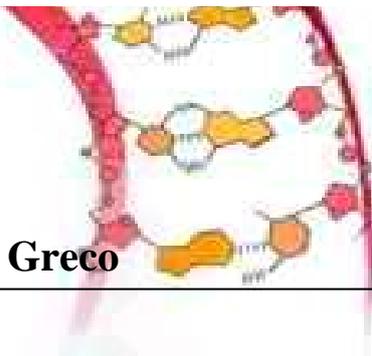




## **Meccanismi di regolazione epigenetica della risposta allo stress nelle piante**

**Dr. Maria Greco**



**Tesi di Dottorato in Biologia Vegetale  
XXI ciclo (2005-2008)**

**Università della Calabria  
Dipartimento di Ecologia**

Università della Calabria



Dipartimento di Ecologia



---

**Università della Calabria**

**DOTTORATO DI RICERCA  
Biologia Vegetale**

**Settore scientifico BIO/01**

**Ciclo XXI**

**TITOLO TESI  
Meccanismi di regolazione  
epigenetica della risposta allo stress  
nelle piante**

**Coordinatore: Prof. Aldo Musacchio**

**Tutor: Dott. Adriana Chiappetta**

**Candidata: Maria Greco**

**Esame finale Dottorato di Ricerca  
2005- 2008**

---



---

...a Pasquale e al mio bambino

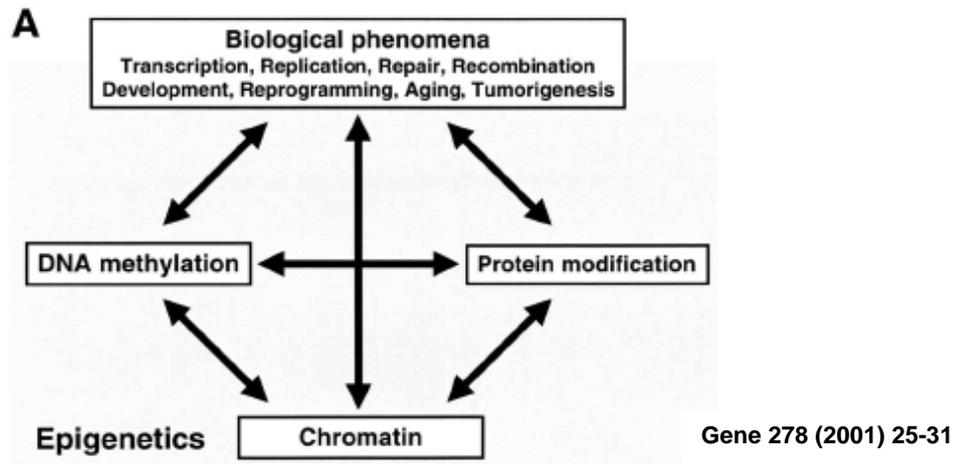
---

---

## **Premessa e scopo della tesi**

L'epigenetica è un campo di ricerca, sviluppatosi rapidamente durante gli ultimi anni, che desta notevole interesse nel campo della biologia cellulare sia umana che animale e vegetale. Il dr. Alan Wolffe definì il termine epigenetica come “ quegli ereditabili cambiamenti nell'espressione genica che avvengono senza cambiamenti nella sequenza del DNA” (Wolffe e Matzke, 1999) e tramite i quali la funzione genica è selettivamente attivata o inattivata all'interno delle cellule. Recentemente, sono state identificate una varietà di proteine regolatrici, coinvolte in questo fenomeno, quali DNA metiltransferasi, enzimi che modificano gli istoni, fattori che rimodellano la cromatina, i quali non agiscono come unità distinte, ma fanno parte di una stretta rete interconnessa di modulatori dell'attività cellulare (Ballestar, E., Wolffe, AP., 2001; Bestor, TH., 2000; Ng, HH., *et* Bird, A, 1999; Aalfs JD, *et* Kingston RE. 2000; Grewal SI, *et* Moazed D, 2003; Strahl, BD., *et* Allis, CD., 2000). Tutto ciò ha portato ad una maggiore comprensione di fenomeni cruciali per la regolazione cellulare come quelli legati alla trascrizione e replicazione del DNA, alle mutazioni, ai meccanismi di riparo e ricombinazione del DNA (Workman, JL, *et* Kingston, RE, 1998; Nakao M, 2001).

---



La struttura cromatinica può essere modulata attraverso 4 vie principali; nella prima, l'organizzazione del nucleosoma viene destabilizzata e riconfigurata da complessi rimodellanti ATP-dipendenti, che possono all'occorrenza aprire e chiudere la struttura cromatina per permettere specifiche reazioni enzimatiche ( Ito T. *et al.*, 1997; Deuring R. *et al.*, 2000; Jerzmanowsky A, 2007; Kanno T. *et al.*, 2004).

Un secondo meccanismo riguarda le modificazioni post-traduzionali delle proteine istoniche attraverso l'azione di istone acetilasi, deacetilasi e metiltransferasi, le quali possono generare modificazioni in distinti e localizzati domini cromatinici (Henikoff S *et al.*, 2004; Iizuka M. e Smith MM. 2003; Nakayama J, *et al.*, 2001; Ogryzko VV. 2001; Probst AV. *et al.*, 2004; Strahl BD e Allis CD. 2000). Terzo, la composizione del nucleosoma può essere modificata attraverso la sostituzione e il ricollocamento delle principali varianti istoniche ( Ahmad K. e Henikoff S. 2002; Santisteban MS. 2000; Smith MM. 2002).

---

In fine, la metilazione delle citosine, che avviene attraverso l'azione di specifiche DNA metiltransferasi, può presiedere ad uno stabile ed ereditabile "mark" epigenetico che modula la struttura della cromatina attraverso il reclutamento di complessi proteici che si legano al DNA metilato (Jackson JP *et al.*, 2002; Jeddloh JA *et al.*, 1998).

Il rimodellamento cromatinico gioca un ruolo cruciale nel modulare l'attività trascrizionale di una cellula, fornendo un addizionale livello di regolazione oltre a quello rappresentato dalla sequenza primaria di DNA. Tale stato cromatinico, può essere mantenuto durante le divisioni cellulari, dando origine ad un processo definito, come detto, eredità epigenetica ( Hsieh TF, e Fischer R. 2005; Bertrand C, *et al.*, 2003; Choi Y, *et al.*, 2002; Sung S, *et Amasino RM*, 2004; Katz A, *et al.*, 2004).

In virtù del suo coinvolgimento nell'attivazione e nella repressione trascrizionale, è evidente che la regolazione di alti ordini di condensazione della cromatina svolga un ruolo essenziale nel processo di differenziazione cellulare e di conseguenza nello sviluppo degli organismi, compreso le piante (Finnegan EJ, *et al.*, 2000; Bartolomei MS, *et Tilghman SM*. 1997; Berger F, *et Gaudin V*, 2003; Cunliffe VT, 2003; Tian L, *et al.*, 2003; Bastow R, *et al.*, 2004; Chanvivattana Y, *et al.*, 2004; Farrona S, *et al.*, 2004). Cambiamenti epigenetici sono stati, inoltre, associati nei mammiferi all'inattivazione del cromosoma X ma anche ad eventi di imprinting genomico nonché a numerose patologie correlate spesso con l'età, chiamando in causa il coinvolgimento di fattori ambientali nei meccanismi di regolazione epigenetica (Kargul J, *et Laurent GJ*. 2008; Anway *et al.*, 2005; Newbold *et al.*, 1998, 2000; Ruden *et al.*, 2005; Turusov *et al.*, 1992; Walker *et Haven* 1997; Edwards TM, *et Myers JP*. 2007).

---

---

Dati recenti sempre più numerosi evidenziano come, anche nelle piante, i fattori ambientali e l'esposizione a condizioni di stress di varia natura influenzino l'espressione genica inducendo cambiamenti epigenetici. Ad esempio ipermetilazione del DNA è stata riscontrata in tabacco a seguito di stress osmotico (Kovarik *et al.*, 1997); anche lo stress idrico, e quello indotto dal dicromato di potassio, inducono un aumento o diminuzione nella metilazione delle citosine all'interno del genoma (Labra *et al.*, 2002, 2004). L'esposizione a basse temperatura è stata in grado di indurre ipometilazione del DNA in radice di cicoria (Demeulemeester *et al.*, 1999) e in *Arabidopsis thaliana* (Finnegan *et al.*, 1998) e de-metilazione in piantine di mais (Steward *et al.* 2002). Infine l'esposizione all'alluminio, (Choi and Sano, 2007), ai metalli pesanti (Alina *et al.*, 2004). Tutte queste osservazioni supportano, pertanto, l'idea che anche nelle piante, il rimodellamento cromatinico indotto da specifici stressori possa costituire uno strumento di risposta adattativa alle mutate condizioni ambientali.

In tale contesto il mio lavoro di dottorato rappresenta un contributo a tale problematica riguardando lo studio di alcuni specifici fattori di regolazione epigenetica in relazione a diversificate condizioni di stress.. In particolare una parte del lavoro è stata incentrata sullo studio dei livelli e del pattern di metilazione del DNA, e, contestualmente, dell'ultrastuttura nucleare nei tessuti deputati alla crescita, in una fanerogama marina, *Posidonia oceanica*(L.) Delile. L'analisi dello stato di metilazione del DNA è stato affrontato con un approccio integrato utilizzando sia la tecnica MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) che tecniche immunocitologiche. Lo scopo è stato quello di evidenziare e identificare se e come i fattori di stress ambientale (impatto antropico) o sperimentalmente indotto (trattamenti con il cadmio) inducessero variazioni nei parametri

---

---

suddetti e se questi potessero coinvolgere specifici geni , putativamente correlati con meccanismi di risposta e/o tolleranza a tale fonte di stress. La scelta di *Posidonia oceanica* (L.) Delile in relazione alla tematica affrontata è da correlarsi al ruolo fondamentale che essa svolge nell'ambito degli ecosistemi marini costieri, (Ferrat *et al.*, 2003) ed al fatto di rappresentare un sensibile indicatore della qualità dell'ambiente marino (Guidetti *et al.*, 2001). Tale parte è stata svolta presso il laboratorio di Citofisiologia Vegetale dell'Università della Calabria sotto la supervisione della Dott. Adriana Chiappetta e della Prof. Maria Beatrice Bitonti ed i risultati ottenuti hanno messo in luce significative differenze nel pattern di metilazione del DNA in relazione alle condizioni analizzate.

Un secondo aspetto ha riguardato il ruolo che le diverse varianti dell'istone "linker" H1 svolgono nella regolazione della struttura cromatinica, essendo nota l'importanza che le modificazioni post-traduzionali degli istoni svolgono nel rimodellamento cromatinico, ed anche nella risposta a fattori di stress (Scippa *et al.*, 2000; Ascenzi Robert *et* Stephen Gantt 1997, 1999). In particolar modo poco si conosce sul ruolo che l'istone "linker" H1 svolge a livello nucleosomale e lo studio delle modifiche post-traduzionali che le varianti dell'istone H1 subiscono possono fornire utili informazioni sui meccanismi cellulari che da tale istone dipendono.

A questo proposito abbiamo con successo, messo a punto un nuovo, articolato e specifico protocollo di estrazione dell'istone linker da cellule di *Arabidopsis thaliana* T87, unito alla creazione di linee cellulari silenti per le diverse varianti dell'istone H1 attraverso la preparazione di costrutti via "artificial micro RNA". Tale parte è stata svolta presso il laboratorio di Biologia Molecolare delle Piante dell'Istituto di Biochimica e Biofisica di Varsavia(PL) sotto la supervisione del Prof. Andrzej JERZMANOWSKI

---

---

---



---

## Indice

### Capitolo 1: Ruolo della variazione nei livelli e nel pattern di metilazione nella risposta di *P.oceanica* allo stress.

#### Introduzione

#### 1.1 Epigenetica e regolazione genica

##### 1.1.1 Metilazione del DNA

#### 1.2 Il modello di studio: *Posidonia oceanica*

##### 1.2.1 Evoluzione, sistematica e morfologia

##### 1.2.2. Caratteristiche generali di *Posidonia oceanica*

##### 1.2.3. Riproduzione

##### 1.2.4. Adattamenti alla vita in ambiente marino

##### 1.2.5. Significato ecologico

##### 1.2.6 Variabilità genetica nelle popolazioni naturali

##### 1.2.7. Principali cause di regressione delle praterie di *Posidonia oceanica*

---

### **1.3 Piano delle attività**

### **1.4 Materiali e Metodi**

#### 1.4.1 Campionamento

1.4.2 Analisi AFLP di siti sensibili alla metilazione attraverso la tecnica Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism.

