella proliferazione e nell'apoptosi di cellule di mammifero (Müller et al., 2001). Per almeno uno degli E2F di mammifero infatti è stata dimostrata la capacità di indurre apoptosi tramite interazione con la proteina p53 o attraverso un pathway indipendente da essa (Black and Azizkhan-Clifford, 1999). Come accennato precedentemente, l'attività dei complessi E2F/DP è fortemente regolata dalle proteine di tipo Retinoblastoma (pRB, p107, p130) (Moberg et al., 1996; Sardet et al., 1997). Gli E2F mostrano una notevole specificità nell'interazione con queste proteine ed il dominio di interazione si trova nella regione C-terminale, all'interno della più vasta regione di transattivazione (Helin et al., 1993). In G0 e all'inizio della fase G1 le pocket proteins sono defosforilate e soltanto in tale stato possono interagire con i fattori E2F. Il legame con le pocket proteins maschera il dominio di transattivazione, impedendo all'E2F di svolgere la sua funzione di attivatore della trascrizione (Harbour et al., 2000; Müller et al., 2000). Inoltre è stato

dimostrato che le pocket proteins reclutano fattori che presentano attività rimodellante la cromatina, quali ad esempio l'istone deacetilasi (HDAC), l'istone metiltransferasi o il complesso SWI/SNF. Questi fattori reprimono in maniera attiva la trascrizione di geni controllati dagli E2F, bloccando l'accesso di altri fattori di trascrizione a livello del promotore (Trouche et al., 1997; Ferreira et al., 1998; Vandel et al., 2001). In tarda fase G1, la fosforilazione delle pocket proteins, da parte del complesso ciclinaD/cdk4-6 e ciclinaE/cdk2, permette il rilascio di E2F trascrizionalmente attivi e dunque l'espressione di geni che mediano l'ingresso in fase S.

1.2.3. I fattori E2F vegetali

A una prima iniziale identificazione di geni vegetali *E2F*-like (Ramirez-Parra et al., 1999; Sekine et al., 1999) e *DP* (Magyar et al., 2000; Ramirez-Parra and Gutierrez, 2000) ha fatto subito seguito l'identificazione di questi geni in numerose specie vegetali incluse carota (Albani et al., 2000), tabacco (Chabouté et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (de Jager et al., 2001; Kosugi and Ohashi, 2002a; Mariconti et al., 2002), riso (Kosugi and Ohashi, 2002b), mais (Sabelli et al., 2005), *Chlamydomonas reinhardtii* (Bisova et al., 2005) e *Ostreococcus tauri* (Robbens et al., 2005).

Arabidopsis thaliana possiede sei geni *E2F* (*AtE2Fa-f*) (Mariconti et al., 2002), due geni *DP* (*AtDPa* e *AtDPb*) e un singolo gene RB-related (*AtRBR*) (Vandepoele et al., 2002).

Dal punto di vista strutturale le proteine AtE2Fa-c corrispondono a E2F tipici, con la struttura delle classiche proteine E2F animali e di altre piante, mentre AtE2Fd-f sono i primi E2F atipici ad essere stati scoperti. AtE2Fa-c presentano una regione N-terminale di legame al DNA, seguita da un dominio di dimerizzazione con i DP e da una regione riconosciuta dalla proteina pRBR (Retinoblastoma-related) all'estremità C-terminale. Possiedono inoltre la regione conservata, chiamata "Marked box", che potrebbe essere implicata nella dimerizzazione e nel

ripiegamento del DNA (Fig. 5; de Jager et al., 2001; Mariconti et al., 2002). Sono quindi strutturalmente correlati con gli E2F1-5 umani.

AtE2Fa e AtE2Fb sono considerati attivatori dei geni della fase S e stimolano la divisione cellulare (Rossignol et al., 2002; De Veylder et al., 2002; Magyar et al., 2005; Sozzani et al., 2006). In particolare, AtE2Fa è un attivatore dell'espressione genica e stimola sia la divisione cellulare che l'endoreduplicazione. In più la coespressione di AtE2Fa con il suo partner di dimerizzazione AtDPa sembra essere in grado di aumentare fortemente questo effetto (De Veylder et al., 2002). In ulteriori studi è stato suggerito che AtE2Fa sia in grado di aumentare l'espressione di AtE2Fb, il quale potrebbe essere il principale attivatore della proliferazione cellulare. Inoltre, un accumulo di AtE2Fb porterebbe ad una diminuzione di AtE2Fa, il che suggerisce la presenza di un meccanismo di autoregolazione (Magyar et al., 2005; Sozzani et al., 2006).

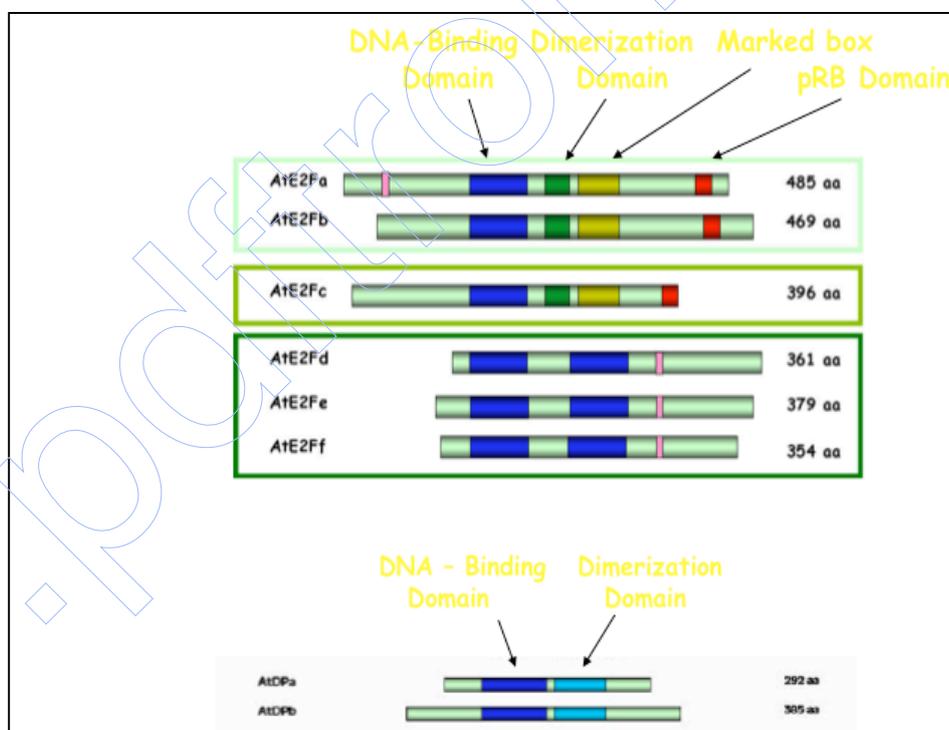


Figura 5. Organizzazione in domini delle proteine E2F e DP di *Arabidopsis thaliana*.

In effetti, AtE2Fb sembrerebbe essere un attivatore dei geni della fase G2/M, mentre si pensa che AtE2Fa regoli principalmente i geni della fase G1/S (Vandepoele et al., 2005) e la sua sovraespressione in piante transgeniche porta ad un aumento dell'endoreduplicazione e ad iperplasia. Secondo questa ipotesi, l'aumento della divisione cellulare osservato in piante sovraesprimenti *AtE2Fa* sarebbe probabilmente il risultato di un aumento dell'espressione di *AtE2Fb* e non direttamente dovuto all'attività di AtE2Fa. D'altra parte, piante sovraesprimenti *AtE2Fb* hanno mostrato un incremento della proliferazione cellulare senza effetti nei livelli di ploidia (Sozzani et al., 2006). Inoltre, si pensa che AtE2Fa, oltre ad attivare l'espressione di *AtE2Fb*, sia anche capace di attivare l'espressione di *AtE2Ff*.

AtE2Fc è invece classificato come repressore dei geni E2F-dipendenti e sembrerebbe agire come regolatore negativo della divisione cellulare, tramite interazione con pRBR (del Pozo et al., 2002, 2006).

Gli E2F cosiddetti atipici, AtE2Fd, e ed f (Mariconti et al., 2002), anche conosciuti come *DEL2*, *DEL1* e *DEL3* (Vandepoele et al., 2002), o *E2L1*, *E2L3* ed *E2L2* rispettivamente (Kosugi and Ohashi, 2002), possiedono un doppio dominio di legame col DNA e agiscono indipendentemente dalle proteine DP (Fig. 5). La mancanza del dominio di transattivazione fa pensare che siano degli inibitori e/o repressori dell'espressione di specifici geni target degli E2F attivatori (Lammens et al., 2009). Questi E2F sono analoghi a quelli di mammifero E2F7 (de Bruin et al., 2003) ed E2F8 (Christensen et al., 2005; Maiti et al., 2005), i quali sono stati scoperti proprio in seguito alla precedente identificazione dei fattori E2F atipici in *Arabidopsis*. Tuttavia la precisa funzione fisiologica di questi E2F atipici è ancora poco conosciuta.

Sono stati suggeriti differenti ruoli per *AtE2Ff* ed *AtE2Fe*. Il primo, infatti, non sembra coinvolto nella progressione del ciclo cellulare ma piuttosto nella distensione e nel differenziamento cellulare, comportandosi da regolatore della crescita, specialmente nelle cellule dell'ipocotile e nella radice. In particolare si ritiene possa avere un ruolo nel controllo di geni coinvolti nella biosintesi della parete cellulare durante la fase di allungamento delle cellule differenziate

(Ramirez-Parra et al., 2004).

AtE2Fe (o *DEL1*) invece controlla negativamente l'endociclo; infatti, la perdita di funzione di *AtE2Fe* porta ad un incremento dei livelli di ploidia, soprattutto nei cotiledoni e nell'ipocotile, mentre la sua sovraespressione riduce l'endoreduplicazione. I cambiamenti di ploidia sono correlati con un'alterata espressione di un set di geni E2F target che codificano proteine necessarie per la replicazione del DNA. In aggiunta, poiché *AtE2Fe* viene trascritto esclusivamente in cellule mitoticamente attive, lo si può ritenere un inibitore dell'endociclo che preserva lo stato mitotico di cellule in proliferazione sopprimendo la trascrizione di geni richiesti per l'endoreduplicazione (Vlieghe et al., 2005; Lammens et al., 2008). Recentemente, è stato inoltre osservato che *AtE2Fe* è un gene target sia di *AtE2Fb* che di *AtE2Fc*, i quali in maniera antagonistica vanno a competere per il legame con elementi cis-E2F canonici, e conferiscono una regolazione della trascrizione di *AtE2Fe* dipendente dalla luce. Quando germogli di *Arabidopsis* cresciuti al buio vengono trasferiti alla luce, i livelli di espressione di *E2Fb* vengono stabilizzati rapidamente, mentre quelli di *E2Fc* vengono destabilizzati e ne consegue un aumento nella trascrizione di *AtE2Fe*. Inoltre, cambiamenti nei livelli di espressione luce-dipendente di *AtE2Fe* sembrano disaccoppiare il legame che c'è tra luce ed endoreduplicazione negli ipocotili. Sembrerebbe quindi che la luce intervenga sull'espressione di *AtE2Fb* ed *AtE2Fc*, e che questi regolino la sovraespressione di *AtE2Fe*, che fungerebbe così da link tra regolazione dell'endoreduplicazione e la risposta fotomorfogenica (Berckmans et al., 2011).

Recentemente, l'analisi di mutanti e piante transgeniche con alterati livelli di espressione di *AtE2Fd/DEL2* hanno mostrato che questo E2F può influenzare la crescita della pianta promuovendo la proliferazione cellulare ed inibendo l'allungamento cellulare (Sozzani et al., 2010). Infatti, è stato visto che la sovraespressione di *AtE2Fd* determina aumenti nell'espressione di *AtE2Fa*, *AtE2Fb* ed *AtE2Fe*, e di altri geni associati ad una stimolazione della proliferazione cellulare. Al contrario, una mutazione che abolisce l'espressione di *AtE2Fd* determina un aumento nell'espressione di alcuni geni coinvolti nella repressione del ciclo cellulare. Questi dati suggeriscono che *AtE2Fd* possa

intervenire nel equilibrio tra proliferazione e differenziamento cellulare agendo inaspettatamente da repressore/inibitore di regolatori negativi della proliferazione cellulare (Sozzani et al., 2010).

1.2.4. Il gene *DcE2F*

Uno dei primi fattori E2F vegetali identificati ed il primo per il quale è stata dimostrata capacità transattivante è il fattore DcE2F di carota. In seguito alla iniziale dimostrazione della presenza, in estratti nucleari di *Daucus carota*, di attività di legame al DNA con specificità per la sequenza canonica E2F, si è proceduto tramite PCR con primers degenerati all'isolamento di un cDNA codificante un fattore E2F di carota, denominato DcE2F (Albani et al., 2000). La proteina DcE2F possiede un'organizzazione dei domini simile a quella dei fattori E2F "tipici" umani (E2F1-5; Fig. 4) e di *Arabidopsis thaliana* (AtE2Fa-c; Fig. 5); infatti sono altamente conservati il dominio di legame col DNA, il dominio di dimerizzazione e la regione chiamata "Marked box", mentre il dominio di attivazione ed il dominio di legame per la proteina Retinoblastoma sono meglio conservati tra le proteine E2F vegetali ma più divergenti se paragonati a quelli delle proteine E2F animali.

Esperimenti di transattivazione in cellule di carota hanno inoltre dimostrato che la proteina DcE2F, in associazione con un partner DP, è in grado di attivare fortemente la trascrizione di un gene reporter posto sotto il controllo di un promotore minimale contenente siti *cis* E2F canonici (Albani et al., 2000). L'analisi dei livelli di mRNA in cellule sincronizzate di carota ha mostrato che il gene *DcE2F* è espresso fortemente in colture cellulari in proliferazione mentre è debolmente espresso in G0. Questo pattern di espressione suggerisce un probabile coinvolgimento di *DcE2F* nell'induzione della proliferazione cellulare anche se cellule non proliferanti, a un livello molto basso, sono anch'esse capaci di esprimere il gene *DcE2F* (Albani et al., 2000). Queste analisi hanno rivelato che, nonostante la presenza di un alto grado di omologia strutturale tra DcE2F e le tre

proteine di *Arabidopsis* AtE2Fa, b e c, da un punto di vista funzionale DcE2F sembra presentare analogie solo con AtE2Fa ed AtE2Fb, che sono attivatori del ciclo cellulare, ma non con AtE2Fc che sembra piuttosto agire da repressore trascrizionale dei geni del ciclo cellulare (Del Pozo et al., 2006).

1.2.5. I geni target dei fattori E2F

Siti di legame agli E2F altamente conservati sono stati trovati in una o più copie (spesso due) nei promotori di numerosi potenziali geni target E2F. In vari casi, è stato dimostrato che questi siti E2F, a seconda dello stadio di sviluppo, possono mediare l'attivazione o la repressione della trascrizione (Egelkrou et al., 2002). La maggiorparte dei target E2F proposti sono geni del ciclo del cellulare, ma altri sono coinvolti per esempio nella formazione ed espansione della parete cellulare, nei processi di assimilazione dell'azoto o nella fotosintesi. Recentemente, l'utilizzo di approcci "genome-wide" che integrano i dati microarray con analisi bioinformatiche, hanno permesso l'identificazione di un largo numero di potenziali geni target degli E2F vegetali.

Tra i promotori meglio studiati contenenti siti consenso E2F troviamo quelli di *RNR1*, *RNR2* e *PCNA* di tabacco, e *ORC*, *CDC6*, *MCM3* e *CDKB1;1* di *Arabidopsis thaliana* (Fig. 2).

RNR (ribonucleotide reductase) è un enzima chiave nella sintesi del DNA. È costituito da due subunità grandi (R1) e da due piccole (R2), codificate da *RNR1* e *RNR2* rispettivamente. Il promotore di *RNR2* di tabacco è stato uno dei primi promotori vegetali dimostrati essere regolati da parte di E2F (Chaboutè et al., 2000). Questo promotore contiene due siti consenso E2F coinvolti nell'attivazione dell'espressione durante la transizione G1/S. Chaboutè et al. (2002) hanno identificato due siti E2F anche nel promotore di *RNR1* in tabacco. I geni *RNR* di *Arabidopsis* e riso sembrano avere una simile regolazione E2F-dipendente, suggerendo che la regolazione da parte di E2F dei promotori *RNR* possa essere una regola generale nelle piante, mentre i geni *RNR* di mammifero mancano di siti

E2F (Filatov and Thelander, 1995).

La proteina CDC6 di *Arabidopsis*, così come quella di lievito e delle cellule animali, è cruciale per l'inizio della replicazione del DNA, e l'espressione del gene *CDC6* è infatti elevata durante la fase S del ciclo cellulare. Analisi *in silico* hanno mostrato la presenza di un sito consenso E2F nella sequenza del promotore *CDC6* di *Arabidopsis*, e analisi EMSA hanno mostrato che gli E2F vegetali sono capaci di legare specificamente questa sequenza (Castellano et al., 2001; de Jager et al., 2001). Inoltre, piantine transgeniche di *Arabidopsis* sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPa hanno mostrato elevati livelli di *AtCDC6* (De Veylder et al., 2002), mentre la sovraespressione di AtE2Fc porta ad una diminuzione della sua espressione (del Pozo et al., 2002).

L'omologo in *Arabidopsis* di MCM3 (mini-chromosome maintenance complex) è coinvolto nell'inizio della replicazione del DNA durante la transizione G1/S. *AtMCM3* contiene diversi siti consenso E2F, due dei quali (D1 e D2) sono responsabili rispettivamente della repressione dell'attività del promotore in G2 e dell'espressione meristemica del promotore; infatti la mutazione del sito D1 abolisce la regolazione collegata al ciclo cellulare mentre la mutazione di D2 abolisce l'attività del promotore nei meristemi apicali (Stevens et al., 2002).

PCNA, inizialmente considerata una proteina ausiliaria della DNA polimerasi δ , è coinvolta in numerosi meccanismi, tra i quali replicazione del DNA, riparazione del DNA, assemblaggio della cromatina e controllo del ciclo cellulare (Tsurimoto, 1998). Il promotore del gene *PCNA* di *Nicotiana benthamiana* possiede due siti di legame E2F. Egelkrou et al. (2002) hanno mostrato che uno di questi elementi E2F attiva la trascrizione in cellule in proliferazione, ma l'altro è un repressore in tessuti differenziati. I siti consenso E2F dei promotori di *PCNA* di tabacco e riso agiscono da regolatori positivi dell'espressione in cellule in attiva divisione (Kosugi and Ohashi, 2002). Anche nel promotore di *AtPCNA* sono stati identificati numerosi siti E2F.

Il complesso ORC (origin recognition complex) è costituito da sei subunità che riconoscono l'origine della replicazione. Tutti i geni *ORC* di *Arabidopsis* (eccetto *ORC5*) contengono almeno un sito consenso E2F a una posizione ottimale dal sito

di inizio della traduzione. Un'analisi in cellule sincronizzate di *Arabidopsis* ha mostrato che l'espressione di questi geni è massimale durante la transizione G1/S del ciclo cellulare (Diaz-Trivino et al., 2005). Inoltre, studi condotti su piante transgeniche esprimenti una versione di una proteina DP mancante del dominio di legame al DNA, che agendo come dominante negativo è in grado di inibire il legame di E2F al DNA, hanno mostrato una riduzione dei livelli di espressione della maggior parte dei geni *ORC* (Ramirez-Parra et al., 2003). All'opposto, piante transgeniche in cui l'attività transattivante degli E2F viene aumentata tramite l'inattivazione inducibile della proteina RBR hanno mostrato un aumento dell'espressione dei geni *ORC* (tranne *ORC5*) (Desvoyes et al., 2006). Nell'insieme, quindi, risultati *in silico*, *in vitro* e *in planta*, supportano la conclusione che l'espressione dei geni *ORC*, eccetto *ORC5*, sia regolata dai fattori E2F (Diaz-Trivino et al., 2005).

Analisi mediante Microarray e Northern blot su piante sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPa hanno rivelato elevati livelli di espressione di *AtCDKB1;1* (Vlieghe et al., 2003). Analisi *in silico* sul promotore hanno indicato la presenza di un sito consenso E2F. In cellule di tabacco BY-2 (Bright Yellow tobacco cells) esprimenti in cui si è posto il gene reporter *GUS* sotto controllo del promotore di *AtCDKB1;1* hanno mostrato un incremento dell'attività *GUS* circa 30 volte maggiore nei calli contenenti il promotore wild type rispetto a quelli con un promotore mutato, mancante del sito E2F. Inoltre, l'espressione del gene *GUS* sotto controllo del promotore *AtCDKB1;1* in piante sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPa ha mostrato un aumento del *GUS* staining nei primordi fogliari e negli stomi (Boudolf et al., 2004). Questo suggerisce un effetto diretto nella regolazione del gene *AtCDKB1;1* da parte di AtE2Fa. La regolazione nella trascrizione di *AtCDKB1;1* da parte di AtE2Fa è stata inaspettata, poichè si pensava che i fattori di trascrizione E2F-DP operassero nella transizione G1/S, mentre l'attività di *AtCDKB1;1* è massimale durante la transizione G2/M (Porceddu et al., 2001). Questo mostrerebbe l'esistenza di meccanismi che collegano le transizioni G1/S e G2/M, e *AtCDKB1;1* potrebbe essere il fattore che, mediante E2F-DP, collega la replicazione del DNA con la successiva mitosi.

Analisi di Microarray in piante di *Arabidopsis* sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPa hanno permesso di identificare un “cross-talking” genetico in cui sono collegati tra loro replicazione del DNA, assimilazione dell’azoto e fotosintesi. I putativi target diretti, identificati per la presenza di siti E2F nei loro promotori, appartengono a un gruppo di geni coinvolti nella sintesi del DNA, mentre i geni indotti secondariamente sono soprattutto coinvolti nell’assimilazione dell’azoto. Vlieghe et al. (2003) hanno ipotizzato che quest’ultimo effetto sia dovuto a una maggiore richiesta di azoto durante la biosintesi dei nucleotidi durante la fase S del ciclo cellulare. Probabilmente la biosintesi dei nucleotidi non è l’unica via metabolica coinvolta, vista la modulazione di un numero così elevato di geni coinvolti nel metabolismo dell’azoto e dei carboidrati.

Uno studio più recente (de Jager et al., 2009) in cui sono stati effettuati Microarray in piante di *Arabidopsis* sovraesprimenti in maniera inducibile *AtE2Fa-AtDPa*, *AtE2Fc-AtDPa* e *AtCYCD3;1*, ha suggerito nuovi possibili ruoli di questi fattori di trascrizione E2F. Il complesso AtE2Fa-AtDPa potrebbe giocare un ruolo anche nella biogenesi della parete cellulare. AtE2Fc invece non sembra giocare un ruolo nel ciclo cellulare, non è un antagonista di AtE2Fa e non è direttamente regolato da AtCYCD3;1. Viene invece indicato un ruolo per AtE2Fc nella fotomorfogenesi e nel metabolismo.

Mediante Affymetrix tiling 1.0R Naouar et al. (2009) hanno identificato 153 possibili nuovi geni target E2F, non presenti fino a quel momento in banca dati, che presentano siti di legame E2F nei loro promotori. Questi geni includono, tra gli altri, anche geni coinvolti nella divisione cellulare, nella replicazione del DNA e nella risposta al danno del DNA. Inoltre sono stati scelti a caso 10 tra questi geni, e sette di questi (AT3G27630, AT4G02110, AT5G06590, AT1G52270, AT3G18730 o TONSOKU, AT5G12920, AT1G80710 o DRS1) sono stati confermati essere target diretti di AtE2Fa mediante esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChiP) condotti con anticorpi specifici anti-AtE2Fa su piante sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPa. Utilizzando anticorpi specifici anti-E2Fb è stato invece osservato che i restanti tre geni (AT3G04850 o TSO-like, AT5G01120, AT4G14700 o ORC1A) sono target diretti di AtE2Fb,

indicando che il loro aumento di espressione nelle piante sovraesprimenti AtE2Fa avviene indirettamente ed è una conseguenza dell'attivazione della trascrizione di *AtE2Fb* (Naouar et al., 2009).

Recentemente è stata studiata la regolazione trascrizionale del promotore della variante del gene *istone H3 centromero-specifica (CENH3)* di *Arabidopsis thaliana* (Heckmann et al., 2011), corrispondente alla proteina centromerica A umana (CENP-A). Analisi *in silico* della regione 5' di *CENH3* di *Arabidopsis thaliana* hanno rivelato la presenza di due siti di legame E2F (GCGGGAAA) nella regione non tradotta a monte dell'ATG. Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) hanno permesso di dimostrare che il promotore di *CENH3* è riconosciuto *in vivo* da AtE2Fa, ma non da AtE2Fb, confermando che *CENH3* è un target di AtE2Fa. Sorprendentemente, la mutazione del sito E2F posto a monte (E2F2), ma in modo meno rilevante la mutazione di quello a valle (E2F1), ha determinato un aumento nei livelli di espressione del gene reporter *GUS* in trasformazioni transienti di protoplasti di *Arabidopsis thaliana*. Questo fa ipotizzare che in condizioni fisiologiche AtE2Fa o altri fattori E2F, escluso AtE2Fb, possano mediare una repressione trascrizionale del promotore di *CENH3*. Tuttavia, esperimenti di co-espressione transiente in protoplasti di *Arabidopsis thaliana* di un gene reporter *GUS* sotto controllo della regione 5' di *CENH3* insieme ai vari fattori di trascrizione AtE2F, hanno mostrato che sia AtE2Fa che AtE2Fb, dimerizzando con le proteine AtDP, sono in grado di transattivare il promotore di *CENH3*. Inoltre, anche le sovraespressioni stabili *in planta* di entrambi gli E2F attivatori di *Arabidopsis*, *AtE2Fa* o *AtE2Fb*, determinano un aumento dei livelli di espressione di *CENH3*, mentre la sovraespressione di *AtE2Fc* ne determina una diminuzione (Heckmann et al., 2011). Da questi dati si può dedurre che la sovraespressione (o l'espressione ectopica ad essa associabile) dei fattori E2F "attivatori" può generare risposte opposte a quelle fisiologiche, probabilmente artifattuali ed imputabili ad una perturbazione della regolazione a cui sono normalmente soggetti i fattori E2F endogeni.

1.3. Endoreduplicazione

L'endoreduplicazione può essere considerata una variazione del ciclo cellulare, chiamata endociclo, caratterizzata dal fatto che la duplicazione dei cromosomi non viene seguita dalla divisione della cellula in due cellule figlie, per cui la cellula diventa poliploide. Questo fenomeno è stato osservato nelle cellule di una grande varietà di organismi, tra cui artropodi, mammiferi e piante. Si pensa che il differenziamento cellulare, l'espansione cellulare, l'attività metabolica e la resistenza a fattori di stress come le radiazioni siano fattori coinvolti nel processo dell'endoreduplicazione.

L'endoreduplicazione è un fenomeno molto più comune nelle cellule vegetali che nelle cellule di mammifero, ed è molto comune soprattutto in specie con un piccolo genoma, come *Arabidopsis thaliana* (Galbraith et al., 1991), *Lycopersicon esculentum* (pomodoro) (Rus-Kortekaas et al., 1994), *Medicago sativa* (alfalfa) e *Medicago truncatula* (erba medica troncata) (Foucher e Kondorosi, 2000), *Brassica oleracea* (cavolo) (Kudo e Kimura, 2002) e *Mesembryanthemum crystallinum* (erba ghiaccio) (De Rocher et al., 1990). Nagl (1976) ipotizzò una correlazione negativa tra la dimensione del genoma e il fenomeno della poliploidia, suggerendo che la poliploidia rappresenti una strategia evolutiva per compensare la mancanza di un aumento filogenetico nella quantità di DNA nucleare.

L'endoreduplicazione sembra essere regolata da diversi fattori ambientali, come siccità, temperatura, presenza o assenza di alcuni nutrienti e la luce, ma i meccanismi molecolari che legano l'endociclo all'ambiente non sono stati ancora chiariti (Engelen-Eigles et al., 2001; Setter and Flannigan, 2001; Cookson et al., 2006). Il caso meglio studiato è forse quello dell'influenza della luce sugli ipocotili di *Arabidopsis* (Gendreau *et al.*, 1997, 1998).

È stata proposta una relazione tra endoreduplicazione e crescita cellulare. Per esempio, in *Arabidopsis thaliana* è stata osservata questa relazione durante la crescita degli ipocotili. Alla fine dell'embriogenesi, poco prima della germinazione, le cellule dell'embrione possiedono un contenuto di DNA 2C. Non

appena la germinazione ha inizio, le cellule subiscono uno o due cicli di endoreduplicazione, e alla fine circa l'80% delle cellule che fanno parte dell'ipocotile diventa poliploide. Praticamente non ci sono quasi divisioni cellulari nell'endoderma e nel cortex dell'ipocotile. Perciò la maggiorparte della crescita iniziale della piantina, subito dopo la germinazione, non è ottenuta mediante divisioni cellulari ma prevalentemente mediante distensione delle cellule dell'ipocotile che hanno subito cicli di endoreduplicazione (Gendreau et al., 1997; Traas et al., 1998).

Una correlazione tra i livelli di ploidia e la dimensione cellulare sono stati osservati anche in noduli radicali di *M. truncatula* e in petali di cavolo (Cebolla et al., 1999; Kudo and Kimura, 2002), suggerendo che l'aumento della dimensione cellulare possa essere dipendere direttamente dall'endoreduplicazione. D'altra parte, altri studi rifiutano questa ipotesi. Per esempio, Beemster et al. (2002) non hanno osservato questa relazione tra endoreduplicazione e la dimensione delle cellule mature della radice di differenti ecotipi di *Arabidopsis*. Si ipotizza quindi che ci siano anche dei meccanismi di controllo della crescita cellulare in maniera ploidia-indipendente.

In piantine transgeniche di *Arabidopsis* e tabacco sovraespressanti AtE2Fa insieme ad AtDPa sono stati osservati due diversi fenotipi. Alcune cellule sembrano subire divisioni cellulari aggiuntive, mentre altre vanno incontro ad endoreduplicazione; come risultato, per esempio, le cellule di foglia con nuclei più grandi coesistono con un gran numero di cellule più piccole (De Veylder et al., 2002; Kosugi and Ohashi, 2003). Anche l'osservazione microscopica degli ipocotili di *Arabidopsis* ha mostrato file di cellule in divisione alternate con file di cellule con nuclei più grandi, che quindi erano andate incontro ad endoreduplicazione (De Veylder et al., 2002).

La coesistenza di cellule piccole in divisione e cellule più grandi che subiscono cicli extra di endoreduplicazione suggerisce che l'attività degli E2F moduli il ciclo cellulare in maniera specifica per alcuni tipi cellulari. Anche la sovraespressione di alcuni geni target E2F (per esempio *CDC6*) porta ad un simile duplice fenotipo (Castellano et al., 2001, 2004).

Si è ipotizzato che questa differente risposta delle cellule dovuta ad un'umentata attività E2F possa dipendere dalla presenza o meno di qualche fattore che induce le cellule ad andare incontro a mitosi (MIF, mitosis-inducing factor). Secondo questo modello, cellule in cui la fase S è stimolata dall'attività E2F progrediranno in mitosi in presenza di MIF, e questo porterà alla divisione cellulare. In assenza di attività MIF, invece, un'umentata espressione dei geni specifici della fase S può portare a diversi cicli di replicazione del DNA, portando ad endopoliploidia (De Veylder et al., 2002). Ancora non si conosce con esattezza quale fattore sia questo MIF, ma la CDKB1;1 (specificata per la fase M) sembra essere il più probabile candidato. Piante sovraesprimenti un dominante negativo di CDKB1;1 mostrano un inizio prematuro nel loro programma di endoreduplicazione, dimostrando che l'attività di CDKB1;1 è richiesta per inibire l'endociclo. Inoltre, quando un mutante di CDKB1;1 è stato sovraespresso in piante sovraesprimenti anche AtE2Fa-AtDPa, è risultata favorita l'endoreduplicazione e inibite le extra divisioni cellulari normalmente indotte dalla sovraespressione di AtE2Fa-AtDPa (Boudolf et al., 2004). CDKB1;1 non può essere comunque il solo fattore ad entrare in gioco nella regolazione dell'equilibrio tra divisioni cellulari ed endoreduplicazione, ma certamente interviene l'azione di cicline (soprattutto del gruppo A e D) e di proteine inibitrici delle CDK (CKI; Fig. 6).

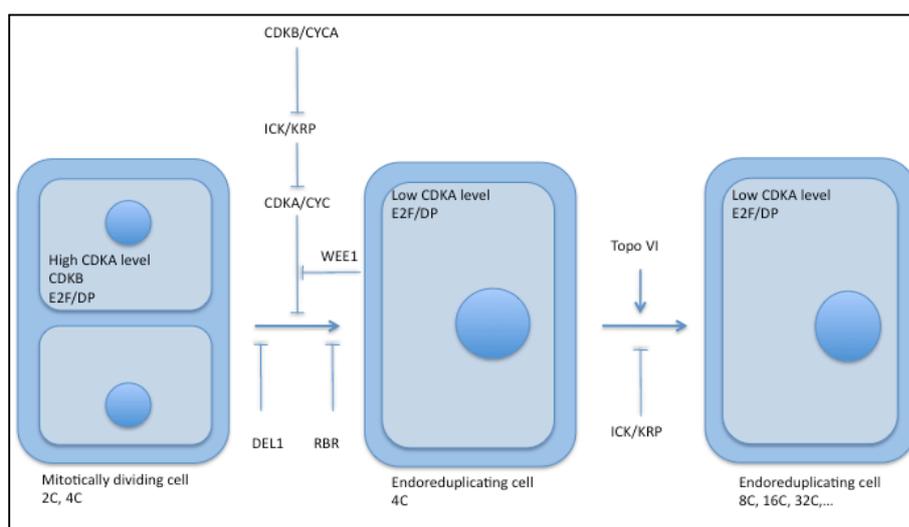


Figura 6. Modello illustrante l'interazione molecolare che regola la transizione da cellula in divisione a cellula in endoreduplicazione (Inzé, 2007).

1.4. Regolazione dello sviluppo della pianta

La dimensione finale e la forma delle piante sono determinate dal numero di cellule e dalla loro dimensione, risultanti da divisioni cellulari post-embionali, espansione e differenziamento cellulare (Mizukami, 2001; Weiss et al., 2005). Infatti, a differenza degli animali, l'organogenesi nelle piante è un processo post-embriale dovuto alla presenza di cellule staminali nei meristemi degli apici del germoglio (SAM, shoot apical meristem) e delle radici (RAM, root apical meristem) che sono tessuti con cellule in attiva proliferazione che continuamente forniscono nuove cellule le quali, smettendo di dividersi, possono prendere diverse vie di differenziamento (Nakajima and Benfey, 2002; Weigel and Jurgens, 2002). Inoltre, le piante hanno una forte capacità rigenerativa per la presenza di cellule meristemoidi (residui di cellule staminali) ma anche grazie al fatto che molte cellule differenziate vegetali sono capaci di de-differenziarsi, ritornare in uno stato di cellule totipotenti e proliferare in maniera controllata per originare interi organi. In varie specie, questa peculiarità permette addirittura lo sviluppo di "embrioni somatici" a partire da cellule coltivate in vitro. Tutto questo implica una fine regolazione tra controllo della divisione cellulare, arresto e riattivazione del ciclo cellulare, endoreduplicazione, differenziamento e morte cellulare (Ramirez-Parra et al., 2005).

La dimensione della pianta sembra essere più variabile rispetto alla forma. Per esempio, vi sono sicuramente dei vincoli nelle forme che una foglia può assumere, imposti dalla selezione naturale per l'adattamento e la sopravvivenza, determinati da una fine regolazione durante lo sviluppo (Mizukami, 2001; Weiss et al., 2005). Sono stati identificati tutta una serie di geni coinvolti nella regolazione dello sviluppo e nell'architettura della pianta, e possono essere suddivisi in tre gruppi principali: quelli coinvolti nel metabolismo degli ormoni vegetali, quelli coinvolti nella regolazione della trascrizione e quelli coinvolti con il ciclo cellulare (Busov et al., 2008).

1.4.1. Il controllo ormonale dello sviluppo

Gli ormoni vegetali svolgono il ruolo principale nella regolazione della dimensione, della forma e della fisiologia della pianta. Analisi genetiche hanno permesso nuove conoscenze sui meccanismi di biosintesi degli ormoni e delle vie di trasduzione del segnale (Sakamoto, 2006).

L'auxina (Fig. 7) svolge un ruolo centrale nella coordinazione della crescita e dello sviluppo nelle piante, e i geni coinvolti nella biosintesi dell'auxina e nella trasduzione del segnale possono modificare fortemente la dimensione e la forma della pianta.

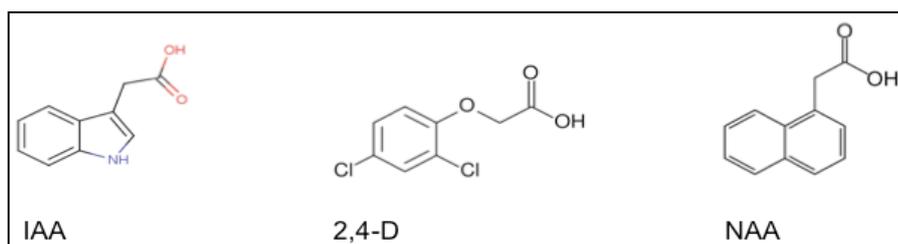


Figura 7. Struttura chimica delle auxine naturale (IAA) e sintetiche (2,4-D e NAA).

Il trasporto dell'auxina è complesso e la sua regolazione coinvolge differenti proteine. Studi chimici e genetici hanno dimostrato che il trasporto dell'auxina ad organi distanti è necessaria per il normale sviluppo della pianta, e vi è quindi un sistema intricato di trasportatori che garantisce la distribuzione di questo ormone (Friml and Palme, 2002). In *Arabidopsis* l'afflusso di auxina è permesso da una proteina transmembrana chiamata Auxina Permeasi 1 (AUX1) e tre proteine LAX, simili ad AUX1 (Bennett et al., 1996; Parry et al., 2001). L'efflusso invece è mediato dalla famiglia di proteine PIN (Friml and Palme, 2002; Friml et al., 2002, 2003). Si è visto che i trasportatori dell'auxina sono implicati nel controllo della filotassi, cioè nella determinazione dell'ordine con cui foglie, fiori, ecc., vengono distribuite nello spazio, conferendo una struttura geometrica alla pianta (Reinhardt

et al., 2003; Jonsson et al., 2006). Il trasporto dell'auxina è mediato anche da un gruppo di proteine chiamate ATP-binding cassette (ABC), che mostrano numerose analogie con i geni multi-drug-resistant di mammifero, i quali sono un sottogruppo della famiglia delle P-glicoproteine (PGP; Noh et al, 2001, 2003). In *Arabidopsis* sono state identificate tre proteine PGP, e in mutanti che avevano perso la loro funzione si sono avuti effetti marcati con anomalie morfologiche nelle radici e nelle parti aeree della pianta (Terasaka et al., 2005; Bouchard et al., 2006). Una delle caratteristiche della risposta all'auxina nelle piante è la forte e rapida induzione dei geni auxina/acido indol-acetico (Aux/IAA; Abel and Theologis, 1996). Sono dei geni di risposta primaria all'auxina, cioè la loro attivazione è diretta e non richiede sintesi di nuove proteine. *Arabidopsis* possiede 29 geni Aux/IAA, e nei mutanti sono stati osservati differenti fenotipi riguardanti dimensioni e forme caratteristiche (Liscum and Reed, 2002).