#### 1.4.3. Immunolocalizzazione della 5-metilcitosina

#### 1.4.4 Analisi citologica

#### 1.4.5 Organizzazione strutturale della cromatina

#### 1.4.6 Contenuto in pigmenti fotosintetici

#### 1.4.7 Isolamento dell'RNA e retrotrascrizione

#### 1.4.8 Quantitativa Real-Time PCR (qPCR )

1.4.9 Isolamento e clonaggio del gene *CMT* da piante di *Posidonia oceanica*

#### 1.4.10 Ibridazione *in situ* del gene *CMT*

### **1.5 Risultati**

1.5.1. Pattern di metilazione del DNA attraverso l'analisi MSAP

1.5.2. Identificazione dei frammenti polimorfici

1.5.3 Immunolocalizzazione della 5-metilcitosina

1.5.4 Rimodellamento cromatinico nei nuclei interfascici dei meristemi del germoglio

---

1.5.4a Parametri morfometrici in piante sottoposte a stress ambientale

1.5.4b Aspetti ultrastutturali in piante sottoposte a stress da cadmio

1.5.5 Livelli di espressione del gene *Pomt2* (*P. oceanica* Metallothioneina) in piante sottoposte a stress da cadmio.

1.5.6 Contenuto in Clorofilla *a* e Clorofilla *b* in piante sottoposte a stress da cadmio.

1.5.7 Caratterizzazione parziale del gene CMT in *Posidonia oceanica* e sua proteina dedotta

1.5.8 PCR-Quantitativa (qRT-PCR)

1.5.9 Ibridazione in situ su apici di *Posidonia oceanica*

## **Capitolo 2: Modificazioni post-traduzionali del core istonico e ruolo dell'istone "linker H1"**

### **Introduzione**

**2.1 Ruolo delle modificazioni post-traduzionali del core istonico.**

**2.2. Ruolo dell'istone "linker H1"**

2.2.1. Struttura dell'istone linker

2.2.2. Legame dell'istone linker alla cromatina

2.2.3. Funzioni dell'istone linker

---

## **2.3 *Arabidopsis thaliana*: Il sistema modello del mondo vegetale**

### **2.4 Piano delle attività**

### **2.5 Materiali e Metodi**

2.5.1. Cellule di *Arabidopsis thaliana*

2.5.2. Trattamento con NaCl

2.5.3. Protocollo di estrazione acida degli istoni

2.5.4. Preparazione di costrutti diretti al silenziamento di tutte le varianti dell'istone H1 attraverso meccanismi di RNA interfering

### **2.6 Risultati**

2.6.1 Estrazione proteica dell'istone H1

2.6.2 Test di vitalità cellulare in cellule di *A.thaliana* sottoposte a stress da NaCl

2.6.3 Preparazione di linee cellulari silenti

## **Conclusioni**

## **Bibliografia**

## **Partecipazione a Congressi e Pubblicazioni**

---

**Capitolo 1: Ruolo della variazione nei livelli e nel pattern di metilazione nella risposta di *P.oceanica* allo stress.**

*Introduzione*

## 1.1 Epigenetica e regolazione genica

Sono sempre più numerose le evidenze sperimentali che suggeriscono come l'espressione genica sia determinata non solo dal codice genetico ma anche da una molteplicità di fenomeni, definiti epigenetici.

I fenomeni epigenetici sono in grado di modificare l'espressione genica senza determinare cambiamenti nella sequenza del DNA e di trasmettersi di generazione in generazione. L'epigenetica è quindi, per definizione, "*lo studio delle modifiche ereditabili nella funzione del genoma che si verificano senza cambiamenti della sequenza di DNA*" (Haig 2004).

Inoltre molteplici dati in letteratura riportano che l'attività genica è fortemente influenzata da proteine che interagiscono con il DNA nell'assemblaggio della cromatina, da enzimi capaci di modificare queste proteine ed il DNA e infine dall'RNA (Habu *et al.*, 2001; Lindroth *et al.*, 2004).

Tra i meccanismi coinvolti nella regolazione epigenetica dei geni un ruolo importante è svolto dalla metilazione del DNA e dalle modificazioni post-traduzionali degli istoni. Questi meccanismi sono spesso correlati tra loro ed entrambi prevedono cambiamenti nella struttura della cromatina (rimodellamento) mediante modifiche covalenti (Habu *et al.*, 2001; Wolffe, A.P., Matzke, M.A. 1999; Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000).

### 1.1.1 Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è una delle principali modificazioni epigenetiche coinvolta nel silenziamento genico, (bloccando l'accesso di fattori di trascrizione ai rispettivi promotori) e nella modulazione della struttura della cromatina (reclutando complessi proteici che si legano al DNA metilato). Essa determina quindi la formazione di stati trascrizionalmente silenti della cromatina e permette la trasmissione di questi specifici pattern di attività genica attraverso le divisioni cellulari. La metilazione del DNA è inoltre associata con il controllo dell'integrità cromosomica, con eventi di ricombinazione genica e con meccanismi di difesa contro l'invasione di sequenze di DNA estraneo all'interno del genoma. Il controllo dell'espressione genica, mediato dalla metilazione del DNA, gioca un ruolo fondamentale anche nello sviluppo degli organismi sia animali che vegetali (Finnegan *et al.*, 1996).

Nelle piante il livello di metilazione del DNA varia a seconda della specie presa in considerazione ed oscilla dal 6% in *Arabidopsis* al 25% in *Zea mays* (Steward *et al.* 2002). Inoltre, la distribuzione delle citosine metilate non è casuale, infatti le sequenze maggiormente modificate sono quelle simmetriche CG e CNG (dove N è A, T o C) (Finnegan *et al.*, 1998). In molti casi anche le sequenze non-simmetriche del tipo CNN possono essere metilate (Steward *et al.*, 2002).

Negli animali la metilazione delle citosine avviene a carico del dinucleotide CpG e questo tipo di metilazione è frequente in particolari zone del genoma eucariotico, chiamate isole CpG. La metilazione del DNA in queste regioni, che generalmente sono poste a monte di promotori, è un meccanismo che interviene nel controllo dell'espressione genica, nell'inattivazione del cromosoma X, nella struttura cromatinica e nell'

*imprinting* genomico, mentre è assente a carico delle sequenze CpNpG e delle sequenze asimmetriche (Finnegan *et al.*, 1998b).

Nelle piante, la metilazione simmetrica CpG o CpNpG è ereditata durante la replicazione del DNA sotto forma di sequenze emimetilate. Al contrario, la metilazione delle citosine asimmetriche è ristabilita *de novo* dopo ogni ciclo di replicazione, dal momento che non ci sono sequenze metilate complementari che guidano la rimetilazione.

La metilazione del DNA dipende da specifici enzimi, le metiltransferasi. Evidenze sperimentali suggeriscono l'esistenza di tre differenti gruppi di DNA metiltransferasi nelle piante che differiscono nella funzione e nella struttura delle proteine (Cao *et al.*, 2003, Finnegan *et al.*, 1998, 2000; Lindroth *et al.*, 2001).

La prima classe è rappresentata dalla famiglia delle **metiltransferasi I** (MET1), omologa alla metiltransferasi di mammifero Dnmt1. I componenti di questa famiglia genica introducono un gruppo metilico nella sequenza CG (Finnegan *et Kovac* 2000), e funzionano come metiltransferasi di mantenimento (Finnegan *et al.*, 1998, 2000).

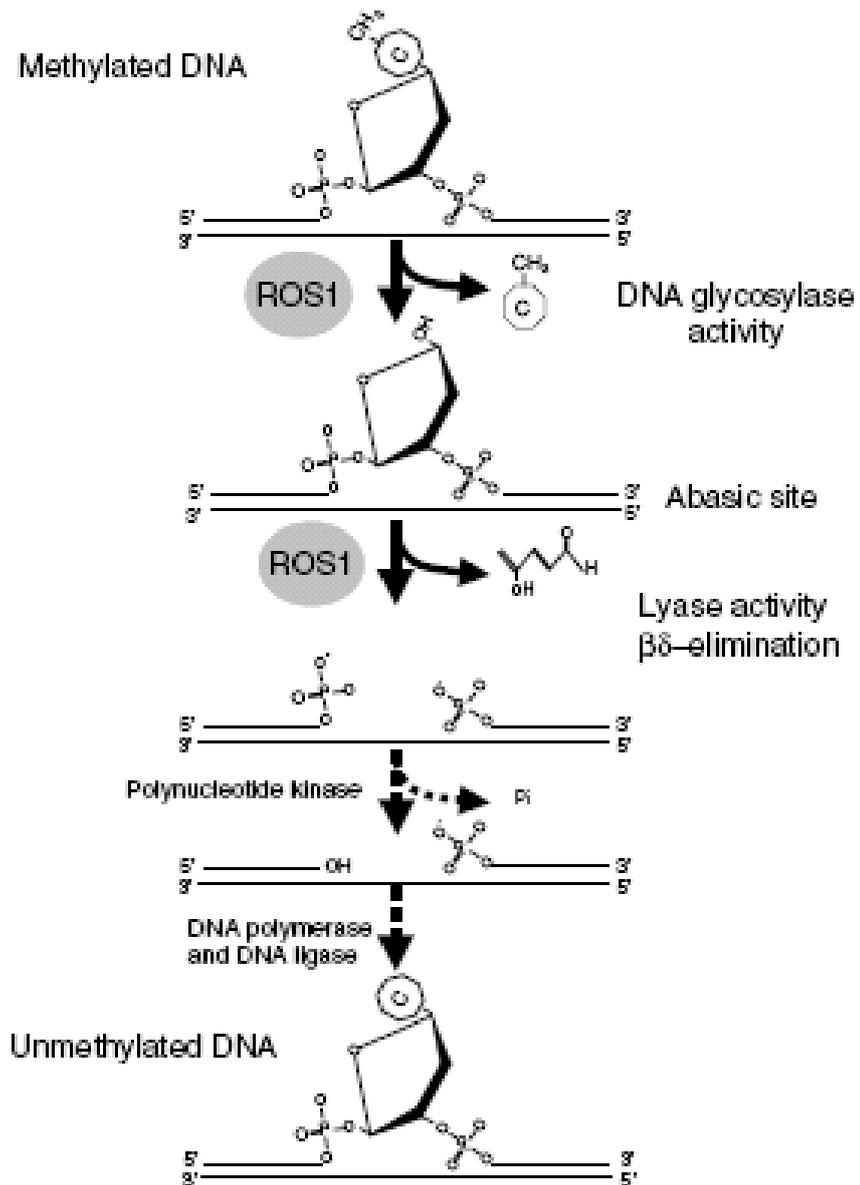
La seconda classe di metiltransferasi, la cromometilasi (**CMT**), è una DNA metiltransferasi, unica e caratteristica del regno delle piante. Essa è responsabile del controllo della metilazione del DNA a livello di sequenze CpNpG (Henikoff *et Comai* 1998; Papa *et al.*, 2001).

La CMT presenta un cromodominio tra i motivi conservati I e IV delle DNA metiltransferasi di mantenimento ed è in grado di interagire direttamente o attraverso l'interazione con altre proteine, a specifici domini della cromatina. Essa è coinvolta nel silenziamento epigenetico che collega la metilazione del DNA alla struttura della cromatina (Lindroth *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2001;).

L'ultima classe di metiltransferasi è chiamata “**domains-rearranged methyltransferases**” (**DRM**). Essa è coinvolta nella metilazione delle sequenze non-CG e mostra omologia di sequenza con la metiltransferasi di mammifero Dnmt3 (Cao *et al.*, 2003).

Le DRM1 e DRM2 sono principalmente indirizzate alla metilazione, *de novo*, dei siti asimmetrici (Cao *et Jacobsen*, 2002) ed hanno una funzione ridondante con la CMT3 nella metilazione dei siti CpNpG (Cao *et al.*, 2003).

Il DNA metilato può anche andare incontro a de-metilazione sia per inibizione della metilazione *de novo*, sia per l'incapacità di mantenere la metilazione dopo i cicli di replicazione del DNA, come evidenziato nei mutanti *met1* (Kankel *et al.*, 2003). In alternativa, un'attiva de-metilazione del DNA può essere il risultato dell'attività delle glicosilasi-like (Figura 1 - 5), come la DNA glicosilasi DEMETER (DME) o la “REPRESSOR OF SILENCING 1” (ROS1), una DNA glicosilasi/liasi che rimuove le metilcitosine dal DNA (Gong *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2005)



**Figura 1** Meccanismo biochimico della de-metilazione del DNA operato da ROS1. L'attività DNA glicosilatica di ROS1 determina la rimozione dell'acitosina metilata e la sua sostituzione con una non metilata. (Kapoor *et al.*, 2005)

Le piante, essendo organismi immobili devono essere capaci di strategie di risposta rapide ed efficienti in risposta a cambiamenti biotici e abiotici. Considerato che la metilazione del DNA rappresenta un meccanismo fondamentale di regolazione della struttura della cromatina e di modulazione dell'espressione genica (Dennis *et al.*, 1998; Finnegan *et al.*, 1998), le piante spesso la utilizzano come strategia di adattamento e di risposta a condizioni di stress attraverso regolazioni epigenetiche (Steward *et al.*, 2002). Non a caso, il genoma vegetale ha un livello di metilazione maggiore rispetto a quello degli animali: più del 40% delle citosine sono metilate nelle piante, rispetto all'8% degli animali (Adams *et Burdon*, 1985).

La metilazione e/o demetilazione del DNA possono quindi rappresentare un meccanismo con cui la pianta risponde o si adatta a condizioni di stress ambientale, attraverso la regolazione dell'espressione di geni coinvolti nella difesa e nella tolleranza allo stress (Finnegan *et al.*, 1993; Kovarik *et al.*, 1997; Steward *et al.*, 2002). Dati in letteratura correlano, ad esempio l'ipermetilazione di loci eterocromatici in tabacco alla risposta a stress osmotici (Kovarik *et al.*, 1997). Dyachenko e collaboratori (2006) hanno messo in evidenza un aumento di due volte nel livello di metilazione delle sequenze CpNpG nel genoma nucleare di *M. crystallinum* in condizioni di alta salinità. Eventi di ipometilazione sono stati invece riportati in radici di cicoria (Demeulemeester *et al.*, 1999) ed in *Arabidopsis thaliana* (Finnegan *et al.*, 1998) in seguito ad esposizione a basse temperature. Anche piantine di mais sottoposte a stress da freddo presentano una massiva de-metilazione del DNA genomico, evidente soprattutto a livello del core nucleosomale (Steward *et al.*, 2002).

La demetilazione del core nucleosomale, con conseguente rilassamento della struttura cromatinica potrebbe rappresentare uno switch trascrizionale indotto dallo stress per attivare geni da esso regolati (Steward *et al.*, 2002). Infatti, in mutanti *met1* di *A.thaliana*, accanto agli eventi di ipometilazione che li caratterizza, si registra l'espressione *ex novo* di 31 geni, molti dei quali correlati alla risposta allo stress. Anche stimoli ambientali come l'esposizione all'alluminio (Choi *et Sano*, 2007), ai metalli pesanti (Aina *et al.*, 2004), ed allo stress idrico, possono indurre variazioni nella metilazione delle citosine all'interno del genoma (Labra *et al.*, 2002). Gli stimoli ambientali possono quindi indurre modificazioni cromatiniche come risposta adattativa a tali cambiamenti (Jablonka *et Lamb*1989).

## 1.2 Il modello di studio: *Posidonia oceanica*

### 1.2.1 Evoluzione, sistematica e morfologia

*Posidonia oceanica* (L.) Delile è una Angiosperma acquatica paleoendemica del mar Mediterraneo e descritta per la prima volta nel 1792 dal naturalista napoletano Filippo Cavolino.

Il nome *Posidonia oceanica* risale al 1813 e deriva da *Poseidone* (ποσειδών), divinità greca del mare (Fig. 1).



**Fig. 1.** Prateria di *Posidonia oceanica*.

Attualmente le Angiosperme marine constano di circa 60 specie (Den Hartog C., 1970), appartenenti a 12 generi ed a 4 famiglie: la famiglia delle *Hydrocharitaceae*, delle *Posidoniaceae*, delle *Cymodoceaceae* e delle *Zosteraceae* (Den Hartog *et al.*, 1977).

Dal punto di vista sistematico la phanerophyta *Posidonia oceanica* (L.) Delile appartiene alla classe delle *Monocotyledonae*, alla sottoclasse delle *Alismatidae*, all'ordine delle *Alismatales*, alla famiglia delle *Posidoniaceae* ed al genere *Posidonia* (Les *et al.*, 1997).

Secondo la teoria più accreditata, il genere *Posidonia* aveva, in passato, una distribuzione areale molto più ampia rispetto a quella attuale e comprendeva sia zone tropicali che temperate. Ma, la competizione con altre piante, meglio adattate alla vita lungo la fascia tropicale, ha confinato *Posidonia* nelle regioni temperate. Attualmente, il genere *Posidonia* presenta una distribuzione bipolare; delle nove specie note *Posidonia oceanica*, è endemica del mar Mediterraneo, mentre le rimanenti otto sono diffuse nei mari dell'Australia (Fig. 2).



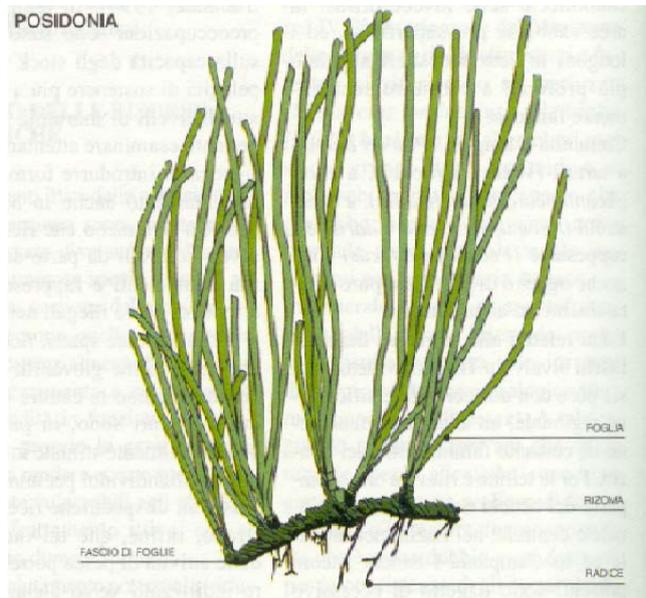
**Fig. 2.** Areale del genere *Posidonia oceanica*.

*Posidonia oceanica* vive a profondità marine comprese tra 1 e 40 metri. Tale variabilità è fortemente condizionata da fattori abiotici quali la luce e la temperatura. Infatti, per quanto riguarda la luce, la presenza della pianta a profondità maggiori si registra solo in acque particolarmente limpide ed in un range di temperature compreso tra 10°C e 28°C. Essa risulta invece poco tollerante alle variazioni di salinità, infatti, manca completamente lungo le foci dei fiumi e nelle lagune salmastre costiere (Boudouresque *et al.*, 1985; Giraud, G. 1977).

Dal punto di vista morfologico, *Posidonia oceanica* è una cormofita ed è quindi una pianta organizzata in radici, fusto e foglie. Il fusto è un rizoma dal cui lato ventrale originano le radici avventizie che garantiscono l'ancoraggio della pianta al substrato e l'assorbimento delle sostanze nutritive.

Le radici così come le foglie seguono uno sviluppo stagionale. Le radici hanno un diametro di 3 - 4 mm circa e possono raggiungere una lunghezza che varia da 1 a 5 cm. La parte più esterna sia del rizoma che della radice vanno incontro ad un graduale processo di lignificazione che rallenta i fenomeni di degradazione dei tessuti.

Nella parte superiore del rizoma è situato il meristema apicale del germoglio dalla cui attività originano le foglie. Queste sono organizzate in ciuffi e formano estese praterie. Le praterie colonizzano soprattutto i fondali sabbiosi sviluppando robusti rizomi ma, non di rado, colonizzano anche i substrati rocciosi (Fig. 3).



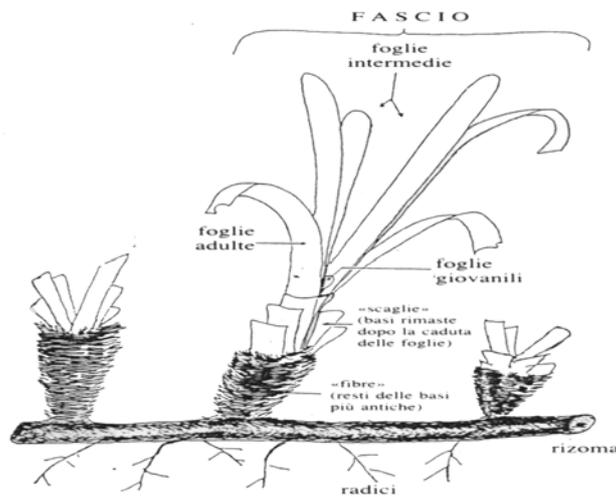
**Fig. 3.** Organizzazione morfologica di *Posidonia oceanica*

### 1.2.2. Caratteristiche generali di *Posidonia oceanica*

L'aspetto morfologico di *Posidonia oceanica* è del tutto peculiare. Nella parte superiore del rizoma è situato l'apice vegetativo da cui originano foglie nastriformi con apici arrotondati la cui larghezza media è di circa un centimetro. Le foglie sono organizzate in tipici fasci e, nell'ambito di ogni fascio, si dispongono a ventaglio: le più vecchie, di maggiore lunghezza, sono esterne mentre le più giovani, di taglia inferiore, si trovano all'interno del fascio stesso (Fig. 4).

Le foglie hanno un lembo fotosintetizzante ed una base di colore bianco, presente solo nelle foglie che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo

adulto. Il limite tra queste due zone (base e lembo) è rappresentato da una linea concava detta ligula, in corrispondenza della quale le foglie più vecchie tendono a staccarsi. Le basi, che restano attaccate al rizoma, con il tempo si riducono a sottili scaglie e, persistendo, formano una sorta di manicotto che avvolge il rizoma stesso. Quindi, a seconda della presenza o meno della base e della lunghezza delle foglie, che può raggiungere anche il metro e mezzo, le foglie sono convenzionalmente distinte in: foglie giovanili (< 5 cm), foglie intermedie (tra 6-20 cm) e foglie adulte (> 20 cm) (Giraud, 1979).



**Fig. 4.** Fascio di foglie di *Posidonia oceanica* in cui sono rappresentate le tre diverse tipologie di foglie (adulte, intermedie, giovanili).

E' importante sottolineare che le foglie di *Posidonia* hanno un accrescimento basale che, nel caso di piante colonizzate da epifiti contribuisce a ridurre l'ombreggiamento dei tessuti in accrescimento e differenziazione da parte di questi stessi organismi.

L'attività fotosintetica sembra essere confinata quasi esclusivamente agli strati epidermici della foglia, mentre, al contrario di quanto avviene nelle piante emerse, risulta scarsa nel mesofillo (Alcoverro *et al.*, 2001; Ott, J.A. 1980). Le cellule epidermiche presentano, infatti, numerosi e ben sviluppati cloroplasti, oltre a molti organuli, indice questo di un'intensa attività metabolica.

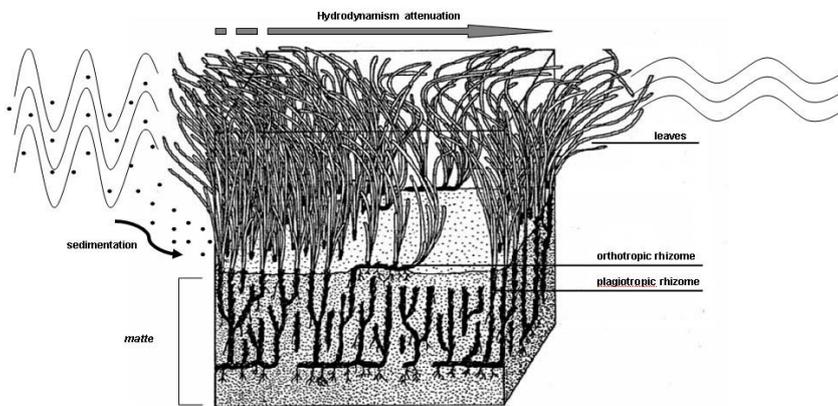
Dal punto di vista fotosintetico le *seagrasses* sono considerate piante a metabolismo C3, ma spesso nella foglia ritroviamo un'organizzazione strutturale intermedia tra le piante C3 e C4, suggerendo la presenza di particolari meccanismi di concentrazione del carbonio per favorire l'azione della Rubisco (Kuo, 1983; Touchette & Burkholder, 2000). Infatti, solo poche piante terrestri adattate a vivere all'ombra presentano una disposizione dei cloroplasti prevalentemente epidermica, confrontabile con quanto riscontrato in *Posidonia oceanica*.

Il rizoma può accrescersi sia in senso orizzontale che verticale ed in base alla modalità di crescita è definito rizoma "plagiotropo" e rizoma "ortotropo" rispettivamente.

La differente capacità di crescita del rizoma assicura alla pianta di adattarsi alle diverse condizioni ambientali in ogni momento del suo ciclo vitale, adottando l'uno o l'altro dei due tipi di crescita. La crescita del rizoma è piuttosto lenta ed è di circa 4 cm all'anno per il rizoma plagiotropo e di 1 cm all'anno per quello ortotropo. I rizomi plagiotropi hanno, inoltre, la funzione di ancorare la pianta al substrato, quelli ortotropi, crescendo invece in altezza, contrastano il progressivo insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione e permettono in tal modo di sfruttare al massimo lo spazio e

la luce disponibili. Diversi strati di rizoma assieme al sedimento in esso compattato, formano una particolare struttura, detta *matte*, che può raggiungere diversi metri di spessore (Green & Short, 2003).

I rizomi, dunque, sono capaci di intrappolare grandi quantità di sedimenti, contribuendo a migliorare la qualità delle acque e nel contempo a limitarne la torbidità (Terrados & Duarte, 2000). Inoltre, le foglie agendo come massa frenante del moto ondoso, smorzano l’impatto idrodinamico sul litorale (Fig. 5).



**Fig. 5.** Rappresentazione schematica di una prateria di *Posidonia oceanica*.

### 1.2.3. Riproduzione

La più frequente modalità di riproduzione adottata da *Posidonia oceanica* è quella vegetativa e forma vaste praterie le cui singole piante sono fortemente intersecate tra loro e danno origine ad una struttura in cui è difficile

distinguere le singole unità. Questa modalità di propagazione è definita “**stolonizzazione**” e rappresenta una conseguenza del meccanismo di riproduzione asessuata largamente adottato nel regno vegetale che origina discendenti geneticamente identici tra loro tali da costituire popolazioni clonali (Caye G. and Meinesz A. 1992).

Accanto alla riproduzione vegetativa *Posidonia oceanica* si riproduce anche attraverso un ciclo sessuato con formazione di fiori e frutti. La riproduzione gamica si verifica in primavera quando le praterie di *Posidonia* raggiungono il loro massimo sviluppo vegetativo.

I fiori sono ermafroditi ed ogni pianta ne produce un numero variabile compreso tra 4 e 10. I fiori sono organizzati in infiorescenze di colore verde, inserite su uno stelo localizzato al centro del ciuffo (Fig. 6).