Le Gibberelline (GA, Fig. 8) sono una famiglia di composti terpenici regolatori della crescita e dello sviluppo (Hooley, 1994; Davies, 1995). Analisi genetiche hanno permesso l'identificazione di numerosi geni coinvolti nel loro metabolismo e nelle vie di segnale, ed è stato studiato il loro ruolo nella regolazione della forma e della dimensione della pianta (Thomas and Sun, 2004). Di solito, mutanti con diminuite concentrazioni di GA o con una diminuita risposta ad esse sono nane o semi-nane, mentre effetti opposti si hanno con alte concentrazioni di questi ormoni.

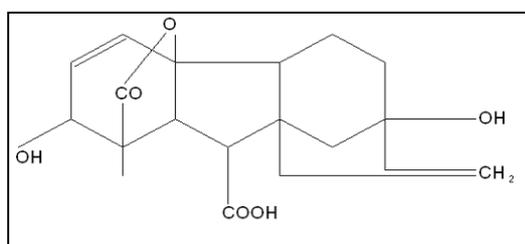


Figura 8. Struttura chimica dell'acido gibberellico (GA).

I brassinosteroidi (BR, Fig. 9) sono una classe di più di 40 derivati dello sterolo, ed hanno un profondo effetto nella dimensione della pianta e nella sua architettura. La loro biosintesi e le vie di trasduzione del segnale sono state studiate nel dettaglio (Fujioka and Yokota, 2003; Vert et al., 2005; Haubrick and Assmann, 2006). Diverse mutazioni determinano modificazioni nella forma e nelle dimensioni delle piante, determinando miglioramenti per le colture di interesse agricolo (Bishop, 2003). Piante con carenze in BR sono caratterizzate da fusti più corti e robusti e foglie piccole, rotondeggianti e di color verde scuro.

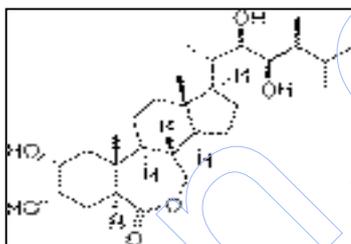


Figura 9. Struttura chimica del Brassinolide, il primo brassinosteroido isolato con attività biologica.

1.4.2. Fattori di trascrizione e sviluppo

I geni che codificano per i fattori di trascrizione rappresentano forti candidati per la manipolazione dell'architettura della pianta. Per esempio, uno dei maggiori responsabili del controllo delle dimensioni degli organi è AINTEGUMENTA (ANT), un gene regolato dall'auxina codificante un fattore di trascrizione la cui sovraespressione aumenta fortemente le dimensioni di foglie e fiori in *Arabidopsis* (Krizek, 1999; Mizukami and Fischer, 2000). L'aumento delle dimensioni di questi organi sembra essere collegato ad un'aumento della proliferazione cellulare piuttosto che ad un aumento delle dimensioni cellulari. Questo dato suggerisce che l'azione di questo gene è in grado di prolungare la capacità

meristemica delle cellule anche durante la crescita degli organi ed il loro differenziamento. Nella cascata del segnale mediata dall'auxina in cui è coinvolto questo gene, gioca un ruolo centrale il gene ARGOS, scoperto durante analisi microarray in uno studio sulla risposta all'auxina (Hu et al., 2003). Quando sovraespresso, ARGOS ha effetti simili a quelli ottenuti dalla sovraespressione di ANT.

Le proteine con dominio TCP sono fattori di trascrizione specifici del regno vegetale, che regolano la forma caratteristica delle piante (Cubas et al. 1999). Il dominio TCP è coinvolto nel legame col DNA e nella dimerizzazione delle proteine. In *Arabidopsis* 24 membri di questa famiglia giocano un ruolo importante nella ramificazione, nella simmetria fiorale e nella curvatura delle foglie mediante sincronizzazione della divisione cellulare e della crescita, probabilmente legandosi ai promotori di alcuni geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella sintesi di componenti ribosomali (Li et al., 2005). Un esempio di proteina che possiede un dominio TCP è CINCINNATA (Crawford et al., 2004) che regola la curvatura ed altre caratteristiche della forma della foglia. Anche alcuni fattori regolatori della crescita (GRF; Horiguchi et al., 2005) sono coinvolti nelle modificazioni delle dimensioni e delle forme di foglie e fiori.

1.4.3. Il link tra regolazione del ciclo cellulare e regolazione dello sviluppo

I regolatori del ciclo cellulare, oltre che controllare appunto la progressione del ciclo cellulare, sembrerebbero avere anche un ruolo nel coordinamento della divisione cellulare nel contesto più ampio dello sviluppo dell'intero organismo.

Vi sono numerosi esempi che supportano la visione di un complesso cross-talk tra controllo della divisione cellulare e sviluppo (Mizukami, 2001; Beemster et al., 2003; Tsukaya, 2003). L'attività di diversi regolatori del ciclo cellulare durante la progressione, o l'arresto e la riattivazione del ciclo cellulare, sembra infatti essere controllata a livello di cellula, tessuto ed organo. Questi regolatori sono quindi i

migliori candidati capaci di creare e mantenere un legame tra proliferazione cellulare e sviluppo dell'intero organismo (Ramirez-Parra et al., 2005). La natura post-embrionica e reiterativa dell'organogenesi durante la vita della pianta influisce certamente sul controllo della proliferazione cellulare. Le cellule che lasciano il meristema, nel quale vi è attiva proliferazione cellulare, escono dal ciclo cellulare e possono entrare a far parte dei primordi di diversi organi, un processo che dipende da segnali di sviluppo, ormonali ed ambientali (Berckmans et al., 2011). L'organogenesi richiede quindi sia un aumento nel numero di cellule, dovuto ad un'aumentata proliferazione cellulare finemente regolata, sia una riorganizzazione cellulare, seguiti da progressione verso differenti programmi di differenziamento. Ne consegue che il tasso di divisione cellulare e i livelli di espressione dei geni del ciclo cellulare possano subire cambiamenti in funzione di fattori di stress sia biotici che abiotici, come per esempio elevate concentrazioni di sali nel terreno, crescita a temperature diverse da quelle ideali per la pianta o deficit d'acqua (Kadota et al., 2004; West et al., 2004).

I risultati di esperimenti che hanno rallentato il ciclo cellulare hanno prodotto risultati variabili. In diversi casi, un'effettiva diminuzione della proliferazione cellulare è risultata anche in un minor numero di cellule, ma meccanismi compensatori hanno aumentato le dimensioni di queste cellule, di fatto annullando gli effetti sulla dimensione e forma finale dell'organo (Doonan, 2000; Inzé and De Veylder, 2006). Per esempio, l'espressione di un dominante negativo di CDKA;1 in piante transgeniche di tabacco risulta in un blocco nella transizione G1/S e di conseguenza una diminuita proliferazione cellulare, compensata però da un'aumento nelle dimensioni cellulari, per cui le dimensioni finali degli organi risultano normali (Hemerly et al., 1995). Inoltre, la sovraespressione di KRP1-3 in *Arabidopsis thaliana* è risultata in un rallentamento del ciclo cellulare e una diminuzione del numero di cellule, con una parziale compensazione mediante aumento delle dimensioni cellulari non sufficiente a determinare un fenotipo normale. Le piantine transgeniche infatti sono risultate notevolmente ridotte in dimensioni, con organi più piccoli e foglie più spesse rispetto alle foglie delle piantine wild type (Wang et al., 2000; De Veylder et al., 2001). Anche la

sovraespressione di *NtCYCA3;2* e *Spcdc25* in tabacco (Wyrzykowska et al., 2002) e la sovraespressione di *cycD3* in *Arabidopsis thaliana* (Dewitte et al., 2003) hanno portato ad alterazioni nella forma della foglia e nello sviluppo dell'intero germoglio, mentre sovraespressioni delle cicline del gruppo B hanno portato un'accelerazione nella crescita delle radici (Lee et al., 2003), confermando quindi questo legame tra i componenti regolatori del ciclo cellulare e lo sviluppo dell'intera pianta.

2. Scopo del lavoro

Dagli studi effettuati in cellule di *Daucus carota* è emerso che l'unico gene *E2F* isolato, *DcE2F*, codifica per un forte transattivatore trascrizionale che potrebbe agire da attivatore del ciclo cellulare e della proliferazione (Albani et al., 2000). Infatti, da un punto di vista strutturale, *DcE2F* mostra analogia con i fattori *E2F* di *Arabidopsis thaliana* cosiddetti "attivatori", *AtE2Fa* e *AtE2Fb*, che sono stati mostrati essere in grado di promuovere la proliferazione cellulare. Da studi *in vitro* è inoltre emerso il bisogno di un partner DP-like per un efficiente legame di *DcE2F* col DNA, anche se non è stato ancora identificato ed isolato nessuna proteina DP in *Daucus carota*. L'assenza di dati sperimentali riguardo le funzioni di *DcE2F in planta* ci hanno spinto a voler caratterizzare meglio questo fattore di trascrizione ed indagare sugli effetti della sua sovraespressione in piantine di *Arabidopsis thaliana*. La scelta di *Arabidopsis thaliana* come organismo modello di indagine si basa su diverse considerazioni. Innanzitutto, il fatto che il suo genoma sia stato completamente sequenziato e vi siano ormai microarrays commerciali disponibili che comprendono le sequenze di più dell'ottanta per cento dei suoi geni (22000 su circa 26000), la rendono un modello ideale per studi di biologia molecolare e cellulare nelle piante. Un ulteriore importante vantaggio dell'utilizzo di *Arabidopsis thaliana* deriva dalla semplicità con la quale si possono produrre piante transgeniche, tramite il processo di trasformazione genetica Floral dipping, sfruttando il batterio *Agrobacterium tumefaciens* per incorporare nuovo DNA nel genoma della pianta. Inoltre le ridotte dimensioni della pianta rendono più semplice il suo utilizzo negli spazi ristretti di un laboratorio, ed il suo ciclo di vita è molto breve: occorrono soltanto sei settimane circa dalla germinazione di una piantina alla produzione di nuovi semi. Questo fatto accelera notevolmente la ricerca, che utilizzando *Daucus carota* richiederebbe invece tempi molto più lunghi. Infine, un aspetto importantissimo è che vi sono tutta una serie di studi già pubblicati in letteratura riguardanti *AtE2Fa* e *AtE2Fb* di *Arabidopsis* (fra i più rilevanti De Veylder et al., 2002; Sozzani et al., 2006), che rendono ancora più semplice un confronto fra il fattore *DcE2F* e questi *E2F* attivatori.

3. Materiali e metodi

3.1. Materiale biologico

3.1.1. Ceppi batterici e condizioni di crescita

Per le clonazioni è stato utilizzato il seguente ceppo batterico:

E. coli DH5 α : F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZY A-argF*)U169 *deoR recA1 endA1*
hsdR17(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ^-

I batteri sono stati fatti crescere sempre in terreno LB, alla temperatura di 37 °C e con un'agitazione di 170 rpm.

- Terreno LB -	
Bactotryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH 7 sterilizzazione in autoclave: 20 minuti a 120°C.	

Per le trasformazioni delle piantine di *Arabidopsis thaliana* è stato utilizzato il seguente ceppo batterico:

Agrobacterium tumefaciens GV3101/pMP90 (Koncz, C. and Schell, J., 1986).

I batteri sono stati fatti crescere in terreno YEP, alla temperatura di 29 °C e con un'agitazione di 170 rpm (O/N).

- Terreno YEP -	
Bactotryptone	10 g/L
Yeast extract	10 g/L
NaCl	10 g/L
pH 7 sterilizzazione in autoclave: 20 minuti a 120°C.	

3.1.2. *Materiale vegetale e condizioni di crescita*

Arabidopsis thaliana, varietà Columbia, è stata scelta come modello sperimentale. Semi wild type e semi transgenici sono stati sterilizzati mediante agitazione per 8-12 ore in una soluzione al 2% v/v di PPM® (Plant Preservative Mixture, Micropoli), addizionata di 50mg/L di sali di magnesio. I semi sono stati quindi stratificati a 4 °C, overnight (O/N) ed in assenza di luce, in una soluzione allo 0,1% di agarosio prima della germinazione in camere di crescita. Tutte le linee transgeniche di *Arabidopsis* usate in questo studio sono state generate con il metodo del Floral dipping (Clough and Bent, 1998) usando il ceppo GV3101/pMP90 di *Agrobacterium tumefaciens*. I semi della progenie sono stati selezionati e fatti crescere in piastre petri contenenti un terreno di selezione MS (MS Medium più antibiotico di selezione) e successivamente in un terreno di recupero (MS Medium).

- MS Medium -	
MS Salts (Murashige and Skoog Medium- Micro and Macro Elements) Duchefa Biochemie.	2,15 g/L
Sucrose	10 g/L
Phyto Agar	8 g/L
pH 6 sterilizzazione in autoclave: 25 minuti a 120°C. Aggiunto PPM (Preservative for Plant Tissue Culture Media) 0,1%	

Nel terreno di selezione vengono usati tutti i reagenti utilizzati per il terreno di recupero (MS medium) con l'aggiunta degli antibiotici specifici per la selezione delle linee transgeniche.

- Selection Medium -	
Hygromycin B	30 mg/L
Timentin	250 mg/L

Piante wild type e piante trasformate sono state quindi trasferite in suolo in vassoi Arasystem (Betatech, Belgium) e fatte crescere sino a maturità all'interno di apposite camere di crescita impostate con le seguenti condizioni:

- 16 ore di luce alla temperatura di $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$;
- 8 ore di buio alla temperatura di $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$;
- Umidità del 70%.

3.2. Costruzione dei vettori pCAMBIA-DcE2F e pCAMBIA-DcE2F-AtDP

Per la costruzione di tutti i vettori CAMBIA di questo studio si è partiti dal pCAMBIA 1304 backbone (Fig. 10) nel quale è stato inserito un frammento del vettore pFF19, contenente il promotore CAMV doppio 35S, il polilinker e il terminatore 35S ter, digerendo entrambi i vettori con gli enzimi di restrizione HindIII ed EcoRI, che riconoscono le seguenti sequenze:

HindIII

5' -	A	A	G	C	T	T	- 3'
3' -	T	T	C	G	A	A	- 5'

EcoRI

5' -	G	A	A	T	T	C	- 3'
3' -	C	T	T	A	A	G	- 5'

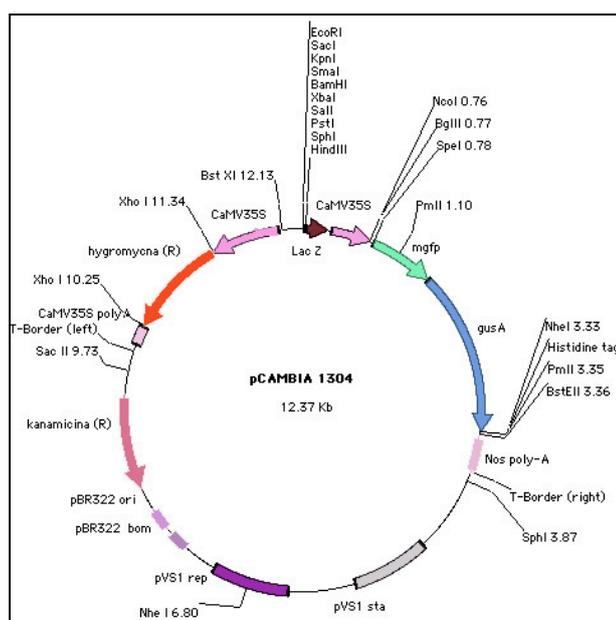


Figura 10: Mappa del vettore pCAMBIA 1304 backbone.

Il vettore così ottenuto è stato chiamato pCAMBIA-FF19. I vettori p35S-DcE2F e pCAMBIA-FF19 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione BamHI ed EcoRI:

BamHI

5' -	G	G	A	T	C	C	- 3'
3' -	C	C	T	A	G	G	- 5'

EcoRI

5' -	G	A	A	T	T	C	- 3'
3' -	C	T	T	A	A	G	- 5'

Nel vettore p35S-DcE2F è contenuto il cDNA di DcE2F (Fig. 11):

```

1   tttctaacc ctctgcact ttctctctt aaaacccta aatctttctc cccaccatcc
61  ctctcccga accaccatct taatctcaca acaatttaat taacttataa gcgctttttt
121 ttgtttaatt aatctaattgt ctcgacctca accttctacc ggccaggcgc cgccgcgctc
181 gccgtcgctc gtcgcgcggt gagcaacggc ggaaatggga tcccgcgcgc gataaagcgg
241 cacctacagt tcgctgcgat gaagccgccc ttcgtgccc cggatgatta ttaccggttc
301 ggagagtcta gaggagtgcg ggatcatgaa gctgatgtta tcactgttaa atctactccc
361 tcaaagcgga agcctggaaa ttataatgaa gttgagtcta gcaggttgag tatgagtcct
421 gcgtacacca atacagttaa aagccccaac cagacacctg tatctgggaa aggaggaagg
481 gtctatggcc ggtctaattgc caaaaagagc ctggcatctg tgcctcagac ccctatgtca
541 aatgctgggt ctcttctcc tcttactcct gctggaagct gccggtatga tagttccttg
601 ggcttttga ccaaaaagt catcaatctg ataaagcaag cagaagatgg tactcttgat
661 ctaataatg ctgctgagac cttagaggtc cagaagaggc gtatatatga catcactaat
721 gtccttgaag gaattggcct tattgaaaag aagctcaaga acagaatcca ctggaaggga
781 attgatgctt caagaccggg tgaatggaa gatgatagta atgttttgc ggcagaagtt
841 gaaaaacttt ctctggaaga aaaaagactt gatgatcgca taagggaaat gcaggaaaag
901 ttgagagact tgagtgagga tgaagcgaat caaaagtggc tttttgtgac cgaagaggat
961 attaagggtc tagaatgctt tatgaataaa accctgatag caattaaagc tccacatgga
1021 accacacttg aggttccaga tccagatgaa gttggtgatt atcctcagag gagatacaga
1081 ataactctaa ggagcacaat gggccaatt gatgtttatc ttggttagcca atttgaggag
1141 aagtttgacg agatgaatag tgtgcaacct tccatgagcc tcccacttgc ttcaagtact
1201 gggctctaatg acaatccagc agcagagacc gcaatcgtgg gacatgggct agagaatgga
1261 acaatgacac aagatggcca tggagtgaac tctgatctgt acacttcgga ggatatttct
1321 ggtggaatta tgaagatttt accttcggaa ctogataatg atgcggatta ctgctccta
1381 acagatccaa gtatcagcat gacagacatg tggaaagacc acgctggtgt cgaatgggat
1441 gggcgagtc tacttaatga ggagttttaa ctgccttgta ttagccctcg accgcagact
1501 ccaccatctg gtgttgctga tgtatcaact gttgcaaatg gcacacaaag gtgactccag
1561 atcaattgat gagctaattg aggatcaagt atggcttctt atggattttc acatcttaat
1621 gtggtccaaa gtcttaggct gggagtggg gtatccactt ctgattcatt tctattcaag
1681 agtcacctgt gatagccact atcatattac taaattacc ctggactttg ggtttacaag
1741 atttcatact gttggactgg gcatagaaa ggcagtgcaa agagataaaa gctttaatgt
1801 acaattggga aaatgcattc tgaggcatgt gttttgatga tgaataaagt cgctcatgca
1861 actgtttatc aatgaattga ttcaggctga gcttgatag tgagcagctt gagcaataga
1921 taaagagtat gtttcccatt tagaacatct ctogtgcata ccttagttga aatttgaat
1981 gcatgttatg ttgtatttgc gtgaagtgg tttatcaaat tgtgatatat atacttgaca
2041 acttgacttg agcactggaa aaaatatcta gtgttcttta gtcggtggtc atggtataca
2101 tattgctatg cctgtattt tcttctttgc ttgccttcag caaaagcagg gcttgccctg
2161 ttactaataa atagataaca tatagttgtc c

```

Figura 11. Sequenza nucleotidica del cDNA di *DcE2F*.

In Figura 12 è rappresentata la mappa finale del vettore pCAMBIA-DcE2F, che contiene, nella regione T-border (quella che viene integrata nel genoma di *Arabidopsis thaliana* durante la trasformazione) contiene il gene *hpt*, per il conferimento della resistenza all'antibiotico igromicina, posto sotto il controllo del forte promotore CAMV doppio 35S, il cDNA del gene *DcE2F*, anch'esso sotto controllo del promotore doppio 35S, ed il gene reporter *gfp/gus* regolato dal promotore 35S singolo.

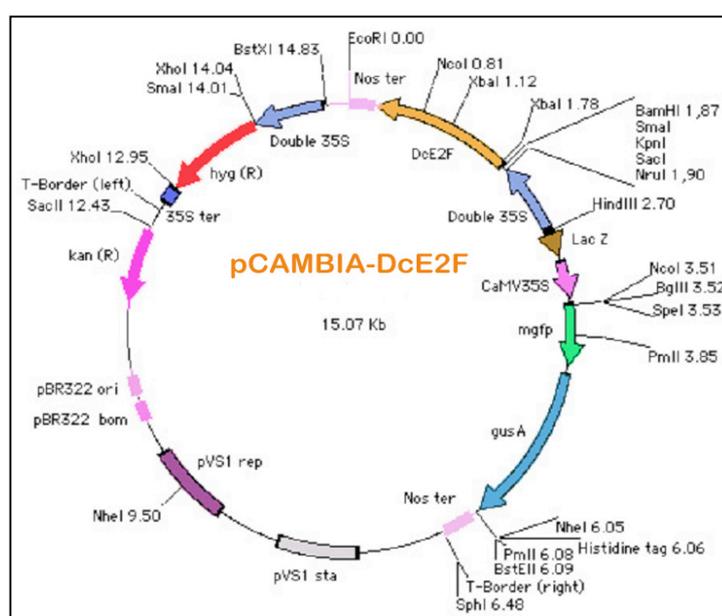


Figura 12. Mappa del vettore pCAMBIA-DcE2F.

Per quanto riguarda i vettori pCAMBIA-DcE2F-AtDPa e pCAMBIA-DcE2F-AtDPb è stata seguita la stessa strategia. I primi passaggi sono comuni a quelli per l'ottenimento del vettore pCAMBIA-DcE2F. È stata eseguita la PCR sui vettori pGEM-T-easy contenenti i cDNA dei geni AtDPa e AtDPb (Fig. 13 e 14) utilizzando i primer DMDP24 (per AtDPa) e DMDP11 (per AtDPb) all'estremità 5', ed M13RV all'estremità 3', a valle del gene, aggiungendo così un sito di restrizione per XhoI e BglII. Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti (in blu è indicato il sito BglII):

DMDP24: 5' – AGCTCGAGATCTAAGGATGAGTATGGAGATGG – 3'

DMDP11: 5' – AGCTCGAGATCTGAGAATGACAACACTACTGGGTC – 3'

M13VR: 5' – GGAAACAGCTATGACCATG – 3'

```
1   tgtttgttta tagcgggaac tetcacccaa agtaattca tctccgattt ttttttttg
61  gttgttgttc gcatctctgt gtaataaaaa gagtaaaacc aaaaccctag aaaaaaaatc
121 tccatctttt tttattccgc cattggaaga tcgatcactg atg
atg agttgttt gtcactccag agaagcagag gcaacatcct tcagtgagcg ttgagaaaac
241 tccagtgaga aggaaattga ttgttgatga tgattctgaa attggatcag agaagaaagg
301 gcaatcaaga acttctggag gcgggcttcg tcaattcagt gttatggttt gtcagaagtt
361 ggaagccaag aagataacta cttacaagga gttgcagac gaaattatth cagattttgc
421 cacaattaag caaacgcag agaagccttt gaatgaaaa gagtacaatg agaagaacat
481 aaggcggaga gtctacgatg cgctcaatgt gttcatggcg ttggatatta ttgcaagggg
541 taaaaaggaa atccggtgga aaggacttcc tattacctgc aaaaaggatg tggaaagaagt
601 caagatggat cgtaataaag ttatgagcag tgtgcaaaag aaggctgctt ttcttaaaga
661 gttgagagaa aaggtctcaa gtcttgagag tcttatgtcg agaaatcaag agatggttgt
721 gaagactcaa ggcccagcag aaggatttac cttaccatc attctacttg agacaaaccc
781 tcacgcagta gtcgaaatcg agatthctga agatatgcaa cttgtacacc tcgacttcaa
841 tagcacacct ttctcgggtc atgatgatgc ttacatthtg aaactgatgc aagaacagaa
901 gcaagaacag aacagagtat cttctcttcc atctacacat caccaatctc aacatagctc
961 cgctcattct tcatocagtt ctgcatgctc ttctggaacc tcaggcccgg tttgctggaa
1021 ctccgggatcc attgatactc gctgaccgag cttctattcc caaattcttc aagaagaaga
1081 agtaatgatc taattggtat actaaaaaat tatacatctg gtttagtgth caattgagag
1141 agactgtaaa atcaattcat aggccaaaca atgthtthtt atccaattht cthththtatt
1201 cgaacttgat gcgatatttc aacggaaaca gaaactattg thththaaacc
```

Figura 13. Sequenza nucleotidica del cDNA del gene *AtDPa*. In verde è indicata la sequenza riconosciuta dal primer DMDP24, in giallo è indicato l'ATG del gene.

XhoI

5' -	C	T	C	G	A	G	- 3'
3' -	G	A	G	C	T	C	- 5'

EcoRI

5' -	G	A	A	T	T	C	- 3'
3' -	C	T	T	A	A	G	- 5'

I vettori pAtDPa(BglII), pAtDPb(BglII) e pCAMBIA-DcE2F sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione BglII ed Eco72I (un isoschizomero di PmlI), determinando l'inserzione dei cDNA dei geni *AtDPa* o *AtDPb* nel vettore CAMBIA al posto del gene reporter *gfp/GUS*.

BglII

5' -	A	G	A	T	C	T	- 3'
3' -	T	C	T	A	G	A	- 5'

Eco72I

5' -	C	A	C	G	T	G	- 3'
3' -	G	T	G	T	A	C	- 5'

Sono stati così ottenuti i vettori finali pCAMBIA-DcE2F-AtDPa e pCAMBIA-DcE2F-AtDPb (Fig. 15 e 16) contenenti, nella regione T-border, il gene *hpt*, per il conferimento della resistenza all'antibiotico igromicina, posto sotto il controllo del forte promotore CAMV doppio 35S, ed i cDNA dei geni *DcE2F*, *AtDPa* o *AtDPb* rispettivamente, regolati anch'essi dal promotore doppio 35S.

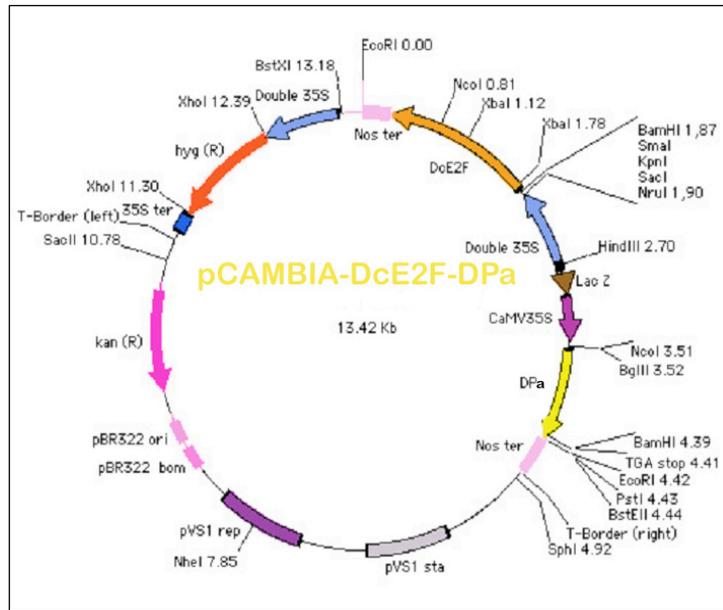


Figura 15. Mappa del vettore pCAMBIA-DcE2F-AtDPa.

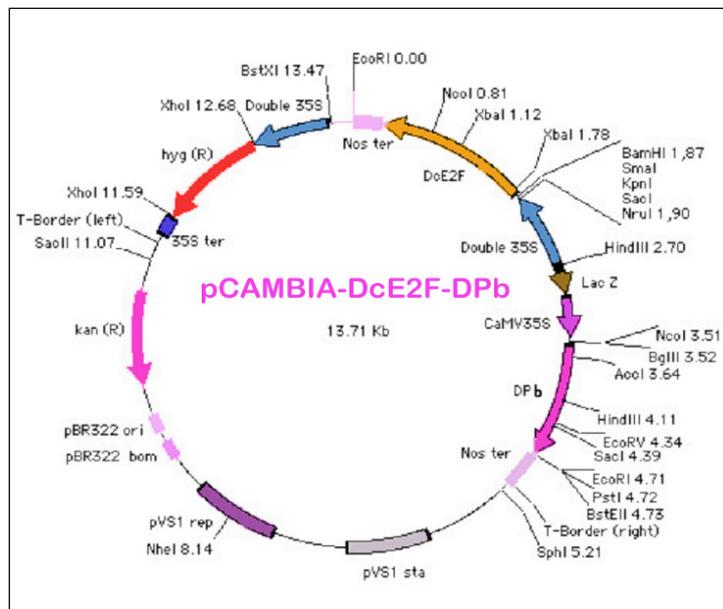


Figura 16. Mappa del vettore pCAMBIA-DcE2F-AtDPb.

3.3. Costruzione dei vettori pCAMBIA-Strep-AtE2F e pCAMBIA-Strep-AtE2F-AtDP

Si è proceduto alla clonazione dei cDNA di *AtE2Fa* e *AtE2Fb* (Fig. 17 e 18) nel vettore BlueScript KS+. Questi geni erano presenti nei vettori pGEM-T-easy-AtE2Fa e pGEM-T-easy-AtE2Fb, ed è stata effettuata una PCR con i primers EAATG (per *AtE2Fa*) e EBATG (per *AtE2Fb*) all'estremità 5' e il primer M13RV che si appaia all'estremità 3', a valle del gene, per inserire i siti di restrizione KpnI (un isoschizomero di *Acc65I*), *NcoI* e (ATG)*BamHI*. Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti (in blu è indicato il sito KpnI, in giallo l'ATG del gene), seguite dalle sequenze riconosciute da KpnI, *NcoI* e *BamHI*:

EAATG: 5' – ATCGGTACCATGGATCCGTCCTCCGGTGTCGTACGATCT – 3'

EBATG: 5' – ATCGGTACCATGGATCCGTCTGAAGAAGTACCTCAA – 3'

M13VR: 5' – GGAAACAGCTATGACCATG – 3'

KpnI (*Acc65I*)

5' -	G	G	T	A	C	C	- 3'
3' -	C	C	A	T	G	G	- 5'

NcoI

5' -	C	C	A	T	G	G	- 3'
3' -	G	G	T	A	C	C	- 5'

BamHI

5' -	G	G	A	T	C	C	- 3'
3' -	C	C	T	A	G	G	- 5'

```

1   tcttctctt tctctcaact aaacccttgt ttccttcaact cgccgctcgt tttcccgctca
61   tcggaatctt caaatcgcac tctcgcttca ctacgatcca t
121  tctcccgggt cttctcagcc gccaccgccg ccgccgcacc atccaccgtc atctccgggt
181  ccggttacat ctacgccggt tataccacct atacgctcgtc acttagcttt cgcctcaaca
241  aaacctccgt ttcaccttc cgatgattac catcgattta acccttcttc gctcagtaat
301  aataacgaca ggagcttcgt tcatggttgt ggtggttag atcgggagga agatgctgtc
361  gttgtagat ctctatttt cccagtgag attggttag aaattcgagg atgttttggg
421  gatttcgatt gctacttggt gcttctaagt ctgattcaaa agcttcgcag cgtagatta
481  tcgctgattc gtgtcaattt ttgtcgtttg tttagcttcg cgatgtcagc aaagagaaag
541  gcgacaatgg atatggttgt tgcctcatct aataatggat tcacgagttc tggtttctact
601  aacataccta gcagtccctg tcaaaactct agaaaagggg gcagagtcaa catcaagtca
661  aaggccaaag gaaacaagtc aactcctcaa acacccatct cgacaaagc tgtagatcc
721  ttttatgaaa tatctttcat gtctagagta acaagtctcc ttacaaaaaa gttcgtcaat
781  ctaattaaac aagccaaaga tggaaatgctg gacctaaaca aagctgcaga aacattggag
841  gtgcagaaac gacgtatata tgatattaca aacgttttgg aggggataga tctcattgaa
901  aagcctttca agaatcgaat actttggaag ggagttgatg cgtgtcctgg cgatgaggat
961  gctgacgtat ctgtattaca gctgcaggca gaaattgaaa acctcgccct cgaagagcaa
1021 gcattagaca accaaatcag atggcttttt gtaactgaag aggatatcaa gagtttacca
1081 ggtttccaga accagactct gatagccgtc aaagctctc atggcacaac tttggaagtg
1141 cctgatccag atgaagcggc tgaccacca caaaggagat acaggatcat tcttagaagt
1201 acaatgggac ctattgacgt atacctcgtc agcgaatttg aagggaatt cgaagacaca
1261 aatgggagtg gtgcagcacc accagcatgc ttgcctattg cttctagctc aggatctaca
1321 ggacaccatg acatogaagc cttactggtt gacaaccag aaactgctat tgtgtctcat
1381 gatcatcctc atcctcaacc cggcgatacc tctgatctta attatttgca agagcaagta
1441 ggaggaatgc ttaagattac tcctctgat gttgaaaatg atgagtcgga ctactggctt
1501 ctctcaaagt ctgagattag catgacggat atttgaaaa ctgactctgg tatcgattgg
1561 gattatggaa tagccgacgt gactactcca ccaccaggaa tgggcgaaat agcaccaaca
1621 gctggtgact caaccccgag atgatcgaat accaagcaca cttctcaact tctgatccca
1681 aatgtgttac ctcaaacac tcctaaaat catatacaag gagggagcaa ctacagaacg
1741 tgatgaacc aatggcaggt cgtttccata caatgtacca ttagattatg attcatttat
1801 cgcctagagt gatggttag aggagcaccg agaaactaat gtaagttaa cagagaatgt
1861 acttcatcgg ctgcattggt aactatttg attataatat ttttgaccac tcaaatgcat
1921 ctttataatc agcta

```

Figura 17. Sequenza nucleotidica del cDNA del gene *AtE2Fa*. In verde è indicata la sequenza riconosciuta dal primer EAATG.

I frammenti PCR ed il vettore BlueScript KS+ sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione KpnI ed EcoRI.

KpnI (Acc65I)

5' -	G	G	T	A	C	C	- 3'
3' -	C	C	A	T	G	G	- 5'

EcoRI

5' -	G	A	A	T	T	C	- 3'
3' -	C	T	T	A	A	G	- 5'

I vettori BlueScript contenenti i cDNA dei geni *AtE2Fa*(KNB) ed *AtE2Fb*(KNB) ed il vettore pSTREP KS (contenente lo STREP-tag) sono stati digeriti con BamHI e XbaI. Sono stati così ottenuti i vettori pSTREP-AtE2Fa e pSTREP-AtE2Fb.

BamHI

5' -	G	G	A	T	C	C	- 3'
3' -	C	C	T	A	G	G	- 5'

XbaI

5' -	T	C	T	A	G	A	- 3'
3' -	A	G	A	T	C	T	- 5'

Infine i vettori pSTREP-AtE2Fa, pSTREP-AtE2Fb e pCAMBIA-FF19 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione KpnI e XbaI per ottenere i vettori finali pCAMBIA-STREP-AtE2Fa e pCAMBIA-STREP-AtE2Fb (Fig. 19 e 20), contenenti nella regione T-border il gene *hpt*, per il conferimento della resistenza all'antibiotico igromicina, posto sotto il controllo del forte promotore CAMV

doppio 35S, i cDNA dei geni *AtE2Fa* o *AtE2Fb* fusi a monte con lo STREP-tag, anch'essi sotto controllo del promotore doppio 35S, ed il gene reporter *gfp/gus* regolato dal promotore 35S singolo.

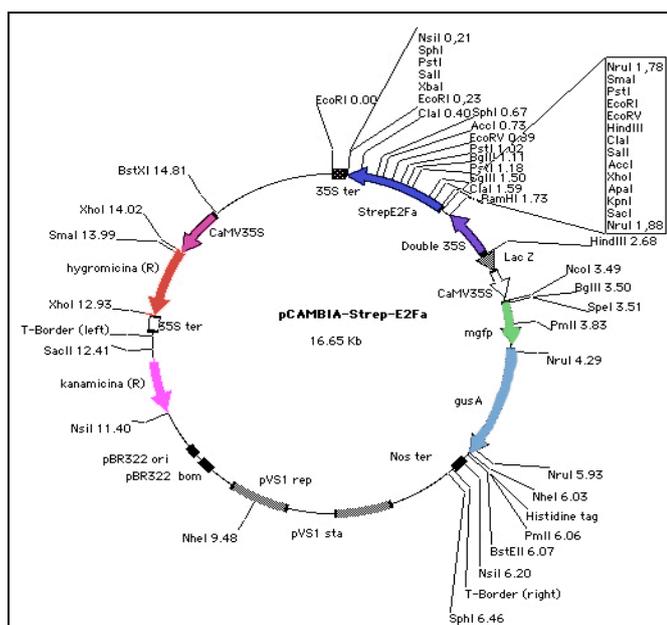


Figura 19. Mappa del vettore pCAMBIA-STREP-AtE2Fa.

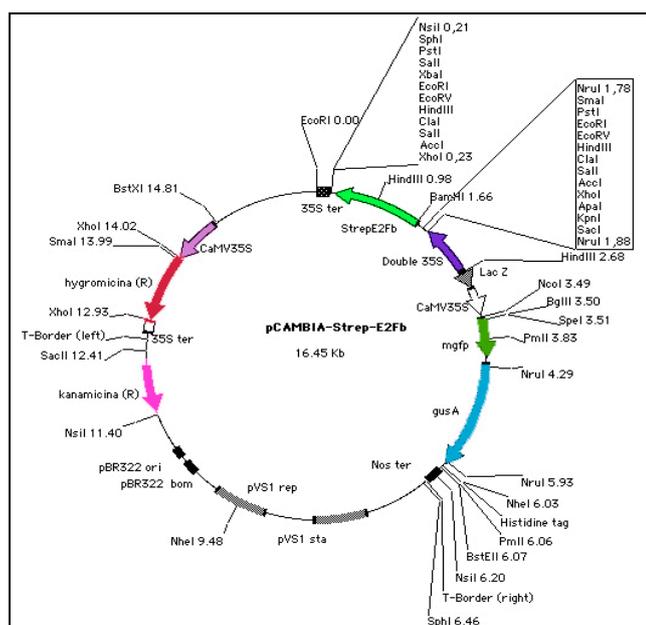


Figura 20. Mappa del vettore pCAMBIA-STREP-AtE2Fb.