Ogni infiorescenza è avvolta per tutta la sua lunghezza da due brattee fiorali de-pigmentate e lunghe circa 2-5 cm (Caye *et al.*, 1984; Meinesz *et al.*, 1984).

Nelle praterie superficiali, quelle che si estendono fino a 15 m di profondità, i fiori compaiono nei mesi di Settembre-Ottobre. In questo caso lo sviluppo dei frutti inizia nel tardo autunno e si completa nei mesi di Marzo ed Aprile. Nelle praterie profonde, quelle che si estendono oltre i 15m di profondità, il ciclo riproduttivo è identico, ma ritardato di circa due mesi (Duarte,C.M. 1991; Lorenzi et al 1995).



**Fig. 6.** Infiorescenza di *Posidonia oceanica*.

La fioritura è un fenomeno abbastanza raro ed è influenzato da una serie di fattori quali la temperatura, la profondità ed il tipo di substrato in cui cresce la prateria.

Alla fecondazione dell'ovulo segue la modificazione dell'ovario e lo sviluppo del frutto di *Posidonia* chiamato “**oliva di mare**” poiché ricorda nella forma e nelle dimensioni un'oliva (Fig. 7).

Completata la maturazione il frutto si stacca dalla pianta madre e galleggia sulla superficie dell'acqua aiutato dall'involucro esterno, il pericarpo, che si presenta poroso e ricco di sostanze oleose. La deiscenza del pericarpo determina la liberazione del seme che, caduto sui fondali marini, inizia il processo di germinazione solo quando incontra le condizioni ambientali favorevoli (Boudouresque *et al.*, 1985). Tale modalità di dispersione del seme assicura alla pianta la colonizzazione di vasti spazi.



**Fig. 7.** Frutto di *Posidonia .oceanica*

#### **1.2.4. Adattamenti alla vita in ambiente marino**

*Posidonia oceanica* come tutte le phanerophyte marine, ha evoluto una serie di adattamenti morfologici e fisiologici che le permettono la vita in mare. Tra i tessuti è diffuso il parenchima aerifero che facilita gli scambi gassosi in tutte le parti della pianta. Le foglie sono prive di stomi ed hanno una cuticola sottile che facilita la diffusione di ioni ed anidride carbonica. Spesso *Posidonia* vive in substrati soggetti all'anossia ed è per questo motivo che le radici, oltre ad ancorare la pianta al substrato ed assorbire sostanze nutritive, fungono da riserva di ossigeno nel parenchima aurifero (Albergoni *et al.*, 1978).

### 1.2.5. Significato ecologico

*Posidonia oceanica* svolge un ruolo fondamentale nell'economia degli ecosistemi marini costieri, per un insieme di motivi di carattere sia biologici che fisici (Della Croce *et al.*, 1997; Gambi, 2002; Pergent *et al.*, 1994; Pergent Martini *et al.*, 1994). Le vaste praterie assicurano infatti:

- una grande produzione di ossigeno. *Posidonia* grazie al notevole sviluppo fogliare, può liberare nell'ambiente fino a 16 litri di ossigeno al giorno per ogni m<sup>2</sup> di prateria;
- l'ecosistema di *Posidonia oceanica* costituisce una sorta di “nursery” e rappresenta un rifugio per un grande numero di organismi, tra cui numerose specie anche di notevole importanza economica;
- una produzione ed esportazione di biomassa e di energia. Si calcola che circa il 30% della produzione di una prateria venga esportato in ecosistemi sia limitrofi, che distanti e molto più profondi;
- fissazione dei fondali;
- protezione delle spiagge dall'erosione. Riduzione infatti l'idrodinamismo con lo strato fogliare e attenua il moto ondoso a riva, con le foglie morte.

In passato *Posidonia oceanica* ha avuto svariati utilizzi anche se attualmente sono stati in gran parte abbandonati. Era utilizzata come materiale da imballaggio o per isolamento termico, come mangime e concime. Attualmente si sta valutando la possibilità di utilizzarla, mediante opportuni trattamenti, anche per produrre biogas.

La consapevolezza dell'estrema importanza di questo ecosistema marino ha portato, in misura sempre crescente, l'interesse sia del mondo scientifico che degli amministratori pubblici ad adottare, misure di salvaguardia e tutela di questa preziosa pianta marina.

### **1.2.6. Variabilità genetica nelle popolazioni naturali**

Uno dei parametri che permette di individuare specie e popolazioni potenzialmente a rischio di estinzione è la valutazione della loro variabilità genetica. Solo un adeguato livello di variabilità genetica conferisce ad una specie la plasticità genetica necessaria per resistere alle minacce di estinzione (Micheli C, *et al.*, 2005).

La capacità di evoluzione di una specie è in funzione del polimorfismo genetico (Lemantin *et al.*, 1964) e di alti valori di eterozigosità che fanno aumentare la fitness della specie. Un ruolo molto importante per introdurre e mantenere la variabilità genetica nelle specie è la riproduzione gamica. In *Posidonia oceanica* la riproduzione gamica è sporadica e le fioriture sono spesso limitate ad alcune praterie ed a particolari condizioni ambientali. In *Posidonia* si registra anche il fenomeno dell'autoimpollinazione mentre la germinazione dei semi sembra essere un evento raro (Mazzella *et al.*, 1987).

Il livello di inbreeding è molto alto nelle popolazioni naturali (Procaccini *et al.*, 2001) e la propagazione clonale è la principale forma di propagazione delle praterie. Solo il flusso genico assicura un certo livello di variabilità genetica nelle popolazioni naturali e dipende sia dalla capacità di dispersione della specie considerata e sia dalle caratteristiche ambientali. Perciò in *Posidonia* sia i frutti galleggianti che i frammenti di rizoma

possono essere trasportati dalle correnti a grandi distanze controbilanciando l'isolamento genetico delle popolazioni.

Tra i possibili fattori che limitano il flusso genico nelle popolazioni sono da prendere in considerazione sia le barriere naturali che la frammentazione degli habitat dovuta principalmente ad attività antropiche (Procaccini *et al.*, 2001).

### **1.2.7. Principali cause di regressione delle praterie di *Posidonia oceanica***

Già a partire dagli anni 1950 numerosi studi hanno sottolineato, da un lato, l'importanza delle praterie di *Posidonia oceanica* nella conservazione degli equilibri degli ecosistemi costieri, dall'altro i gravi fenomeni di regressione, che interessano molti tratti costieri del Mediterraneo (Fig. 8b), soprattutto nelle fasce più superficiali (Duarte, 2000). Tra le possibili cause di tale regressione sono da annoverare sia le tecniche di pesca in uso, deleterie per i fondali (Pasqualini *et al.*, 1999), sia lo sversamento nelle acque marine di sostanze tossiche e/o nocive e di scarichi civili. Anche la diffusione di specie vegetali alloctone, fortemente invasive e di grande capacità colonizzatrice, quali ad esempio *Caulerpa taxifolia*, sembrano causare danni seri alle praterie di *Posidonia* o quantomeno ostacolarne i processi di ricolonizzazione, là dove questa risulti diradata o danneggiata. In generale, gli effetti di disturbo esercitati su questa phanerophyta stanno ormai diventando causa di grave alterazione degli ecosistemi marini da essa caratterizzati (Whitfield *et al.*, 2004), con conseguente riduzione degli habitat, perdita di biodiversità, alterazione della rete trofica, riduzione della

funzionalità ecologica, della capacità di controllo dei meccanismi di erosione costiera, della produttività, della qualità ambientale e così via.

**Fig. 8. *Posidonia.oceanica***



**(a) sito di controllo**



**(b) sito disturbato**

### 1.3 Piano delle attività

La putativa relazione tra stato di metilazione del DNA rimodellamento cromatinico e condizioni di stress è stata analizzata nella fanerogama marina *Posidonia oceanica* (L.) Delile. In particolare sono state analizzate:

- i) piante cresciute in praterie dislocate lungo le coste della Calabria, ad una distanza di circa tre chilometri l'una dall'altra, sottoposte a diverso impatto antropico; in particolare una ben preservata localizzata a San Nicola Arcella (M3= sito ben preservato) in un'area poco antropizzata e l'altra a Praia a Mare (M4= sito disturbato), un'area turistica vicino alla foce del fiume Noce che provoca periodiche aumenti nella velocità di sedimentazione e nella torpidità delle acque. I prelievi sono stati effettuati in due successivi anni e nel corso di tre diversi periodi dell'anno: Aprile, Giugno e Novembre;
- ii) piante acclimatate in acquario per tre giorni e quindi sottoposte a condizioni di stress controllato indotto da  $\text{CaCd}_2$ , a differenti concentrazioni e per differenti tempi:  $10\mu\text{M}$  per 6 ore (t 106h), 2 giorni (t 102d) 4 giorni (t 104d) e  $50\mu\text{M}$  per 6 (t 506h), 2 giorni (t 502d) 4 giorni (t 504d).

E' stato selezionato il cadmio quale stressore da applicare in quanto uno dei metalli pesanti maggiormente presente in ambienti marini impattati (Audrey M. Pruski and David R. Dixon 2002; Michael P. Waalkes 2000). E' inoltre ben documentato che il cadmio, oltre ad essere riconosciuto come carcinogeno umano (Pruski *et al.*, 2002; Waalkes *et al.*, 2000) ha effetti tossici per le piante inibendone la

crescita (Chakravarty *et al.* , 1992 ; Liu *et al.* , 1992). Tra gli effetti indotti a livello cellulare è stato dimostrato che il cadmio rallenta l'attività mitotica (Zhang *et al.* , 1994) ed induce diversi cambiamenti a livello ultrastrutturale e un'alta condensazione della cromatina nucleare che portano al fenomeno dell'apoptosi o morte cellulare programmata sia nelle piante che negli animali (Liu *et al.*, 2004; Banfalvi *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 1997; Kuthanova *et al.*, 2004; Gichner *et al.*, 2004).

Al fine di valutare l'influenza di tali fattori di stress sullo stato di metilazione del DNA, sono stati presi in esame gli organi deputati all'accrescimento ed alla produttività della pianta, quali apice meristematico e giovani foglie. Lo stato di metilazione è stato investigato attraverso un duplice approccio:

- i) l'analisi MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) (Voe *et al.*, 1995), una variante della tecnica AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) (Xu *et al.* , 2000), al fine di individuare la presenza di polimorfismi legati alla metilazione del DNA;
- ii) l'analisi immunocitologica, usando un anticorpo monoclonale contro la metilcitosina, al fine di verificare non solo il livello di metilazione ma anche il pattern di localizzazione e distribuzione della metilazione a livello dei nuclei interfascici.

Successivamente è stato valutato il rimodellamento cromatinico nei nuclei interfascici degli stessi organi analizzando alcuni parametri morfometrici, come la misura dell'area nucleare e nucleolare, nelle piante esposte a stress ambientale ed analizzando al microscopio elettronico le caratteristiche ultrastrutturali nucleari nelle piante trattate con cadmio.

Per quanto attiene i trattamenti con il cadmio, al fine di verificare la reale sensibilità di *Posidonia oceanica* nei confronti di tale metallo, abbiamo valutato attraverso qRT-PCR ( Real Time Polymerase chain reaction) il livello di espressione del gene *Pomt 2*, già presente in banca dati ([AJ628145](#)) che codifica in *P. oceanica* per una *metallotioneina di classe 2*), proteine che svolgono un ruolo chiave nella risposta della pianta ai metalli pesanti.

Le MTs sono una famiglia di piccole proteine (6–7 kDa) leganti i metalli, altamente conservate durante l'evoluzione (Klaassen *et al.*, 1999). Caratteristica delle MTs è l'assenza di aminoacidi aromatici mentre i *clusters* aminoacidici caratteristici sono costituiti da Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-X-Cys dove X è rappresentato da un diverso aminoacido. Una delle più importanti funzioni delle metallotioneine è la detossificazione da metalli pesanti, grazie ai loro gruppi tiolici con i quali riescono ad immobilizzare e complessare gli ioni di diversi metalli pesanti, in particolare il cadmio e il mercurio. Esse si esprimono principalmente nelle radici e nelle foglie, due dei principali organi coinvolti nel trasporto e nella detossificazione dei metalli pesanti (Marentes E, Rauser WE 2007; Gonzalez-Mendoza D, *et al.*, 2007; Cobbett C, Goldsbrough P. 2002; Zimeri AM *et al.*, 2005). Da sottolineare che le MTs, sono particolarmente sensibili nei confronti dell'intossicazione da parte del cadmio all'interno della cellula (Zimeri AM *et al.*, 2005). Le metallotioneine si dividono in 2 classi ed in *Posidonia oceanica* sono stati finora identificate i geni per le MTs di tipo 2 ([AJ628146](#), [AJ628145](#), [AJ628144](#), [AJ628143](#), [AJ628142](#), [AJ628141](#), [AJ628140](#), [AJ628139](#), [AJ628138](#)). Il trascritto di *Pomt 2* è stata localizzato nel meristema apicale ed a livello delle giovani foglie e correlato alla funzione

della proteina nel trasporto a lunga distanza dei metalli pesanti (Giordani *et al.*, 2000).