Lara Perrotta

Studi funzionali del fattore di trascrizione DcE2F di *Daucus carota* tramite sovraespressione in piantine transgeniche di *Arabidopsis thaliana*

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Università degli Studi di Sassari

Per quanto riguarda i vettori pCAMBIA-STREP-AtE2F-AtDP i primi passaggi sono comuni a quelli per l'ottenimento dei vettori pSTREP-AtE2F (creati per la costruzione dei vettori pCAMBIA-STREP-AtE2F) e pAtDP(Bgl) (creati per la costruzione dei vettori pCAMBIA-DcE2F-AtDP).

I vettori pAtDPa(Bgl), pAtDPb(Bgl) e il pCAMBIA-FF19 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione BglII ed Eco72I, che riconoscono le seguenti sequenze:

BglII

5' -	A	G	A	T	C	T	- 3'
3' -	T	C	T	A	G	A	- 5'

Eco72I

5' -	C	A	C	G	T	G	- 3'
3' -	G	T	G	T	A	C	- 5'

Sono stati così ottenuti i vettori pCAMBIA-AtDPa e pCAMBIA-AtDPb. Questi e i vettori pSTREP-AtE2Fa e pSTREP-AtE2Fb sono stati digeriti con NruI e XbaI, ottenendo i vettori finali pCAMBIA-STREP-AtE2Fa-DPa, pCAMBIA-STREP-AtE2Fa-DPb, pCAMBIA-STREP-AtE2Fb-DPa e pCAMBIA-STREP-AtE2Fb-DPb (Fig. 21, 22, 23 e 24), contenenti, nella regione T-border, il gene *hpt*, per il conferimento della resistenza all'antibiotico igromicina, posto sotto il controllo del forte promotore CAMV doppio 35S, ed i cDNA dei geni *AtE2Fa* o *AtE2Fb*, *AtDPa* o *AtDPb* rispettivamente, regolati anch'essi dal promotore doppio 35S.

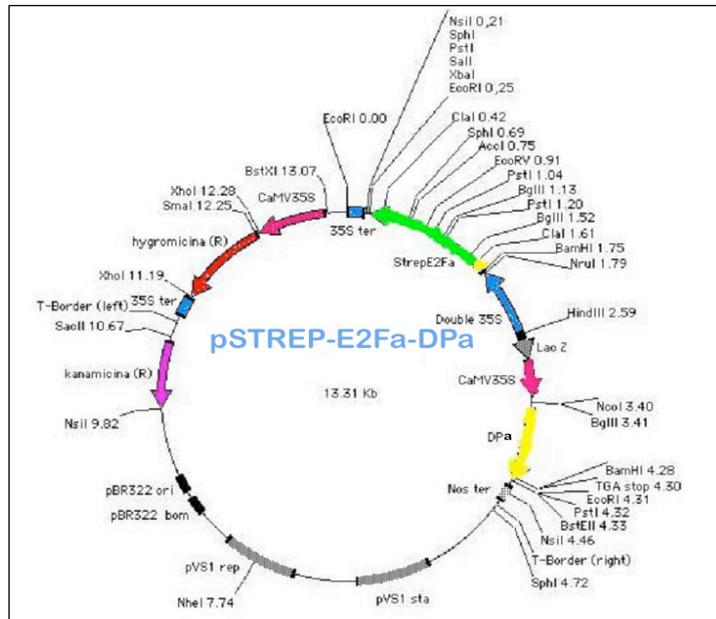


Figura 21. Mappa del vettore pCAMBIA-STREP-AtE2Fa-AtDPa.

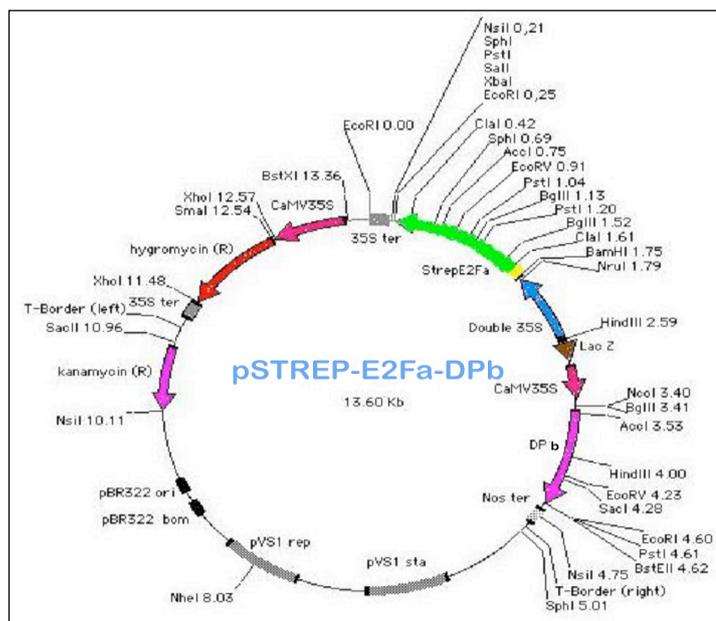


Figura 22. Mappa del vettore pCAMBIA-STREP-AtE2Fa-AtDPb.

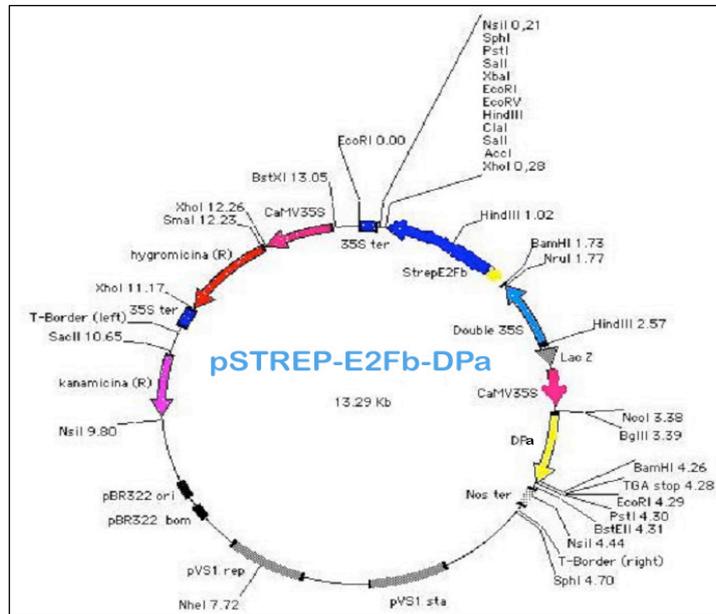


Figura 23. Mappa del vettore pCAMBIA-STREP-AtE2Fb-AtDPa.

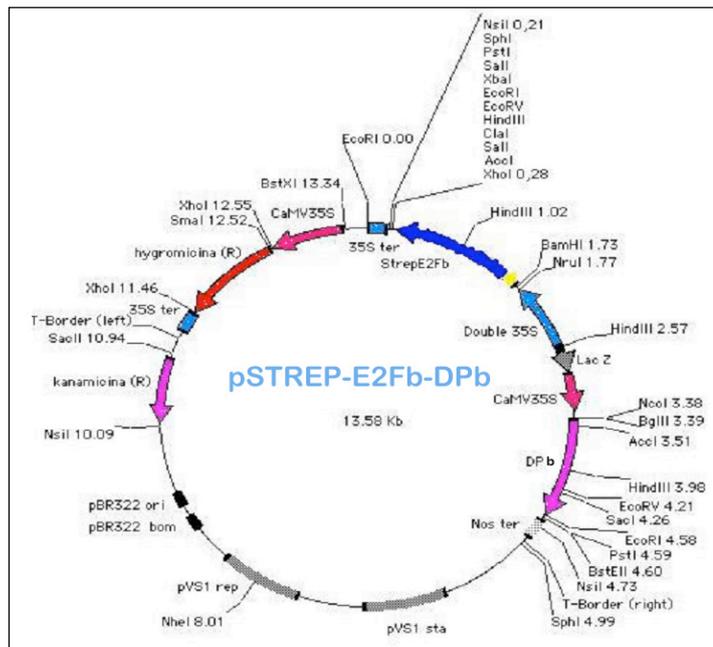


Figura 24. Mappa del vettore pCAMBIA-STREP-AtE2Fb-AtDPb.

3.4. Trasformazione e selezione delle colonie batteriche

3.4.1. Trasformazione delle cellule di *Escherichia coli*

Le ligazioni tra i diversi plasmidi e i rispettivi inserti sono state utilizzate per trasformare cellule di *E. coli* DH5 α competenti; quindi, i campioni venivano piastrati su terreno LB solido contenente agar e antibiotico di selezione: 100 μ g/ml ampicillina per il vettore Blue-script e 100 μ g/ml kanamicina per il vettore Cambia. Infine le piastre venivano incubate O/N a 37 °C.

Si è poi proceduto ad una selezione delle colonie batteriche tramite PCR per individuare quelle trasformate con il plasmide contenente l'inserto. Sono state quindi prelevate dalle 15 alle 20 colonie e ciascuna di esse è stata inoculata in 30 μ l di terreno LB contenente l'antibiotico di selezione specifico. Quindi 2 μ l di ciascuna coltura venivano aggiunti a 23 μ l di una miscela di reazione contenente: 2,5 μ l del tampone di reazione (10X, 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen), 0,5 μ l della miscela di dNTPs (100 mM), 0,25 μ l dei due primers (FW e RV, 100 μ M) e 0,25 μ l di Taq polimerasi (5 u/ μ l, GeneSpin). Le condizioni utilizzate per la PCR sono state le seguenti: 3 minuti di denaturazione a 94 °C, seguiti da 30 cicli così composti: 45 secondi di denaturazione a 94 °C, 45 secondi di annealing a 50 °C e 60 secondi di estensione a 72 °C. Si è proceduto poi con una estensione finale di 10 minuti a 72 °C. I prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all' 1% per visualizzare la banda corrispondente all'inserto. Le colture risultate positive alla PCR sono state inoculate in 3 ml di terreno LB, contenenti 100 μ g/ml dell' antibiotico di selezione, ed incubate O/N a 37 °C e con un'agitazione di 170 rpm.

3.4.2. Trasformazione delle cellule di *Agrobacterium tumefaciens*

Successivamente sono state trasformate colonie di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Per la preparazione delle cellule competenti una singola colonia

batterica è stata inoculata in 5 ml di terreno YEP con gli antibiotici di selezione (100 µg/ml gentamicina, 50 µg/ml rifampicina e 100 µg/ml kanamicina) e cresciuta in agitazione a 200 rpm per 16-18 ore a 28 °C. Una parte di questa coltura (2 ml) è stata inoculata in 50 ml di terreno YEP e fatta crescere a 28 °C in agitazione sino al raggiungimento di una densità ottica compresa tra 0,5 e 1,0 OD. Le cellule sono state quindi raffreddate in ghiaccio, sedimentate mediante centrifugazione a 4000 g per 5 minuti a 4 °C, risospese in 1 ml di una soluzione 20 mM di calcio cloruro a 0-4 °C ed infine suddivise in aliquote da 0,1 ml conservate successivamente a -80 °C. Per la trasformazione, dopo l'aggiunta di 0,5-1 µg del plasmide, le cellule competenti sono state incubate in ghiaccio per circa 30 minuti, congelate in azoto liquido e sottoposte ad uno shock termico incubandole per 5 minuti a 37 °C prima dell'aggiunta di 1 ml di terreno YEP. Dopo una crescita di 2 ore a 28 °C con leggera agitazione, le cellule sono state piastrate su terreno YEP solido contenente gli antibiotici di selezione.

È stato poi estratto il DNA plasmidico mediante il Kit "GFX Microplasmid Prep (Amersham Biosciences)" e le colonie sono state poi selezionate mediante PCR. I prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% per visualizzare la banda corrispondente all'inserto. Le colonie risultate positive sono state utilizzate per la trasformazione delle piantine di *Arabidopsis thaliana*.

3.4. Trasformazione piantine di *Arabidopsis thaliana* mediante Floral dipping

In un tubo Falcon da 50 ml si aggiungono circa 750 semi wild type e 15 ml di soluzione sterile di agarosio allo 0,1% e si lasciano stratificare a 4°C O/N. Il giorno dopo viene seminato 1 ml (circa 50 semi) di questa miscela in vasetti contenenti terreno universale. I vasetti si innaffiano e si sistemano nelle camere di crescita.

Dopo circa 1 settimana le piantine vengono sfoltite in modo da lasciare in ciascun

vasetto 12-13 piantine. Quindi si lasciano crescere fino a completa fioritura finché non raggiungono uno sviluppo ideale per la trasformazione.

Per la trasformazione di *Arabidopsis thaliana*, una singola colonia di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, contenente il gene di interesse sul vettore binario, è stata inoculata in 5 ml di terreno liquido YEP con gli antibiotici di selezione (100 µg/ml gentamicina, 50 µg/ml rifampicina e 100 µg/ml kanamicina) e fatta crescere in agitazione a 200 rpm per 16-18 ore a 28 °C. Successivamente 250 µl di questa coltura sono stati inoculati in 400 ml di terreno YEP e fatti crescere a 28 °C in agitazione sino al raggiungimento di una densità ottica non superiore a 1.7 OD.

In seguito le cellule vengono sedimentate a 4000 rcf, per 7 minuti, a 4 °C, quindi risospese in 400 ml di una soluzione di saccarosio al 5% alla quale, immediatamente prima del “floral dipping” (inzuppamento delle infiorescenze), è stata addizionata con 150 µl di Silwet L-77 surfactant (OSi).

In seguito le piantine vengono inzuppate in questa soluzione per 45 secondi quindi riposte nelle apposite camere di crescita dove cresceranno fino allo sviluppo di silique mature.

I semi delle piantine così trasformate (T0) sono stati fatti crescere in un terreno MS di selezione contenente gli antibiotici timentina e igromicina per ottenere le linee T1.

3.5. Estrazione DNA genomico da cellule vegetali

Uno dei metodi impiegati per l'estrazione del DNA da tessuto vegetale è il “Sucrose Prep” (Berendzen *et al.*, 2005) che utilizza il saccarosio come reagente principale.

Si utilizzano circa 10 mg di foglie in 200 µl di sucrose solution e si effettua una omogeneizzazione del tessuto vegetale mediante micro pestelli in microtubi da 1,5 ml. In seguito gli estratti si scaldano a 99-100°C per 10 minuti e si effettua una centrifugazione per 5 secondi a 2000-6000 g.

Si utilizza 1 µl del supernatante per effettuare la PCR di controllo.

- Sucrose Solution -	
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	300 mM
Saccarosio	300 mM

3.6. Saggio istochimico per l'attività della β -glucuronidasi

La determinazione istochimica dell'attività β -glucuronidasi nelle piante trasformate con plasmidi che presentano il gene *GUS* (pCAMBIA-DcE2F, pCAMBIA-Strep-AtE2Fa, pCAMBIA-Strep-AtE2Fb), è stata eseguita su piante di *Arabidopsis* di circa 6-7 giorni d'età, utilizzando come substrato il 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) (adattato da Jefferson *et al.*, 1987). Il prodotto dell'attività enzimatica, derivante dalla dimerizzazione ossidativa dell'indolo, forma un precipitato blu in corrispondenza del sito dell'attività glucuronidasi. Una fogliolina per ogni pianta è stata incubata a 37 °C O/N in una soluzione GUS (Staining solution) contenente:

-Staining solution -	
NaPO ₄ , pH 7 (2/30 Na ₂ HPO ₄ + 1/30 NaH ₂ PO ₄)	50 mM
Triton	0,1%
K-ferricianuro	1 mM
X-Gluc	0,5 mg/ml

La soluzione è stata poi rimossa e aggiunto etanolo al 70%, cambiando questa soluzione più volte sino allo sbiancamento dei tessuti, per mettere in evidenza la colorazione dovuta al saggio eliminando l'eventuale mascheratura del colore da parte della clorofilla.

Le piante trasformate con i vettori mancanti del gene *GUS* (pCAMBIA-DcE2F-AtDP, pCAMBIA-Strep-AtE2F-AtDP) sono state testate mediante PCR.

3.7. Isolamento di linee omozigoti a singolo inserto

Le linee T1, selezionate prima su piastra petri mediante l'antibiotico specifico (20 µg/ml di igromicina) e poi mediante saggi GUS o PCR, sono state poi analizzate per isolare linee omozigoti e possibilmente a singolo inserto sfruttando la segregazione dei transgeni. Il piastraggio di circa 100 semi di ogni linea trasformante su igromicina (20 µg/ml) ha permesso di identificare le linee con un 75% circa di resistenza all'antibiotico, e quindi presumibilmente a singolo inserto. Queste linee sono state mandate a seme e circa 100 semi di ogni linea così ottenuta sono stati piastrati nuovamente su igromicina (20 µg/ml). Stavolta sono state selezionate le linee con un 100% di resistenza all'antibiotico, e quindi omozigoti.

È stata analizzata la segregazione anche dei semi T2 delle piantine con fenotipi interessanti, anche se non avevano mostrato il 75% di resistenza all'antibiotico, per cercare di ottenere qualche linea resistente al 100% nelle generazioni successive, e quindi omozigote.

3.8. Analisi fenotipica

3.8.1. Analisi fenotipica dei germogli mediante stereoscopio

Tutte le linee T1 e T2 sono state piastrate in selezione (20 µg/ml di igromicina) ed osservate allo stereoscopio 4-6 giorni dopo la germinazione, prestando attenzione

soprattutto al numero di cotiledoni presenti in questi germogli. Successive osservazioni nei giorni successivi, sempre mediante stereoscopio, hanno permesso di osservare anche il numero degli apici meristematici presenti in questi germogli.

3.8.2. Analisi dei cotiledoni mediante microscopio ottico DIC

Piantine T2 sovraesprimenti DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb sono state fatte crescere in piastre petri, e sono stati raccolti i cotiledoni a due diverse fasi di sviluppo. Lo stadio I è uno stadio molto precoce che corrisponde a circa 7 giorni d'età, quando il germoglio possiede i cotiledoni e la prima coppia di foglioline è appena abbozzata. Lo stadio II corrisponde invece ad uno stadio di sviluppo più avanzato, a circa 14 giorni dalla germinazione, nel quale il germoglio possiede anche la seconda coppia di foglioline ben sviluppata, ed i cotiledoni stanno andando incontro a maturazione. I cotiledoni corrispondenti a questi due stadi di sviluppo sono stati chiarificati con il metodo del Chloral Hydrate clearing: i cotiledoni sono stati fissati in una soluzione di etanolo/acido acetico in proporzioni 9:1 per circa 2 ore. Sono state lavate poi con etanolo al 90% due volte per 30 minuti a lavaggio e infine poste in un eppendorf con circa 500 µl di una soluzione contenente Chloral Hydrate (Sigma) e 30% di glicerolo per diverse ore. Infine sono state poste in un vetrino ed osservate al microscopio ottico DIC (Differential Interference Contrast). Per l'osservazione del cotiledone intero è stato utilizzato l'ingrandimento a 2.5X, mentre per la misurazione e il conteggio delle cellule epidermiche adassiali è stato utilizzato il 10X. L'analisi delle immagini è stata effettuata con il software Pixel link Microscopy-SW.

3.8.3. Analisi delle radici primarie mediante microscopio ottico DIC

Le radici primarie di piantine a quattro diverse età (5, 10, 15 e 20 giorni dalla semina) sono state chiarificate con il metodo del Chloral Hydrate clearing e sono state utilizzate per misurarne la lunghezza. Le radici a 5, 10 e 15 giorni sono state

utilizzate anche per l'osservazione dei meristemi radicali al microscopio ottico DIC utilizzando un ingrandimento a 20X, che ha consentito sia l'osservazione dell'intero meristema radicale, sia l'osservazione delle cellule dei tre diversi tessuti epidermico, corticale e della stele. L'analisi delle immagini è stata effettuata con il software Pixel link Microscopy-SW.

3.9. Studio sulla germinabilità

Per questo studio circa 100 semi sono stati piastrati in piastre petri su dischi di carta bibula imbevuti di H₂O mQ e fatti stratificare al buio per 3 giorni a 4 °C. Sono stati poi trasferiti nelle camere di crescita a 22 °C e luce continua (24h di luce) ed osservato il numero di semi germinati per ogni linea mediante stereoscopio ogni 4 ore, dalla 16^a alla 28^a ora di incubazione, e poi il giorno successivo alla 44^a ora per verificare il numero totale finale di semi germinati.

3.10. Studi quantitativi di espressione dei transgeni

3.10.1. Estrazione RNA totale da tessuto vegetale

L'analisi è stata effettuata su piantine intere di *Arabidopsis thaliana* a 6 giorni dalla germinazione e su piantine di *Daucus carota* (varietà Berlin) alla stessa età, raccogliendo circa 10 mg di tessuto per ogni linea, ponendoli in eppendorf da 1,5 ml e congelandoli in azoto liquido. Sono stati pestellati negli eppendorf, facendo attenzione a non scaldare il campione e immergendo in azoto liquido sia l'eppendorf che il pestellino continuamente. Si è proceduto poi all'estrazione dell'RNA totale utilizzando RNeasy Mini Kit (QIAGEN) secondo il seguente protocollo:

- Aggiungere 450 µl di Buffer RLT-βMercaptoetanolo. Pestellato ancora e vortexare leggermente.

- Centrifugare per 15 minuti a 13000 rpm. Trasferire il surnatante in un tubino nuovo.
- Aggiungere 0,5 volumi di etanolo e mischiare con la pipetta.
- Trasferire il campione su una colonnina RNeasy. Centrifugare per 15 secondi a 10000 rpm. Scaricare il surnatante.
- Aggiungere 350 µl di Buffer RW1 alla colonnina e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare 15 secondi a 10000 rpm. Scaricare il surnatante.
- Aggiungere 10 µl di DNase I stock solution a 70 µl di Buffer RDD. Aggiungere questa mix nella colonnina e incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.
- Aggiungere 350 µl di Buffer RW1 alla colonnina. Centrifugare 15 secondi a 10000 rpm. Scaricare il surnatante.
- Aggiungere 500 µl di Buffer RPE alla colonnina. Centrifugare 15 secondi a 10000 rpm. Scaricare il surnatante.
- Aggiungere 500 µl di Buffer RPE alla colonnina. Centrifugare 2 minuti a 10000 rpm. Scaricare il surnatante.
- Posizionare la colonnina in un tubino nuovo e aggiungere 30 µl di H₂O RNase-free direttamente al centro del filtro della colonnina. Centrifugare 1 minuto a 10000 rpm.
- Conservare il surnatante (RNA totale) a -80 °C.

Si è proceduto al trattamento con DNase I (QIAGEN) per essere sicuri di eliminare completamente ogni residuo di DNA genomico dai campioni. È stata effettuata una PCR su RNA totale per confermare l'assenza di DNA genomico in questi campioni.

La concentrazione dell'RNA totale è stata misurata utilizzando lo spettrofotometro SmartSpec Plus (BIO-RAD) e confermata su gel di formaldeide all'1,3% in condizioni denaturanti, per controllare non solo la concentrazione ma anche la qualità dell'RNA appena estratto.

- Gel di Formaldeide -	
Agarosio	0,43 g
MOPS 10X	3,3 ml
H₂O DEPC	29 ml
Tutto in bottiglietta pre-autoclavata. Far sciogliere l'agarosio, far raffreddare ed aggiungere sotto cappa chimica:	
Formaldeide 37%	1,7 ml

Preparare i campioni di RNA totale alla corsa, aggiungendo 3,5 µl di RNA Loading Buffer per ogni µl di RNA totale che si intende caricare sul gel. Incubare a 65 °C per 20 minuti, poi porre subito in ghiaccio e caricare il gel.

- RNA Loading Buffer -	
MOPS 10X	20 µl
Formamide	100 µl
Formaldeide 37%	10 µl
H₂O DEPC	11,25 µl
Bromuro d'etidio	2 µl
GBBE Buffer	20 µl

- GBBE Buffer stock -	
Glicerolo	2,5 ml
Blu di Bromofenolo	2,5 mg
EDTA 0,5 M	50 µl
H₂O DEPC	per arrivare a 5 ml TOT.
Conservare a -20 °C	

L'elettroforesi è stata eseguita in MOPS 1X a 100 V fino al raggiungimento del Blu di Bromofenolo ai 2/3 del gel.

3.10.2. Retrotrascrizione

La Retrotrascrizione è stata effettuata su 1 µg di RNA totale utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) con le seguenti condizioni:

RNA totale	1 µg
dNTPs	1 µl
Hexamers	1 µl
H₂O DEPC	per arrivare a 10 µl TOT.
Incubare 5 minuti a 65 °C. Porre subito in ghiaccio e	

aggiungere:	
Buffer RT 10X	2 μl
MgCl₂	4 μl
DTT	2 μl
RNase OUT	1 μl
SS III RT	1 μl

Procedere con la retrotrascrizione in un Thermal cycler alle seguenti condizioni:

- 10 minuti a 25 °C
- 1 ora a 45 °C
- 5 minuti a 85 °C
- Conservare a -20 °C o procedere subito con la PCR.

Una PCR semi-quantitativa per il gene ribosomale della subunità 18S è stata eseguita sul retrotrascritto per verificare l'avvenuta retrotrascrizione e l'amplificabilità del cDNA appena ottenuto. In questo modo si è potuta verificare su gel d'agarosio all'1,5% anche la corretta normalizzazione dei campioni. Le condizioni della PCR semi quantitativa sono state le seguenti:

- 3 minuti a 94 °C
 - 1 minuto a 94 °C
 - 1 minuto a 55 °C
 - 30 secondi a 72 °C
 - 10 minuti a 72 °C
- } per 10 cicli

3.10.3. Real-Time PCR

È stata quantificata l'espressione dei geni *DcE2F*, *AtE2Fa* e *AtE2Fb*, utilizzando come gene house keeping di controllo il gene per la subunità ribosomale *18S*. I primers utilizzati sono qui rappresentati:

DcE2F-FW: 5' – TGTTTTGCAGGCAGAAAGTTG – 3'

DcE2F-RV: 5' – GTGGTTCCATGTGGAGCTTT – 3'

AtE2Fa-FW: 5' – TGATAGCCGTCAAAGCTCCT – 3'

AtE2Fa-RV: 5' – TCGATGTCATGGTGTCTGT – 3'

AtE2Fb-FW: 5' – AAGCACCGAAAGAAACATGG – 3'

AtE2Fb-RV: 5' – GTTTGTGGCTGCTCCAAGAT – 3'

18S2-FW: 5' – CCTGCGGCTTAATTTGACTC – 3'

18S2-RV: 5' – TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT – 3'

I primers 18S2 (FW e RV) sono stati disegnati per amplificare una regione altamente conservata, in maniera tale da poter essere utilizzati sia in *Arabidopsis thaliana* che in *Daucus carota*. Tutte le coppie di primers sono state disegnate utilizzando il software on line Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) in

maniera che producessero frammenti molto piccoli (150-200 bp) e avessero $T_m = 55$ °C. Gli oligonucleotidi sono stati poi controllati con il software on line Oligo Analyzer

(<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) per verificare che non si formassero self- o etero-dimeri e che non si formassero strutture secondarie che potessero interferire con il loro funzionamento.

La Real-Time PCR è stata eseguita utilizzando la mix di reazione QuantiTect SYBR Green I PCR kit, alla quale è stato aggiunto il cDNA diluito 1:20 e la primers mix appropriata (concentrazione finale di 1,2 μ M). La macchina Thermal cycler della BIO-Rad (iCycler) per micro piastre da 90 pozzetti, è stata impostata alle seguenti condizioni:

- 15 minuti a 95 °C
 - 30 secondi a 95 °C
 - 30 secondi a 55 °C
 - 30 secondi a 72 °C
- } per 45 cicli

I valori di espressione sono stati ricavati col metodo del $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001), utilizzando come riferimento i livelli di espressione dell'RNA ribosomale 18S.

4. Risultati

4.1. Isolamento di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore DcE2F con o senza i fattori AtDP

4.1.1. Selezione ed analisi fenotipica macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore DcE2F

Per verificare l'effetto della sovraespressione di DcE2F, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pCAMBIA-DcE2F (Fig. 25) che nella porzione T-border (quella che viene integrata nel genoma di *Arabidopsis thaliana* durante la trasformazione) contiene il gene *hpt*, per il conferimento della resistenza all'antibiotico igromicina, posto sotto il controllo del forte promotore CAMV doppio 35S, il cDNA del gene *DcE2F*, anch'esso sotto controllo del promotore doppio 35S, ed il gene reporter *gfp/gus* regolato dal promotore 35S singolo.

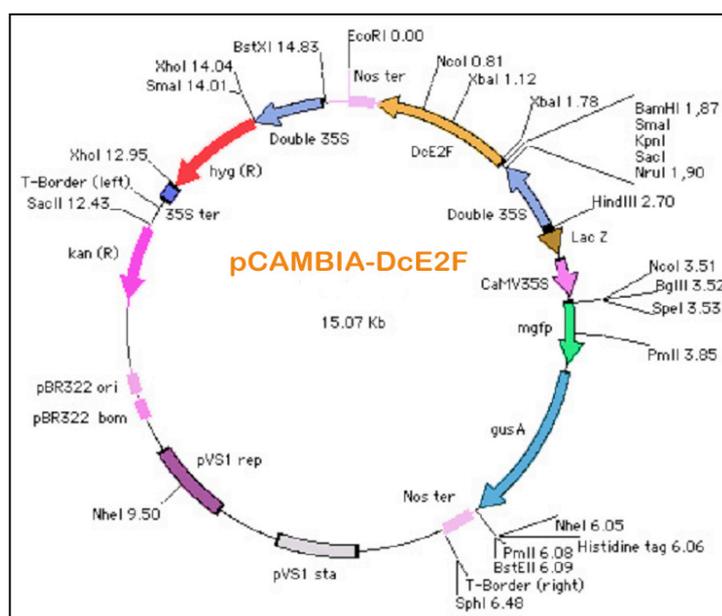


Figura 25. Mappa del vettore pCAMBIA-DcE2F.

Lara Perrotta

Studi funzionali del fattore di trascrizione DcE2F di *Daucus carota* tramite sovraespressione in piantine transgeniche di *Arabidopsis thaliana*

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Università degli Studi di Sassari

Le linee trasformate sono state selezionate mediante l'utilizzo di igromicina e piastrando circa 30 μ l di semi T0, corrispondenti a circa 750 semi, sono state ottenute 23 linee T1 resistenti all'antibiotico, con una efficienza di trasformazione di circa il 3%. Per confermare la presenza del transgene, foglioline di queste piante T1 sono state testate con il saggio istochimico per la β -glucuronidasi (saggio GUS), e le piante sono state fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite saggio GUS per verificare la trasmissibilità del transgene.

Plantule di tutte le linee T2 sono state quindi osservate per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche, osservando il loro fenotipo fin dai primi giorni di sviluppo mediante stereoscopio. Alcune di queste linee hanno presentato, anche se a bassa penetranza, un fenotipo embrionale molto particolare. *Arabidopsis thaliana* è una pianta dicotiledone, ma in 8 delle 23 linee transgeniche si è notata la presenza di germogli T2 con alterazioni nel numero dei cotiledoni (Fig. 26 e 27), con un'incidenza del fenotipo di circa il 35% delle linee.

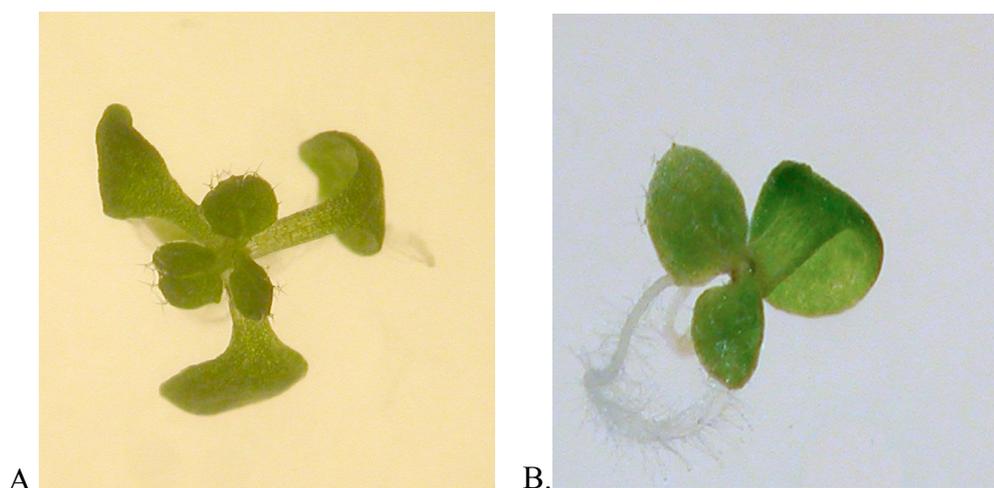


Figura 26. Fenotipo delle piantine transgeniche DcE2F: (A) DcE2F #16, Tricotiledone (10 giorni); (B) DcE2F #23, Monocotiledone (7 giorni).

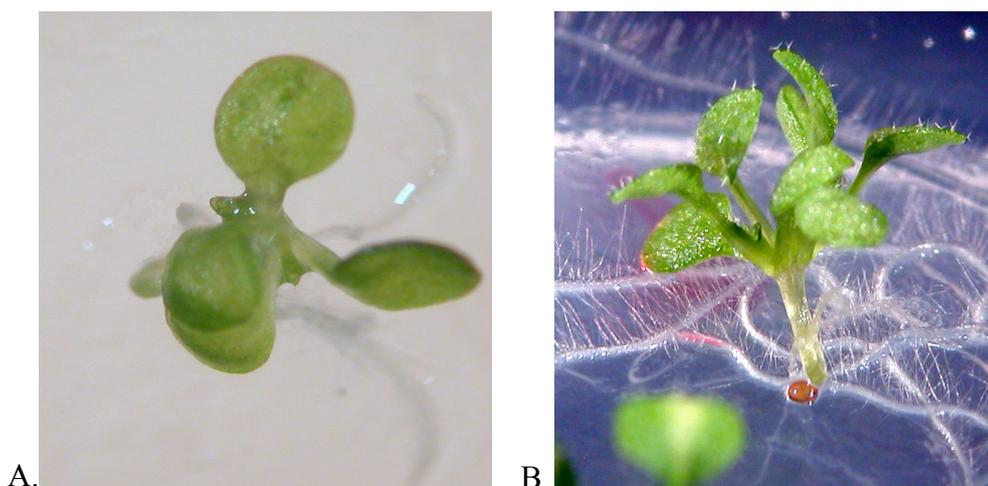


Figura 27. Ulteriore fenotipo delle piantine transgeniche DcE2F: DcE2F #16, Quadricotiledone con doppio apice meristematico (SAM) a 7 giorni di età (A) e 21 giorni (B).

Nello specifico, in tutte le 8 linee sono state riscontrati germogli caratterizzati da tricotiledonia (linee #2, 8, 9, 10, 13, 16, 17 e 23). Inoltre, 3 di queste linee hanno generato anche piantine monocotiledoni (linee #2, 9 e 23) mentre una linea (linea #13) ha presentato anche un caso di quadricotiledonia con doppio apice meristematico. I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono rappresentati nella Tabella 1 e sono indicativi di modificazioni della proliferazione cellulare embrionale nelle linee sovraesprimenti il fattore DcE2F di carota.

Per verificare la trasmissibilità del fenotipo embrionale, i semi delle piantine T2 che hanno presentato la tricotiledonia sono stati piastrati in presenza dell'agente selettivo igromicina, ed i germogli T3 risultanti sono stati osservati durante lo sviluppo. In effetti si è visto che il fenotipo, pur rimanendo a bassa penetranza, viene trasmesso nelle generazioni successive.

# Linea DcE2F ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
2	Tricotiledonia, Monocotiledonia
8	Tricotiledonia
9	Tricotiledonia, Monocotiledonia
10	Tricotiledonia,
13	Tricotiledonia, Quadricotiledonia
16	Tricotiledonia
17	Tricotiledonia
23	Tricotiledonia, Monocotiledonia
Incidenza fenotipo	8/23= 34,78%

Tabella 1. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle linee sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F.

Come accennato, nella linea #13 la quadricotiledonia è associata alla presenza di un doppio meristema apicale (Fig. 2 C e D; Tab. 2), con un'incidenza globale del fenotipo di circa il 4%.

# Linea DcE2F ^{OE}	Fenotipo SAM
13	Doppio SAM
Incidenza fenotipo	1/23=4,35%

Tabella 2. Alterazioni nel numero di meristemi apicali (SAM) nelle linee sovraesprimenti DcE2F.

4.1.2. Isolamento delle linee omozigoti sovraesprimenti il fattore DcE2F

Sulla generazione T2 delle linee presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F è stato effettuato uno screening sfruttando la resistenza all'antibiotico igromicina per poter individuare linee a singolo inserto dalle quali ottenere linee omozigoti per il transgene. Tutte le linee che hanno presentato circa il 75% di germogli T2 resistenti all'antibiotico sono state considerate potenziali linee a singolo inserto. Lo screening della generazione successiva ha permesso di selezionare generazioni 100% resistenti all'antibiotico, e perciò presumibilmente omozigoti per il transgene.

In dettaglio, dall'analisi effettuata germinando circa 100 semi di ognuna delle 23 linee T1 sono emerse 8 linee con germogli T2 caratterizzati da percentuali di resistenza all'igromicina che vanno dal 70 all'80% (#1, 2, 5, 6, 7, 8, 13 e 17; Tab. 3). Lo screening successivo sulla generazione T3 ha mostrato il 100% di resistenza all'igromicina per la linea #13 che è quindi presumibilmente omozigote per il transgene (Tab. 4). Inoltre, l'analisi della segregazione della resistenza all'igromicina nella generazione T3 delle linee con alterazioni fenotipiche ha mostrato una resistenza del 100% anche per la linea #16. Sia la linea 13 che quella 16 presentano germogli con tricotiledonia e la linea 13 ha presentato inoltre quadricotiledonia (Tab. 1). In base a questi risultati, su queste due linee sono state effettuate ulteriori analisi morfologiche e molecolari.

# linea DcE2F ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	74.6 (47/63)
2*	77.14 (54/70)
3	50 (11/22)
4	39.13 (9/23)
5	74.5 (38/51)
6	75 (39/52)
7	78.26 (54/69)
8*	70.15 (47/67)
9 *	66.66 (46/69)
10*	60.37 (32/53)
11	67.21 (41/61)
12	25 (7/28)
13*	80.7 (46/57)
14	44 (11/25)
15	90 (27/30)
16*	57.89 (33/57)
17*	74.28 (52/70)
18	44.44 (8/18)
19	83.33 (25/30)
20	57.14 (12/21)
21	43.75 (7/16)
22	69.81 (37/53)
23*	0 (0/4)

Tabella 3. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle linee sovraesprimenti il fattore DcE2F. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le probabili linee a singolo inserto.

# linea DcE2F ^{OE}	Segregazione T3 (%)
1	60.71 (17/28)
2*	90.9 (20/22)
5	83.33 (10/12)
6	88.88 (8/9)
9 *	88.23 (30/34)
10*	55.55 (10/18)
13*	100 (22/22)
16*	100 (37/37)
17*	18.75 (3/16)
23*	0 (0/22)

Tabella 4. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T3 di alcune delle linee sovraesprimenti il fattore DcE2F. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le linee considerate a singolo inserto.

4.1.3. Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme alla proteina AtDPa

Per verificare se, come dimostrato nel caso di AtE2Fa, la sovraespressione del partner AtDPa insieme al fattore DcE2F può generare effetti più marcati rispetto alla sovraespressione di DcE2F da solo, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pCAMBIA-DcE2F-AtDPa (Fig. 28), un vettore analogo al pCAMBIA-DcE2F nel quale il gene reporter *gfp/gus* è stato sostituito con il cDNA di *AtDPa*.

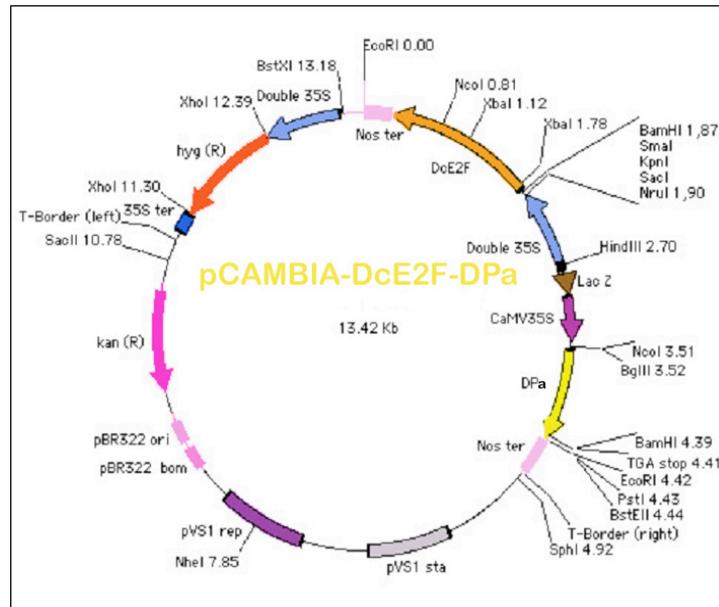


Figura 28. Mappa del vettore pCAMBIA-DcE2F-AtDPa.

Anche in questo caso le linee trasformate sono state isolate mediante selezione con igromicina. Dalla selezione, effettuata con circa 750 semi T₀, sono state ottenute 44 linee T₁ resistenti all'antibiotico indicative di una elevata efficienza di trasformazione, corrispondente a circa il 5,9%. A causa della mancanza del gene reporter *gfp/gus*, per confermare la presenza del transgene queste linee sono state testate mediante PCR e fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T₂. Anche le linee T₂ risultanti sono state analizzate tramite PCR per verificare la presenza del transgene.

Le plantule T₂ sono state quindi osservate per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche, osservando il loro fenotipo fin dai primi giorni di sviluppo mediante stereoscopio. Anche queste linee, come quelle presumibilmente sovraesprimenti il solo fattore DcE2F, hanno presentato alterazioni nel numero dei cotiledoni (Fig. 29). Tra le 44 linee selezionate, 15 hanno presentato alterazioni nel numero dei cotiledoni, seppur con bassa penetranza, con un'incidenza del fenotipo di circa il 34%. Nello specifico, 9 di queste linee hanno presentato tricotiledonia (linee #4, 22, 23, 27, 28, 34, 36, 38 e 44) mentre 7 linee hanno presentato monocotiledonia (linee #2, 16, 19, 29, 30, 36 e 41). I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono rappresentati nella Tabella 5.



Figura 29. Fenotipo delle piante transgeniche Dce2F-AtDPa: (A) Dce2F-AtDPa #38, Tricotiledone (8 giorni); (B) Dce2F-AtDPa #30, Monocotiledone (8 giorni).

# linea Dce2F-AtDPa ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
2	Monocotiledonia
4	Tricotiledonia
16	Monocotiledonia
19	Monocotiledonia
22	Tricotiledonia
23	Tricotiledonia
27	Tricotiledonia
28	Tricotiledonia
29	Monocotiledonia
30	Monocotiledonia
34	Tricotiledonia
36	Tricotiledonia, Monocotiledonia
38	Tricotiledonia
41	Monocotiledonia
44	Tricotiledonia
Incidenza fenotipo	15/44=34,09%

Tabella 5. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle piante presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione Dce2F insieme alla proteina AtDPa.

Per verificare la trasmissibilità del fenotipo, sono stati poi piastrati in presenza dell'agente selettivo igromicina, i semi delle piantine T2 che hanno presentato la tricotiledonia, e poi ancora i semi delle piantine T3. Anche in questo caso i fenotipi sono stati confermati nelle generazioni successive.

Una volta raggiunto il completo sviluppo, è stata inoltre osservata una ritardata fioritura nelle linee #32 e 38 (Tab. 6), con un'incidenza del fenotipo di circa il 4%. Nella Figura 30 sono confrontate una piantina DcE2F-AtDPa #38 di 10 settimane d'età con una wild type (Col-0) della stessa età.



Figura 30. Fenotipo delle piantine transgeniche DcE2F-AtDPa: linea #38, Fioritura tardiva (70 giorni, a sinistra), comparata con una piantina wild type Col-0 della stessa età (a destra).

# linea DcE2F-AtDPa ^{OE}	Fenotipo fioritura
32	Fioritura tardiva
38	Fioritura tardiva
Incidenza fenotipo	2/44=4,55%

Tabella 6. Fenotipo Fioritura tardiva nelle piante presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F insieme alla proteina AtDPa.

Si è notata una fortissima differenza nello stadio di sviluppo delle due piante: la piantina DcE2F-AtDPa #38 ha presentato una fioritura molto rallentata, con sviluppo di foglie di grandi dimensioni, e solo alla decima settimana d'età ha iniziato il processo di fioritura mentre la linea wild type alla stessa età presenta numerose siliques mature. Non sono state osservate alterazioni nel numero degli apici meristematici in queste linee. Dai risultati ottenuti, non è chiaro quindi se la sovraespressione di AtDPa insieme a DcE2F è effettivamente in grado di aumentarne gli effetti. Tuttavia, nessuna delle linee sovraesprimenti solo il fattore DcE2F ha mostrato ritardi nella fioritura ed è possibile che questo fenotipo sia collegato ad un potenziamento dell'attività di DcE2F tramite la co-espressione di AtDPa.

4.1.4. *Analisi della segregazione dei transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso DcE2F/AtDPa*

Dallo screening effettuato su circa 100 semi di ognuna delle 44 linee T1 presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F insieme ad AtDPa, sono emerse 15 generazioni T2 con una resistenza all'igromicina di circa il 75% (linee #2, 5, 10, 11, 13, 16, 19, 20, 21, 26, 29, 31, 35, 41, 44 e 45; Tab. 7) ed utili per l'ottenimento di linee omozigoti.

# linea DcE2F-AtDPa ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	0 (0/2)
2	72.31 (47/65)
4*	56 (14/25)
5	76.92 (20/26)
6	67.31 (35/52)
7	50 (7/14)
8	70.73 (29/41)
9	55 (11/20)
10	77.38 (65/84)
11	72.84 (59/81)
12	90 (27/30)
13	76.12 (51/67)
14	57.9 (22/38)
15	50 (8/16)
16*	75.86 (66/87)
17	65.62 (21/32)
18	79.27 (65/82)
19*	72.41 (42/58)
20	76.81 (53/69)
21	72 (36/50)
22*	84.84 (84/99)
23*	97.83 (45/46)

Tabella 7. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraespressanti il fattore DcE2F insieme ad AtDPa. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e Fioritura tardiva. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le probabili linee a singolo inserto.

24	80.85 (38/47)
25	67.5 (27/40)
26	77.5 (31/40)
27*	66.66(16/24)
28*	91.55 (65/71)
29*	77.9 (67/86)
30*	81.25 (39/48)
31	72.72 (64/88)
32*	82.43 (61/74)
33	84.04 (79/94)
34*	98.04 (100/102)
35	73.13 (49/67)
36*	66.66 (54/81)
37	84.21 (16/19)
38*	60.65 (37/61)
39	79.24 (42/53)
40	71.43 (50/70)
41*	78.05 (64/82)
42	91.89 (34/37)
43	65.62 (21/32)
44*	78.57 (11/14)
45	72.72 (8/11)

Tabella 7 (continuazione). Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme ad AtDPa. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e Fioritura tardiva. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le probabili linee a singolo inserto.

4.1.5. Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme alla proteina AtDPb

Poichè in *Arabidopsis thaliana* sono presenti i geni per due differenti fattori DP (*AtDPa* ed *AtDPb*), si è voluto verificare se la sovraespressione di un complesso DcE2F/AtDPb può generare effetti diversi rispetto alla sovraespressione del fattore DcE2F da solo, o se vi siano differenze rispetto alla sovraespressione del complesso DcE2F/AtDPa. A tal scopo, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pCAMBIA-DcE2F-AtDPb (Fig. 31), un vettore analogo al pCAMBIA-DcE2F ma nel quale il gene reporter *gfp/gus* è stato sostituito stavolta con il cDNA di *AtDPb*.

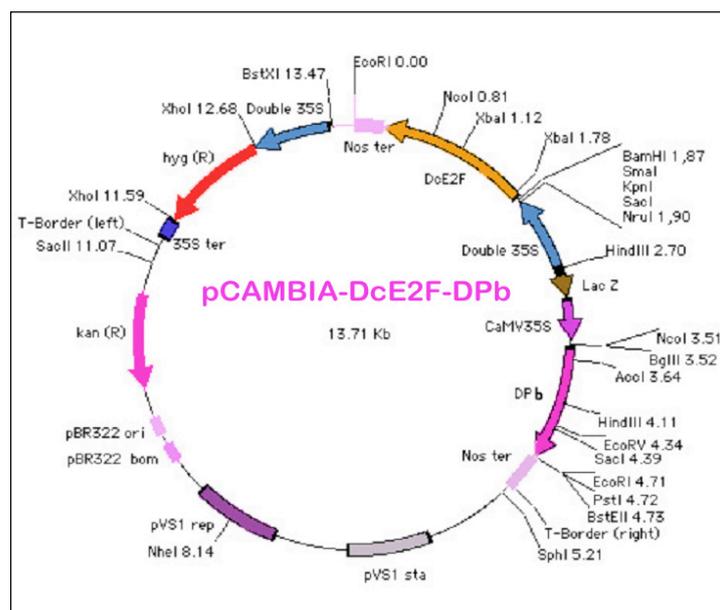


Figura 31. Mappa del vettore pCAMBIA-DcE2F-AtDPb.

Anche in questo caso le linee trasformate sono state isolate mediante selezione con igromicina. Dalla selezione, effettuata con circa 750 semi T0, sono state ottenute 31 linee T1 resistenti all'antibiotico, con una efficienza di trasformazione

di circa il 4,1%. A causa della mancanza del gene reporter *gfp/gus*, anche in questo caso, come per le linee sovraesprimenti il complesso DcE2F/AtDPa, per confermare la presenza del transgene sono state effettuate analisi mediante PCR. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite PCR per verificare la presenza del transgene.

Le plantule T2 sono state quindi osservate mediante stereoscopio per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche, osservando il loro fenotipo fin dai primi giorni di sviluppo. Anche queste linee, come quelle presumibilmente sovraesprimenti il fattore DcE2F da solo o con la proteina AtDPa, hanno presentato alterazioni nel numero dei cotiledoni e dei meristemi (Fig. 32), seppur sempre a bassa penetranza.



Figura 32. Fenotipo delle piante transgeniche DcE2F-AtDPb #27, Quadricotiledone con SAM multipli (7 giorni).

Tra le 31 linee T2 osservate, 10 linee hanno presentato alterazioni nel numero di cotiledoni, con un'incidenza del fenotipo di circa il 32%. Nello specifico, 4 linee hanno presentato tricotiledonia (linee #4, 13, 14 e 16), mentre 5 linee hanno presentato monocotiledonia (linee #6, 17, 20, 22 e 29) e una linea ha presentato

quadricotiledonia (linea #27). I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono rappresentati nella Tabella 8.

# linea DcE2F-AtDPb ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
4	Tricotiledonia
6	Monocotiledonia
13	Tricotiledonia
14	Tricotiledonia
16	Tricotiledonia
17	Monocotiledonia
20	Monocotiledonia
22	Monocotiledonia
27	Quadricotiledonia
29	Monocotiledonia
Incidenza fenotipo	10/31=32,26%

Tabella 8. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle piante presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F insieme alla proteina AtDPb.

Nella linea #27 sovraesprimente il complesso DcE2F/AtDPb è stato osservato, oltre che quadricotiledonia, un aumento del numero di meristemi apicali (Fig. 32; Tab. 9), con un'incidenza del fenotipo di circa il 3%.

Anche in questo caso, come per la sovraespressione del complesso DcE2F/AtDPa, dai risultati ottenuti non è chiaro se la sovraespressione di AtDPb insieme a DcE2F è effettivamente in grado di aumentarne gli effetti.

# linea DcE2F-AtDPb ^{OE}	Fenotipo SAM
27	SAM multipli
Incidenza fenotipo	1/31=3,23%

Tabella 9. Alterazioni nel numero di meristemi apicali (SAM) nelle piante presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F insieme alla proteina AtDPb.

4.1.6. Analisi della segregazione dei transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso DcE2F/AtDPb

Dallo screening effettuato su circa 100 semi di ognuna delle 31 linee T1 presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione DcE2F insieme ad AtDPb, sono emerse 12 generazioni T2 con una resistenza all'igromicina di circa il 75% (linee #1, 3, 4, 6, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 23 e 25; Tab. 10) ed utili per l'ottenimento di linee omozigoti.

# linea DcE2F-AtDPb ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	75 (30/40)
2	56.52 (26/46)
3	73.76 (104/141)
4*	74.72 (68/91)
5	69.1 (85/123)
6*	74.45 (102/137)

Tabella 10. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme ad AtDPb. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le linee possibilmente a singolo inserto.

7	0 (0/13)
8	10 (1/10)
9	53.84 (21/39)
10	78.02 (142/182)
11	77.45 (134/173)
12	94.28 (66/70)
13*	68.55 (85/124)
14*	78.01 (110/141)
15	78.32 (112/143)
16*	73.58 (117/159)
17*	95.29 (162/170)
18	65.17 (58/89)
19	71.85 (97/135)
20*	77.12 (91/118)
21	92.1 (105/114)
22*	73.62 (120/163)
23	75.69 (109/144)
24	82.56 (71/86)
25	76.66 (23/30)
26	58.97 (23/36)
27*	79.14 (110/139)
28	100 (4/4)
29*	70.75 (104/147)
30	83.52 (147/176)
31	70.83 (17/24)

Tabella 10 (continuazione). Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore DcE2F insieme ad AtDPb. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le linee possibilmente a singolo inserto.

4.2. Isolamento di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti i fattori AtE2Fa o AtE2Fb, con o senza i fattori AtDP

I fenotipi embrionali osservati nelle linee transgeniche sovraesprimenti il fattore DcE2F di carota sono chiaramente indicativi di un'alterazione della proliferazione cellulare embrionale ma non sono mai stati riportati in precedenti esperimenti di sovraespressione di fattori E2F vegetali. Per verificare meglio la rilevanza delle osservazioni effettuate sulle piante transgeniche sovraesprimenti il fattore DcE2F, con o senza la co-espressione delle proteine AtDP, si è deciso di confrontare direttamente questi risultati con quelli ottenibili sovraesprimendo gli E2F "attivatori" di *Arabidopsis thaliana*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*, procedendo con le stesse modalità utilizzate per il fattore DcE2F.

4.2.1. Selezione ed analisi fenotipica macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore *AtE2Fa*

Per poter quindi confrontare gli effetti della sovraespressione del fattore DcE2F con quelli ottenibili dalla sovraespressione del fattore endogeno di *Arabidopsis thaliana* *AtE2Fa*, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pSTREP-*AtE2Fa*, un vettore analogo al pCAMBIA-DcE2F ma contenente il cDNA dell'E2F attivatore *AtE2Fa*, fuso a monte con uno STREP tag (Fig. 33).

Le linee trasformate sono state selezionate con igromicina. Piastrandolo circa 90µl di semi T0, corrispondenti a circa 2250 semi, sono state ottenute 10 linee T1 resistenti all'antibiotico, indicative di un'efficienza di trasformazione di circa 0,4%. Per confermare l'avvenuta trasformazione, foglioline di queste piante T1 sono state testate con il saggio istochimico per la β-glucuronidasi (saggio GUS), e le piante sono state fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite saggio GUS per verificare la trasmissibilità del transgene.

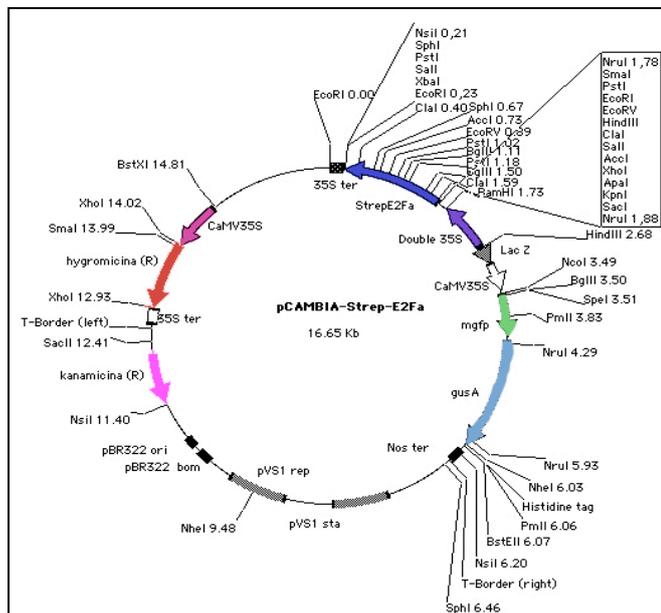


Figura 33. Mappa del vettore pSTREP-AtE2Fa.

Plantule di tutte le linee T2 ottenute sono state quindi osservate per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche. Alcune di queste linee, come precedentemente osservato nelle linee sovraesprimenti il fattore DcE2F, hanno mostrato a bassa penetranza alterazioni nel numero dei cotiledoni (Fig. 34).



Figura 34. Fenotipo delle piante transgeniche AtE2Fa #1, Tricotiledone (9 giorni).

In 2 delle 10 linee transgeniche si è notata la presenza di alcune piantine con alterazioni nel numero di cotiledoni, con un'incidenza del fenotipo del 20%. Nello specifico, nelle 2 linee sono state osservate piantine tricotiledoni (linee #1 e 4). I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono rappresentati nella Tabella 11.

# linea AtE2Fa ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
1	Tricotiledonia
4	Tricotiledonia
Incidenza fenotipo	2/10=20%

Tabella 11. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle piante presumibilmente sovraesprimenti AtE2Fa.

È stato inoltre osservato, come già visto anche nelle linee sovraesprimenti il fattore DcE2F da solo o con la proteina AtDPb, un alterato numero di meristemi apicali (SAM) in 2 linee sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fa (linee #1 e 5) le quali presentano appunto un meristema apicale multiplo (Fig. 34; Tab. 12), con un'incidenza del fenotipo del 20%.

# linea AtE2Fa ^{OE}	Fenotipo SAM
1	SAM multipli
5	SAM multipli
Incidenza fenotipo	2/10=20%

Tabella 12. Alterazioni nel numero di meristemi apicali (SAM) nelle piante presumibilmente sovraesprimenti AtE2Fa.

4.2.2. Isolamento delle linee omozigoti sovraesprimenti il fattore *AtE2Fa*

Sulla generazione T2 delle 10 linee presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione *AtE2Fa* è stato effettuato uno screening sfruttando la resistenza all'antibiotico igromicina per poter individuare linee a singolo inserto dalle quali ottenere linee omozigoti per il transgene. Anche in questo caso, tutte le linee che hanno presentato circa il 75% di piantine resistenti all'antibiotico sono state mandate a seme, e lo screening della generazione successiva ha permesso di selezionare linee 100% resistenti all'antibiotico, e perciò presumibilmente omozigoti per il transgene.

Dall'analisi effettuata con circa 100 semi di ognuna delle 10 linee T1 sovraesprimenti il fattore di trascrizione *AtE2Fa*, sono emerse 3 generazioni T2 con una resistenza all'igromicina vicina al 75% (linee #1, 3 e 5; Tab. 13).

# linea <i>AtE2Fa</i> ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1*	71.6 (58/81)
2	52.46 (32/61)
3	77.01 (67/87)
4*	60.34 (70/116)
5*	72.56 (82/113)
6	58.57 (41/70)
7	82 (82/100)
8	79.09 (87/110)
9	82.14 (22/28)
10	67.5 (27/40)

Tabella 13. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore *AtE2Fa*. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le possibili linee con un singolo inserto.

Il successivo screening sulla generazione T3 ha mostrato 3 linee (linee #1, 5 e 7) con il 100% di resistenza all'igromicina e presumibilmente omozigoti (Tab. 14). Di queste, le linee #1 e 5 avevano mostrato la presenza di SAM multipli, mentre la linea #1 aveva mostrato anche tricotiledonia.

In base a questi risultati, tenendo conto sia delle alterazioni nel numero dei cotiledoni, nel numero dei SAM che della segregazione del transgene, queste due linee sono state utilizzate per effettuare ulteriori analisi.

# linea AtE2Fa ^{OE}	Segregazione T3 (%)
1*	100
4*	78.05
5*	100
7	100

Tabella 14. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T3 delle piantine presumibilmente sovraespressanti il fattore AtE2Fa. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le linee considerate omozigoti a singolo inserto.

4.2.3. Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraespressanti il fattore AtE2Fa insieme alla proteina AtDPa

Per verificare se, come descritto in letteratura, la concomitante sovraespressione di AtDPa può potenziare gli effetti della sovraespressione del fattore AtE2Fa, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fa-AtDPa (Fig. 35), un vettore analogo al pSTREP-AtE2Fa nel quale il gene reporter *gfp/gus* è stato sostituito con il cDNA di *AtDPa*.

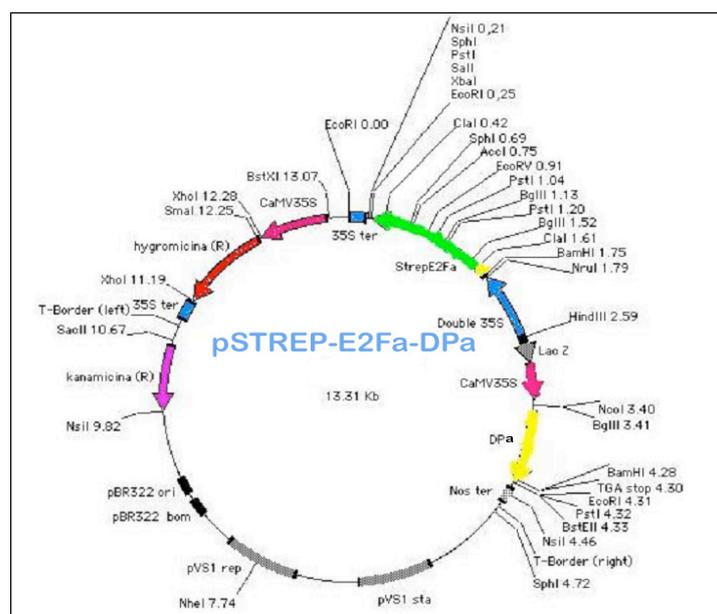


Figura 35. Mappa del vettore pSTREP-AtE2Fa-AtDPa.

Anche in questo caso le linee trasformate sono state isolate mediante selezione con igromicina. Dalla selezione effettuata con tutti i semi T0, corrispondenti a circa 2750 semi, sono state ottenute solamente 3 linee T1 resistenti all'antibiotico, con un'efficienza di trasformazione di circa il 0,1%. A causa della mancanza del gene reporter *gfp/gus*, per confermare la presenza del transgene queste linee sono state testate mediante PCR e fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite PCR per verificare la presenza del transgene.

L'osservazione delle piantine T2 mediante stereoscopio fin dai primi giorni di sviluppo non ha rilevato fenotipi particolari in queste 3 linee. Tuttavia, la bassa efficienza di trasformazione ottenuta in questo caso rispetto alle trasformazioni effettuate con gli altri vettori suggerisce la possibilità che queste linee siano "controselezionate" e presentino quindi una bassa attività e/o sovraespressione del complesso AtE2Fa/AtDPa.

4.2.4. Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fa/AtDPa

Dallo screening effettuato su circa 100 semi di ognuna delle 3 linee T1 presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fa insieme ad AtDPa, è emersa solo una generazione T2 con una resistenza all'igromicina di circa il 75% (linea #3; Tab. 15) ed utile per l'ottenimento di almeno una linea omozigote.

# linea AtE2Fa-AtDPa ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	62.07 (36/58)
2	61.43(43/70)
3	74.14 (43/58)

Tabella 15. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore AtE2Fa insieme ad AtDPa. La percentuale di segregazione in neretto indica la possibile linea a singolo inserto.

4.2.5. Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore AtE2Fa insieme alla proteina AtDPb

Viste le apparenti difficoltà riscontrate nell'ottenimento di piante caratterizzate dalla sovraespressione di AtE2Fa insieme ad AtDPa, si è voluto verificare se la sovraespressione di un complesso AtE2Fa/AtDPb può essere più facilmente attuabile e se, eventualmente, la coespressione di AtDPb è in grado di generare effetti più marcati rispetto alla sovraespressione del fattore AtE2Fa da solo. A tal scopo, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fa-AtDPb (Fig. 36), un vettore analogo al pSTREP-AtE2Fa ma nel quale il gene reporter *gfp/gus* è stato sostituito stavolta con il cDNA di *AtDPb*.

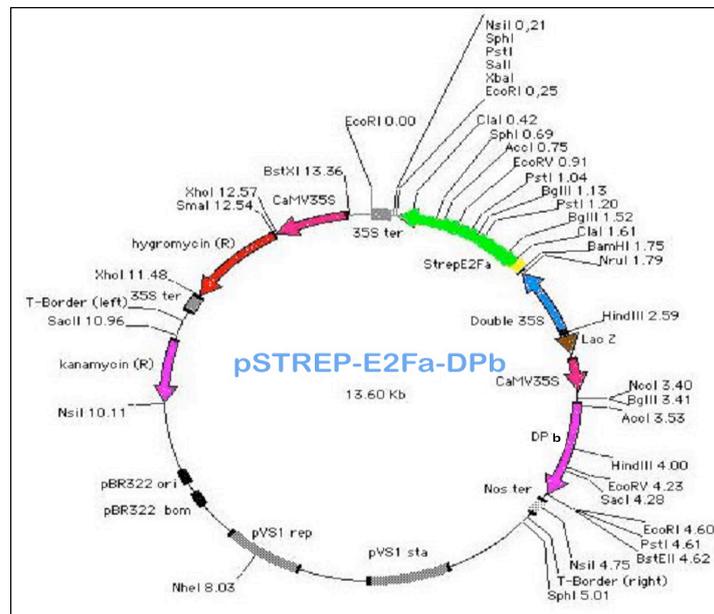


Figura 36. Mappa del vettore pSTREP-AtE2Fa-AtDPb.

Come nei casi precedenti, le linee trasformate sono state isolate mediante selezione con l'antibiotico igromicina. Dalla selezione effettuata con circa 750 semi T0 sono state ottenute 15 linee T1 resistenti all'antibiotico, corrispondenti ad una efficienza di trasformazione del 2%. A causa della mancanza del gene reporter *gfp/gus*, anche in questo caso le linee sono state testate mediante PCR per confermare la presenza del transgene, e fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite PCR per verificare la presenza del transgene.

Le plantule T2 sono state quindi osservate allo stereoscopio fin dai primi giorni di sviluppo per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche. Anche queste linee, come quelle sovraesprimenti AtE2Fa da solo o il fattore DcE2F, da solo o con le proteine AtDP, hanno presentato a bassa penetranza alterazioni nel numero dei cotiledoni (Fig. 37).



Figura 37. Fenotipo delle piante transgeniche AtE2Fa-AtDPb: linea #10, Tricotiledone (10 giorni).

Infatti, 6 delle 15 linee hanno presentato alterazioni nel numero di cotiledoni, con un'incidenza del fenotipo del 40%. Nello specifico, 5 linee hanno presentato tricotiledonia (linee #6, 7, 10, 11 e 17), mentre 3 linee hanno presentato monocotiledonia (linee #7, 14 e 17). I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono riportati nella Tabella 16.

# linea AtE2Fa-AtDPb ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
6	Tricotiledonia
7	Tricotiledonia, Monocotiledonia
10	Tricotiledonia
11	Tricotiledonia
14	Monocotiledonia
17	Tricotiledonia, Monocotiledonia
Incidenza fenotipo	6/15=40%

Tabella 16. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle piante presumibilmente sovraesprimenti AtE2Fa insieme con AtDPb.

È stato inoltre osservato un'alterazione nel numero di meristemi apicali (SAM) in ben 7 linee, con un'incidenza del fenotipo di circa il 47%. Nello specifico, 6 linee hanno presentato meristemi apicali multipli (linee #5, 6, 11, 13, 14 e 17) mentre 2 linee hanno prodotto, a bassa penetranza, germogli con totale assenza del SAM (linee # 14 e 15) (Fig. 38; Tab. 17).



Figura 38. Fenotipo delle piante transgeniche AtE2Fa-AtDPb: (A) AtE2Fa-AtDPb #15, Assenza di SAM (17 giorni); (B) AtE2Fa-AtDPb #13, SAM multipli (34 giorni).

# linea AtE2Fa-AtDPb ^{OE}	Fenotipo SAM
5	SAM multipli
6	SAM multipli
11	SAM multipli
13	SAM multipli
14	SAM multipli, Assenza di SAM
15	Assenza di SAM
17	SAM multipli
Incidenza fenotipo	7/15=46,67%

Tabella 17. Alterazioni nel numero di meristemi apicali (SAM) nelle piante presumibilmente sovraesprimenti AtE2Fa insieme ad AtDPb.

L'incidenza dei fenotipi ottenuti con questa trasformazione, in particolare il numero elevato di linee con meristemi multipli che raggiunge quasi il 50% del totale, suggerisce che la concomitante sovraespressione di AtDPb è in grado di causare un marcato potenziamento degli effetti della sovraespressione di AtE2Fa.

4.2.6. Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fa/AtDPb

Dallo screening effettuato su circa 100 semi di 9 delle linee T1 presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fa insieme ad AtDPa, sono emerse due generazioni T2 con una resistenza all'igromicina che si avvicina al 75% (linea #14 e 17; Tab. 18) ed utili per l'ottenimento di linee omozigoti.

# linea AtE2Fa-AtDPb ^{OE}	Segregazione T2 (%)
5*	12.5 (1/8)
6*	35 (21/60)
7*	2.13 (1/47)
10*	0 (0/19)
13*	0
14*	73.07 (57/78)
15*	14.54 (8/55)
16	40.38 (21/52)
17*	71.05 (54/76)

Tabella 18. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il complesso AtE2Fa/AtDPb. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni e SAM. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le possibili linee a singolo inserto.

4.2.7. Selezione ed analisi fenotipica macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore *AtE2Fb*

Per poter comparare i risultati ottenuti dalla sovraespressione del fattore DcE2F e del fattore endogeno di *Arabidopsis thaliana* *AtE2Fa* con quelli ottenibili dalla sovraespressione anche dell'altro E2F attivatore endogeno di *Arabidopsis*, *AtE2Fb*, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pSTREP-*AtE2Fb*, un vettore analogo al pCAMBIA-DcE2F ma contenente stavolta il cDNA di *AtE2Fb*, fuso a monte con uno STREP tag (Fig. 39).

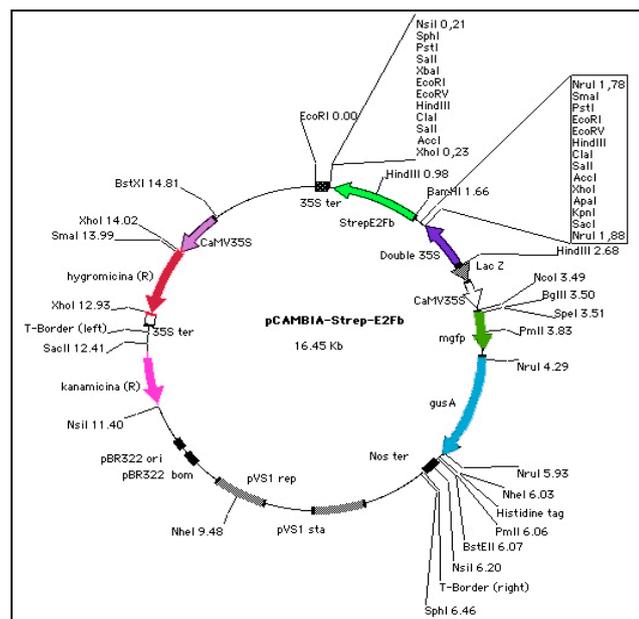


Figura 39. Mappa del vettore pSTREP-*AtE2Fb*.

Le linee trasformate sono state selezionate mediante l'utilizzo di igromicina. Piastrandolo circa 30 μ l di semi T₀, corrispondenti a circa 750 semi, sono state ottenute 14 linee T₁ resistenti all'antibiotico, con una efficienza di trasformazione di circa 1,9%. Foglioline di queste piante T₁ sono state testate con il saggio

istochimico per la β -glucuronidasi (saggio GUS) per confermare l'avvenuta trasformazione e le piante sono state fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite saggio GUS per verificare la trasmissibilità del transgene.

Plantule di tutte le linee T2 ottenute sono state quindi osservate per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche, osservando il loro fenotipo fin dai primi giorni di sviluppo mediante stereoscopio. Alcune di queste linee, come precedentemente osservato nelle linee sovraesprimenti il fattore DcE2F ed AtE2Fa, hanno mostrato alterazioni nel numero dei cotiledoni, come al solito a bassa penetranza (Fig. 40).



Figura 40. Fenotipo delle piante transgeniche AtE2Fb #13, Tricotiledone (9 giorni).

Tra le 14 linee presumibilmente sovraesprimenti il fattore AtE2Fb osservate, 4 linee hanno presentato alterazioni nel numero di cotiledoni, con un'incidenza del fenotipo di circa il 29%. Nello specifico, le 4 linee osservate hanno tutte presentato tricotiledonia (linee #2, 7, 13 e 14). I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono rappresentati nella Tabella 19.

# linea AtE2Fb ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
2	Tricotiledonia
7	Tricotiledonia
13	Tricotiledonia
14	Tricotiledonia
Incidenza fenotipo	4/14=28,57%

Tabella 19. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle piante presumibilmente sovraesprimenti AtE2Fb.

A differenza delle linee sovraesprimenti i fattori DcE2F o AtE2Fa, da soli o con AtDPb, non sono state osservate alterazioni nel numero dei meristemi apicali in queste linee sovraesprimenti il solo fattore AtE2Fb.

Questi risultati suggeriscono la possibilità che la sovraespressione di AtE2Fb sia in grado di generare effetti meno marcati rispetto a quanto riscontrato mediante la sovraespressione di AtE2Fa o DcE2F.

4.2.8. Isolamento delle linee omozigoti sovraesprimenti il fattore *AtE2Fb*

Sulla generazione T2 delle 14 linee presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fb è stato effettuato uno screening sfruttando la resistenza all'antibiotico igromicina per poter individuare linee a singolo inserto dalle quali ottenere linee omozigoti per il transgene. Anche in questo caso, tutte le linee che hanno presentato circa il 75% di piantine resistenti all'antibiotico sono state mandate a seme, e lo screening della generazione successiva ha permesso di selezionare linee 100% resistenti all'antibiotico, e perciò presumibilmente omozigoti per il transgene.

Dall'analisi effettuata con circa 100 semi di ognuna delle 14 linee T1 sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fb, sono emerse 5 generazioni T2 con una resistenza all'igromicina di circa il 75% (linee #2, 3, 7, 11 e 14; Tab. 20).

# linea AtE2Fb ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	97.17 (103/106)
2*	75.82 (69/91)
3	73.33 (77/105)
4	70.24 (59/84)
5	70 (63/90)
6	89.65 (52/58)
7*	72.82 (67/92)
9	86.92 (113/130)
10	88.04 (81/92)
11	75.73 (78/103)
12	36.76 (25/68)
13*	81.81 (99/121)
14*	75.45 (83/110)
16	46.55 (27/58)

Tabella 20. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraespressanti il fattore AtE2Fb. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le probabili linee a singolo inserto.

Il successivo screening sulla generazione T3 ha mostrato 4 linee (linee #2, 6, 7 e 13) con il 100% di resistenza all'igromicina e presumibilmente omozigoti (Tab. 21). Di queste, le linee #2, 7 e 13 hanno mostrato tricotiledonia.

In base a questi risultati, tenendo conto sia delle alterazioni nel numero dei cotiledoni che della segregazione del transgene, le linee #7 e 13 sono state scelte per effettuare tutte le analisi successive.

# linea AtE2Fb ^{OE}	Segregazione T3 (%)
2*	100
6	100
7*	100
13*	100

Tabella 21. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T3 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore AtE2Fb. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le linee a singolo inserto.

4.2.9. Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore AtE2Fb insieme alla proteina AtDPa

Per verificare se la sovraespressione di un complesso AtE2Fb/AtDPa può generare effetti più marcati rispetto alla sola sovraespressione di AtE2Fb, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fb-AtDPa (Fig. 41), un vettore analogo al pSTREP-AtE2Fb ma nel quale il gene reporter *gfp/gus* è stato sostituito con il cDNA di *AtDPa*.

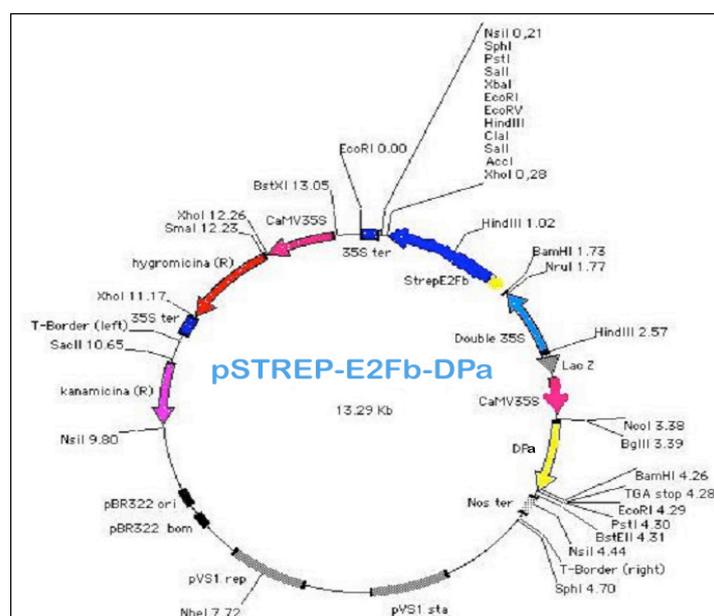


Figura 41. Mappa del vettore pSTREP-AtE2Fb-AtDPa.