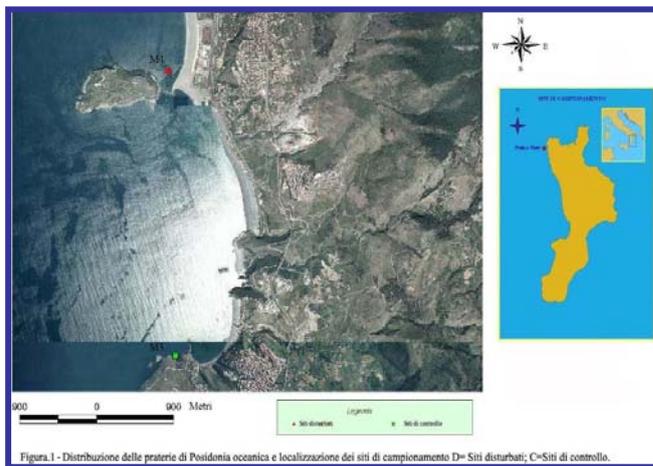
Altro parametro strettamente connesso all'accrescimento delle piante, preso in esame nelle piante sottoposte a stress da cadmio è stato la quantità in clorofilla *a* e *b*. Quando si accumula nei tessuti, il cadmio influenza infatti negativamente numerosi processi biochimici, morfologici e fisiologici portando ad una inibizione della crescita, anche in risposta alla diminuita attività fotosintetica (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999). Il cadmio infatti inibisce la sintesi di clorofilla (Stobart *et al.* 1985; Horvath *et al.*, 1996) oltre ad attivarne la degradazione enzimatica (Somashekaraiah *et al.* 1992). In pomodoro, ad esempio, l'esposizione al Cd è risultata indurre una diminuzione nel contenuto in clorofilla *a* e *b* ed un'alterazione nell'architettura dei fotosistemi con riduzione nell'efficienza del PSII (Christine Delpere and Stanley Lutts 2008; Baszynski *et al.*, 1980).

A valle dell'analisi MSAP è stato infine caratterizzato in *P.oceanica*, uno dei geni chiave nel meccanismo di metilazione del DNA, il gene *cromometilasi (CMT)*, essendo questi risultato essere differenzialmente regolato in piante di *P. oceanica* esposte ai trattamenti con il cadmio. Alla caratterizzazione è seguito lo studio, attraverso sia qRT-PCR che ISH del pattern di espressione di tale gene in risposta allo stress da cadmio. In particolare l'espressione di *PoCMT* (*Posidonia oceanica*CROMOMETILASI) è stata monitorata sia negli apici meristemati che nelle foglie di piante acclimatate in acquario in presenza di (CaCd<sub>2</sub>), alla duplice concentrazione di 10µM e 50µM per 6 ore, 2 giorni e 4 giorni.

## 1.4 Materiali e Metodi

### 1.4.1 Campionamento

Piante di *Posidonia oceanica* sono state prelevate, in maniera *random*, da due popolazioni situate lungo il litorale tirrenico in Calabria (Sud Italia). Una delle due praterie è un'area turistica che si trova vicino la foce del fiume Noce, il quale provoca un alto tasso di sedimentazione e torbidità delle acque. E' quindi una prateria caratterizzata da un forte impatto antropico, denominata M4, localizzata a nord dell'Isola di Dino, a Praia a Mare. L'altra popolazione, non disturbata è stata considerata una prateria di controllo e denominata M3. Essa si trova nei pressi di San Nicola Arcella (Figura 1). Analisi preliminari ci hanno permesso di identificare significative variazioni nell'intensità luminosa delle due praterie prese in considerazione, con una diminuzione di circa il 50% dell'intensità luminosa nella prateria M4 rispetto a quella ben preservata M3.



**Figura 1.** Siti di campionamento.

La sigla M, utilizzata per identificare i due siti, indica “substrato molle” e descrive le caratteristiche del fondale marino in cui sono state prelevate le piante. Si tratta di un substrato di tipo sabbioso (M=molle).

Per quanto riguarda i campioni processati per questo lavoro, gli individui sono stati raccolti in un *range* barimetrico compreso tra i 10 ed i 20 m di profondità.

30-35 differenti piante sono state prelevate in tre diversi periodi stagionali: Aprile, Giugno e Novembre, nei due siti per due anni consecutivi. Le singole piantine sono state raccolte a circa 10 m di distanza l’una dall’altra, allo scopo di minimizzare i rischi di campionare all’interno di una stessa popolazione clonale. I campioni sono stati riposti in contenitori adeguati, trasportati in laboratorio ed opportunamente processati.

#### Scheda di campionamento 1

Luogo di Raccolta	Prateria 1	Prateria 2
Località	Praia a Mare (M4)	San Nicola Arcella (M3)
Distanza dalla riva	100m	100m
Tipo di fondale	sabbioso	sabbioso
N° di campioni	20	20
Data di campionamento	Aprile, Giugno e Novembre.	Aprile, Giugno e Novembre.

Da ciascuna pianta sono stati prelevati gli apici vegetativi e le foglie. Per quanto riguarda le foglie, queste sono state accuratamente lavate e

ripulite di eventuali epifiti presenti sulle loro superfici attraverso l'uso di un bisturi sterile.

Su questi campioni è stata effettuata un'analisi istologica ed un'analisi del pattern di metilazione del DNA. Quest'ultima è stata estesa anche a piante prelevate da una prateria ben conservata presente lungo la zona tirrenica Calabrese presso Scilla.

Al fine di valutare la risposta delle piante ad uno stress controllato, i campioni prelevati a Scilla sono stati trasportati in laboratorio e trasferiti in due differenti acquari (30-35 piante per acquario) in presenza di CdCl<sub>2</sub> a due differenti concentrazioni, una di 10 µM e l'altra di 50 µM. E' stato scelto il CdCl<sub>2</sub> perchè è uno dei metalli pesanti maggiormente presente in ambienti marini impattati (Bertin *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Le piante sono state trattate con CdCl<sub>2</sub> per tre differenti periodi: 6 ore, 2 giorni e 4 giorni.

Ogni acquario è stato allestito con circa 100 l di acqua di mare, a pH 7.8, ed al suo interno è stato assicurato un adeguato flusso di ossigeno. I campioni utilizzati per le analisi cito-fisiologiche e molecolari sono stati adeguatamente fissati o congelati in azoto liquido.

### Scheda di campionamento 2

Luogo di raccolta	Prateria 3	Prateria 3	Prateria 3
Località	Scilla	Scilla	Scilla
Trattamento	CaCd <sub>2</sub>	CaCd <sub>2</sub>	Controllo
Concentrazione usata	10 µM	50 µM	--
Tempo di trattamento	6ore, 2 giorni, 4giorni	6ore, 2 giorni, 4giorni	6ore, 2 giorni, 4giorni

#### **1.4.2 Analisi AFLP di siti sensibili alla metilazione attraverso la tecnica Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism.**

Apici meristematici ( 10-15 per ogni campione) e foglie di *Posidonia oceanica* provenienti da ogni prateria presa in esame (M3,M4) e foglie di piante sottoposte ai diversi trattamenti con CdCl<sub>2</sub>, sono stati prelevati e sottoposti ad estrazione di DNA genomico totale secondo il metodo Doyle *et al.* (1987). La digestione dell'RNA presente nell'estratto è stata effettuata incubando i campioni con RNasi A (0,1mg /ml) per 60 min a 37°C. Il DNA totale, estratto e purificato, è stato infine quantizzato, usando il fluorimetro DyNA Quant<sup>TM</sup> 200.

L'analisi MSAP è stata effettuata secondo un adattamento del protocollo di Xu *et al.*, (2000). A tale scopo il DNA genomico di apici meristematici e foglie di *Posidonia oceanica* è stato sottoposto a doppia digestione, usando due coppie di enzimi di restrizione (isoschizomeri) separatamente. Nella prima reazione circa 1 µg di DNA genomico è stato digerito con 7 U di EcoR I/ Msp I (Promega) in un volume finale di 45 µl contenente il buffer Multi core (Promega), a 37 °C per tutta la notte. In una reazione parallela, una stessa quantità di DNA genomico è stata digerita con 7 U di EcoR I/Hpa II (Promega) nelle stesse condizioni di reazione della prima digestione. I frammenti di DNA ottenuti dalle due digestioni parallele sono stati "ligati" a specifici adattatori oligonucleotidici, in una reazione che comprende il legame ai rispettivi adattatori Msp I o Hpa II (50 pmol), entrambi insieme all'adattatore EcoR I (5 pmol). La reazione è stata condotta con 1,5 unità di DNA ligasi T4, a 16°C per tutta la notte, in un volume finale di 50 µl, come descritto da Xiong *et al.*, (1999).

L'adattatore EcoRI consiste nella combinazione di due primers: 5' - CTCGTAGACTGCGTACC-3' e 3'- CTGACGCATGGTTAA - 5'. Mentre l'adattatore unico, Hpa II/Msp I consiste nella combinazione dei primers 5' - GACGATGAGTCTCGAT-3' e 3'- TACTCAGAGCTAGC - 5'. Gli adattatori sono stati preparati unendo una uguale quantità dei due filamenti oligonucleotidici di DNA, riscaldandoli a 65°C per 10 min, e successivamente raffreddandoli a temperatura ambiente.

Dopo la ligazione, la mix di reazione, formata dal digerito/ligato è stata diluita in un volume finale di 250µl con il buffer TE (10mMTris-HCl, 0,1mM EDTA pH 8,0), ed è stata usata come templatato per la prima reazione di amplificazione, chiamata preamplificazione selettiva.

Questa tappa consiste in una reazione di PCR in cui si usano primers complementari agli adattatori EcoRI e HpaII/MspI con un nucleotide addizionale selettivo al 3' (primers EcoRI +A/T e HpaII-MspI +A/T).

La reazione di PCR ha previsto 20 cicli di amplificazione, con una prima tappa di denaturazione a 94°C per 45 s, seguita da 1 min di "annealing" a 54°C, e 1 min di estensione a 72°C. Dopo una tappa finale di allungamento a 72° C per 10 min, il prodotto della preamplificazione selettiva è stato diluito 15 volte con il buffer TE ed ulteriormente usato come "templatato" per la successiva reazione di PCR chiamata amplificazione selettiva. In questa fase finale di amplificazione sono stati usati i primers EcoR I e Hpa II/Msp I con due o tre nucleotidi selettivi, aggiunti all'estremità 3'.

L'amplificazione selettiva è stata effettuata secondo il protocollo di Vos *et al.*, (1995). La combinazione dei primers EcoR I e Hpa II/MspI con i nucleotidi selettivi ha permesso di ottenere un ottimo numero di frammenti

polimorfici identificabili. La combinazione di primers usata è mostrata nella tabella 1- 3 .

Alla fine dell'amplificazione selettiva, il prodotto di amplificazione è stato separato elettroforeticamente, secondo il seguente protocollo: 5 $\mu$ l di buffer per la corsa (90% formammide, 10mM EDTA pH 8,0, e blu di bromo fenolo e xylene cyanol come coloranti) sono stati aggiunti a 5 $\mu$ l di prodotto di amplificazione, denaturati a 95° C per 2 min e rapidamente raffreddati in ghiaccio. La corsa è stata effettuata su gel denaturante di poliacrilammide al 5% per 3 h a 200 volts.

Il gel è stato pre-corso vuoto a 150 volts per 1 h in un apparato elettroforetico mini Bio-Rad Vertical (Criterium cell BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Il prodotto è stato quindi colorato con nitrato d'argento secontanto quanto descritto da Qu Lujiang *et al.*, 2005.

Ogni banda presente sul gel ha rappresentato un sito di taglio riconosciuto da uno, o entrambi gli isoschizomeri. Il pattern di metilazione è stato dedotto dal diverso profilo di bande, ottenute digerendo con i due enzimi (MspI and HpaII). Il diverso profilo di bande è stato visualizzato usando un sistema di acquisizione di immagine GS-700 IMAGING DENSITOMETER (BIORAD).

I frammenti differenzialmente presenti sono stati prelevati dal gel con l'aiuto di un bisturi, ed il DNA è stato recuperato ed eluito grazie al kit QUIAEX II Gel extraction kit (QUIAGEN). I diversi frammenti di DNA sono stati clonati all'interno del vettore pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) e successivamente sequenziati, grazie al servizio offerto da GENELAB (ROMA). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti in banca dati.

**Tabella 1.** Combinazioni di *primers* usati nell'amplificazione pre-selettiva.

1. EcoRI+ A/ HpaII/MspI + A
2. EcoRI+ A/ HpaII/MspI + T
3. EcoRI+ T/ HpaII/MspI + A
4. EcoRI+ T/ HpaII/MspI + T

**Tabella 2.** Combinazioni di *primers* usati durante l'amplificazione selettiva.

1. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + ACT
2. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + AAT
3. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + ATT
4. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + ATC
5. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + ACA
6. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + AG
7. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + TTA
8. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + TCC
9. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + TAA
10. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + TC
11. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + TG
12. EcoRI+ AC/ HpaII/MspI + TT
13. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + ACT

14. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + AAT
15. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + ATT
16. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + ATC
17. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + ACA
18. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + AG
19. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + TTA
20. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + TCC
21. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + TAA
22. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + TC
23. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + TG
24. EcoRI+ TA/ HpaII/MspI + TT

**Tabella 3.** Sequenza dei *primers* usati nell'analisi MSAP.

<b><i>EcoRI-AC</i></b>	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC- 3'
<b><i>EcoRI-TA</i></b>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CTA- 3'
<b><i>HpaII/MspI-H</i></b>	5'ATG AGT CTC GAT CGG ACT-3'
<b><i>HpaII/MspI-8</i></b>	5' ATG AGT CTC GAT CGG AAT-3'
<b><i>HpaII/MspI -M</i></b>	5'ATG AGT CTC GAT CGG ATT-3'
<b><i>HpaII/MspI -L</i></b>	5' ATG AGT CTC GAT CGG ATC 3'
<b><i>HpaII/MspI -N</i></b>	5'ATG AGT CTC GAT CGG ACA-3'

<i>HpaII/MspI -I</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>AG</b> -3'
<i>HpaII/MspI-E</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>TTA</b> -3'
<i>HpaII/MspI-F</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>TCC</b> -3'
<i>HpaII/MspI-P</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>TAA</b> -3'
<i>HpaII/MspI-R</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>TC</b> -3'
<i>HpaII/MspI-Q</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>TT</b> -3'
<i>HpaII/MspI-S</i>	5' ATG AGT CTC GAT CGG <b>TG</b> -3'

### 1.4.3. Immunolocalizzazione della 5-metilcitosina

La presenza e la distribuzione della 5-metilcitosina a livello del nucleo è stata effettuata attraverso una tecnica immunocitochimica che sfrutta un anticorpo monoclonale, anti-mouse, che riconosce la 5-metilcitosina. Per l'immunolocalizzazione della 5-metilcitosina circa 10 apici meristemati per ogni prateria e trattamento sono stati fissati in 0,5% (v/v) glutaraldeide e 3% (v/v) paraformaldeide in tampone PBS, inclusi in resina e sezionati grazie al microtomo Leica RM2155 ottenendo delle sezioni 4µm di spessore.

La reazione di immunolocalizzazione si basa sulla formazione di un complesso antigene-anticorpo (Ag-Ab) che permette di localizzare la zona nucleare in cui è presente la 5-metilcitosina. In generale una reazione immunitaria è resa visibile perché l'anticorpo primario o, come nel nostro caso, un eventuale anticorpo secondario è marcato attraverso la sua

coniugazione con un enzima, con particelle d'oro colloidale, con un fluorocromo oppure è reso radioattivo. Nel nostro caso l'anticorpo primario monoclonale che riconosce le citosine metilate in posizione 5, ci è stato gentilmente fornito dalla Dott.ssa Monica Ruffini-Castiglione, del Dipartimento di Scienze Botaniche dell'Università di Pisa, ed è stato prodotto *in vitro* secondo il protocollo descritto in Podestà *et al.* 1993. Come anticorpo secondario è stato usato un anticorpo immunogold coniugato con argento.

La procedura di immunolocalizzazione seguita ha previsto inizialmente la denaturazione del DNA con HCl 5N per 25 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi lavati velocemente con acqua distillata ed incubati con Normal Goat Serum (1,5%NGS; 0,1M PBS; 0,5%BSA) (1x15') in una camera umida. Questo trattamento ha la funzione di bloccare i siti cellulari aspecifici. Le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo primario anti-5metilcitidina (1:250 in 0,1M PBS; 1%BSA; 0,2% tween 20). Come controllo negativo alcuni vetrini sono stati incubati con il solo tampone di ibridazione.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario si è proceduto con una serie di lavaggi in tampone di ibridazione (3x3') ed infine le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario (Goat anti-mouse gold conjugated) (1:250 in 0,1M PBS; 1%BSA; 0,2%tween 20). Il segnale di immunoreazione è stato reso visibile attraverso l'uso del silver-enhancing Kit (BBI Silver Enhancing Kit) usato secondo le specifiche del produttore. Per aumentare il contrasto tra la cromatina nucleare ed i granuli d'argento metallico precipitati e favorire quindi l'analisi dei preparati, i vetrini sono stati colorati con una soluzione di fucsina basica 1% (w/v) in acqua distillata.

L'analisi della distribuzione della marcatura per nucleo è stata realizzata con l'ausilio di un microscopio Leica DMRB corredato di telecamera IVC e di Personal computer, attraverso il sistema di analisi di immagine Leica QWin. Questo programma ci ha anche permesso di misurare la superficie nucleare e la percentuale di marcatura media per nucleo.

#### **1.4.4 Analisi citologica**

Apici meristematici (5 per ogni campione) excisi da piante di *Posidonia oceanica* provenienti dai siti M3 ed M4 e prelevate ad Aprile, Giugno e Novembre nonché apici di piante trattate con cadmio, sono stati fissati per 3h a 4°C, in una soluzione di paraformaldeide 3% (w/v) e gluteraldeide 0,5% (v/v) in PBS (135mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2).

I campioni sono stati successivamente lavati in PBS (3x10'), quindi in acqua distillata (3x2') e disidratati in una serie di alcoli a gradazione crescente (etanolo al 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95%, ad intervalli di 30' ciascuno). Infine si è proceduto con l'inclusione in resina. A tale scopo i campioni sono stati trasferiti in una soluzione di infiltrazione costituita da etanolo e resina Tecnovitt 8100, in rapporti crescente (1:3, 1:1, 3:1) fino alla resina pura. Infine si è provveduto alla loro polimerizzazione.

A polimerizzazione avvenuta sono stati montati nella morsa porta-oggetti del microtomo Leica RM2155, opportunamente orientati e sezionati con l'aiuto di una lama al tungsteno, ottenendo delle sezioni di 4µm di

spessore. Le sezioni sono state poste ordinatamente su vetrini portaoggetti e lasciate asciugare su una piastra termostata alla temperatura di 37°C per 12h. I vetrini così preparati sono stati processati per una serie di colorazioni al fine di evidenziare vari aspetti citomorfologici.

In particolare si è proceduto con la

- colorazione al Feulgen;
- colorazione con blu di toluidina;
- colorazione PAS;

Al fine di evidenziare la struttura e la distribuzione nucleare della cromatina, gli apici vegetativi sono stati sottoposti alla colorazione al Feulgen. Tale colorazione sfrutta il principio dell'idrolisi acida per permettere al DNA di denaturarsi così da favorire il legame del reattivo di Schiff al DNA stesso, in maniera stechiometrica. I campioni sono stati quindi trattati con HCl 5N per 30' a temperatura ambiente, trasferiti poi in una soluzione di fucsina acida per 1,5 h infine lavati sotto acqua corrente per 5' e successivamente in acqua distillata (1x2'). I vetrini sono stati quindi posti ad asciugare a 37°C per 1h circa e chiusi permanentemente con un vetrino coprioggetto e balsamo del Canada.

Per effettuare le misure dell'area nucleare e nucleolare, gli apici sono stati colorati con il blu di toluidina. Per tale colorazione i vetrini sono stati immersi in una soluzione di blu di toluidina allo 0,05% (w/v) in acqua per 1'. Sono stati poi trasferiti sotto acqua corrente (1x3') ed infine in acqua distillata. I vetrini sono stati lasciati asciugare a 37°C per 1h circa e chiusi permanentemente con un vetrino coprioggetto e balsamo del Canada.

Allo scopo di evidenziare sia l'organizzazione cromatinica che la presenza di carboidrati nelle cellule, alcune sezioni sono state sottoposte a colorazione PAS. Per tale colorazione i vetrini sono stati trattati inizialmente

con una soluzione denaturante, HCl 5N, per 30' a temperatura ambiente e successivamente con acido periodico per 10' alla stessa temperatura. I vetrini sono stati poi trasferiti in una soluzione di fucsina acida per 30' ed infine sono stati effettuati 3 passaggi di 2' ciascuno in metabisolfito di sodio (preparato in HCl 1%). I vetrini sono stati quindi lavati sotto acqua corrente per 5' e successivamente in acqua distillata (1x2'). Infine, i vetrini sono stati lasciati asciugare a 37°C per 1h circa e chiusi permanentemente con un vetrino coprioggetto e balsamo del Canada.

L'osservazione dei preparati è stata effettuata con l'ausilio di un microscopio Leica DMRB, corredato di una telecamera IVC e di Personal computer. L'analisi dei parametri nucleari relativa alla superficie nucleare e nucleolare è stata eseguita mediante un sistema di analisi di immagine Leica QWin.

### 1.4.5 Organizzazione strutturale della cromatina

Per l'analisi dell'organizzazione della cromatina, 5 apici meristematici di piante di *Posidonia oceanica* di controllo e sottoposti a trattamento con cadmio ( $\text{CdCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$  per 6 ore, 2 giorni e 4 giorni) sono stati fissati in una soluzione di glutaraldeide 0,5% (v/v) e paraformaldeide 3% (w/v) in PBS (135 mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,8mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH7,2) e post-fissati per 2h in tetrossido di osmio 1%. I campioni sono stati disidratati in una soluzione formata da una serie crescente di alcool e ossido di propilene e quindi inclusi in araldite. Durante il passaggio di disidratazione con alcool al 70% è stata effettuata la colorazione con acetato di uranile.

Sezioni ultrafini (0,06mm) sono state ottenute grazie all'Ultramicrotomo Leica UCT, colorate con citrato di piombo ed osservate con un microscopio elettronico a trasmissione (Zeiss EM900).

### 1.4.6 Contenuto in pigmenti fotosintetici

Allo scopo di valutare il contenuto in pigmenti fotosintetici, si è proceduto all'estrazione della clorofilla a e della clorofilla b da foglie di *Posidonia oceanica* (giovani ed adulte). Come suggerito da Pirc (1984), gli epifiti presenti sulla superficie delle foglie adulte, sono stati rimossi con cura, e circa 1 cm<sup>2</sup> di superficie fogliare, proveniente dalle tre diverse porzioni della foglia (la base, il centro, e l'apice), sono stati prelevati ed usati nella misura. A tal fine, 0,5g di tessuto sono stati polverizzati in un mortaio con l'aiuto di azoto liquido. Sono state effettuate due estrazioni sequenziali, usando acetone 80% 1:5 (w/v) per 3h al buio (Dennison 1990), seguite da una centrifugazione a 4°C a 3000 rpm. La densità ottica del preparato è stata misurata grazie allo spettrofotometro U-3410 HITACHI. La lettura è stata effettuata a 663 nm per la clorofilla *a* ed a 645 nm per la clorofilla *b*. La concentrazione delle clorofille *a* e *b* è stata determinata grazie alla seguente equazione (Arnon 1949; Dennison 1990):

$$\text{clorofilla } a \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 12.7A_{663} - 2.69 A_{645},$$

$$\text{clorofilla } a \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = (12.7A_{663} - 2.69 A_{645}) \cdot 0.01/\text{wt};$$

$$\text{clorofilla } b \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663},$$

$$\text{clorofilla } b \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = (22.9 A_{645} - 4.68 A_{663}) \cdot 0.01/\text{wt};$$

La concentrazione totale di clorofilla è rappresentato dalla somma di valori della clorofilla *a* e *b*. La misura è stata effettuata in triplicato, e per ogni replica sono state effettuate sei misure di ogni campione.

#### **1.4.7. Isolamento dell'RNA e retrotrascrizione**

L'RNA totale è stato isolato da foglie ed apici meristemati (100 mg) di campioni trattati con cadmio alle concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  per 6 ore, 2 giorni e 4 giorni. I campioni sono stati processati separatamente con il kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore. Nella tappa finale di eluizione, l'RNA totale è stato risospeso in un volume di 50  $\mu\text{l}$  in acqua RNase-free ed incubato a 37°C per 30 minuti con DNase I in un volume finale di 100  $\mu\text{l}$ . La DNase I è stata incubata a 70°C per 15 minuti. L'RNA è stato poi precipitato ed infine risospeso in un volume finale di 40  $\mu\text{l}$  di acqua RNase-free.

La qualità e la quantità dell'RNA totale isolato è stata controllata attraverso lo strumento NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotomer ND-1000. L'RNA totale (3-5  $\mu\text{g}$ ) proveniente da ogni campione è stato retrotrascritto a c-DNA attraverso l'uso della SuperScript III Reverse Transcriptase con l'oligo dT(22), secondo le istruzioni del produttore (Invitrogen, S.R.L., Life Technologies, Milano, Italia).

#### **1.4.8 Quantitativa Real-Time PCR (qPCR )**

Ogni qPCR è stata effettuata grazie allo strumento BIORAD MINIOPTICON (Biorad) attraverso il quale è stata valutata l'espressione di due differenti geni: il gene che codifica per una metallotioneina e quello per una cromometilasi.

Una specifica coppia di *primers* del gene delle metallotioneine (*MT*) è stata disegnata da una sequenza specifica di *Posidonia oceanica* presente in banca dati ([AJ628145](#))

La coppia di *primers* usata per quantizzare l'espressione del gene cromometilasi (*CMT*) è stata disegnata nella regione del 3'UTR di tale gene, caratterizzata nel corso di questo lavoro.

Tutti i *primers* sono stati disegnati allo scopo di ottenere un amplificato di circa 150 bp. La reazione di amplificazione è stata preparata in un volume finale di 25 µl, aggiungendo 12,5 µl di iTaq™ SYBR®-Green Super Mix con ROX (Biorad) contenente (iTaq DNA polymerase 50 units/ml, 6mM Mg<sup>2+</sup>, 1µM ROX internal Reference DYE Stabilizers, 0,4 mM di dATP-dCTP-dGTP e 0,8 mM dUTP), 0,4 µM di primers, e 2µl di cDNA. Ogni reazione è stata effettuata in triplicato.