Anche in questo caso le linee trasformate sono state isolate mediante selezione con igromicina. Dalla selezione, effettuata con circa 750 semi T0, sono state ottenute 9 linee T1 resistenti all'antibiotico, corrispondenti ad una efficienza di trasformazione pari a 1,2%. A causa della mancanza del gene reporter *gfp/gus*, per confermare la presenza del transgene queste linee sono state testate mediante PCR e fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite PCR per verificare la presenza del transgene.

Ad un'analisi fenotipica effettuata fin dai primi giorni di sviluppo, non sono stati osservati fenotipi particolari in queste 9 linee, come visto anche per le piantine presumibilmente sovraespressanti il complesso AtE2Fa/DPa. Sembra quindi che entrambi gli E2F attivatori endogeni di *Arabidopsis* non manifestino fenotipi particolari a livello macroscopico quando sovraespressi insieme al fattore AtDPa. Come indicato precedentemente, questo potrebbe derivare dalla contro-selezione di linee parzialmente silenziate e/o inattivate dovuta ad un eccessivo potenziamento dell'azione dei fattori AtE2F attivatori causato dalla sovraespressione di AtDPa.

4.2.10. *Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fb/AtDPa*

Dallo screening effettuato su circa 100 semi di ognuna delle 9 linee T1 presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fb insieme ad AtDPa, sono emerse 2 linee T2 con una resistenza all'igromicina di circa il 75% (linee #4 e 10; Tab. 22) ed utili per l'ottenimento di linee omozigoti.

# linea AtE2Fb-AtDPa ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	69.05 (29/42)
2	80.55 (29/36)
3	51.72 (15/29)
4	78.57 (22/28)
5	0 (0/3)
6	0/0
7	63.64 (14/22)
9	66.66 (6/9)
10	78.95 (15/19)

Tabella 22. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraesprimenti il fattore AtE2Fb insieme ad AtDPa. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le possibili linee a singolo inserto.

4.2.11. Selezione ed analisi macroscopica di linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore AtE2Fb insieme alla proteina AtDPb

Per verificare se la sovraespressione di un complesso AtE2Fb/AtDPb può invece generare effetti più marcati rispetto alla sovraespressione del fattore AtE2Fb da solo, piante di *Arabidopsis thaliana* sono state trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fb-AtDPb (Fig. 42), un vettore analogo al pSTREP-AtE2Fb ma nel quale il gene reporter *gfp/gus* è stato sostituito stavolta con il cDNA di *AtDPb*.

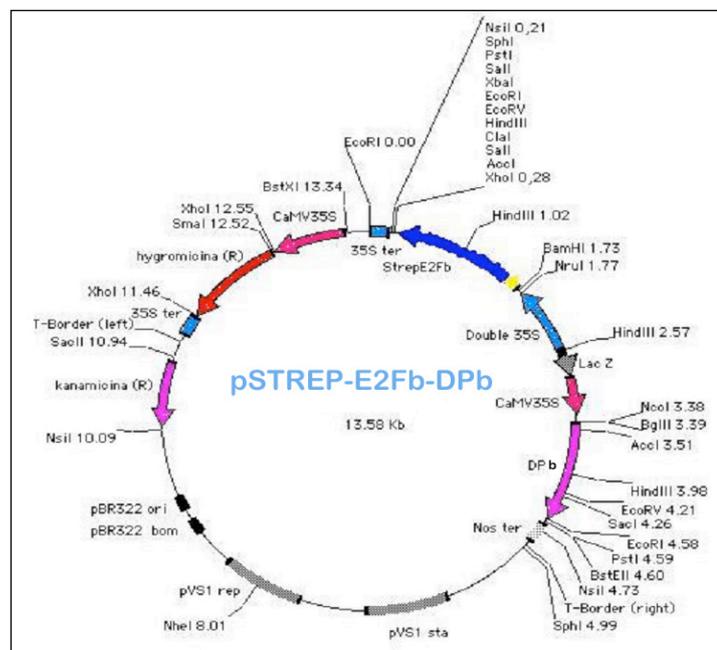


Figura 42. Mappa del vettore pSTREP-AtE2Fb-AtDPb.

Come sempre, le linee trasformate sono state isolate mediante selezione con l'antibiotico igromicina. Dalla selezione, effettuata con circa 750 semi T0, sono state ottenute 18 linee T1 resistenti all'antibiotico, con una efficienza di trasformazione pari al 2,4%. A causa della mancanza del gene reporter *gfp/gus*, anche in questo caso, come per le altre linee sovraesprimenti i complessi

E2F/AtDP, per confermare la presenza del transgene sono state condotte analisi tramite PCR. Le piante sono quindi state fatte crescere a maturità per produrre semi e generare le linee T2. Anche le linee T2 risultanti sono state analizzate tramite PCR per verificare la presenza del transgene.

Le plantule T2 sono state quindi osservate mediante stereoscopio per verificare la presenza di eventuali alterazioni morfologiche. Anche queste linee, come quelle presumibilmente sovraesprimenti il fattore AtE2Fa, da solo o con AtDPb, e il fattore DcE2F da solo o con entrambe le proteine AtDP, hanno presentato alterazioni nel numero dei cotiledoni (Fig. 43) a bassa penetranza.



Figura 43. Fenotipo delle piante transgeniche AtE2Fb-AtDPb #12, Tricotiledone (14 giorni).

Tra le 18 linee T2 osservate, 5 di esse hanno presentato alterazioni nel numero di cotiledoni, con un'incidenza del fenotipo di circa il 28%. Nello specifico, 4 linee hanno presentato tricotiledonia (linee #3, 7, 11 e 12), mentre una linea ha presentato monocotiledonia (linea #6). I risultati complessivi dell'osservazione fenotipica sono rappresentati nella Tabella 23.

# linea AtE2Fb-AtDPb ^{OE}	Fenotipo cotiledonare
3	Tricotiledonia
6	Monocotiledonia
7	Tricotiledonia
11	Tricotiledonia
12	Tricotiledonia
Incidenza fenotipo	5/18=27,78%

Tabella 23. Alterazioni nel numero di cotiledoni nelle piante presumibilmente sovraesprimenti AtE2Fb insieme con AtDPb.

Non sono state osservate alterazioni nel numero dei meristemi apicali in queste linee presumibilmente sovraesprimenti il fattore AtE2Fb insieme ad AtDPb. Questo fenotipo infatti è stato osservato solo in linee sovraesprimenti solo DcE2F o DcE2F insieme ad AtDPb, oppure in linee sovraesprimenti solo AtE2Fa o AtE2Fa insieme ad AtDPb.

4.2.12. *Analisi della segregazione di transgeni sulle linee T2 sovraesprimenti il complesso AtE2Fb/AtDPb*

Dallo screening effettuato su circa 100 semi di ognuna delle 18 linee T1 presumibilmente sovraesprimenti il fattore di trascrizione AtE2Fb insieme ad AtDPb, sono emerse 2 linee T2 con una resistenza all'igromicina di circa il 75% (linee #12 e 15; Tab. 24) ed utili per l'ottenimento di linee omozigoti.

# linea AtE2Fb-AtDPb ^{OE}	Segregazione T2 (%)
1	-
2	-
3*	6.89 (2/29)
4	69.23 (9/13)
5	-
6*	0 (0/6)
7*	6.12 (3/49)
9	-
10	-
11*	0 (0/37)
12*	71.42 (20/28)
13	-
14	-
15	73.33 (33/45)
16	-
17	-
18	-
19	-

Tabella 24. Resistenza all'antibiotico igromicina (20 µg/ml) della generazione T2 delle piantine presumibilmente sovraespressanti il fattore AtE2Fb insieme ad AtDPb. Con l'asterisco sono indicate le linee con alterazioni nel numero di cotiledoni. Le percentuali di segregazione in neretto indicano le possibili linee a singolo inserto.

4.3. Studio dei livelli di espressione dei transgeni

Per dimostrare l'effettiva sovraespressione dei geni *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb* nelle piantine transgeniche di *Arabidopsis thaliana*, è stato effettuato uno studio sui livelli d'espressione dei transgeni mediante Real-Time PCR, confrontandoli con i livelli endogeni di espressione.

Per valutare i livelli d'espressione del gene *DcE2F* nei trasformanti di *Arabidopsis thaliana* presumibilmente sovraesprimenti *DcE2F*, l'analisi è stata effettuata su RNA isolato da piantine di 6 giorni di età delle linee omozigoti *DcE2F* #13 e #16, precedentemente identificate tramite analisi di segregazione. In parallelo, sono stati analizzati campioni di RNA estratto da giovani plantuline di *Daucus carota* (varietà Berlin), per verificare quali fossero i livelli d'espressione fisiologici del gene *DcE2F*. Campioni di RNA estratto da piantine wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia) sono stati inoltre analizzati come controllo negativo.

I valori di espressione sono stati ricavati col metodo del $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001), utilizzando come riferimento i livelli di espressione della subunità 18S dell'RNA ribosomale, e sono riportati in Figura 44 e nella Tabella 25. Da questa analisi si evince che la linea transgenica *DcE2F* #13 esprime il gene *DcE2F* circa 47 volte in più rispetto ai livelli fisiologici osservati in *Daucus carota* mentre l'espressione nella linea #16 è solo leggermente superiore ai livelli fisiologici (due volte in più). L'espressione è invece praticamente assente nelle piantine wild type di *Arabidopsis thaliana*, a conferma della specificità dell'analisi qPCR. Questi dati dimostrano quindi una sovraespressione di questo gene in entrambe le linee transgeniche analizzate, sovraespressione che risulta particolarmente marcata nella linea *DcE2F* #13.

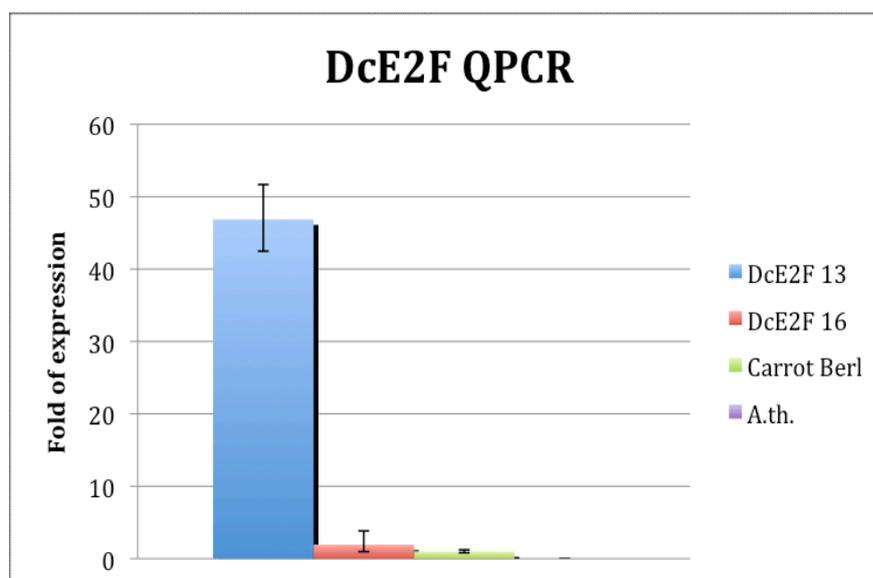


Figura 44. Livelli di espressione del gene *DcE2F* nelle piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana* trasformate con il vettore pCAMBIA-DcE2F, nelle piante wild type di *Daucus carota* (varietà Berlin) e nelle piante wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia). Le barre d'errore indicano il range superiore ed inferiore indicato dall'output del metodo $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Linea #	Fold of expression
DcE2F 13	46,851
DcE2F16	1,932
Carrot Berl.	1
Col-0	0,0014

Tabella 25. Livelli di espressione del gene *DcE2F* nelle piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana* trasformate con il vettore pCAMBIA-DcE2F, nelle piante wild type di *Daucus carota* (varietà Berlin) e nelle piante wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia).

Per quanto riguarda i livelli di espressione del gene *AtE2Fa* (locus AT2G36010) nelle due linee omozigoti selezionate tramite segregazione, le analisi Real-Time PCR hanno confermato anche in questo caso un'effettiva sovraespressione del transgene rispetto ai livelli d'espressione fisiologici misurati in piantine wild type. I risultati complessivi ottenuti dall'analisi di due repliche biologiche col metodo del $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) sono riportati in Figura 45 e Tabella 26. I livelli d'espressione sono molto alti in entrambe le linee e sono più forti nella linea *AtE2Fa* #1, che esprime il transgene circa 190 volte in più rispetto ai livelli endogeni in *Arabidopsis* contro le 100 volte in più della linea *AtE2Fa* #5.

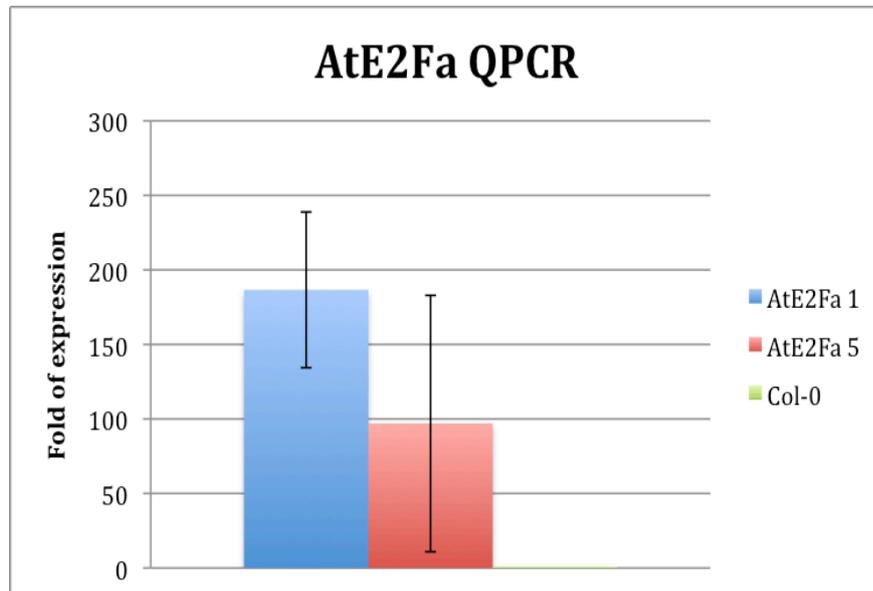


Figura 45. Livelli di espressione del gene *AtE2Fa* nelle piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana* trasformate con il vettore pSTREP-*AtE2Fa* e nelle piante wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia). Le barre d'errore indicano l'errore standard ($SE=SD/\sqrt{n}$).

Linea #	Fold of expression
AtE2Fa 1	186,61
AtE2Fa 5	96,9198
Col-0	1

Tabella 26. Livelli di espressione del gene *AtE2Fa* nelle piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana* trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fa e nelle piante wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia).

Per quanto riguarda infine l'analisi dei livelli di espressione del gene *AtE2Fb* (locus AT5G22220) in piantine delle due linee omozigoti di *Arabidopsis thaliana* selezionate, anche in questo caso le analisi Real-Time PCR hanno confermato una forte sovraespressione del transgene. I risultati complessivi ottenuti dall'analisi di tre repliche biologiche col metodo del $\Delta\Delta C_t$ sono riportati nella Figura 46 e in Tabella 27, da cui si evince che la linea AtE2Fb #7 esprime il transgene circa 110 volte in più rispetto ai livelli endogeni in *Arabidopsis*, mentre la linea AtE2Fb #13 esprime circa 30 volte in più.

Linea #	Fold of expression
AtE2Fb 7	110,7206
AtE2Fb 13	27,0601
Col-0	1

Tabella 27. Livelli di espressione del gene *AtE2Fb* nelle piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana* trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fb e nelle piante wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia).

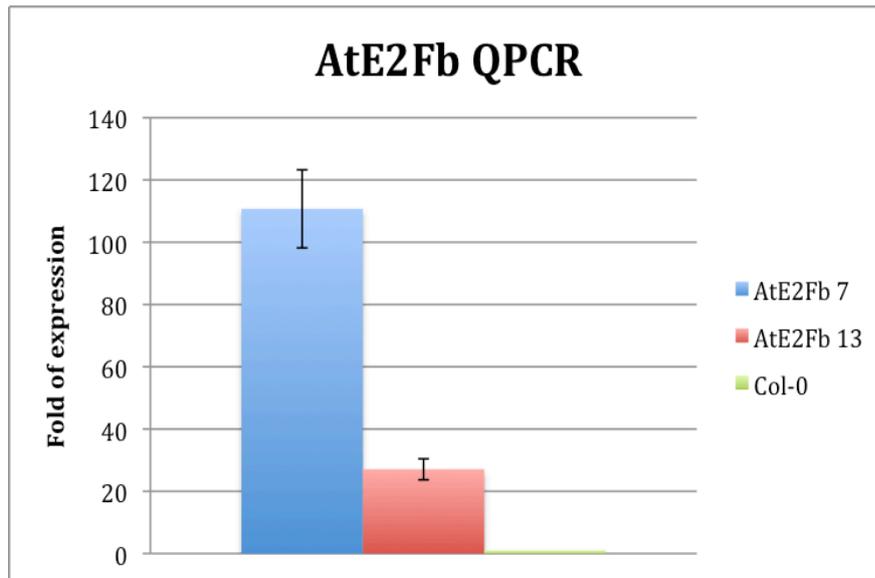


Figura 46. Livelli di espressione del gene *AtE2Fb* nelle piante transgeniche di *Arabidopsis thaliana* trasformate con il vettore pSTREP-AtE2Fb e nelle piante wild type di *Arabidopsis thaliana* (varietà Columbia). Le barre d'errore indicano l'errore standard ($SE=SD/\sqrt{n}$).

4.4. Caratterizzazione fenotipica dettagliata delle linee omozigoti sovraesprimenti DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb

Per caratterizzare ulteriormente il fenotipo delle linee transgeniche di *Arabidopsis thaliana* sovraesprimenti il fattore *DcE2F* si è proceduto ad un'analisi più dettagliata a livello di alcuni organi (cotiledoni e radici primarie), per verificare se la sovraespressione di questo fattore di trascrizione può effettivamente determinare variazioni nei livelli di proliferazione cellulare, come suggerito dall'osservazione di un alterato numero di cotiledoni e di apici meristematici. Questi risultati sono stati confrontati con quelli riscontrabili nelle piantine sovraesprimenti i fattori *AtE2Fa* o *AtE2Fb*, per i quali in effetti era stato già osservato un coinvolgimento nella promozione della proliferazione cellulare (De Veylder *et al.*, 2002; Sozzani *et al.*, 2006).

4.4.1. Analisi della dimensione dei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb

Per verificare le dimensioni dei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti il fattore di trascrizione *DcE2F* o i fattori *AtE2Fa* o *AtE2Fb*, sono state effettuate misurazioni al microscopio usando il software Pixel Link Microscopy-SW. Per avere un quadro più completo della situazione, le osservazioni sono state effettuate a due diversi stadi di sviluppo dei germogli: nello stadio precoce (stadio I) sono evidenti gli abbozzi della prima coppia di foglioline ed i cotiledoni sono ancora in fase di accrescimento; nel secondo stadio (stadio II), invece, i cotiledoni hanno raggiunto le dimensioni finali e la prima coppia di foglie è pienamente formata, mentre sono evidenti gli abbozzi della seconda coppia di foglioline. Per quanto riguarda il primo stadio di sviluppo sono state misurate le dimensioni di 30 cotiledoni delle piantine transgeniche sovraesprimenti il fattore *DcE2F* (in particolare, 16 cotiledoni della linea #13 e 14 cotiledoni della linea #16), 22

cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fa* (10 cotiledoni della linea #1 e 12 cotiledoni della linea #5) e 24 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fb* (18 cotiledoni della linea #7 e 6 cotiledoni della linea #13). Questi risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle misurazioni di 14 cotiledoni delle piantine wild type allo stesso stadio di sviluppo. I dati complessivi delle dimensioni medie dei cotiledoni sono illustrati in Tabella 28 e Figura 47 ed indicano che, nonostante una discreta variabilità delle due linee DcE2F, a questo stadio di sviluppo non sembrano essere presenti differenze sostanziali tra le dimensioni dei cotiledoni delle linee transgeniche e quelli delle piantine wild type.

Linea #	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Area (mm ²)
DcE2F 13 ^{OE}	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2
DcE2F 16 ^{OE}	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2
AtE2Fa 1 ^{OE}	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2
AtE2Fa 5 ^{OE}	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2
AtE2Fb 7 ^{OE}	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1
AtE2Fb 13 ^{OE}	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1
WT	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2 ± 0,1

Tabella 28. Dimensioni medie dei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo I (\pm SE=SD/ \sqrt{n}).

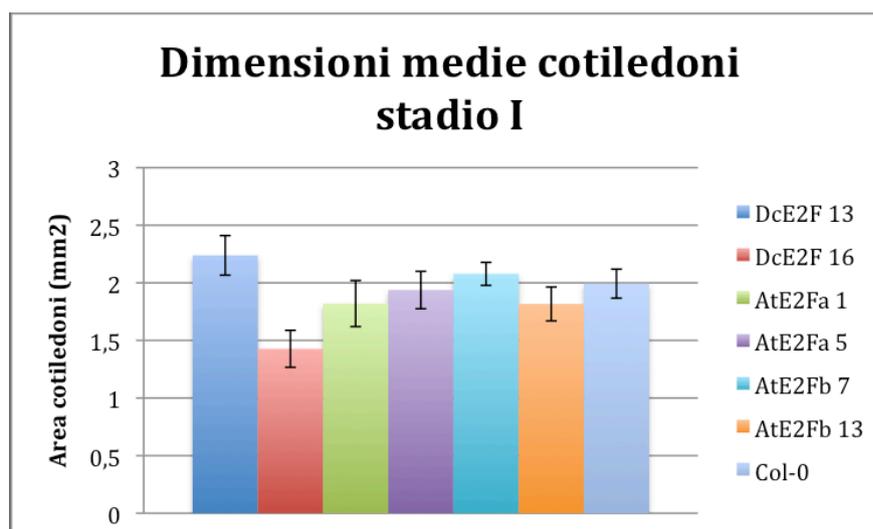


Figura 47. Dimensioni medie dei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo I. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($SE=SD/\sqrt{n}$).

Per quanto riguarda lo stadio di sviluppo II (cotiledoni maturi, abbozzo seconda coppia di foglioline), sono state osservate le dimensioni di 21 cotiledoni delle piantine transgeniche sovraesprimenti il fattore *DcE2F* (11 cotiledoni della linea #13 e 10 cotiledoni della linea #16), 13 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fa* (8 cotiledoni della linea #1 e 5 cotiledoni della linea #5) e 15 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fb* (9 cotiledoni della linea #7 e 6 cotiledoni della linea #13). Questi risultati sono stati comparati con quelli ottenuti dalle misurazioni di 11 cotiledoni delle piantine wild type allo stesso stadio di sviluppo. I dati complessivi delle dimensioni medie dei cotiledoni allo stadio II sono rappresentate in Tabella 29 e Figura 48 da cui si evince che a questo stadio di sviluppo le dimensioni medie dei cotiledoni delle linee transgeniche *DcE2F* ed *AtE2Fa* sono marcatamente superiori a quelle dei cotiledoni delle piantine wild type mentre le dimensioni dei cotiledoni delle linee *AtE2Fb* non sembrano cambiate in modo significativo.

Linea #	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Area (mm ²)
DcE2F 13 ^{OE}	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2
DcE2F 16 ^{OE}	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2
AtE2Fa 1 ^{OE}	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1	4,4 ± 0,5
AtE2Fa 5 ^{OE}	3 ± 0,3	2,7 ± 0,2	5,4 ± 0,3
AtE2Fb 7 ^{OE}	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	3,6 ± 0,1
AtE2Fb 13 ^{OE}	2,1 ± 0,1	2 ± 0,1	3,1 ± 0,4
WT	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	3,1 ± 0,2

Tabella 29. Dimensioni medie dei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo II (\pm SE=SD/ \sqrt{n}).

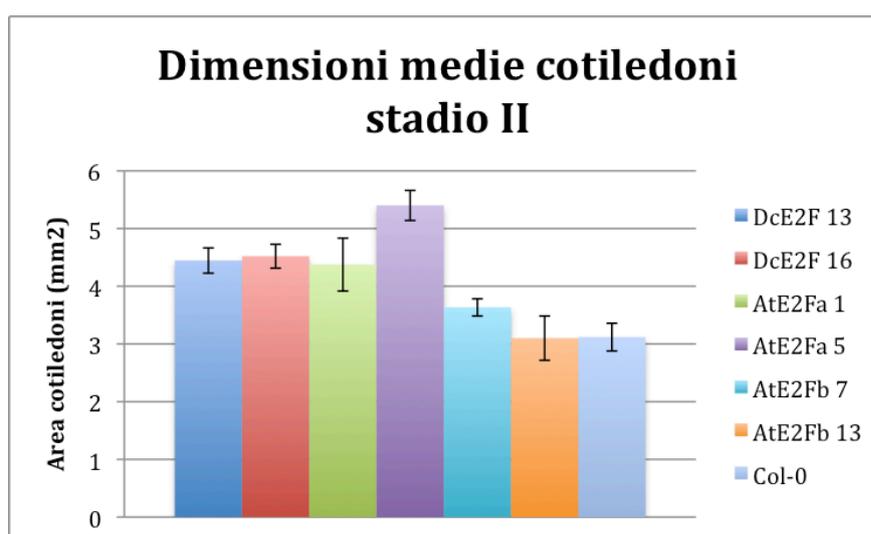


Figura 48. Dimensioni medie dei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo II. Le barre d'errore indicano l'errore standard (SE=SD/ \sqrt{n}).

4.4.2 Analisi del numero di cellule epidermiche nei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*

Usando un microscopio a contrasto per interferenza differenziale (DIC) è stato analizzato il numero di cellule dell'epidermide adassiale nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e wild type (Col-0). Come per l'analisi delle dimensioni cotiledonari, sono stati presi in considerazione due diversi stadi di sviluppo: nel primo (stadio I) è presente l'abbozzo della prima coppia di foglioline ed i cotiledoni stanno ancora crescendo; nel secondo (stadio II) i cotiledoni hanno raggiunto le dimensioni finali ed è presente l'abbozzo della seconda coppia di foglioline.

Per quanto riguarda lo stadio di sviluppo I è stato osservato il numero di cellule epidermiche per unità di area ($100000 \mu\text{m}^2$) di 27 cotiledoni delle piantine transgeniche sovraesprimenti il fattore *DcE2F* (14 cotiledoni della linea #13 e 13 cotiledoni della linea #16), 35 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fa* (15 cotiledoni della linea #1 e 20 cotiledoni della linea #5) e 45 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fb* (32 cotiledoni della linea #7 e 13 cotiledoni della linea #13). Questi risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti dall'osservazione di 11 cotiledoni delle piantine wild type allo stesso stadio di sviluppo. Come mostrato nella Tabella 30 e nella Figura 49, si è osservato che il numero di cellule epidermiche per unità di area nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori E2F è quasi raddoppiato rispetto a quello dei cotiledoni delle wild type. Conseguentemente, le dimensioni medie cellulari sono all'incirca dimezzate. Poichè, come descritto prima, la dimensione media dell'intero organo appare abbastanza invariata a questo stadio di sviluppo, questi dati sono indicativi di un forte aumento della proliferazione cellulare nei cotiledoni delle linee sovraesprimenti i fattori E2F.

Linea #	N° medio di cellule in 100000 μm^2	Dimensione media cellulare (μm^2)
DcE2F 13	50,1 \pm 0,7	1996,00 \pm 27,9
DcE2F 16	50,3 \pm 3,0	1988,07 \pm 118,6
AtE2Fa 1	49,6 \pm 2,2	2016,13 \pm 89,4
AtE2Fa 5	42,9 \pm 2,3	2331,00 \pm 125,0
AtE2Fb 7	43,5 \pm 1,2	2298,85 \pm 63,4
AtE2Fb 13	42,6 \pm 1,3	2347,42 \pm 71,6
Col-0	24,5 \pm 1,5	4081,63 \pm 249,9

Tabella 30. Numero medio di cellule epidermiche adassiali per unità di area e dimensione media delle cellule epidermiche nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e di piantine wild type allo stadio di sviluppo I (\pm SE=SD/ \sqrt{n}).

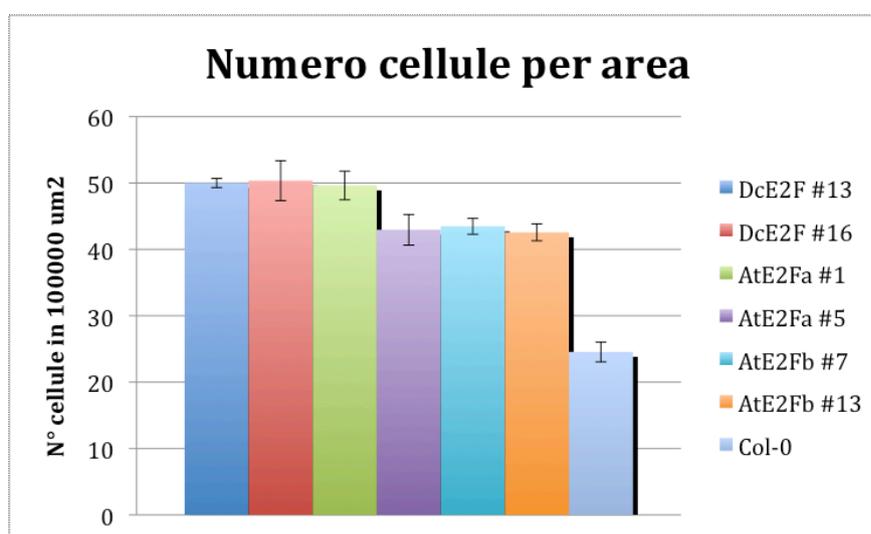


Figura 49. Numero medio di cellule epidermiche adassiali per unità di area nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo I. Le barre d'errore indicano l'errore standard (SE=SD/ \sqrt{n}).

Per quanto riguarda lo stadio di sviluppo II (cotiledoni maturi, abbozzo seconda coppia di foglioline) l'analisi è stata effettuata su 50 cotiledoni delle piantine transgeniche sovraesprimenti il fattore *DcE2F* (28 cotiledoni della linea #13 e 22 cotiledoni della linea #16), 14 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fa* (11 cotiledoni della linea #1 e 3 cotiledoni della linea #5), 15 cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fb* (12 cotiledoni della linea #7 e 3 cotiledoni della linea #13) e 18 cotiledoni delle piantine wild type allo stesso stadio di sviluppo (Tab. 31; Fig. 50). Anche in questo caso, come nell'osservazione delle piantine al primo stadio di sviluppo, si è osservato che il numero di cellule epidermiche per unità di area nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori E2F è notevolmente maggiore (da 1,5 a 2 volte in più) rispetto a quanto rilevato nei cotiledoni wild type. Conseguentemente, anche nel secondo stadio di sviluppo le dimensioni medie delle cellule epidermiche, seppur notevolmente aumentate rispetto al primo stadio, rimangono fortemente inferiori nelle linee sovraesprimenti i fattori E2F.

Linea #	N° medio di cellule in 100000 μm^2	Dimensione media cellulare (μm^2)
DcE2F 13	30,9 \pm 1	3236,25 \pm 104,7
DcE2F 16	26,3 \pm 0,8	3802,28 \pm 115,7
AtE2Fa 1	33,6 \pm 1,2	2976,19 \pm 106,3
AtE2Fa 5	31,1 \pm 1,7	3215,43 \pm 175,8
AtE2Fb 7	35,7 \pm 1,1	2801,12 \pm 86,3
AtE2Fb 13	32,2 \pm 3,3	3105,59 \pm 318,3
Col-0	18,2 \pm 0,7	5494,51 \pm 211,3

Tabella 31. Numero medio di cellule epidermiche per unità di area e dimensione media delle cellule epidermiche nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo II (\pm SE=SD/ \sqrt{n}).

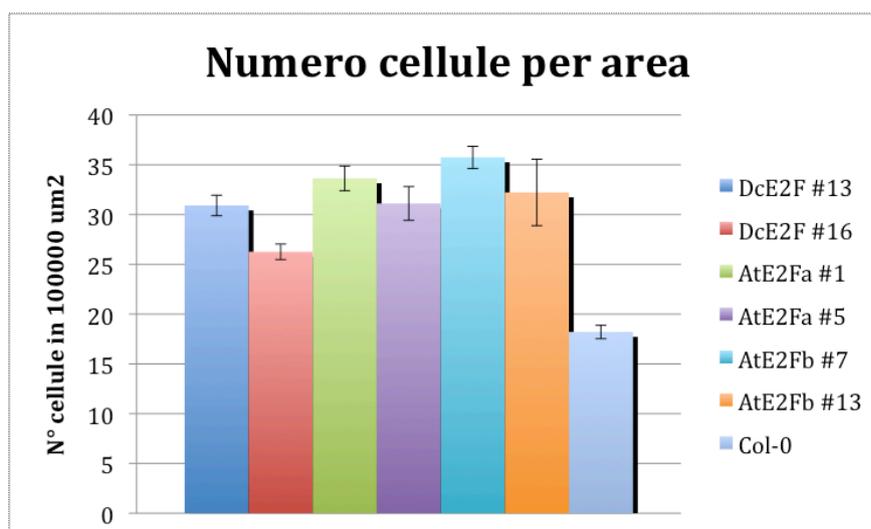


Figura 50. Numero medio di cellule epidermiche adassiali per unità di area nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type allo stadio di sviluppo II. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($SE=SD/\sqrt{n}$).

Calcolando il numero medio totale di cellule presenti nell'epidermide adassiale dei cotiledoni ai due diversi stadi di sviluppo risulta, come descritto nella Tabella 32 e nella Figura 51, che allo stadio I i cotiledoni delle linee sovraesprimenti i fattori E2F presentano forti aumenti del numero di cellule rispetto ai cotiledoni wild type, con variazioni che vanno da un minimo del 44% in più (DcE2F #16) fino al 125% (DcE2F #13), mentre allo stadio II gli aumenti sono ancora più marcati e vanno da un minimo del 77% in più (AtE2Fb #13) fino al 198% di aumento (AtE2Fa #5). Inoltre, è interessante notare che nel passaggio dallo stadio I a quello finale (stadio II) il numero medio totale di cellule epidermiche aumenta solo del 15% nei cotiledoni wild type, a conferma del fatto che durante la germinazione l'accrescimento cotiledonare è fortemente collegato alla distensione e non alla proliferazione cellulare. Tuttavia, nei cotiledoni delle linee transgeniche si rilevano aumenti molto maggiori del numero totale di cellule epidermiche adassiali, che arrivano a raddoppiare nel caso della linea AtE2Fa #5 (106%) ed indicano che la sovraespressione dei fattori E2F “attivatori” è in grado di indurre un incremento della proliferazione cellulare nei cotiledoni anche durante le fasi successive alla germinazione.

Linea #	N° medio totale di cellule nello stadio I	N° medio totale di cellule nello stadio II	Incremento dallo stadio I allo stadio II
DcE2F 13	1102,2 ± 100,2	1359,6 ± 61,8	23 %
DcE2F 16	704,2 ± 100,6	1183,5 ± 52,6	68 %
AtE2Fa 1	892,8 ± 99,2	1478,4 ± 168,0	66 %
AtE2Fa 5	815,1 ± 85,8	1679,4 ± 93,3	106 %
AtE2Fb 7	913,5 ± 43,5	1285,2 ± 32,7	41 %
AtE2Fb 13	766,8 ± 42,6	998,2 ± 128,8	30 %
Col-0	490,0 ± 24,5	564,2 ± 36,4	15 %

Tabella 32. Numero medio totale di cellule epidermiche adassiali nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type ai due stadi di sviluppo ($\pm SE=SD/\sqrt{n}$).

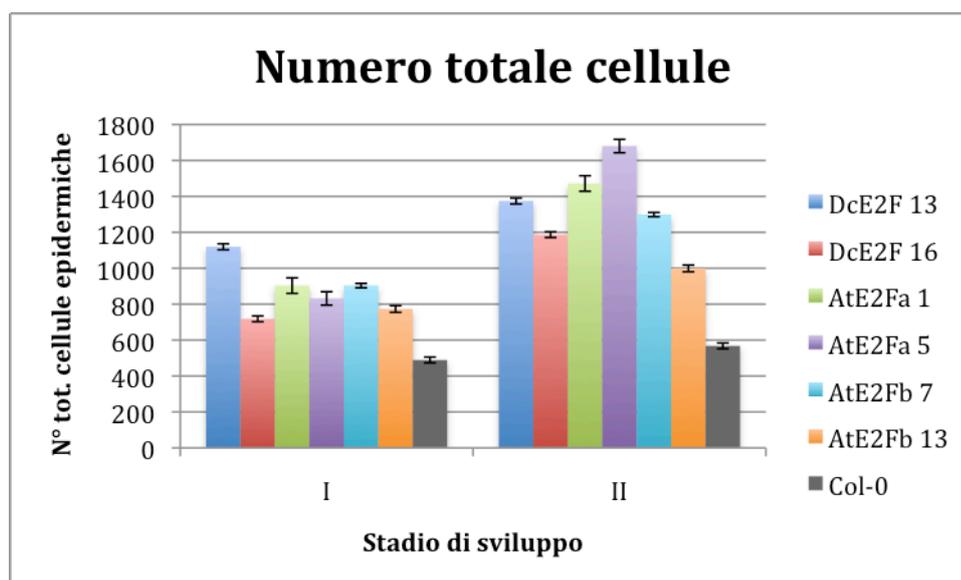


Figura 51. Numero medio totale di cellule dell'epidermide adassiale nei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type ai due stadi di sviluppo. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($SE=SD/\sqrt{n}$).

4.4.3. Misurazione dell'area delle cellule epidermiche nei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*

Per confermare le precedenti stime delle dimensioni delle cellule epidermiche cotiledonari, che risultano notevolmente ridotte nelle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione E2F, sono state effettuate misurazioni dirette tramite microscopia a contrasto per interferenza differenziale (DIC) sui germogli allo stadio I, con cotiledoni in accrescimento e un abbozzo della prima coppia di foglioline.

È stata misurata l'area di 1882 cellule epidermiche dei cotiledoni delle piantine transgeniche sovraesprimenti il fattore *DcE2F* (1223 cellule in 20 cotiledoni della linea #13 e 659 cellule in 12 cotiledoni della linea #16), 1549 cellule dei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fa* (809 cellule in 11 cotiledoni della linea #1 e 740 cellule in 9 cotiledoni della linea #5) e 1675 cellule dei cotiledoni delle piantine sovraesprimenti *AtE2Fb* (1148 cellule in 17 cotiledoni della linea #7 e 527 cellule in 6 cotiledoni della linea #13). Questi risultati sono stati comparati con quelli ottenuti dall'osservazione di 580 cellule in 15 cotiledoni delle piantine wild type allo stesso stadio di sviluppo.