La reazione di PCR ha previsto l'uso di una piastra di 48 pozzetti riscaldata inizialmente a 95 °C per 3 min allo scopo di attivare l'enzima *Taq*, seguito da 40 cicli di cui denaturazione a 95 °C per 10 sec ed una tappa di *annealing* ed estensione a 58 °C per 30 sec. I valori ottenuti sono stati normalizzati con quelli di un gene *housekeeping* che nel nostro caso è stato quello per l' *rRNA 5.8S* di *Posidonia oceanica* presente in banca dati.

I livelli di espressione relativa del gene *MT* sono stati calcolati sui c-DNA ottenuti da apici meristemati e da foglie, e sono relativi a tre esperimenti indipendenti. La sequenza dei primers usati per l'espressione del gene *MT* è stata MET-REAL-4FW (5'-ATGGAGAAGAGCACCACCAC -3') e MET-REAL5-BW (5'-TAGCAGTTGCAGGGATCACA -3'); per il gene cromometilasi, CRO-REAL-FW (5'- TGTAATCAATAGCAAAGTCTTCATGTC-3') e CRO-REAL-BW (5'-AATGACCGATCAATCTTTTGC-3'); per i *5.8S rRNA* è

stata RIB5.8S -REAL1FW (5'-TCCGAACACTTCCGGTACAT-3') e RIB5.8S-REAL1BW (5'- CAATCAACGCAATTCACCAC -3').

#### **1.4.9 Isolamento e clonaggio del gene *CMT* da piante di *Posidonia oceanica***

Allo scopo di isolare e caratterizzare il gene *CMT*, il cDNA ottenuto da apici meristemati di controllo è stato usato in una reazione di PCR con i seguenti *primers* degenerati CROMODO-FW1 (5'-TBBHWCTBYTKAAGGARTGGG -3') e CROMODO-BW1 (5'-CCABYKBACCTTMAAMTWHA -3'). Tali *primers* sono stati disegnati sulla sequenza altamente conservata del cromodominio presente in *Arabidopsis thaliana* ed altre specie. Mediante PCR è stato ottenuto un prodotto di circa 300 bp.

Una seconda coppia di *primers* degenerati è stata disegnata in una regione adiacente al 3', CRO-FW1 (5'- ATGGAAAAYGTYGTKGAYAT -3') e CRO-BW1 (5'- ACMRTYTSRTCCCACCAMAG -3') ed ha permesso di ottenere un prodotto di PCR di circa 650bp.

La tecnica RACE (rapid amplification of cDNA ends) è stata usata per isolare l'estremità 3' del gene *CMT* da cDNA di apici. L'estremità 3' del gene *CMT* è stata amplificata usando il kit "First-strand cDNAs" grazie all'uso di *primers* oligo-(dT)-AP. La reazione è stata condotta secondo le istruzioni del produttore (INVITROGEN). La PCR è stata effettuata usando lo specifico *primer* di *CMT*, RICROMO-FW2 (5'-CAAGGGAAGTCTTTAAGACCGT -3'), ed il *primer* universale

“Universal Amplification Primer” (UAP) presente nel kit. Allo scopo di isolare il *full-length* del gene *CMT*, la sequenza ottenuta da *primers* degenerati è stata usata per disegnare *primers* specifici, ed ha permesso di ottenere un frammento di cDNA lungo 1.997 bp. La PCR ha previsto l’uso di DNA genomico (200ng) e/o cDNA (20ng), 1,5  $\mu$ M per ogni *primers*, 0,5mM dNTs, Taq DNA polymerase (Go Taq, PROMEGA) 2,5 U, 1/10 di Taq buffer 10X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, in un volume finale di 50 $\mu$ l. Le condizioni di PCR usate sono state: fase iniziale a 95°C per 4 min; 35 cicli di cui la denaturazione a 95°C per 1 minuto, l’annealing a 55°C per 50” ed una tappa di allungamento a 72°C per 1 minuto. Infine è seguita una tappa a 72°C per 10 minuti.

Tutti i frammenti di PCR sono stati clonati all’interno del vettore “pGEM-T easy vector system” secondo le istruzioni del produttore (PROMEGA) e sequenziati dal servizio GENELAB ENEA (Roma, Italia).

E’ attualmente in corso l’identificazione dell’estremità 5’ del gene attraverso la tecnica RACE.

#### **1.4.10 Ibridazione *in situ* del gene *CMT***

Per la preparazione dei campioni biologici da sottoporre ad ibridazione *in situ*, piante di *Posidonia oceanica* sono state prelevate a Scilla ed acclimatate in acquario per due giorni. Successivamente, le piante, circa 60 ciuffi in totale, sono state sottoposte a condizioni di stress controllato indotte da cadmio a differenti concentrazioni e per diversi tempi (10  $\mu$ M - 50  $\mu$ M per 6ore, 2 giorni e 4 giorni). Gli apici meristemati sono stati quindi prelevati ed immediatamente fissati, disidratati ed inclusi in paraffina. I

campioni sono stati poi sezionati a 10  $\mu\text{m}$  di spessore con l'aiuto del microtomo RM 2125 RT (Leica) ed ibridati alla temperatura di 52°C con la sonda ad RNA antisenso marcata con digossigenina. Per la *detection* sono stati adoperati due coloranti l'NBT (4-nitro-blu-tetrazolium-cloruro) ed il BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). Si tratta di due sali che inizialmente sono incolori ma reagendo con l'enzima fosfatasi alcalina, associato agli anticorpi anti-Dig innescano una reazione di ossido-riduzione. Il trascritto è visualizzato grazie ad una colorazione marrone bluastra. Dopo aver bloccato la reazione con TE (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM EDTA), le sezioni sono state montate in 50% glicerolo in TE ed analizzate con un microscopio ottico (Leica DMRB). Le immagini sono state acquisite con una telecamera digitale (Leica).

Per l'analisi di espressione *in situ*, è stata utilizzata come sonda un frammento altamente specifico del gene, disegnato nella regione 3'UTR (Figura 2, 3), della lunghezza di circa 230bp. Tale regione è stata clonata nel vettore pGEM-T-Easy vector (Promega) e linearizzata grazie agli enzimi di restrizione SpeI e NcoI. Questo prodotto è stato usato come template per sintetizzare attraverso la trascrizione *in vitro*, una sonda ad RNA marcata con digossigenina senso ed antisenso grazie alle polimerasi T7 ed SP6. Il protocollo DIG-RNA labelling Kit, (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) è stato usato secondo le istruzioni del produttore. La sonda marcata è stata risospesa in 100 $\mu\text{L}$  di acqua DEPC.

3' UTR

CAGT **CAAGATCTTCTCCTGAAGTTCTCAAGTAATTTATTGTCCTA**  
**CATTGTGTGATCTTAATGTAATCAATAGCAAAGTCTTCATGTCTT**  
**AAAATGTTATTGAGTAGGTGAATCTTCAAAGGCGGCAAAGATT**  
**GATCGGTCATTGGCCTTATTTATCTTTTCTTTGTAGCATTAGGTCC**  
**ATTCTTTAATCAAACAAGATGTTACCAGTGGCCCCATATTATTTT**  
**ATGATTGT**TGATTTAATTAAATCAGTTTTTT**AAAAAAAAAAAAAA**  
**AAAA**

**Figura 2:** Regione al 3'UTR usata come sonda.



**Figura 3:** Schema dei domini trovati nella *CMT* di *P.oceanica* con regione 3'UTR su cui è stata disegnata la sonda per l'ibridazione *in situ*.

## 1.5 Risultati

### 1.5.1. Pattern di metilazione del DNA attraverso l'analisi MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism)

L'analisi MSAP è una tecnica di DNA fingerprinting che, grazie all'uso di un set di primers generici, permette l'identificazione di polimorfismi genomici, senza necessità di avere informazioni a priori sulle sequenze geniche dell'organismo studiato (Voe *et al.*, 1995). Considerato che poco o nulla si conosce sul genoma di *P.oceanica*, tale approccio è risultato utile per valutarne lo stato di metilazione.

La tecnica MSAP prevede la digestione del DNA totale con enzimi di restrizione che siano isoschizomeri sensibili nei confronti dei siti metilati (McClelland *et al.*, 1994). Si generano così una serie di frammenti di diversa taglia cui viene ligata una sequenza oligonucleotidica, definita adattatore. Segue l'amplificazione selettiva dei sets di frammenti di restrizione e l'analisi dei polimorfismi di banda generati su gel di poliacrilammide.

Per ciascun campione è stata realizzata una doppia digestione del DNA, utilizzando le seguenti combinazioni di enzimi di restrizione: **HpaII**-EcoRI e **MspI**-EcoRI, in cui **HpaII** ed **MspI** sono gli isoschizomeri sensibili nei confronti dei siti metilati (McClelland *et al.*, 1994).

La sequenza di taglio riconosciuta da HpaII e MspI è la seguente:



HpaII digerisce oltre al DNA emimetilato, solo i siti CCGG non metilati, quindi è inattivo quando una o entrambe le citosine sono metilate, mentre MspI digerisce i siti CCGG e CmCCG ma non la sequenze mCCGG o mCmCCGG (McClelland *et al.*, 1994). Ciascuno dei frammenti presenti sul gel di poliacrilammide rappresenta un sito di taglio riconosciuto da uno o entrambi gli isoschizomeri (**MspI/ HpaII**) e, la presenza di frammenti polimorfici, indica un differente pattern di metilazione nei campioni analizzati.

Allo scopo di identificare un elevato numero di polimorfismi nella nostra analisi abbiamo usato 24 differenti combinazioni di primers, caratterizzate dall'aver 3 nucleotidi selettivi all'estremità 3'.

Per quanto riguarda il confronto fra le praterie ben conservate (M3) e quelle sottoposte a stress antropico (M4), per minimizzare gli effetti correlati alla stagionalità, sono stati cumulati i risultati ottenuti dai diversi campionamenti effettuati nei diversi momenti dell'anno ( Aprile, Giugno e Novembre) per due anni consecutivi. Nel complesso, a partire dal materiale estratto dai meristemi apicali, sono stati identificati 1228 frammenti di cui 64 sono risultati essere differenzialmente amplificati (Tab. 1). Di questi il 79% sono dovuti a emimetilazione della citosina esterna, mentre il 21% è dovuto a metilazione della citosina interna. La stessa tendenza è stata riscontrata nelle foglie provenienti dalle medesime praterie, che mostrano 57 frammenti differenzialmente amplificati su 1211 identificati. Di queste il 71% è dovuto a digestione via HpaII e il 29% via MspI (Tab. 1).

Tabella1. Numero di bande polimorfiche identificate nel DNA estratto da apici e foglie di *P. oceanica* tra piante prelevate nei siti M3 ed M4

	N° Frammenti Identificati	N° Frammenti Polimorfici		% di Polimorfismo
<b>Apice</b>	<b>1228</b>	<b>64</b>	26M3 38M4	<b>79% HpaII</b> <b>21% MspI</b>
<b>Foglie</b>	<b>1211</b>	<b>57</b>	22M3 35M4	<b>71% HpaII</b> <b>29% MspI</b>

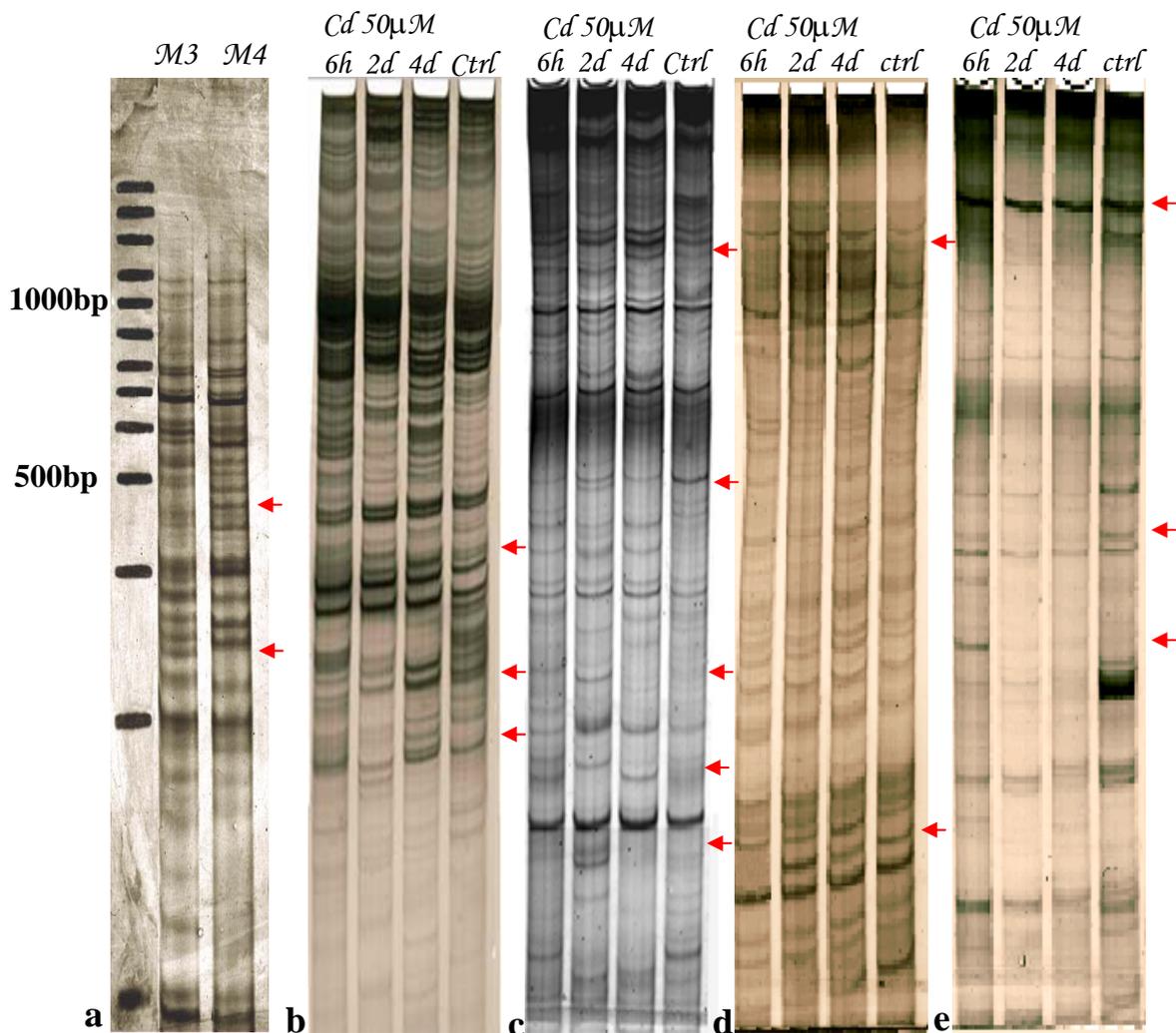
Nel caso dello stress indotto dal cadmio sono stati analizzati campioni esposti a concentrazioni diverse per tempi diversi: 10µM per 6 ore ( t 106h), 2 giorni (t 102d) e 4 giorni (t 104d) e 50µM per 6 (t 506h), 2 giorni (t 502d) e 4 giorni (t 504d). Nel complesso abbiamo identificato un totale di 1784 bande, delle quali 79 risultano essere differenzialmente metilate, di cui 9 presenti nel controllo. Di queste il 74% è dovuto a digestione via HpaII ed il 26% via MspI (Tabella 2).