Come descritto nella Tabella 33 e nella Figura 52, i valori medi delle effettive misurazioni sono risultati lievemente superiori ai valori stimati precedentemente ma hanno pienamente confermato il fatto che l'area delle cellule epidermiche dei cotiledoni delle linee transgeniche è circa dimezzata rispetto a quella delle cellule epidermiche dei cotiledoni wild type. Questo contribuisce a confermare l'induzione di un aumento della proliferazione cellulare in tutte le linee transgeniche a dimostrazione che la sovraespressione di *DcE2F* in piantine di *Arabidopsis thaliana* è in grado di generare gli stessi effetti ottenuti dalla sovraespressione di *AtE2Fa* o *AtE2Fb*.

Linea #	Area cellule epidermiche (μm^2)
DcE2F 13	2621 \pm 119
DcE2F 16	2238 \pm 104
AtE2Fa 1	2681 \pm 227
AtE2Fa 5	2831 \pm 265
AtE2Fb 7	2827 \pm 133
AtE2Fb 13	2753 \pm 160
Col-0	4894 \pm 236

Tabella 33. Area media misurata delle cellule epidermiche dei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type (\pm SE=SD/ \sqrt{n}).

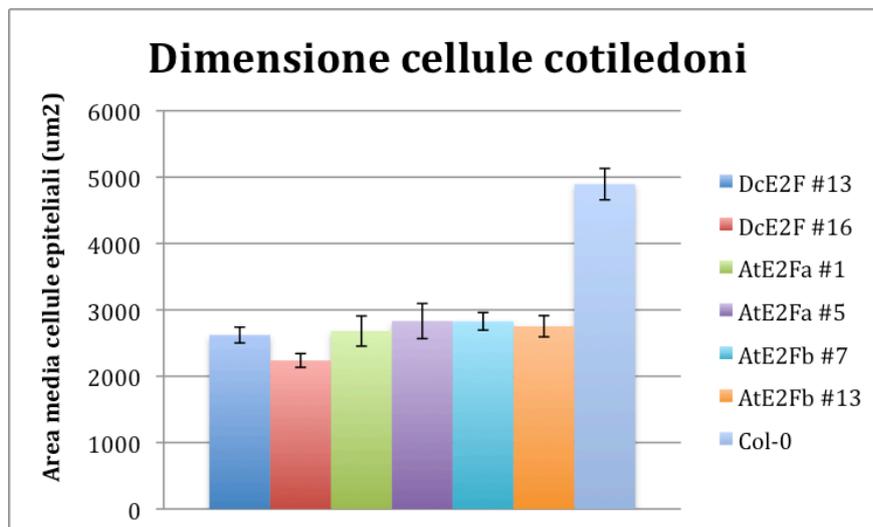


Figura 52. Area media misurata delle cellule epidermiche dei cotiledoni delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type. Le barre d'errore indicano l'errore standard (SE=SD/ \sqrt{n}).

4.4.4. Osservazione mediante microscopio a contrasto per interferenza differenziale (DIC) dei meristemi radicali delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*.

Per verificare se gli effetti sulla proliferazione cellulare fossero evidenti anche nel meristema radicale (RAM), il tessuto epidermico, corticale e della stele localizzati nei meristemi radicali delle piantine sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb* sono stati analizzati mediante microscopio a contrasto per interferenza differenziale (DIC) a tre diverse stadi di sviluppo. In particolare è stata misurata la lunghezza delle cellule e la lunghezza del tessuto, stimando il numero di cellule presenti, ed è stata misurata l'area del RAM delle piantine transgeniche, comparando questi risultati con quelli osservati su piantine wild type (Col-0). Tutte le misurazioni sono state effettuate sulle cellule meristematiche dell'apice radicale dal centro quiescente fino al punto di transizione.

4.4.4.1. Analisi del tessuto meristemico epidermico radicale

Per quanto riguarda il tessuto meristemico epidermico (protoderma) nei meristemi radicali delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*, la lunghezza delle cellule epidermiche nei RAM delle piantine è stata misurata a 5 ($26 \leq n \leq 81$), 10 ($48 \leq n \leq 143$) e 15 giorni d'età ($25 \leq n \leq 150$).

I dati complessivi delle misurazioni delle lunghezze cellulari medie nel protoderma radicale nei tre diversi stadi di sviluppo mostrati in Figura 53 e riassunti in Figura 54 rivelano come vi siano sostanziali differenze tra le linee transgeniche e le piantine wild type nel tessuto epidermico a 5 giorni d'età, ma queste differenze vanno scomparendo con l'avanzare dello sviluppo.

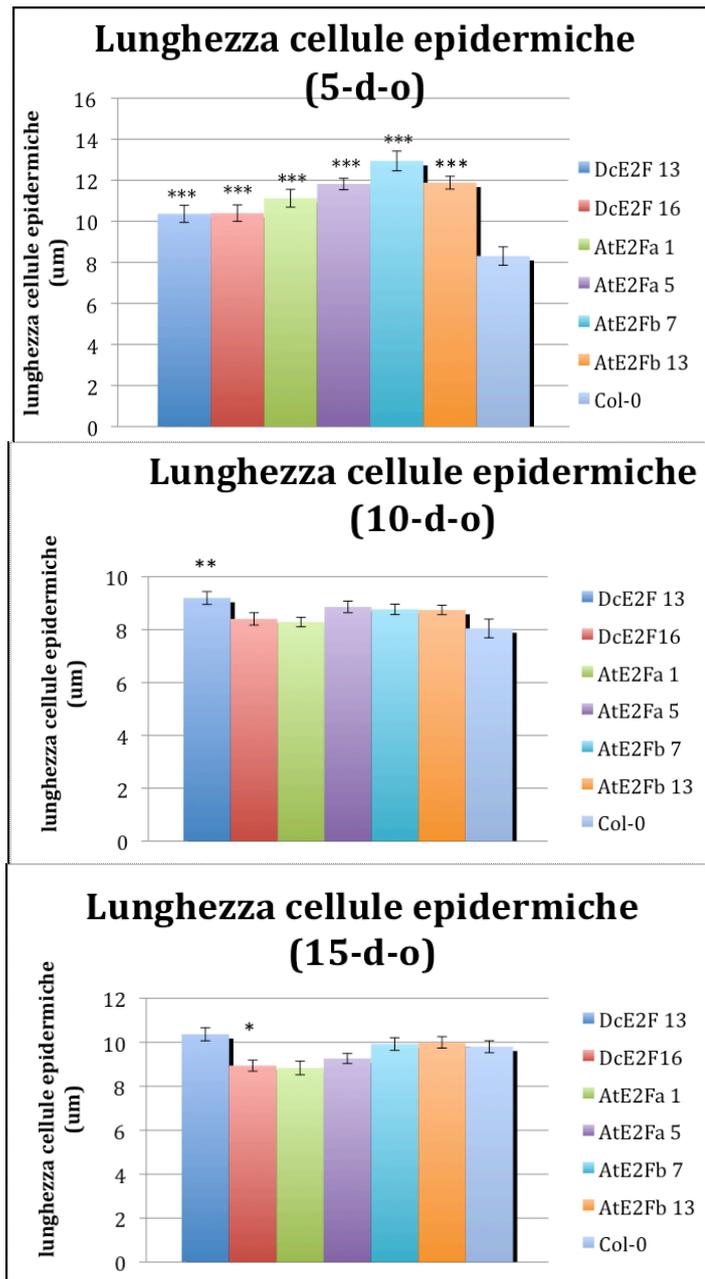


Figura 53. Lunghezza media (μm) delle cellule epidermiche nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell'unpaired *t* test (* = $0.05 < p \text{ value} < 0.02$, ** = $0.02 < p \text{ value} < 0.001$, *** = $p \text{ value} < 0.001$).

A 5 giorni d'età il test statistico *t* di student ha infatti mostrato differenze statisticamente altamente significative tra le linee transgeniche e le wild type, mentre a 10 giorni d'età solamente la linea DcE2F #13 mostra una differenza statisticamente significativa all'unpaired *t* test rispetto alle wild type. A 15 giorni d'età solamente la linea DcE2F #16 mostra una differenza leggermente statisticamente significativa all'unpaired *t* test rispetto alle wild type.

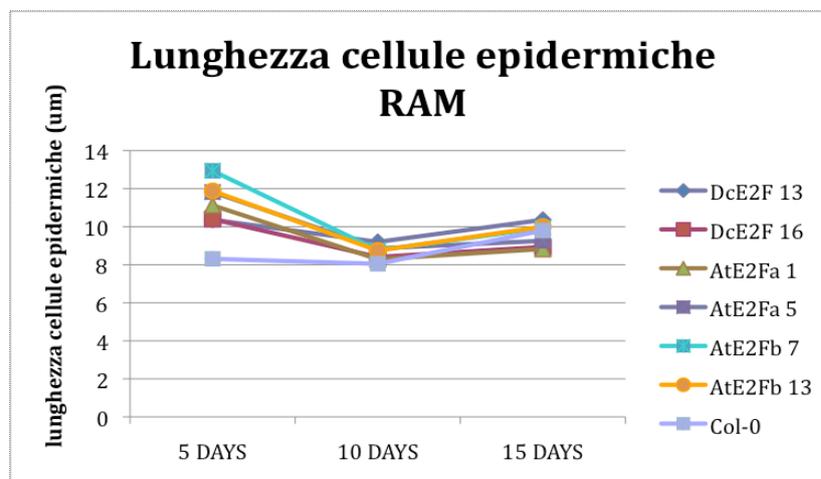


Figura 54. Lunghezza media (μm) delle cellule epidermiche nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

Anche per quanto riguarda la lunghezza del tessuto epidermico, sono stati osservati i RAM delle piantine a 5 ($4 \leq n \leq 6$), 10 ($n = 5$) e 15 giorni d'età ($n = 5$). Nel caso della lunghezza del tessuto epidermico le differenze fra le linee transgeniche e le wild type sono evidenti già nelle piantine a 5 giorni d'età ma, a differenza di quanto osservato per la lunghezza media delle cellule di questo tessuto, permangono in maniera più o meno marcata anche nelle fasi di sviluppo successive. I dati delle misurazioni nei tre diversi stadi di sviluppo sono rappresentati in Figura 55 e riassunti in Figura 56.

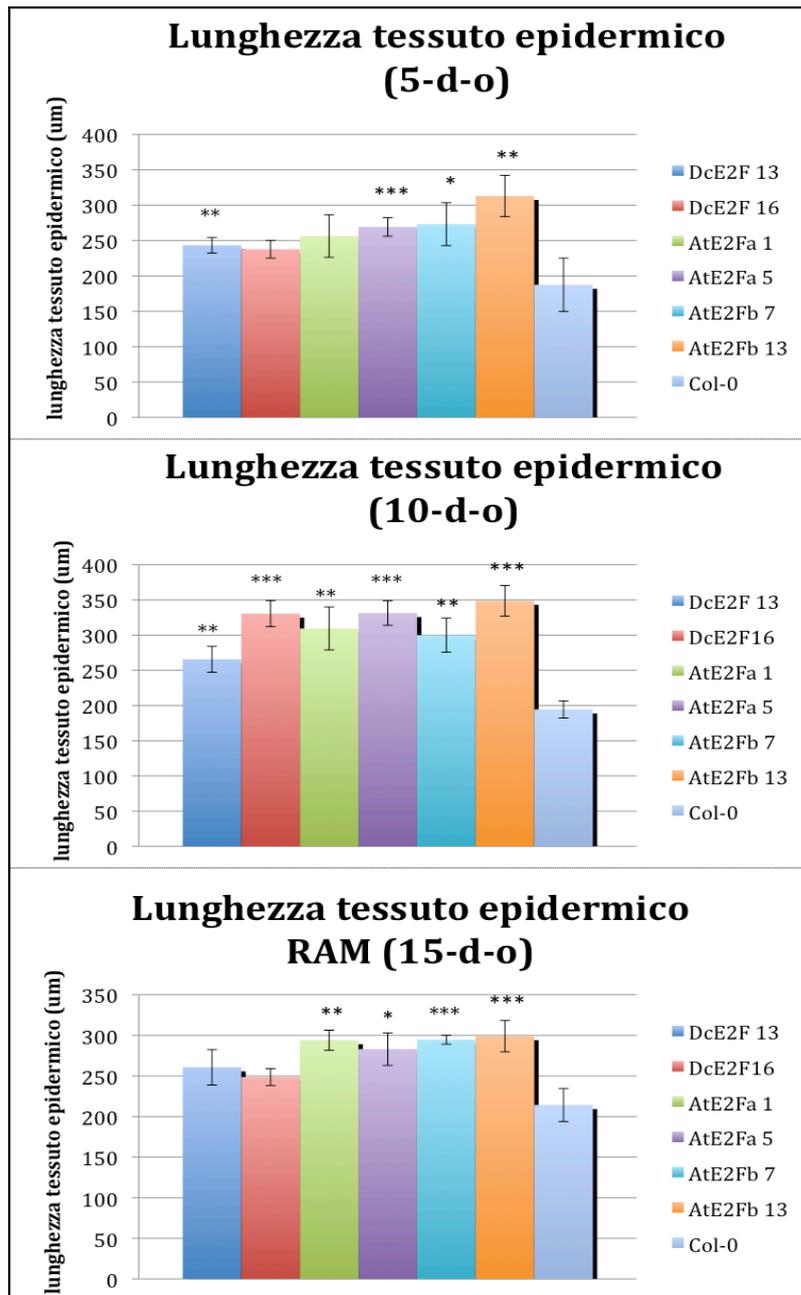


Figura 55. Lunghezza media (μm) del tessuto epidermico nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell'unpaired t test (* = $0.05 < p \text{ value} < 0.02$, ** = $0.02 < p \text{ value} < 0.001$, *** = $p \text{ value} < 0.001$).

A 5 giorni d'età il test statistico t di student ha mostrato differenze statisticamente significative tra le linee DcE2F #13, AtE2Fa #5, AtE2Fb #7 e #13 e le wild type. A 10 giorni d'età tutte le linee transgeniche mostrano differenze statisticamente significative all' unpaired t test rispetto alle wild type. A 15 giorni d'età il t test ha mostrato differenze significative tra le linee AtE2Fa #1 e #5, AtE2Fb #7 e #13 e le wild type.

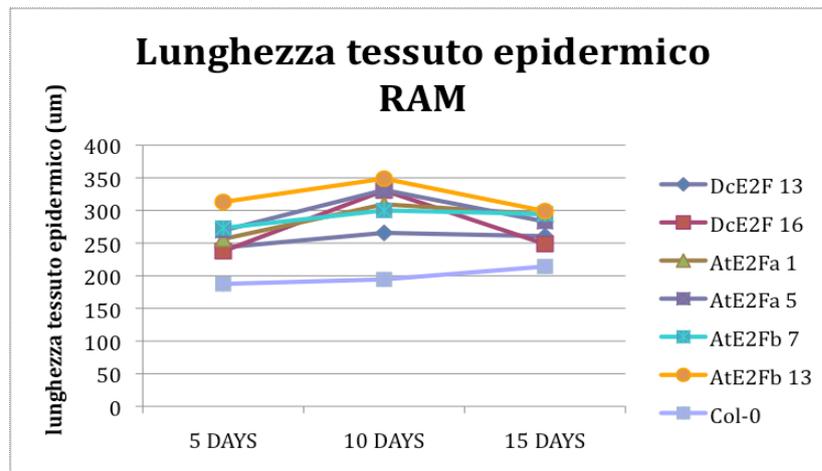


Figura 56. Lunghezza media (μm) del tessuto epidermico nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

In base ai dati ottenuti dalle misurazioni della lunghezza media del tessuto epidermico e dalla lunghezza media delle cellule epidermiche, è stato possibile stimare il numero di cellule epidermiche presenti nel meristema radicale, dividendo appunto la lunghezza media del tessuto per la lunghezza media delle cellule. I risultati complessivi del numero medio di cellule epidermiche nei tre stadi di sviluppo sono rappresentati in Figura 57 e riassunti in Figura 58, nella quale si nota che le differenze nel numero di cellule epidermiche meristematiche tra le linee transgeniche e le wild type sono marginali a 5 giorni di età ma risultano essere molto più marcate a 10 giorni, dopodichè queste differenze vanno diminuendo a 15 giorni di età.

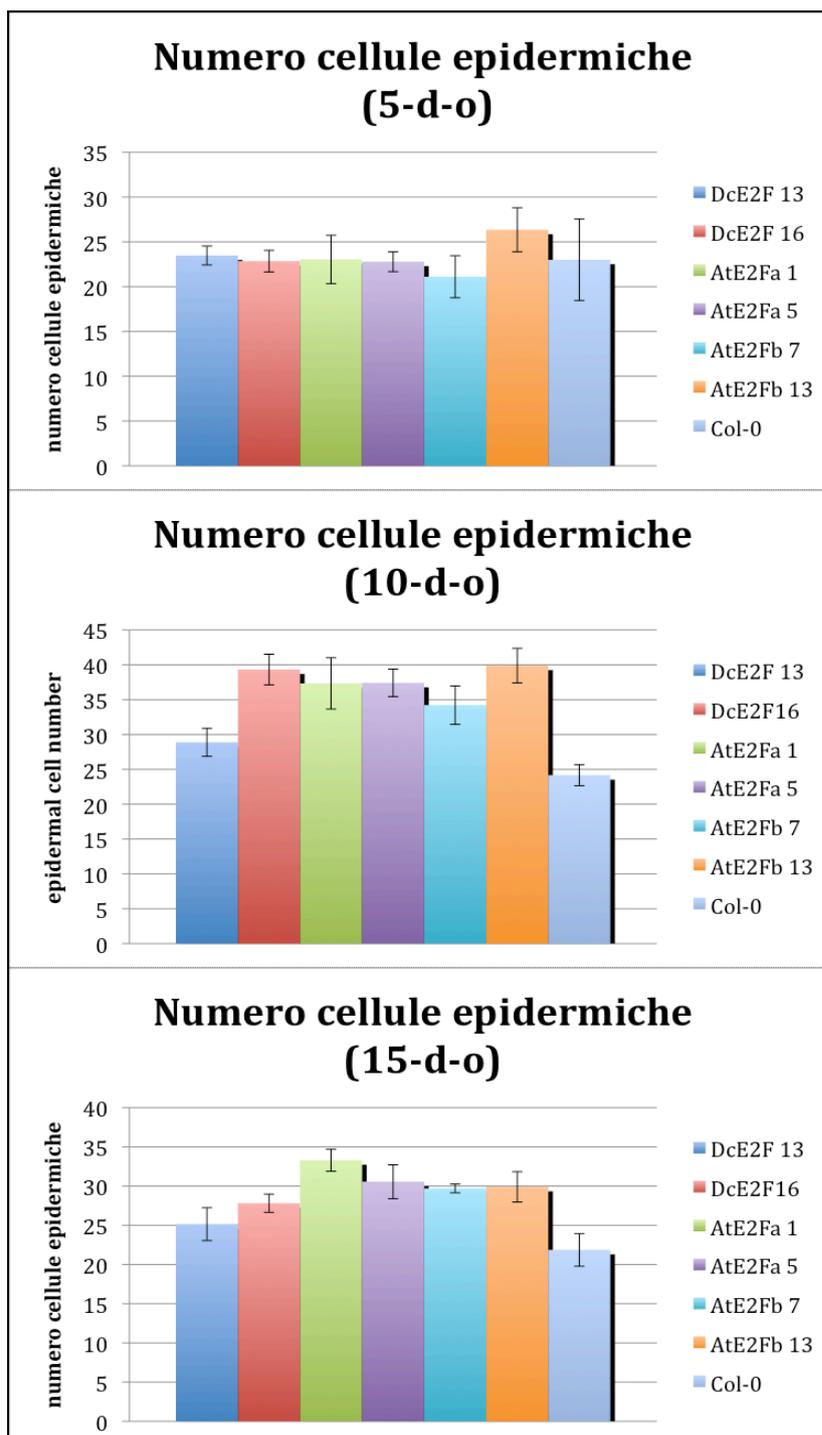


Figura 57. Stima del numero medio di cellule epidermiche nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm SE=SD/\sqrt{n}$).

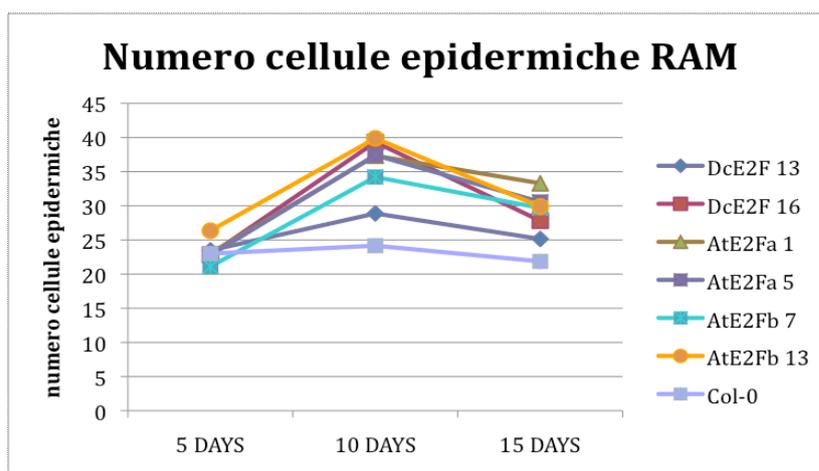


Figura 58. Stima del numero medio di cellule epidermiche nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

A 5 giorni d'età non sono state trovate grosse differenze fra il numero di cellule epidermiche nei meristemi delle piantine transgeniche e delle wild type, quindi l'aumento della lunghezza del tessuto epidermico a quest'età risulta essere collegato unicamente all'aumento della lunghezza delle cellule epidermiche. A 10 giorni d'età invece vi sono differenze nel numero di cellule epidermiche fra i meristemi delle piantine transgeniche e delle wild type ma non vi sono differenze significative nella lunghezza delle cellule, quindi l'aumento della lunghezza del tessuto epidermico a quest'età può essere spiegata con l'aumento nel numero di cellule. Infine, a 15 giorni d'età le differenze fra il numero di cellule epidermiche nelle piantine transgeniche rispetto alle wild type sono meno forti, ma sufficienti a determinare un aumento nella lunghezza del tessuto epidermico in quanto la lunghezza media delle cellule rimane costante.

4.4.4.2. Analisi del tessuto meristemato corticale radicale

La lunghezza media delle cellule corticali è stata misurata osservando i RAM delle piantine a 5 ($24 \leq n \leq 77$), 10 ($54 \leq n \leq 134$) e 15 giorni d'età ($101 \leq n \leq 122$). I dati delle misurazioni ai tre diversi stadi di sviluppo sono mostrati in Figura 59 ed i dati complessivi sono riassunti in Figura 60.

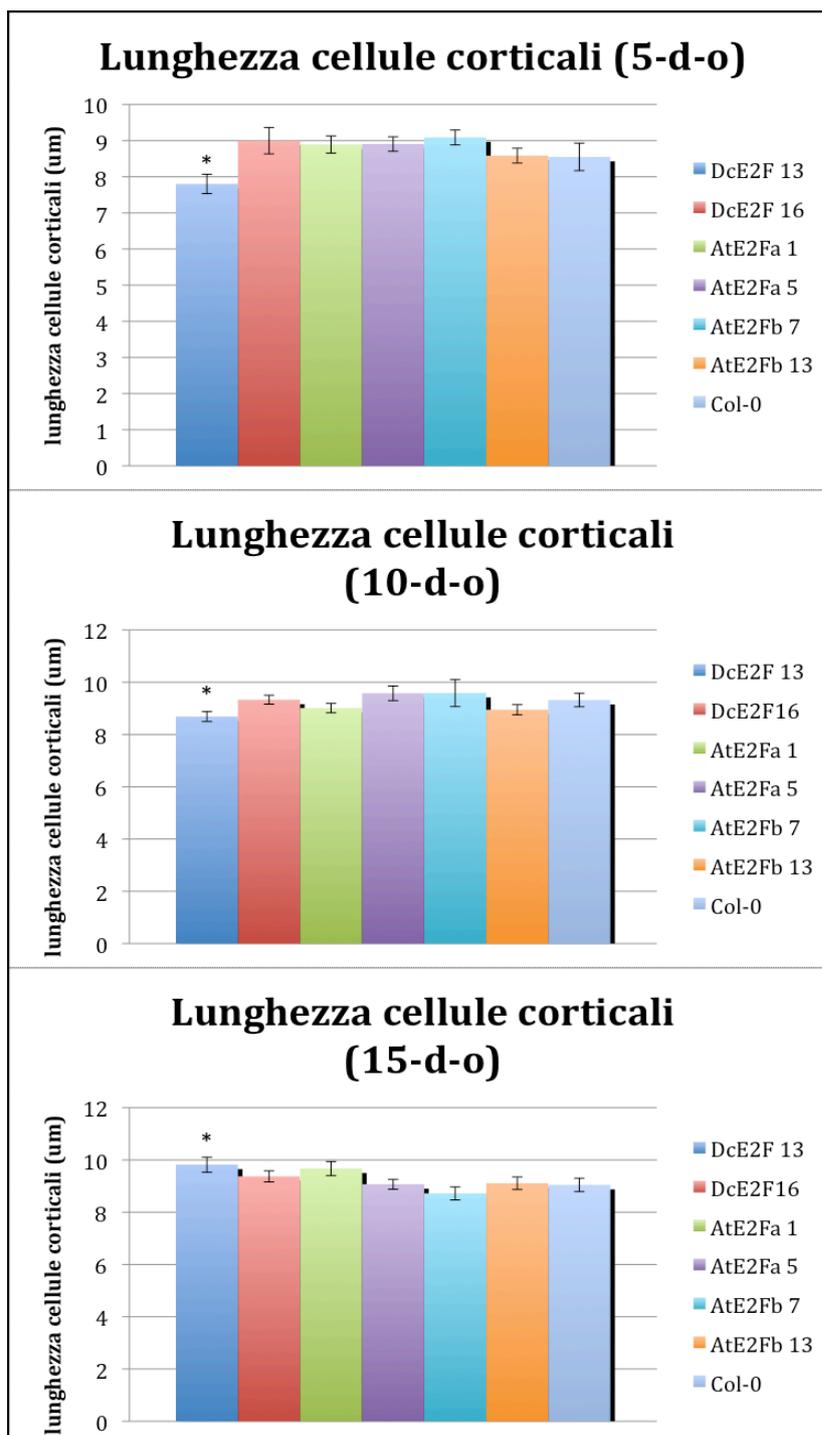


Figura 59. Lunghezza media (μm) delle cellule corticali nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell'unpaired t test ($* = 0.05 < p \text{ value} < 0.02$).

A 5, 10 e 15 giorni d'età il test statistico t di student ha mostrato differenze statisticamente significative solamente tra la linea DcE2F #13 e le wild type, evidenziando quindi che non vi sono sostanziali differenze tra le linee transgeniche e le piantine wild type nel tessuto corticale nelle diverse fasi di sviluppo, ad eccezione per la linea DcE2F #13.

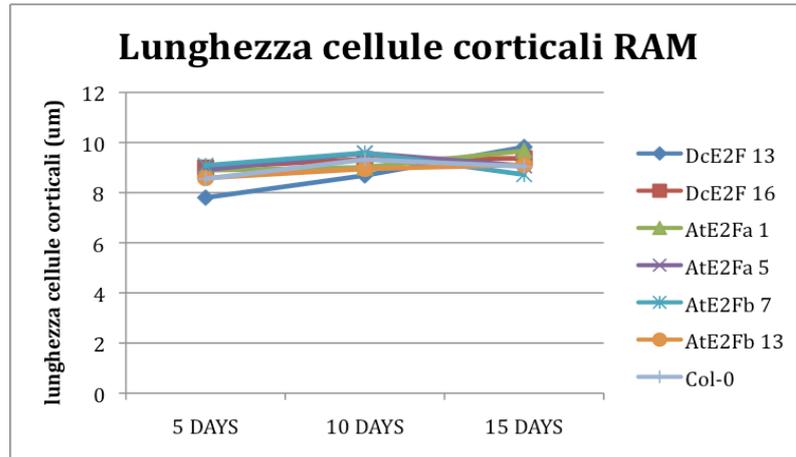


Figura 60. Lunghezza media (μm) delle cellule corticali nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

Per quanto riguarda la lunghezza del tessuto corticale, sono stati osservati i RAM delle piantine a 5 ($4 \leq n \leq 5$), 10 ($n = 5$) e 15 giorni d'età ($n = 5$). I dati delle misurazioni ai tre diversi stadi di sviluppo sono mostrati in Figura 61 ed i dati complessivi sono riassunti in Figura 62.

A 5 e 10 giorni d'età il test statistico t di student ha mostrato differenze statisticamente significative tra le linee transgeniche e le wild type, mentre a 15 giorni d'età il t test ha mostrato differenze significative solo tra la linea AtE2Fb #7 e le wild type.

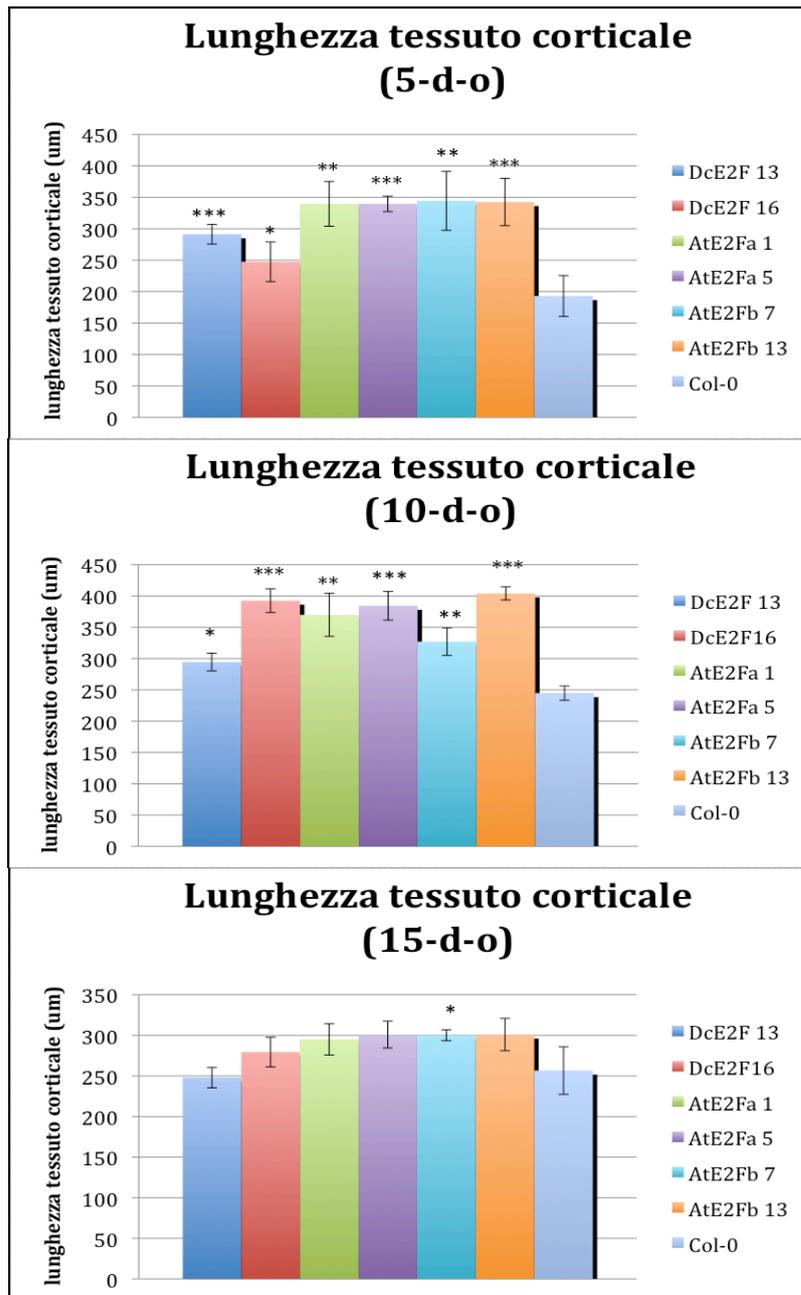


Figura 61. Lunghezza media (μm) del tessuto corticale nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell'unpaired t test (* = $0.05 < p \text{ value} < 0.02$, ** = $0.02 < p \text{ value} < 0.001$, *** = $p \text{ value} < 0.001$).

Nel caso della lunghezza del tessuto corticale quindi, a differenza di quanto osservato per il tessuto epidermico, le differenze fra le linee transgeniche e le wild type sono ben evidenti già nelle piantine a 5 giorni d'età e permangono, in maniera più o meno marcata, anche a 10 giorni d'età, mentre vanno successivamente scomparendo.

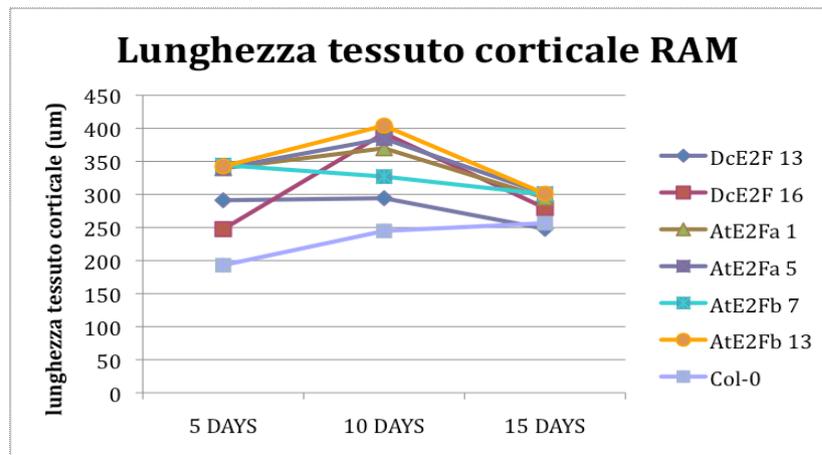


Figura 62. Lunghezza media (μm) del tessuto corticale nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

In base ai dati ottenuti dalle misurazioni della lunghezza media del tessuto corticale e dalla lunghezza media delle cellule, è stato possibile anche in questo caso stimare il numero di cellule presenti nel meristema corticale radicale, dividendo appunto la lunghezza media del tessuto per la lunghezza media delle cellule. I risultati complessivi del numero medio di cellule corticali nei tre stadi di sviluppo sono mostrati in Figura 63 e riassunti in Figura 64.

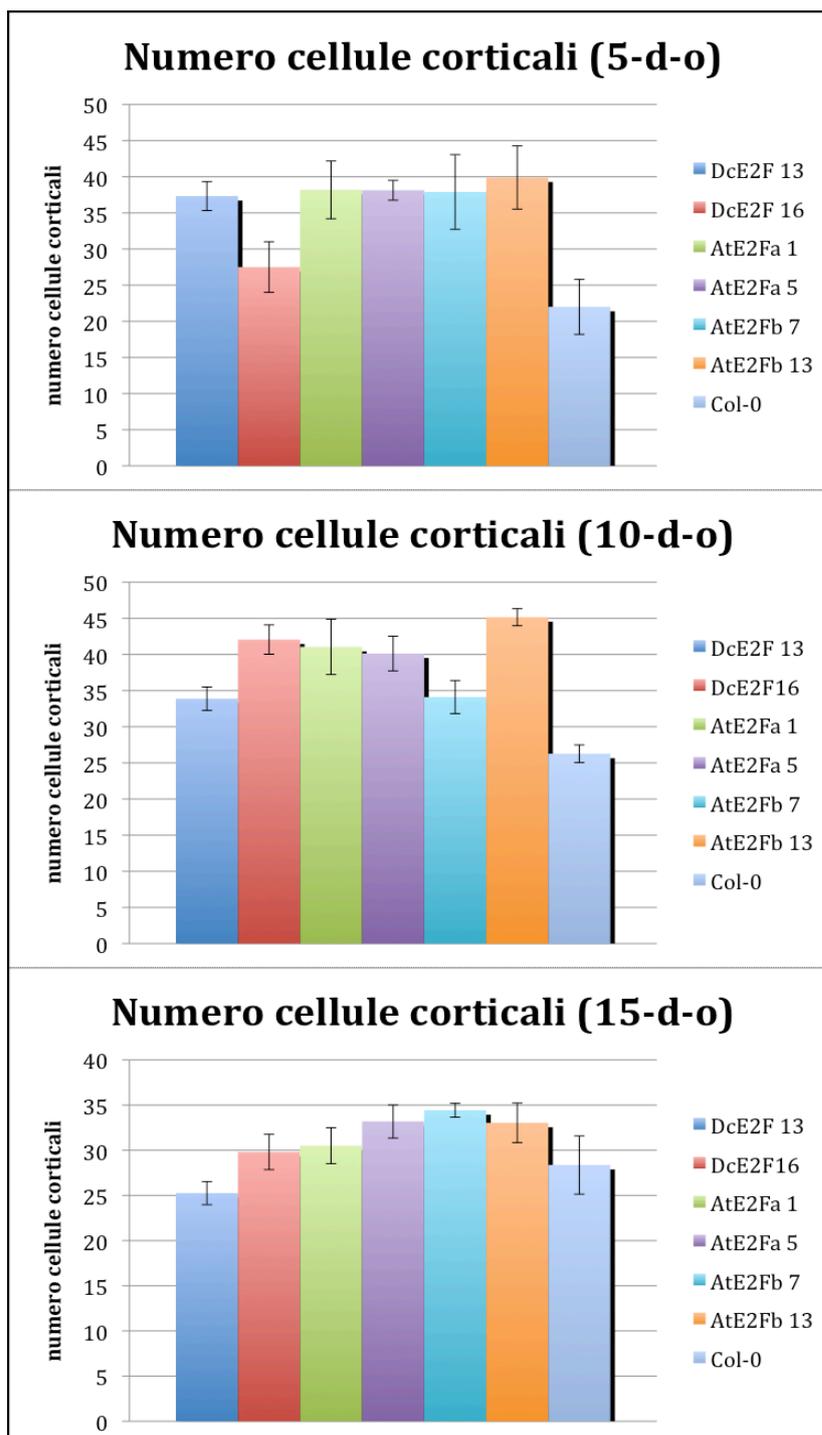


Figura 63. Stima del numero medio di cellule corticali nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm SE=SD/\sqrt{n}$).

A 5 giorni d'età il numero di cellule corticali nei meristemi delle piantine transgeniche è aumentato rispetto alle wild type, a eccezione fatta della linea DcE2F #16 che presenta valori invariati. L'aumento della lunghezza del tessuto corticale rilevato può essere quindi principalmente collegato all'aumento del numero di cellule corticali in quanto non vi erano sostanziali differenze nella lunghezza cellulare. A 10 giorni d'età vi sono differenze, più o meno marcate, nel numero di cellule corticali fra i meristemi delle piantine transgeniche e le wild type, ma poiché non ve ne erano di significative nella lunghezza delle cellule, anche a questo stadio di sviluppo l'aumento della lunghezza del tessuto corticale può essere spiegata solamente con l'aumento del numero di cellule in questo tessuto. A 15 giorni d'età le differenze fra il numero di cellule corticali nelle piantine transgeniche rispetto alle wild type sono meno forti, e la lunghezza delle cellule rimane costante. Infatti anche la lunghezza del tessuto corticale in questo stadio di sviluppo non mostra differenze tra le linee transgeniche e le wild type. È evidente quindi che anche per il tessuto meristemico corticale, come visto per il tessuto epidermico, le differenze nel numero di cellule tra le linee transgeniche e le wild type vanno scomparendo con lo sviluppo.

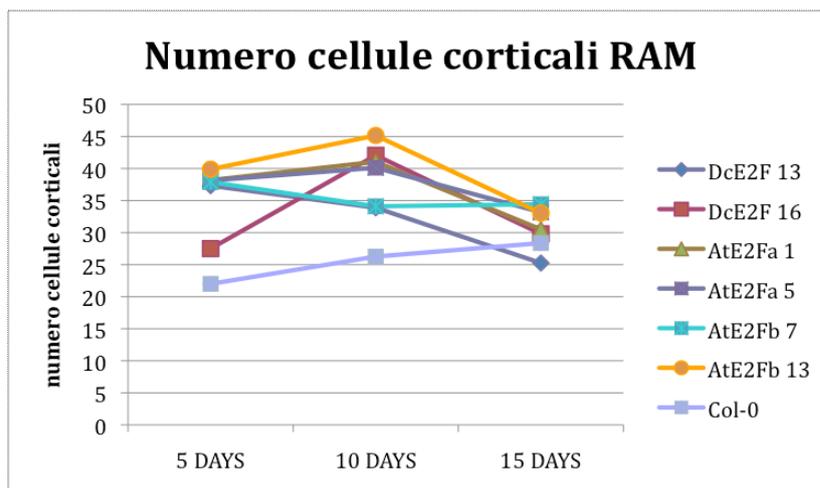


Figura 64. Stima del numero medio di cellule corticali nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

4.4.4.3. Analisi del tessuto meristemico della stele nei meristemi radicali

Per quanto riguarda infine il tessuto della stele nei meristemi radicali delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*, anche in questo caso è stata misurata mediante l'utilizzo del microscopio ottico a contrasto differenziale (DIC) la lunghezza delle cellule, la lunghezza dell'intero tessuto della stele nel meristema radicale e stimato il numero di cellule presenti in questo tessuto come rapporto tra le due lunghezze.

È stata misurata la lunghezza media delle cellule corticali osservando i RAM delle piantine a 5 ($34 \leq n \leq 79$), 10 ($51 \leq n \leq 133$) e 15 giorni d'età ($92 \leq n \leq 112$).

A 5 e 10 giorni d'età il test statistico *t* di student non ha mostrato differenze statisticamente significative tra le linee transgeniche e le wild type.

Invece a 15 giorni d'età si è osservato un leggero aumento delle dimensioni cellulari nelle linee *DcE2F* #13 ed *AtE2Fa* #5 rispetto alle wild type, mostrando quindi che le cellule della stele assumono un comportamento diverso durante le diverse fasi di sviluppo rispetto a quello delle cellule epidermiche e corticali, poichè non vi sono differenze statisticamente significative nei primi stadi di sviluppo, ed iniziano a comparire, seppur lievi, solamente a 15 giorni d'età in alcune linee transgeniche, quando ormai il meristema radicale dovrebbe aver raggiunto le sue dimensioni definitive.

I dati delle misurazioni ai tre diversi stadi di sviluppo sono mostrati in Figura 65 ed i dati complessivi sono riassunti in Figura 66.

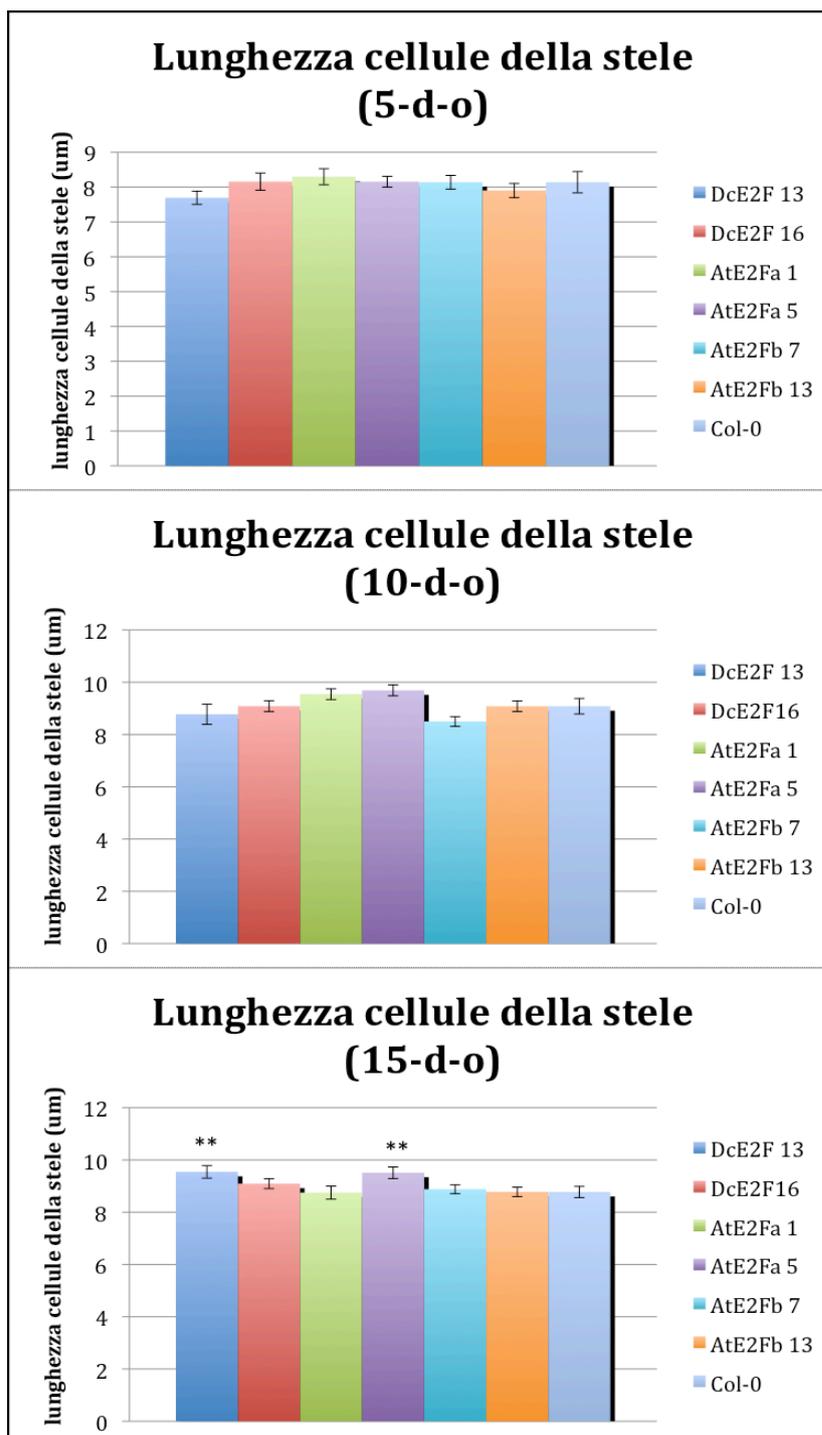


Figura 65. Lunghezza media (μm) delle cellule della stele nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell'unpaired *t* test (** = $0.02 < p \text{ value} < 0.001$).

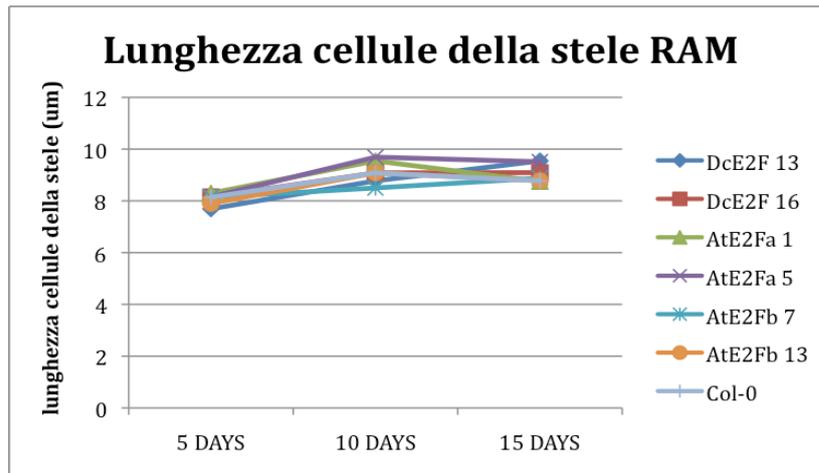


Figura 66. Lunghezza media (μm) delle cellule della stele nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

Per quanto riguarda la lunghezza del tessuto della stele, è stato misurato anche in questo caso a partire dal centro quiescente fino al punto di transizione, dove inizia l'allungamento cellulare. Sono stati osservati i RAM delle piantine a 5 ($4 \leq n \leq 5$), 10 ($n = 5$) e 15 giorni d'età ($4 \leq n \leq 5$).

A 5 giorni d'età il test *t* di student ha mostrato differenze statisticamente significative tra le linee transgeniche e le wild type, a eccezione per la linea DcE2F #16.

A 10 giorni d'età invece tutte le linee transgeniche mostrano differenze statisticamente significative all' unpaired *t* test rispetto alle wild type.

A 15 giorni d'età il *t* test non ha mostrato invece differenze significative tra le linee transgeniche e le wild type.

Nel caso della lunghezza del tessuto della stele, come per quello epidermico e corticale, le differenze fra le linee transgeniche e le wild type sono ben evidenti già nelle piantine a 5 giorni d'età e permangono, in maniera più o meno marcata, anche a 10 giorni d'età, mentre a 15 giorni d'età vanno scomparendo.

I dati delle misurazioni ai tre diversi stadi di sviluppo sono mostrati in Figura 67 ed i dati complessivi sono riassunti in Figura 68.

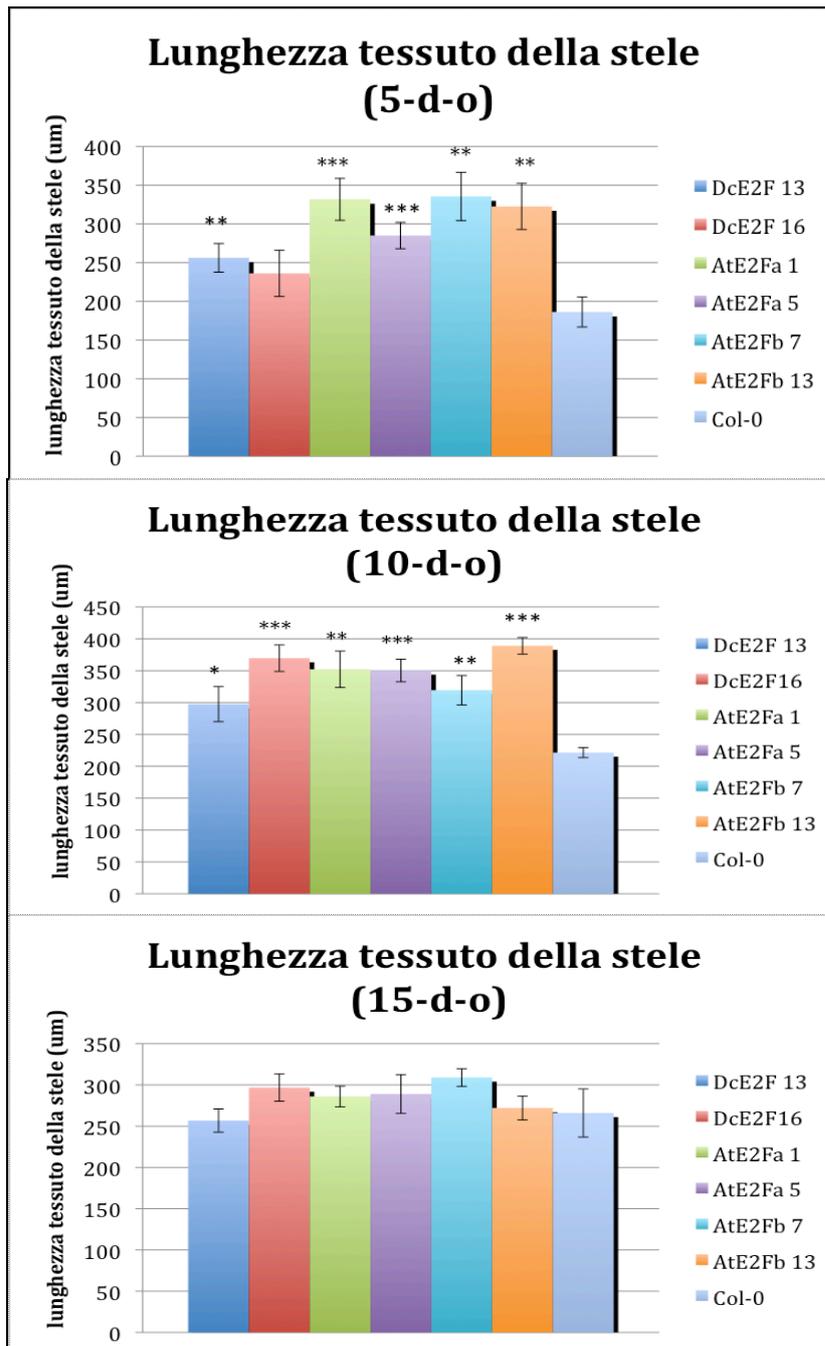


Figura 67. Lunghezza media (μm) del tessuto della stele nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell' unpaired *t* test (* = $0.05 < p \text{ value} < 0.02$, ** = $0.02 < p \text{ value} < 0.001$, *** = $p \text{ value} < 0.001$).

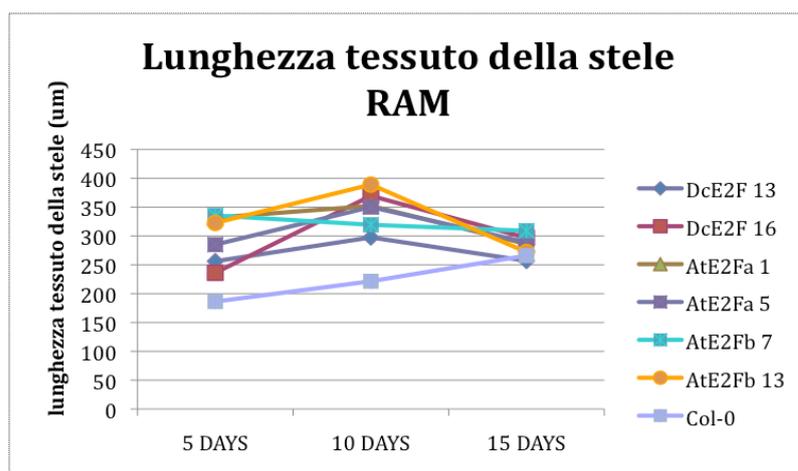


Figura 68. Lunghezza media (μm) del tessuto della stele nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

Si è proceduto come per il tessuto epidermico e corticale, per stimare il numero di cellule della stele presenti nel meristema radicale, dividendo la lunghezza media del tessuto per la lunghezza media delle cellule.

Sia a 5 che a 10 giorni d'età il numero di cellule della stele nei meristemi delle piantine transgeniche è aumentato rispetto alle wild type e l'aumento della lunghezza del tessuto può essere spiegata da un aumentato numero di cellule in quanto non vi erano sostanziali differenze nella lunghezza cellulare. A 15 giorni d'età le differenze fra il numero di cellule corticali nelle piantine transgeniche rispetto alle wild type sono molto meno forti ed anche a questa età la lunghezza delle cellule è rimasta pressochè costante. Infatti anche la lunghezza del tessuto della stele in questo stadio di sviluppo non mostra differenze tra le linee transgeniche e le wild type.

I risultati complessivi del numero medio di cellule corticali nei tre stadi di sviluppo sono mostrati in Figura 69 e riassunti in Figura 70, nella quale si può appunto notare che, come visto anche per i tessuti epidermico e corticale, le differenze nel numero di cellule della stele tra le linee transgeniche e le wild type vanno scomparendo con lo sviluppo.

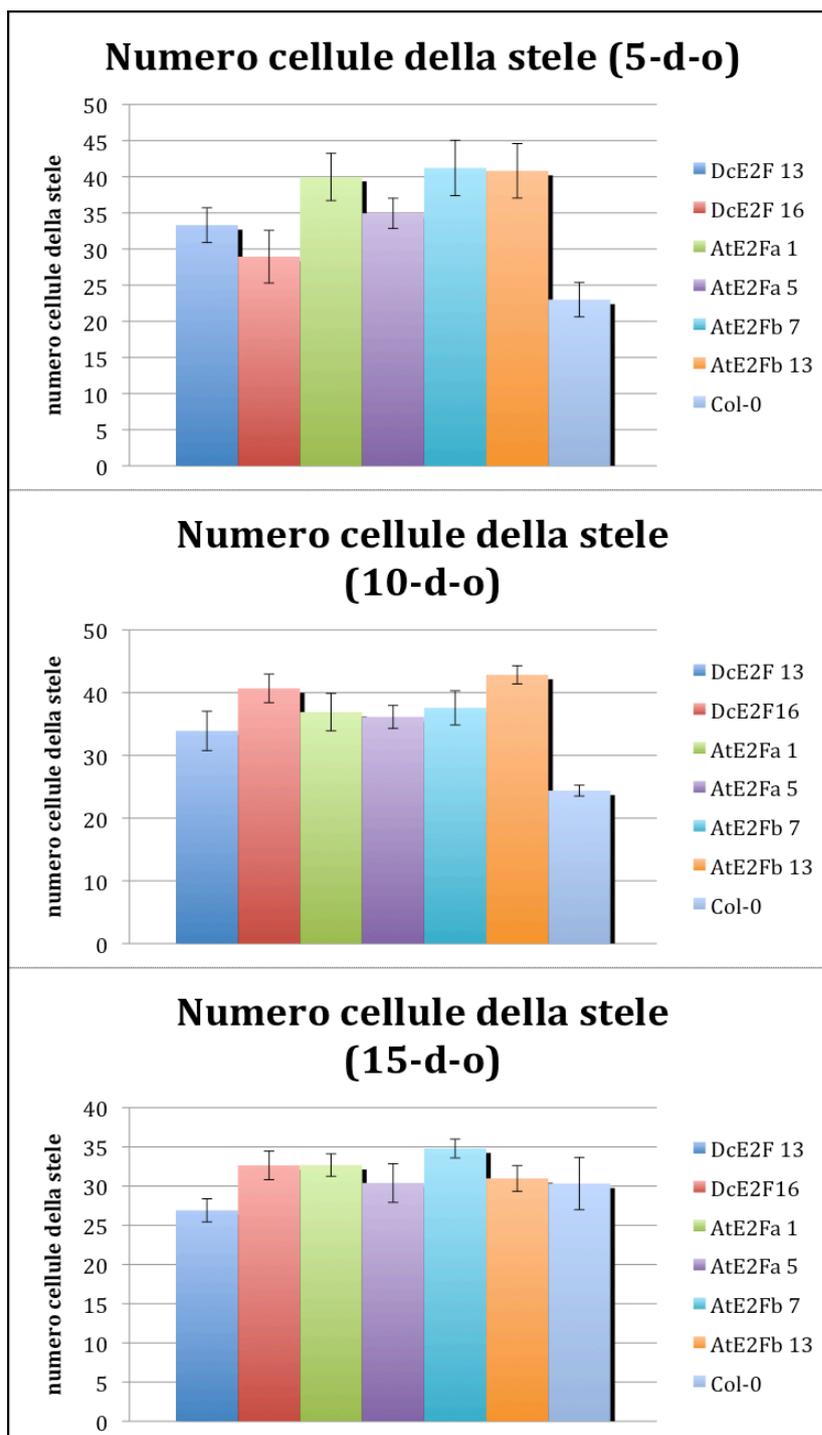


Figura 69. Stima del numero medio di cellule della stele nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm SE=SD/\sqrt{n}$).

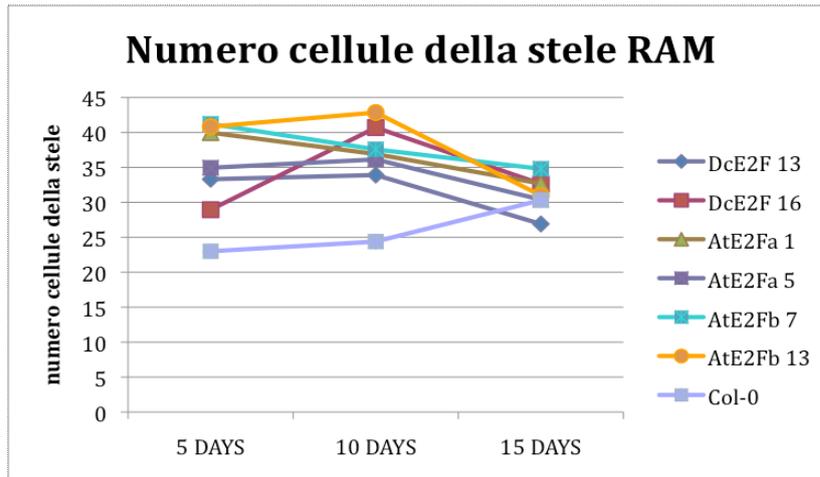


Figura 70. Stima del numero medio di cellule della stele nei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

4.4.4.4. Analisi delle dimensioni dei meristemi radicali

Per completare l'analisi sui meristemi radicali delle piantine sovraesprimenti *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb* si è proceduto alla misurazione dell'intero meristema radicale. Sono stati osservati i RAM delle piantine a 5 ($4 \leq n \leq 5$), 10 ($n = 5$) e 15 giorni d'età ($n = 5$).

A 5 giorni d'età il test statistico *t* di student ha mostrato differenze statisticamente significative tra le piantine wild type e quasi tutte le linee transgeniche, a eccezione della linea *DcE2F* #16. Anche a 10 giorni d'età il *t* test statistico ha mostrato differenze statisticamente significative, a eccezione stavolta della linea *DcE2F* #13. Infine a 15 giorni d'età il *t* test ha mostrato differenze statisticamente significative solo tra le wild type e le linee transgeniche *AtE2Fa* #1 e #5, *AtE2Fb* #7 e #13.

Si può quindi notare come, globalmente, vi sono differenze statisticamente significative tra l'area dei meristemi radicali delle piantine transgeniche rispetto alle wild type nelle diverse fasi di sviluppo. I risultati complessivi dell'area media dei meristemi radicali nei tre stadi di sviluppo sono rappresentati in Figura 71 e riassunti in Figura 72.

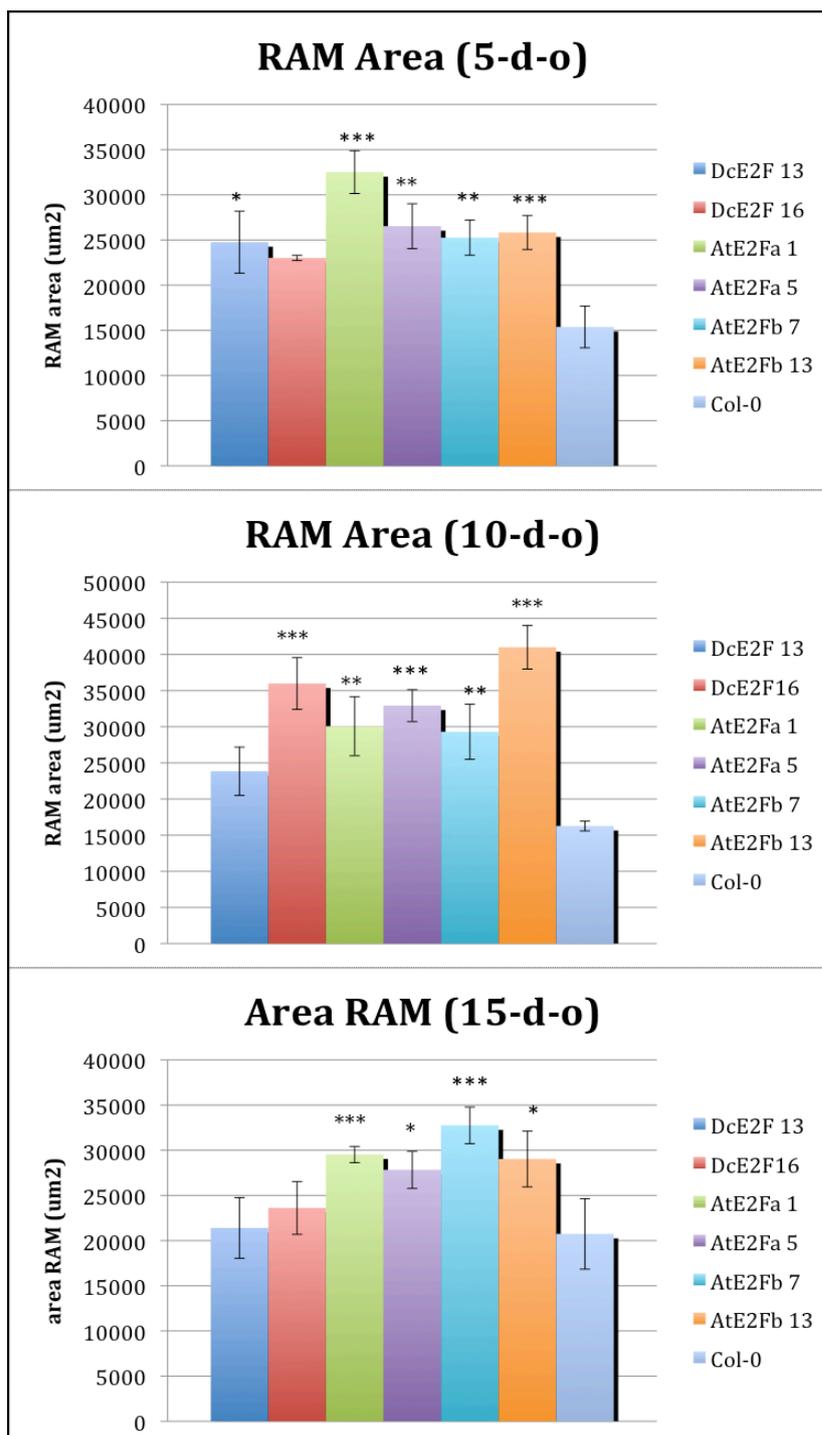


Figura 71. Area media (μm^2) dei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età. Le barre d'errore indicano l'errore standard ($\pm \text{SE} = \text{SD}/\sqrt{n}$). Gli asterischi indicano il risultato dell' unpaired t test (* = $0.05 < p \text{ value} < 0.02$, ** = $0.02 < p \text{ value} < 0.001$, *** = $p \text{ value} < 0.001$).

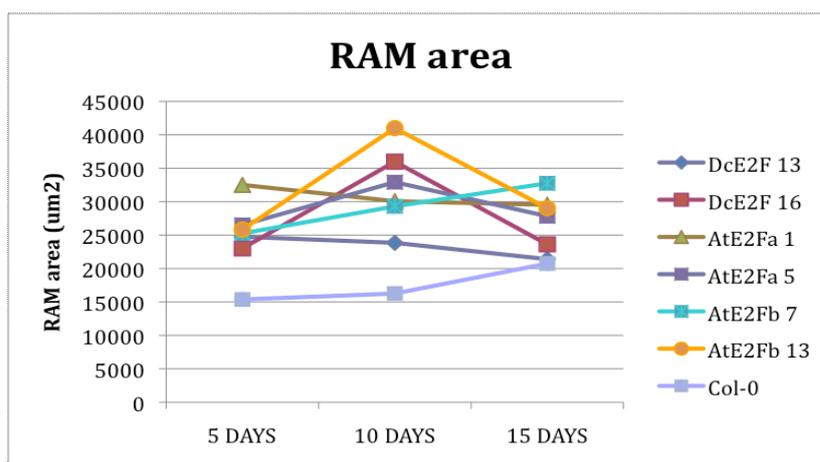


Figura 72. Area media dei RAM delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type a 5, 10 e 15 giorni d'età.

4.4.5. Misurazione delle radici primarie delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*

Poichè un aumento della proliferazione cellulare potrebbe essere collegato ad un aumento nella velocità di crescita o nella dimensione di alcuni organi, è stata effettuata una misurazione della lunghezza delle radici primarie delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb* a 3, 8, 13 e 18 giorni dopo la germinazione (days after germination, DAG), per verificare se vi fossero differenze tra le linee sovraesprimenti i fattori E2F e piantine wild type (Columbia-0) della stessa età.

Tutte le misurazioni effettuate nei 4 diversi stadi di sviluppo hanno mostrato radici primarie più lunghe nelle linee trasformanti rispetto alle wild type, con differenze altamente statisticamente significative al test statistico unpaired *t* di student (con *p* value <0,001), ma la velocità di crescita sembra costante. I risultati complessivi sono rappresentati nella Figura 73.

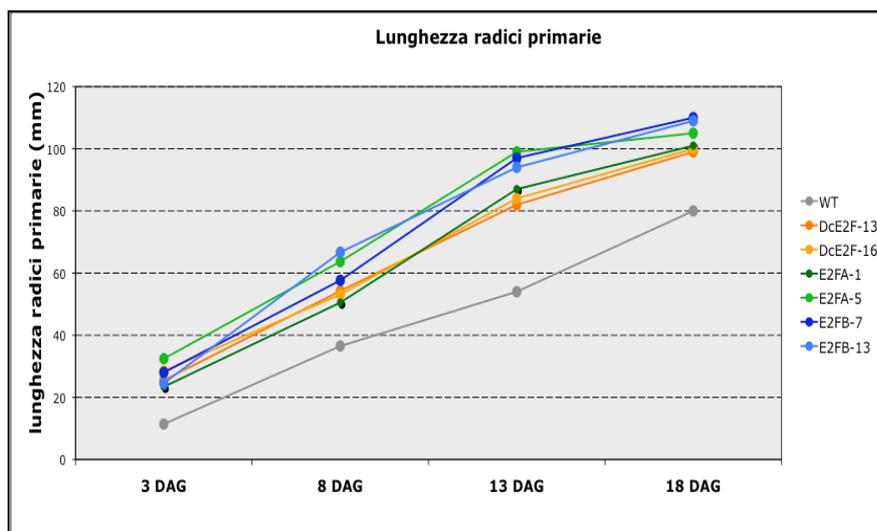


Figura 73. Lunghezza media (mm) delle radici primarie delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type, a 3, 8, 13 e 18 giorni dopo la germinazione (DAG).

4.4.6. Studio sulla germinabilità dei semi delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*.

La velocità di accrescimento delle radici non sembra essere molto diversa nelle linee transgeniche ma la lunghezza media delle radici primarie risulta essere significativamente maggiore nelle linee transgeniche rispetto alle piantine wild type. Questo risultato potrebbe dipendere da un aumento nella velocità di crescita durante i primi stadi di sviluppo dopo la germinazione o da un'anticipata germinazione di questi semi. Per verificare quale di queste ipotesi possa essere reale, è stato effettuato uno studio sulla germinabilità di semi delle piantine sovraesprimenti i fattori *DcE2F*, *AtE2Fa* ed *AtE2Fb*, cresciuti, raccolti e conservati tutti insieme e nelle stesse condizioni.

Da un'osservazione preliminare è emerso che i semi delle linee transgeniche germinano effettivamente in anticipo rispetto ai semi wild type, ad eccezione fatta per la linea *AtE2Fa* #1, che ha presentato invece valori simili (Fig. 74). Uno studio più approfondito e su diversi batch di semi sarà tuttavia necessario per

confermare questa osservazione, che spiegherebbe in effetti come mai le radici primarie delle linee transgeniche sono più lunghe ma crescono alla stessa velocità delle radici primarie delle piantine wild type.

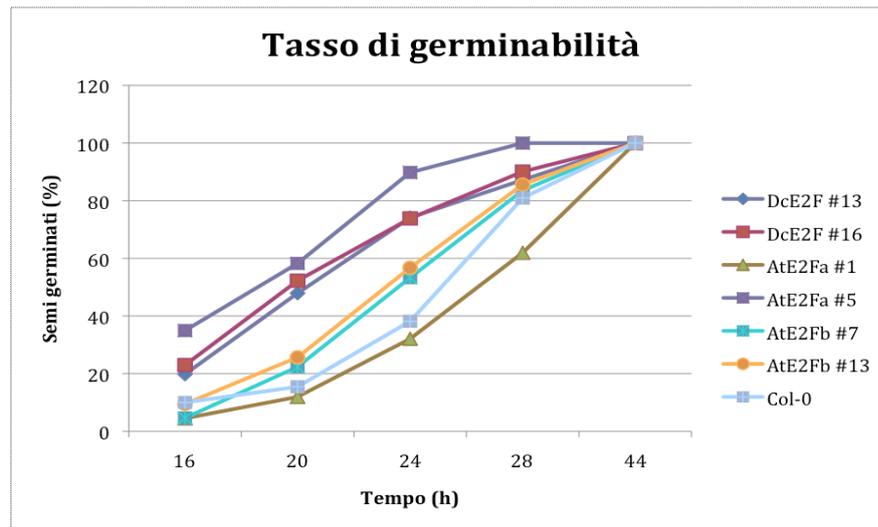


Figura 74. Tasso di germinabilità dei semi delle linee transgeniche sovraesprimenti i fattori di trascrizione *DcE2F*, *AtE2Fa*, *AtE2Fb* e delle piantine wild type. Il tempo è riferito come tempo di incubazione a 22 °C subito dopo la stratificazione.

5. Discussione

I fattori di trascrizione E2F sono importanti regolatori di geni coinvolti nella sintesi del DNA e nella progressione del ciclo cellulare sia negli animali che nelle piante. Questo studio si è focalizzato sulla caratterizzazione funzionale del fattore di trascrizione DcE2F di *Daucus carota* e la definizione del suo proposto coinvolgimento nel controllo della proliferazione cellulare. Questo fattore di trascrizione è stato uno dei primi fattori E2F vegetali descritti in letteratura ed è stato il primo per il quale è stata dimostrata una capacità transattivante (Albani et al. 2000). La descrizione di DcE2F ha infatti preceduto l'identificazione dei fattori E2F presenti nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* (Mariconti et al. 2002, Kosugi and Ohashi 2002a, 2002b) che hanno portato alla scoperta di fattori E2F cosiddetti "atipici", per i quali sono previste funzioni repressive, strutturalmente distinti dagli E2F "tipici", simili a DcE2F ed a tutti gli altri E2F animali e vegetali conosciuti sino ad allora, per i quali sono state proposte funzioni sia di attivazione che di repressione genica. È stato visto infatti che gli E2F, sia animali che vegetali, possono svolgere dei compiti anche opposti a quelli previsti. I siti di regolazione E2F possono essere coinvolti sia nell'attivazione che nella repressione della trascrizione genica. La repressione, nel caso degli E2F "tipici" di *Arabidopsis thaliana*, è proposta per AtE2Fc (del Pozo et al., 2002, 2006), che gioca un ruolo negativo nel controllo della proliferazione cellulare, mentre AtE2Fa e AtE2Fb sono considerati essere attivatori trascrizionali e sono stati dimostrati essere in grado di promuovere la proliferazione cellulare (Rossignol et al., 2002; Magyar et al., 2005). Per AtE2Fa è stato proposto anche un ruolo nella promozione dell'endoreduplicazione (De Veylder et al., 2002), che non sembra essere valido per AtE2Fb nei confronti del quale è stato proposto un possibile controllo trascrizionale da parte di AtE2Fa (Sozzani et al., 2006).

Questo studio ha confermato le possibili funzioni di promozione della proliferazione cellulare da parte del fattore DcE2F, già ipotizzate in base alle informazioni precedentemente acquisite (Albani et al., 2000) che, in virtù delle forti capacità transattivanti, lo accumulavano agli E2F "tipici" ed "attivatori" di *Arabidopsis thaliana*, AtE2Fa e AtE2Fb.

Il ruolo di DcE2F nella promozione della proliferazione cellulare, anche se era in effetti prevedibile, andava comunque confermato. Inoltre, i risultati ottenuti in questo studio hanno messo in evidenza un sorprendente effetto di DcE2F sulla proliferazione cellulare già durante lo sviluppo embrionale, evidenziato anche nelle nostre linee sovraesprimenti AtE2Fa o AtE2Fb, che non era stato osservato in precedenza in studi analoghi sugli E2F attivatori di *Arabidopsis*. Infatti la presenza di alterazioni nel numero dei cotiledoni (mono-, tri- e quadricotiledonia) e nel numero di apici meristemati (SAM doppi e multipli) sono chiare indicazioni di un effetto sulla proliferazione cellulare anche a livello embrionale. In uno studio precedente (De Veylder et al., 2002), la sovraespressione costitutiva del fattore AtE2Fa insieme al partner AtDPa ha determinato effetti molto marcati sulla proliferazione cellulare, associati ad una forte perturbazione dei meccanismi di controllo dello sviluppo che hanno portato ad un blocco dell'accrescimento, mentre la sovraespressione del solo AtE2F ha causato effetti molto meno marcati, anche se ha comunque incrementato la proliferazione cellulare portando allo sviluppo di cotiledoni di maggiori dimensioni e con un forte aumento del numero di cellule. Nel nostro studio, fenotipi particolarmente rimarchevoli sono stati riscontrati anche sovraesprimendo i soli fattori E2F. Infatti, la sovraespressione individuale di DcE2F è stata in grado di generare germogli con alterazioni nel numero dei cotiledoni e si è verificato anche il caso di un germoglio con doppio apice meristemato (doppio SAM). Anche la sovraespressione individuale degli E2F attivatori di *Arabidopsis* ha generato fenotipi consistenti. Sovraesprimendo AtE2Fa sono state ottenute alterazioni nel numero dei tricotiledoni ma anche numerosi germogli con apici meristemati multipli (SAM multipli), mentre sovraesprimendo AtE2Fb sono state riscontrate piantine con alterazioni nel numero dei cotiledoni. Nel complesso, l'incidenza dei fenotipi sembra suggerire un effetto più marcato sulla proliferazione cellulare da parte di AtE2Fa e DcE2F ed un effetto minore da parte di AtE2Fb. In considerazione della presenza di questi fenotipi significativi anche senza la sovraespressione di fattori DP, il nostro studio si è incentrato su queste linee, sovraesprimenti solo i fattori E2F, che sono state ulteriormente analizzate a livello molecolare e fenotipico.

Tuttavia, come evidenziato precedentemente, la sovraespressione congiunta di

AtE2Fa ed AtDPa è in grado di determinare una forte perturbazione dello sviluppo. Ciò indica che la sovraespressione di AtDPa è in grado di potenziare marcatamente gli effetti della sovraespressione di AtE2Fa e che, quindi, i livelli endogeni di espressione dei partner DP potrebbero essere parzialmente limitanti per una completa azione degli E2F attivatori. Inoltre, studi contemplanti la sovraespressione di AtDPb non sono stati riportati e non era ancora chiaro se anche AtDPb, oltre ad AtDPa, può potenziare l'attività degli E2F attivatori. Per tali motivi, si è proceduto alla trasformazione di piante di *Arabidopsis* con costrutti in grado di permettere la sovraespressione dei fattori E2F attivatori, DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb, sia congiuntamente alla sovraespressione di AtDPa che insieme ad AtDPb. Nel caso di DcE2F, la sua co-espressione insieme ai DP di *Arabidopsis thaliana* ha determinato fenotipi abbastanza simili a quelli ottenuti con la sola sovraespressione di DcE2F. Tuttavia, è da notare che per due delle linee sovraesprimenti DcE2F insieme ad AtDPa sono stati rilevati casi di marcato ritardo nella fioritura. Comunque, allo stato attuale delle conoscenze, non è chiaro quale sia l'effettiva rilevanza di questo fenotipo e se possa essere eventualmente riconducibile ad un potenziamento di alcuni dei possibili effetti causati dalla sovraespressione del fattore E2F di carota.

Per quanto riguarda la sovraespressione di AtE2Fa insieme con AtDPa l'efficienza di trasformazione si è rivelata molto bassa e sono state ottenute solo tre putative linee transgeniche mentre nel caso della sovraespressione di AtE2Fb insieme con AtDPa si è avuta una discreta efficienza di trasformazione. In entrambi i casi, tuttavia, non sono stati osservati fenotipi particolari. In accordo con i dati pubblicati sulle linee sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPa (De Veylder et al., 2002), è plausibile ipotizzare che la sovraespressione congiunta di AtDPa insieme agli AtE2F "attivatori" possa causare stravolgimenti nello sviluppo della pianta tali da determinare una controselezione in queste linee. A questo riguardo, è da notare che le linee sovraesprimenti AtE2Fa insieme ad AtDPa descritte da De Veylder et al. (2002) non sono state ottenute tramite trasformazione diretta, come nel nostro caso, ma sono state generate incrociando una linea omozigote sovraesprimente solo AtE2Fa ed una linea emizigote sovraesprimente AtDPa. In tal modo non è stato necessario procedere a nessuna selezione ed è stato possibile ottenere facilmente un

numero elevato di germogli che hanno mostrato serie difficoltà nello sviluppo. La sovraespressione congiunta di AtE2Fa o AtE2Fb insieme con AtDPb non era stata riportata in letteratura ed i risultati ottenuti con questo studio hanno dimostrato che anche AtDPb è in grado di potenziare gli effetti sulla proliferazione cellulare, mostrando alterazioni nel numero dei cotiledoni in entrambi i casi ed alterazioni nel numero degli apici meristemati soltanto nelle linee sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPb.

L'incidenza del fenotipo cotiledonare è molto alta nelle linee sovraesprimenti AtE2Fa-DPb (circa 40%) e nelle linee sovraesprimenti DcE2F, sia con che senza gli AtDP (32-35%), mentre è più bassa nelle sovraesprimenti AtE2Fa e AtE2Fb da soli e AtE2Fb-AtDPb (circa 20% e 27-29% rispettivamente) ed è completamente assente nelle linee AtE2Fa-AtDPa ed AtE2Fb-AtDPa. L'incidenza del fenotipo SAM doppi o multipli è anche stavolta più alta nelle linee sovraesprimenti AtE2Fa-DPb (circa 47%), più bassa nelle linee sovraesprimenti AtE2Fa da solo (circa 20%), ma molto più bassa nelle linee sovraesprimenti DcE2F da solo e DcE2F-AtDPb (3-4%). Questo fenotipo è invece completamente assente nelle linee sovraesprimenti DcE2F-AtDPa (che hanno comunque presentato casi di fioritura tardiva) e nelle linee AtE2Fa-AtDPa ed AtE2Fb-AtDPa. In generale possiamo quindi dire che tutti questi E2F hanno effetti sulla proliferazione cellulare a livello embrionale già da soli, che questi effetti sono simili sovraesprimendo DcE2F con i DP di *Arabidopsis thaliana*, mentre sono potenziati dalla sovraespressione congiunta di AtE2Fa o AtE2Fb con AtDPb e, come riportato in letteratura, con AtDPa, anche se in questo caso il potenziamento sembrerebbe essere talmente forte da determinare una perturbazione nello sviluppo della pianta e quindi controselezione delle linee maggiormente perturbate. Gli effetti sulla proliferazione cellulare a livello embrionale sembrerebbero comunque più marcati nel caso della sovraespressione di AtE2Fa, che presenta la più alta incidenza di germogli con apici meristemati multipli, e molto meno marcati per AtE2Fb, che non presenta in nessun caso, sia da solo che con gli AtDP alterazioni nel numero degli apici meristemati. DcE2F da questo punto di vista sembrerebbe trovarsi in una situazione intermedia, poichè possiede un'incidenza delle alterazioni nel numero degli apici meristemati molto più bassa rispetto alle sovraesprimenti AtE2Fa, ma

non è completamente assente come nel caso delle sovraespressioni AtE2Fb.

Le evidenze di un'aumentata proliferazione cellulare non sono state limitate solamente a livello embrionale nelle linee sovraesprimenti i fattori DcE2F, AtE2Fa o AtE2Fb, ma sono state riscontrate anche post-germinazione, da quanto emerso dall'osservazione delle cellule epidermiche adassiali dei cotiledoni delle linee transgeniche a due diversi stadi di sviluppo. La prima osservazione è stata effettuata ad uno stadio precoce di sviluppo del germoglio (circa 7 giorni dopo la germinazione) nel quale è presente un abbozzo della prima coppia di foglioline. La seconda osservazione è stata effettuata invece ad uno stadio di sviluppo più avanzato (circa 14-16 giorni dalla germinazione), nel quale i cotiledoni stanno raggiungendo la maturità e la seconda coppia di foglioline è già ben sviluppata. Già allo stadio I, nonostante la mancanza di variazioni significative nella dimensione dei cotiledoni, è evidente un'aumentata proliferazione cellulare nelle linee transgeniche rispetto ai germogli wild type, con circa il doppio di cellule epidermiche che risultano all'incirca dimezzate rispetto al controllo. L'aumento del numero di cellule epidermiche nelle nostre linee transgeniche allo stadio I potrebbe essere dovuto ad un aumento della proliferazione cellulare dopo la germinazione ma anche alla presenza di un maggior numero di cellule già a livello embrionale. Tuttavia, l'osservazione dei cotiledoni allo stadio II ha mostrato un ulteriore incremento del numero di cellule epidermiche unito ad un notevole aumento delle dimensioni cotiledonari collegato ad un aumento fisiologico delle dimensioni cellulari. In misura inferiore, anche i cotiledoni dei germogli wild type mostrano un incremento del numero di cellule epidermiche nel passaggio dallo stadio I allo stadio II (circa del 15%), indicativo di una moderata proliferazione cellulare post-germinativa. Tuttavia, nelle linee transgeniche questi incrementi sono decisamente più elevati, con percentuali del 23% e 68% nelle linee DcE2F (#13 e 16 rispettivamente), del 30% e 40% nelle linee AtE2Fb (#7 e 13), fino addirittura al 66% e 106% nelle AtE2Fa (#1 e 5). Ne consegue che la sovraespressione degli E2F attivatori è chiaramente in grado di aumentare l'attività proliferativa cellulare durante lo sviluppo post-germinativo dei cotiledoni. Questo trova conferma nei precedenti lavori che hanno descritto gli effetti della sovraespressione di AtE2Fa (De Veylder et al., 2002) o AtE2Fb (Sozzani et al., 2006) ed hanno riportato un

aumento del numero di cellule epidermiche adassiali cotiledonari, dimensioni totali dei cotiledoni leggermente aumentate, e dimensioni cellulari pressochè dimezzate. Questi risultati indicano quindi che la sovraespressione di DcE2F in piante di *Arabidopsis thaliana* è capace di generare effetti simili a quelli ottenuti dalla sovraespressione di AtE2Fa o AtE2Fb. Tuttavia, come mostrato dall'incidenza dei fenotipi dei germogli, anche nel caso dell'analisi dei cotiledoni AtE2Fa sembra mostrare effetti più marcati rispetto ad AtE2Fb e DcE2F sembra avere effetti intermedi.

L'osservazione delle cellule epidermiche adassiali dei cotiledoni ha mostrato anche un altro aspetto interessante. Nello stadio di sviluppo II si è riscontrata una differente capacità di compensazione per le linee sovraesprimenti DcE2F o AtE2Fa rispetto alle linee sovraesprimenti AtE2Fb. Nelle linee AtE2Fb la compensazione sembra essere ottima in quanto è stato osservato un numero di cellule epidermiche raddoppiato rispetto ai germogli wild type ma l'area delle cellule è praticamente dimezzata e le dimensioni dei cotiledoni sono effettivamente invariate nella linea AtE2Fb #13 e solo leggermente aumentate nella linea AtE2Fb #7. Nelle linee sovraesprimenti AtE2Fa invece la compensazione non è stata così ottimale, poiché dimensioni cellulari sono anche in questo caso praticamente dimezzate ma il numero di cellule epidermiche è all'incirca triplicato rispetto al controllo ed i cotiledoni risultano quindi più grandi, soprattutto nella linea AtE2Fa #5 in cui le dimensioni cotiledonari sono aumentate del 74%. La compensazione non è stata quindi perfetta perchè all'aumentare del numero di cellule epidermiche non è corrisposta un'adeguata riduzione delle dimensioni cellulari (anche se comunque c'è stato un dimezzamento). Per quanto riguarda invece DcE2F, in questo caso il numero di cellule epidermiche risulta più che raddoppiato, le dimensioni cellulari sono all'incirca dimezzate e le dimensioni dei cotiledoni sono aumentate rispetto al controllo, anche se meno rispetto alle linee AtE2Fa, evidenziando anche in questo caso la mancanza di una compensazione perfetta. Per quanto riguarda le linee sovraesprimenti AtE2Fa, che sono quelle con maggiore proliferazione cellulare, la parziale compensazione potrebbe derivare dal superamento di una soglia del numero di cellule, che non sarebbero quindi in grado di diminuire ulteriormente le loro dimensioni. Tuttavia, questo non può sicuramente valere nel caso delle linee

DcE2F in quanto la linea DcE2F #16 possiede un numero di cellule epidermiche inferiore rispetto alla linea AtE2Fb #7 eppure presenta una compensazione peggiore rispetto a quest'ultima. Inoltre, un ulteriore studio sulle linee sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPA ottenute dal gruppo di De Veylder (Boudolf et al. 2004) ha riportato riduzioni delle dimensioni delle cellule epidermiche cotiledonari molto più marcate (quasi nove volte minori del wild type) di quanto osservato nelle linee sovraesprimenti unicamente il fattore AtE2Fa. In effetti, a conferma dei drastici effetti sullo sviluppo, in tali linee i cotiledoni presentano addirittura dimensioni ridotte rispetto al wild type nonostante un aumento di quasi sei volte del numero di cellule epidermiche. Ci dev'essere quindi qualche altro meccanismo che interviene nella regolazione della compensazione, e quindi delle dimensioni cellulari rispetto al numero di cellule presenti nei cotiledoni delle linee sovraesprimenti i fattori E2F. La perfetta compensazione osservata nella linea AtE2Fb #13 suggerisce che AtE2Fb potrebbe essere coinvolto nella regolazione di questi meccanismi, quindi regolare anche l'espansione cellulare, oppure l'endoreduplicazione potrebbe giocare un ruolo chiave in tutto questo. Gli studi precedenti infatti hanno rivelato che AtE2Fb non sembra essere in grado di promuovere l'endoreduplicazione, ma anzi la riduce (Sozzani et al. 2006), mentre la sovraespressione di AtE2Fa insieme ad AtDPA è in grado di farlo in quanto sono stati osservati livelli di ploidia più elevati rispetto al controllo (sono state rilevate addirittura cellule con un contenuto di DNA pari a 64C) e nuclei più grandi nei tricomi e nelle radici (De Veylder et al., 2002; Boudolf et al. 2004). L'effetto di AtE2Fa sull'endoreduplicazione, anche se minore rispetto a quello sulla proliferazione cellulare, potrebbe in effetti andare a contrastare la compensazione nelle nostre linee sovraesprimenti AtE2Fa. Tuttavia, è sorprendente che i germogli AtE2Fa-AtDPA descritti da Boudolf et al. (2004) presentano cotiledoni di dimensioni ridotte nonostante queste piantine siano caratterizzate da un aumento della ploidia. Inoltre, l'analisi della ploidia nei cotiledoni di piantine sovraesprimenti il solo fattore AtE2Fa non ha mostrato una promozione dell'endoreduplicazione, ma anzi ha rivelato una riduzione della ploidia anche se questa riduzione appare meno marcata nella linea con maggiore sovraespressione (De Veylder et al., 2002). Per quanto riguarda la compensazione nei cotiledoni, le

linee DcE2F non riescono a compensare perfettamente, come avviene per le linee AtE2Fb. Ciò fa pensare che DcE2F possa essere più simile ad AtE2Fa che non ad AtE2Fb e, possibilmente, possa avere anche un ruolo nella promozione dell'endoreduplicazione oltre che promuovere la proliferazione cellulare. Varrebbe quindi la pena analizzare i livelli di ploidia dei cotiledoni di queste linee, per indagare appunto sul fatto se vi siano o meno differenze nella diminuzione dell'endoreduplicazione nelle linee sovraesprimenti AtE2Fb rispetto a quelle sovraesprimenti AtE2Fa e DcE2F. Purtroppo non è stato ancora possibile effettuare questa analisi poiché la strumentazione disponibile presso l'Università di Sassari non permette la misurazione della ploidia di nuclei con basso contenuto di DNA come quelli di *Arabidopsis thaliana*. Tuttavia, a parte il possibile contributo del controllo dell'endoreduplicazione, come suggerito prima, le differenze riguardo alla capacità di compensazione potrebbero anche indicare un ruolo di AtE2Fb nella regolazione della distensione cellulare. Da questo punto di vista, è interessante notare che analisi Microarray su linee sovraesprimenti AtE2Fa-AtDPA in maniera inducibile hanno rivelato aumenti nell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo della parete cellulare (de Jager et al., 2009). Sarà quindi importante verificare in analisi future se vi sia un'espressione differenziale di questi geni tra le linee sovraesprimenti gli E2F attivatori oggetto di questa tesi.

Un altro aspetto che rimane da chiarire è l'influenza del controllo della proliferazione cellulare nello sviluppo delle radici. In diversi studi su fattori coinvolti nella regolazione del destino delle cellule dei meristemi radicali in *Arabidopsis thaliana*, come SCARECROW (SCR) (Sabatini et al., 2003), i complessi APC/C^{CCS52A} (Vanstraelen et al., 2009), o anche gli effetti del trattamento con gibberelline (Ubeda-Tomás et al., 2009), hanno rivelato che le linee con un maggior numero di cellule meristematiche presentano anche radici primarie più lunghe, e viceversa mutanti con un minor numero di cellule meristematiche possiedono radici più corte. In precedenti esperimenti di sovraespressione del fattore AtE2Fb sono state invece osservate cellule meno allungate nelle radici delle piantine transgeniche rispetto alle wild type (Sozzani et al., 2006), che suggeriscono un effetto compensatorio in risposta ad un aumento della proliferazione cellulare nella pianta, anche se analisi delle dimensioni del

meristema radicale e/o del numero di cellule totale nella radice non erano state effettuate. Nel nostro studio è stato confermato un effetto di promozione della proliferazione cellulare nei meristemi radicali da parte sia di DcE2F che degli E2F attivatori di *Arabidopsis*. Tuttavia, questo effetto appare essere molto marcato nelle prime fasi di sviluppo del meristema radicale (probabilmente perchè queste radici possiedono un numero più elevato di cellule già a livello embrionale), ma va scomparendo man mano che lo sviluppo del RAM prosegue, tanto che il meristema radicale nelle piante sovraesprimenti i fattori E2F attivatori raggiunge le stesse dimensioni finali del RAM delle piante wild type. In base a questi dati, sembrerebbe quindi che meccanismi di regolazione (probabilmente prevalentemente ormonali) vadano a sovrapporsi agli effetti sulla promozione della proliferazione cellulare da parte degli E2F annullandoli. Inoltre, le radici delle nostre linee trasformanti risultano effettivamente più lunghe rispetto alle radici wild type ma non sembrerebbero crescere più velocemente delle wild type, il che fa pensare che siano semplicemente partite in anticipo, con un numero di cellule maggiore rispetto alle wild type già a livello embrionale e nei primissimi stadi di sviluppo del germoglio. Lo studio sulla germinabilità ha infatti evidenziato anche un'anticipazione nei tempi di germinazione dei semi trasformanti rispetto a quelli wild type della stessa età, che supporta l'osservazione di radici primarie più lunghe. Gli effetti più marcati in questa anticipazione della germinazione si vedono anche stavolta in una linea AtE2Fa (la linea #5), i meno marcati nelle linee sovraesprimenti AtE2Fb, e DcE2F si trova in una situazione intermedia fra AtE2Fa ed AtE2Fb, confermando quanto visto sia per l'incidenza dei fenotipi riscontrati nei germogli (alterazioni nel numero dei cotiledoni e nel numero degli apici meristemati) sia per le differenze nella capacità di compensazione dei cotiledoni. In conclusione, con questo studio è stato possibile dimostrare che DcE2F, come gli E2F attivatori di *Arabidopsis thaliana*, AtE2Fa ed AtE2Fb, è in grado di promuovere la proliferazione cellulare. In particolare, a differenza di quanto descritto in altri studi, si è riscontrato che gli effetti della sovraespressione di tutti questi tre fattori E2F vegetali si manifestano principalmente a livello embrionale e nelle prime fasi di sviluppo dei germogli, quindi su cellule e tessuti che si trovano in un contesto non ancora condizionato dall'influenza esercitata sullo sviluppo da

parte delle strutture adulte della pianta. Infatti, a parte il marcato ritardo nella fioritura che è stato riscontrato in due piantine di linee sovraesprimenti AtE2Fa con AtDPa, la cui rilevanza non è ancora chiara, non sono state notate particolari modificazioni nella velocità di accrescimento delle linee sovraesprimenti i fattori E2F oggetto di questo studio e lo sviluppo di radici più allungate sembra piuttosto derivare da un'accelerazione della germinazione e delle prime fasi di sviluppo delle radici. Sembrerebbe quindi che meccanismi di controllo dell'attività proliferativa dei meristemi apicali, dipendenti da appropriati bilanci ormonali e dal controllo dell'attività e del turnover di vari regolatori del ciclo cellulare, siano in grado di contrastare gli effetti degli E2F attivatori notati a livello embrionale ed all'inizio dell'accrescimento. A questo proposito, sia in cellule animali che in cellule vegetali, è stata evidenziata una regolazione post-trascrizionale di molti componenti dell'apparato di controllo del ciclo cellulare, inclusi anche i fattori E2F vegetali che sono stati riportati essere soggetti a degradazione proteosoma-dipendente (Del Pozo et al. 2002; Hirano et al. 2011). Ulteriori sviluppi di questo progetto saranno rivolti all'indagine del probabile controllo post-trascrizionale degli E2F vegetali per chiarire i risultati ottenuti nelle nostre linee transgeniche.

6. Bibliografia

- Abel S. and Theologis A. (1996). Early genes and auxin action. *Plant Phys.* **111**, 9-17.
- Albani D., Mariconti L., Ricagno S., Pitto L., Moroni C., Helin K., Cella R. (2000). DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *daucus carota*. *J. Biol. Chem.* **275**, 19258-67.
- Attwooll C., Lazzarini Denchi E., Helin K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* **23**, 4709-16.
- Beemster G.T., De Vusser K., De Tavernier E., De Bock K., Inzé D. (2002). Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiol.* **129**, 854-64.
- Beemster G.T.S., Fiorani F., Inzé D. (2003). Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* **8**, 154-158.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B., Feldmann K.A. (1996). *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948-50.
- Berckmans B., Lammens T., Van Den Daele H., Magyar Z., Bogre L. and De Veylder L. (2011). Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol. Preview* (Epub ahead of print).
- Berendzen K., Searle I., Ravenscroft D., Koncz C., Batschauer A., Coupland G., Somssich I.E., Ulker B. (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and

- Landsberg erecta. *Plant Methods* **23**, 4.
- Bishop G.J. (2003). Brassinosteroid Mutant of Crops. *J. Plant Growth Regul.* **22**, 325-35.
- Bisova K., Krylov D.M., Umen J.G. (2005). Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **137**, 475-491.
- Black A.R. and Azizkhan-Clifford J. (1999). Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* **237**, 281-302.
- Bouchard R., Bailly A., Blakeslee J.J., Oehring S.C., Vincenzetti V., Lee O.R., Paponov I., Palme K., Mancuso S., Murphy A.S. et al. (2006). Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of Arabidopsis P-glycoproteins. *J. of Biol. Chem.*, **281**, 30603-12.
- Boudolf V., Vlieghe K., Beemster G.T.S., (2004). The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2683-2692.
- Busov V.B., Brunner A.M., Strauss S.H. (2008). Genes for control of plant stature and form. *New Phytol.* **177**, 589-607.
- Castellano M.M., del Pozo J.C., Ramirez-Parra E., Brown S., Gutierrez C. (2001). Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreduplication. *Plant Cell* **13**, 2671-2686.
- Castellano M.M., Boniotti M.B., Caro E., Schnittger A., Gutierrez C. (2004). DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreduplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell* **16**, 2380-93.

- Cebolla A., Vinardell J.M., Kiss E., Oláh B., Roudier F., Kondorosi A. and Kondorosi E. (1999). The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* **18**, 4476-84.
- Chabouté M.E., Clement B., Sekine M., Philipps G., Chaubet-Gigot N. (2000). Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotidoreductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* **12**, 1987-2000.
- Chabouté M.E., Clément B., Philipps G. (2002). S phase and meristem-specific expression of the tobacco RNR1b gene is mediated by an E2F element located in the 5' leader sequence. *J. Biol. Chem.* **277**, 17845-51.
- Christensen J., Cloos P., Toftegaard U., Klinkenberg D., Bracken A.P., Trinh E., Heeran M., Di Stefano L., Helin K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5458-5470.
- Clough S.J. and Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Cookson S.J., Radziejowski A., Granier C. (2006). Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication? *Plant Cell Environ.* **29**, 1273-83.
- Crawford B.C., Nath U., Carpenter R., Coen E.S. (2004). CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petals lobes and leaves of *Antirrhinum*. *Plant Phys.* **135**, 244-53.
- Cubas P., Lauter N., Doebley J., Coen E. (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* **18**, 215-22.

- Davies P.J. (1995). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. London, UK, Kluwer Academic Publishers, 6-7.
- de Bruin A., Maiti B., Jakoi L., Timmers C., Buerki R., Leone G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **278**, 42041-42049.
- de Jager S.M., Menges M., Bauer U.M., Murray J.A.H. (2001). Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol. Biol.* **47**, 555-568.
- De Jager S., Scofield S., Huntley R.P., Robinson A.S., den Boer B.H.J., Murray A.H.J. (2009). Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol. Biol.* **71**, 345-65.
- De Rocher E.J., Harkins K.R., Galbraith D.W., Bohnert H.J. (1990). Developmentally regulated systemic endopolyploid in succulents with small genomes. *Science* **250**, 99-101.
- De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T.S., Krols L., Terras F., Landrieu I., Van Der Schueren E., Maes S., Naudts M., Inzé D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1653-67.
- De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T., de Almeida Engler J., Ormenese S., Maes S., Naudts M., Van Der Schueren E., Jacquard A., Engler G., Inzé D. (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* **21**, 1360-1368.

- Del Pozo J.C., Boniotti M.B., Gutierrez C. (2002). Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF^{AtSKP2} pathway in response to light. *Plant Cell* **14**, 3057-3071.
- Del Pozo J.C., Diaz-Trivino S., Cisneros N., Gutierrez C. (2006). The balance between cell division and endoreduplication depends on E2Fc-DPb, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF^{AtSKP2} pathway. *Plant Cell* **18**, 2224-2235.
- Desvoyes B., Ramirez-Parra E., Xie Q., Chua N.H., Gutierrez C (2006). Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol.* **140**, 67-80.
- Dewitte W., Murray J.A.H. (2003). The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 235-264.
- Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S., Healy J.M.S., Jacquard A., Kilby N.J., Murray J.A.H. (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**, 79-92.
- Diaz-Trivino S., del Mar Castellano M., de la Paz Sanchez M., Ramirez-Parra E., Desvoyes B., Gutierrez C. (2005). The genes encoding Arabidopsis ORC subunits are E2f targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreduplicating cells. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5404-5414.
- Dimova D.K., Dyson N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene.* **24**, 2810-26.
- Doonan J. (2000). Social controls on cell proliferation in plants. *Curr. Opin. In Plant Biol.* **3**, 482-87.

- Egelkroun E.M., Mariconti L., Settlege S.B., Cella R., Robertson D., Hanley-Bowdoin L. (2002). Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell* **14**, 3225-3236.
- Engelen-Eigles G., Jones R.J., Phillips R.L. (2001). DNA endoreduplication in maize endosperm cells is reduced by high temperature during the mitotic phase. *Crop Sci.* **41**, 114-21.
- Ferreira R., Magnaghi-Jaulin L., Robin P., Harel-Bellan A., Trouche D. (1998). The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 10493-10498.
- Filatov D. and Thelander L. (1995). Role of a proximal NF-Y binding promoter element in S phase-specific expression of mouse ribonucleotide reductase R2 gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 25239-25243.
- Foucher F. and Kondorosi E. (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago. *Plant Mol. Biol.* **43**, 773-86.
- Friml J. and Palme K. (2002). Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Mol. Biol.* **49**, 273-84.
- Friml J., Wisniewska J., Benkova E., Mendgen K., Palme K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**, 806-9.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Meijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jurgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**, 147-53.

- Fujioka S., Yokota T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Ann. Rev. of Plant Biol.* **54**, 137-64.
- Galbraith D. W., Harkins K. R., Knapp S. (1991). Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **96**, 985-9.
- Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M., Höfte H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 295-305.
- Gendreau E., Hofte H., Granjean O., Brown S., Traas J. (1998). Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant J.* **13**, 221-30.
- Harbour J.W., and Dean D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**, 2393-2409.
- Haubrick L.L. and Assmann S.M. (2006). Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, Cell & Env.* **29**, 446-57.
- Heckmann S., Lermontova I., De Veylder L., Bäumlein H., Schubert I. (2011). The E2F transcription factor family regulates *CENH3* expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (Epub).
- Helin K., Harlow E., and Fattaey A.R. (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6501-6508.
- Hemerly A., Engler J.A., Bergounioux C., van M.M., Engler G., Inzé D., Ferreira P. (1995). Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* **14**, 3925-36.

- Hirano H., Shinmyo A., Sekine M. (2001). Arabidopsis G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 687-91.
- Hooley R. (1994). Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1529-55.
- Horiguchi G., Kim G.T., Tsukaya H. (2005). The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **43**, 68-78.
- Hu Y., Xie Q., Chua N.H. (2003). The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**, 1951-61.
- Huntley R.P., Murray J.A.H. (1999). The plant cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 440-446.
- Inzé D. (2007). Cell cycle control and plant development, *Annual Plant Reviews* **32**, Blackwell Publishing Ltd.
- Inzé D. and De Veylder L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Ann. Rev. of Gen.* **40**, 77-105.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-7.
- Jonsson H, Heisler M.G., Shapiro B.E., Meyerowitz E.M., Mjolsness E. (2006). An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci., USA* **103**, 1633-38.
- Kadota Y., Watanabe T., Fujii S., Higashi K., Sano T., Nagata T., Hasezawa S.,

- Kuchitsu K. (2004). Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* **40**, 131-42.
- Koncz, C., and Shell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kosugi S. and Ohashi Y. (2002a). E2Ls, E2F-like repressors of Arabidopsis that bind to E2F sites in a monomeric form. *J. Biol. Chem.* **277**, 16553-16558.
- Kosugi S. and Ohashi Y. (2002b). E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J.* **29**, 45-59.
- Kosugi S. and Ohashi Y. (2003). Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type specific manner. *Plant Physiol.* **132**, 2012-22.
- Kovesdi I., Reichel R., Nevins J.R. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *PNAS* **84**, 2180-2184.
- Kudo N. and Kimura Y. (2002). Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *J. Exp. Bot.* **53**, 1017-23.
- Krizek B.A. (1999). Ectopic expression of AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs. *Dev. Gen.* **25**, 224-36.
- Lammens T., Boudolf V., Kheibarshekan L., Zalmas L.P., Gaamouche T., Maes S., Vanstraelen M., Kondorosi E., La Thangue N.B., Govaerts W., Inzé D., De Veylder L. (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function

- obligatory for endocycle onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14721-26.
- Lammens T., Li J., Leone G., De Veylder L. (2009). Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol.* **19**, 111-18.
- Lee J., Das A., Yamaguchi M., Hashimoto J., Tsutsumi N., Uchimiya H., Umeda M. (2003). *Plant J.* **34**, 417-25.
- Li C., Potuschak T., Colòn-Carmona A., Gutiérrez R.A., Doerner P. (2005). Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12978-83.
- Liscum E. and Reed J.W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **49**, 387-400.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Magyar Z., Atanassova A., De Veylder L., Rombauts S., Inzé D. (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **486**, 79-87.
- Magyar Z., De Veylder L., Atanassova A., Bakó L., Inzé D., Bögre L. (2005). The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* **17**, 2527-2541.
- Maiti B., Li J., de Bruin A., Gordon F., Timmers C., Opavsky R., Patil K., Tuttle J., Cleghorn W., Leone G. (2005). Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **280**, 18211-18220.

- Mariconti L., Pellegrini B., Cantoni R., Stevens R., Bergounioux C., Cella R., Albani D. (2002). The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 9911-9919.
- Menges M., Hennig L., Gruissem W., Murray J.A.H. (2002). Cell Cycle-regulated Gene Expression in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**, 41987-42002.
- Mizukami Y. and Fischer R.L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci., USA*, **97**, 942-47.
- Mizukami Y. (2001). A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 533-39.
- Moberg K., Starz M.A., Lees J.A. (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1436-49.
- Müller, H., and Helin, K. (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Acta.* **1470**, M1-M12.
- Müller H., Bracken A.P., Vernell R., Moroni M.C., Christians F., Grassilli E., Prosperini E., Vigo E., Oliner J.D., Helin K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 267-85.
- Nagl W. (1976). DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature* **261**, 614-5.
- Nakajima K. and Benfey P.N. (2002). Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root. *Plant Cell* **14** Suppl: S265-276.

- Naouar N., Vandepoele K., Lammens T., Casneuf T., Zeller G., van Hummelen P., Weigel D., Rättsch G., Inzé D., Kuiper M., De Veylder L., Vuylsteke M. (2009). Quantitative RNA expression analysis with Affymetrix Tiling 1.0R arrays identifies new E2F target genes. *The Plant J.* **57**, 184–94.
- Noh B., Murphy A.S., Spalding E.P. (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* **13**, 2441-54.
- Noh B., Bandyopadhyay A., Peer W.A., Spalding E.P. Murphy A.S. (2003). Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**, 999-1002.
- Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C., Bennett M.J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* **25**, 399-406.
- Porceddu A., Stals H., Reicheld J.P., Segers G., De Veylder L., Barroco R.P., Casteels P., Van Montagu M., Inzé D., Mironov V. (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* **276**, 36354-60.
- Ramirez-Parra E., Xie Q., Boniotti M.B., Gutierrez C. (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**, 3527-3533.
- Ramirez-Parra E., Gutierrez C. (2000). Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett* **486**, 73-78.
- Ramirez-Parra E., Frundt C., Gutierrez C. (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**, 801-811.

- Ramirez-Parra E., Lopez-Matas M.A., Frundt C., Gutierrez C. (2004). Role of an atypical E2F transcription factor in the control of Arabidopsis cell growth and differentiation. *Plant Cell* **16**, 2350-2363.
- Ramirez-Parra E., Desvoves B., Gutierrez C. (2005). Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 467-77.
- Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-60.
- Robbens S., Khadaroo B., Camasses A., Derelle E., Ferraz C., Inzé D., Van de Peer Y., Moreau H. (2005). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in the unicellular green alga *Ostreococcus tauri*. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 589-97.
- Rosignol P., Stevens R., Perennes C., Jasinski S., Cella R., Tremousaygue D., Bergounioux C. (2002). AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase. *Mol. Genet. Genomics* **266**, 995-1003.
- Rus-Kortekaas W., Smulders M.J., Arens P., Vosman B. (1994). Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* **37**, 375-81.
- Sabatini S., Heidstra R., Wildwater M., Scheres B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev.* **17**, 354-58.
- Sabelli P.A., Dante R.A., Leiva-Neto J.T., Jung R., Gordon-Kamm W.J., Larkins B.A. (2005). RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13005-13012.

- Sardet C., LeCam L., Fabbriozio E., Vidal M. (1997). E2Fs and the retinoblastoma protein family. *Oncogenes and a transcriptional regulators* (ed. J. Ghysdael and M. Yaniv) **2**, 1-63.
- Sakamoto T. (2006). Phytohormones and rice crop yield: strategies and opportunities for genetic improvement. *Transg. Res.* **15**, 399-404.
- Sekine M., Ito M., Uemukai K., Maeda Y., Nakagami H., Shinmyo A. (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett* **460**, 117-122.
- Setter T.L., Flannigan B.A. (2001). Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm. *J. Exp. Bot.* **52**, 1401-08.
- Sozzani R., Maggio C., Varotto S., Canova S., Bergonioux C. Albani D., Cella R. (2006). Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol.* **140**, 1355-1366.
- Sozzani R., Maggio C., Giordo R., Umana E., Ascencio-Ibanez J.T. Hanley-Bowdoin L., Bergonioux C., Cella R., Albani D. (2010). The E2FD/DEL2 factor is a component of a regulatory network controlling cell proliferation and development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **72**, 381-395.
- Stevens R., Mariconti L., Rossignol P., Perennes C., Cella R., Bergonioux C. (2002). Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 32978-32984.
- Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bandyopadhyay A., Makam S.N., Lee O.R., Richards E.L., Murphy A.S., Sato F. *et al.*, (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell* **17**, 2922-39.

- Thomas S.G and Sun T.P. (2004). Update on gibberellin signalling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol.* **135**, 668-76.
- Trouche D., La Chalony C., Muchardt C., Yaniv M., and Kouzarides T. (1997). RB and hbrm co-operate to repress the activation functions of E2F-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 11268-11273.
- Traas J., Hulskamp M., Gendreau E., Hofte H. (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 498-503.
- Tsukaya H. (2003). Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 57-62.
- Tsurimoto T. (1998). PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **1443**, 23-39.
- Ubeda-Tomás S., Federici F., Casimiro I., Beemster G.T.S., Bhalerao R., Swarup R., Doerner P., Haseloff J., Bennett M.J. (2009). Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Curr. Biology* **19**, 1194-99.
- Vandel L., Nicolas E., Vaute O., Ferreira R., Ait-Si-Ali S., Trouche D. (2001). Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6484-6494.
- Vandepoele K., Raes J., De Veylder L., Rouze P., Rombauts S., Inzé D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 903-916.
- Vandepoele K., Vlieghe K., Florquin K., Hennig L., Beemster G.T., Grissem W., Van de Peer Y., Inzé D., De Veylder L. (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* **139**, 316-328.
- Vanstraelen M., Balobana M., Da Inesa O., Cultrone A., Lammens T., Boudolf V., Brown S.C., De Veylder L., Mergaert P., Kondorosi E. (2009).

- APC/C^{CCS52A} complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *PNAS* **106**, 11806-11.
- Vert G., Nemhauser J.L., Geldner N., Hong F., Chory J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signalling in plants. *Ann. Rev. of Cell and Dev. Biol.* **21**, 177-201.
- Vlieghe K., Vuylsteke M., Florquin K., (2003). Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *J. Cell Sci.* **116**, 4249-4259.
- Vlieghe K., Boudolf V., Beemster G.T., Maes S., Magyar Z., Atanassova A., de Almeida Engler J., De Groodt R., Inzé D., De Veylder L. (2005). The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.* **15**, 59-63.
- Wang H., Zhou Y., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L.C. (2000). Expression of plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* **24**, 613-23.
- Weigel D. and Jurgens G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-54.
- Weiss J., Gado-Benarroch L., Egea-Cortines M. (2005). Genetic control of floral size and proportions. *Int. J. of Dev. Biol.* **49**, 513-25.
- West G., Inzé D., Beemster G.T.S. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. *Plant Physiol.* **135**, 1050-58.
- Wyrzykowska J., Pien S., Shen W.H., Fleming A.J. (2002). Manipulation of leaf shape by modulation of cell division. *Development* **129**, 957-64.

7. Ringraziamenti

Vorrei ringraziare innanzitutto il Prof. Diego Albani per la sua disponibilità e pazienza in tutti questi anni. Ha contribuito in maniera sostanziale a far di me la scienziata che sono oggi.

Grazie a Roberta Giordo, Stefania Ghisaura e Maria Giovanna Marche, per la collaborazione e il sostegno, e per aver reso ancora più piacevole il tempo speso insieme in laboratorio.

Grazie anche alla Dott.ssa Hilary J. Rogers e al Dr. Dannis Francis per avermi accolto nel loro laboratorio presso la Cardiff University (UK) per un anno e mezzo di Dottorato, e al Prof. Jim Murray ed i suoi collaboratori (Simon Scofield, Jeroen Nieuwland e Walter Dewitte) per la loro disponibilità ad utilizzare la loro strumentazione e per i consigli preziosi.

A mia Madre, la persona che mi ha sostenuto e ha creduto più in me da sempre. Il suo aiuto è stato ancora più prezioso ed impagabile durante quest'ultimo difficile anno, e non posso dire altro che Grazie!!

Un ringraziamento speciale a tutte le persone che ho incontrato a Cardiff, in particolare Faezah Mohd Salleh, Danilo Aros Orellana, Argyrw Mouchliadou, Gemma Cook, Lièn Gonzales e Natasha Spadafora, per aver contribuito a rendere la mia esperienza in UK indimenticabile. Anche se ormai siamo tutti sparsi in parti diverse del mondo, e forse non ci rivedremo più, li porterò sempre nel mio cuore.

A Paolo, che mi ha sostenuto ed aiutato sempre, incoraggiandomi e credendo in me, ed avendo molta pazienza nei momenti difficili nei quali ero veramente intrattabile!!

Infine un grazie enorme a tutti i miei amici. Qui non voglio iniziare a fare una lunga lista di nomi, anche perché con la fretta e lo stress della scrittura dei ringraziamenti last minute me ne dimenticherei sicuramente qualcuno. Sono certa che tutte le persone che mi son state vicino e mi hanno incoraggiato in questi anni, anche con piccoli gesti, si sentiranno incluse. Grazie per aver fatto parte di questo capitolo della mia vita, e spero che ci sarete anche per il prossimo...