Passando ad analizzare gli effetti dei diversi trattamenti si osserva, inoltre come il numero di frammenti polimorfici aumenti al crescere della concentrazione di cadmio usata, risultando essere di 29 bande per 10µM e di 41 per 50µM. In entrambi i casi, inoltre il numero di bande polimorfiche aumenta in funzione del tempo (Tab.2).

Tabella 2. Numero di bande polimorfiche identificate nel DNA estratto da foglie di *P. oceanica* sottoposte a stress controllato 10 $\mu$ M per 6 ore (t 106h) , 2 giorni (t 102d) e 4 giorni (t 104d) e 50 $\mu$ M per 6 (t 406h) , 2 giorni (t 502d) e 4 giorni (t 504d)

<b>Campioni</b>	<b>N° di Frammenti Polimorfici Totali</b>	<b>% di Polimorfismo</b>	<b>N° Frammenti polimorfici per trattamento</b>
<b>Controllo</b>			<b>9</b>
<b>(t 106h)</b>		<b>74% HpaII</b>	<b>7</b>
<b>(t 102d)</b>			<b>9</b>
<b>(t 104d)</b>			<b>13</b>
		<b>Totali 10<math>\mu</math>M</b>	<b>29</b>
<b>( t 506h)</b>	<b>79</b>		<b>8</b>
<b>(t 502d)</b>		<b>26% MspI</b>	<b>15</b>
<b>(t 504d)</b>			<b>18</b>
		<b>Totali 50<math>\mu</math>M</b>	<b>41</b>

Un esempio del profilo dei polimorfismi ottenuti mediante l'analisi MSAP è evidente dai gel di poliaccrilammide mostrati in Figura 1a,b,c,d,e.



**Fig. 1** Gel di poliaccrilammide in cui è possibile identificare numerose bande polimorfiche tra i diversi campioni.

**a:** DNA estratto dai campioni prelevati rispettivamente dai siti M3 ed M4; **b-e:** DNA estratto da campioni sottoposte a trattamento con cadmio rispettivamente 50µM per 6ore; 2giorni, 4giorni e di controllo.

La combinazione dei primers usati è stata rispettivamente: EcoRI+AC/HpaII+ACT (**a**); EcoRI+TA/HpaII+TTA (**b**); EcoRI+AC/ HpaII+ATT(**c**); EcoRI+AC/ HpaII+ATC(**d**); EcoRI+AC/ HpaII+ACA(**e**).

### 1.5.2. Identificazione dei frammenti polimorfici

Allo scopo di identificare le sequenze differenzialmente metilate, bande polimorfiche ottenute tramite l' MSAP, sono state isolate dal gel di poliacrilammide e sequenziate. Molte delle sequenze identificate sono distribuite all'interno di porzioni non codificanti del genoma, probabilmente sequenze intergeniche, trasposoni e promotori stessi che sono bersaglio di regolazione da parte della metilazione. Il basso numero di sequenze EST presenti in banca dati per *P.oceanica* ha, inoltre, reso difficile l'identificazione anche delle sequenze codificanti. Alcune delle sequenze codificanti identificate sono mostrate nella Tabella 3. In particolar modo tra queste si notano geni che codificano per:

- proteine coinvolte nella risposta allo stress (*Heat shock protein 70, manganese superoxide dismutase, phytochrome B, iron alcohol dehydrogenase, catalase CAT-2*).
- proteine coinvolte nel trasporto di ioni (*Ion transport protein, predicted ATPase*);
- enzimi coinvolti nelle modificazioni epigenetiche (*hydrolase of the HAD superfamily, chromomethylase CMT2, bromodomain adjacent to zinc fing., GCN5-related N-acetyltransferase ( histone acetyltransferases (HATs)*);
- proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (*histidine kinase, NIMA (never in mitosis gene a), serine/threonine-protein kinase-like protein; integral membrane sensor signal transduct*);
- fattori di trascrizione (*zf-C2H2 Zinc finger, C2H2, transcription regulator protein*).

Di particolare interesse per noi è stata l'identificazione di un gene coinvolto nella metilazione di particolari sequenze del DNA, *la cromometilasi*. Tale

gene è stato, pertanto, parzialmente caratterizzato e ne è stato analizzato il livello di espressione in piante esposte al cadmio allo scopo di correlare il suo ruolo modulatore nella metilazione del DNA ad una condizione di stress.

**Tabella 3. Elenco dei geni identificati dalle bande polimorfiche risultanti dall'analisi MSAP.**

1. [NP\\_001105769.1](#) thiol oxidoreductase
2. [AAZ32862.1](#) putative splicing factor Prp8
3. [ZP\\_01546732.1](#) Ion transport protein.
4. [ZP\\_02166172.1](#) probable transcription regulator protein o DNA-binding response regulator.
5. [ZP\\_02162965.1](#) hypothetical protein KAOT1
6. [CAD90583.1](#) N-acetylglucosaminyltransferase
7. [XP\\_509537.2](#) bromodomain adjacent to zinc fng...
8. [CAD42938.2](#) manganese superoxide dismutase. .
9. [CAN67546.1](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
10. [CAN75930.1](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
11. [ABA95894.2](#) Nucleoporin autopeptidase family protein.
12. [ZP\\_02168364.1](#) Ion transport protein
13. [CAQ43070.2](#) putative puroindoline b protein
14. [ZP\\_00990099.1](#) predicted ATPase
15. [ZP\\_01066479.1](#) Predicted hydrolase of the HAD superfamily.
16. [AAK69757.1|AF383171\\_1](#) chromomethylase CMT2 [Arabidopsis th..
17. [ZP\\_01062992.1](#) 3-hexulose-6-phosphate synthase.
18. [EAZ49061.1](#) GGDEF family protein.
19. [AAZ32862.1](#) putative splicing factor Prp8 [Medicago sativa]
20. [CAQ43070.2](#) putative puroindoline b protein [Triticum aes...
21. [CAN66714.1](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
22. [XP\\_001386089.2](#) zf-C2H2 Zinc finger, C2H2 type.
23. [ABQ63409.1](#) K26 protein
24. [AAC79110.1](#) putative polyprotein of LTR transposon [Arabid...
25. [ZP\\_00992304.1](#) Predicted hydrolase of the HAD superfamily...
26. [YP\\_001523994.1](#) histidine kinase.
27. [YP\\_001819289.1](#) integral membrane sensor signal transduct...
28. [NP\\_001026221.1](#) NIMA (never in mitosis gene a)-related ki...
29. [YP\\_001664688.1](#) hypothetical protein Teth39\_0690
30. [YP\\_001294142.1](#) hypothetical chloroplast RF2
31. [CAN73677.1](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
32. [NP\\_067331.2](#) growth factor receptor bound protein 2-assoc...

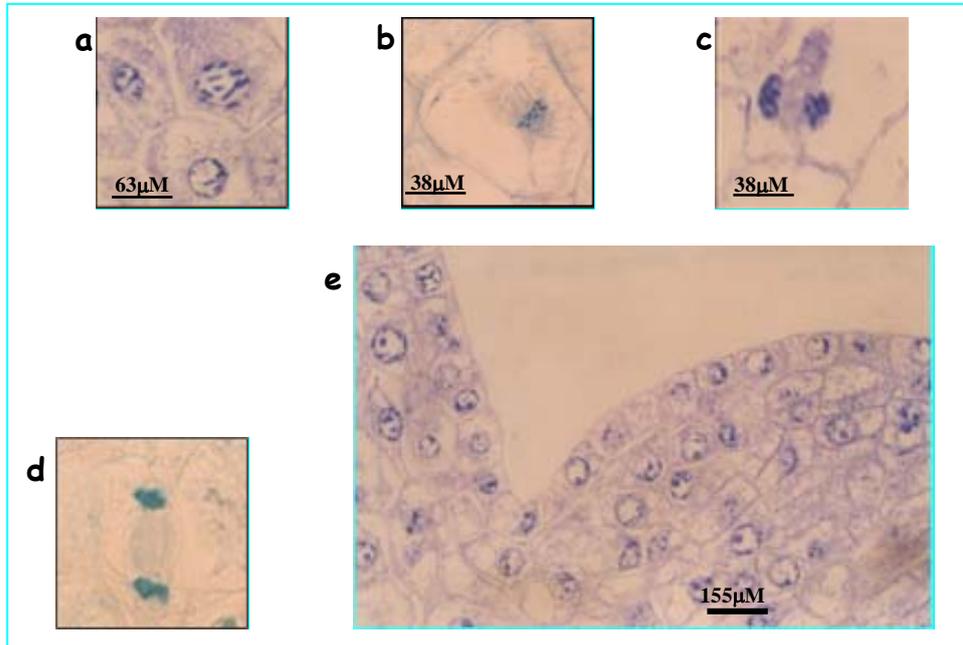
33. [ref|NP\\_001072105.1|](#) membrane-associated DHHC5 zinc finger pro...
34. [ABI52743.1|](#) 10 kDa putative secreted protein
35. [NP\\_819073.1|](#) deoxyribose-phosphate aldolase
36. [AAZ32862.1|](#) putative splicing factor Prp8 [Medicago sativa]
37. [AAR32737.1|](#) phytochrome B [Arabidopsis thaliana]
38. [ABD28291.1|](#) Integrase, catalytic region; Ribonuclease H [M...
39. [NP\\_710584.1|](#) hypothetical protein LA040
40. [NP\\_001026221.1|](#)NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
41. [ABD28291.1|](#) Integrase, catalytic region;
42. [CAO66256.1|](#) unnamed protein product [Vitis vinifera]
43. [CAO66256.1|](#) unnamed protein product [Vitis vinifera]
44. [ABR29877.1|](#) phosphoenolpyruvate carboxylase
45. [ABW96889.1|](#) CMT-type DNA-methyltransferase [Elaeis guineen.
46. [ZP\\_01742069.1|](#) hypothetical protein
47. [YP\\_001364670.1|](#) peptidase M4 thermolysin
48. [ZP\\_00990099.1|](#) predicted ATPase
49. [CAA52684.1|](#) heat shock protein 70 cognate [Arabidopsis.....
50. [CAB71903.1|](#) serine/threonine-protein kinase-like protein..
51. [NP\\_396009.1|](#) iron alcohol dehydrogenase
52. [YP\\_469536.1|](#) adenylate/guanylate cyclase protein
53. [YP\\_001753661.1|](#) GCN5-related N-acetyltransferase ( histone acetyltransferases (HATs).
54. [ZP\\_01748513.1|](#) hydrolase, NUDIX family, NudH subfamily pr...
55. [ZP\\_02009077.1|](#) DNA/RNA non-specific endonuclease
56. [ZP\\_00990099.1|](#) predicted ATPase
57. [ZP\\_01842854.1|](#) peptidase M4
58. [ABR29877.1|](#) phosphoenolpyruvate carboxylase [Ricinus
59. [A55092](#) catalase (EC 1.11.1.6) CAT-2 - maize
60. [YP\\_171788.1|](#) N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
61. [YP\\_001538802.1|](#) glycosyl transferase family protein [Sali...
62. [CAN69753.1|](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
63. [YP\\_001573089.1|](#) hypothetical protein SARI\_04158 [Salmonel.
64. [ZP\\_02998769.1|](#) hypothetical protein
65. [XP\\_001595602.1|](#) hypothetical protein

### 1.5.3 Immunolocalizzazione della 5-metilcitosina

Tale analisi è stata condotta sui meristemi apicali di piante di *P.oceanica*:

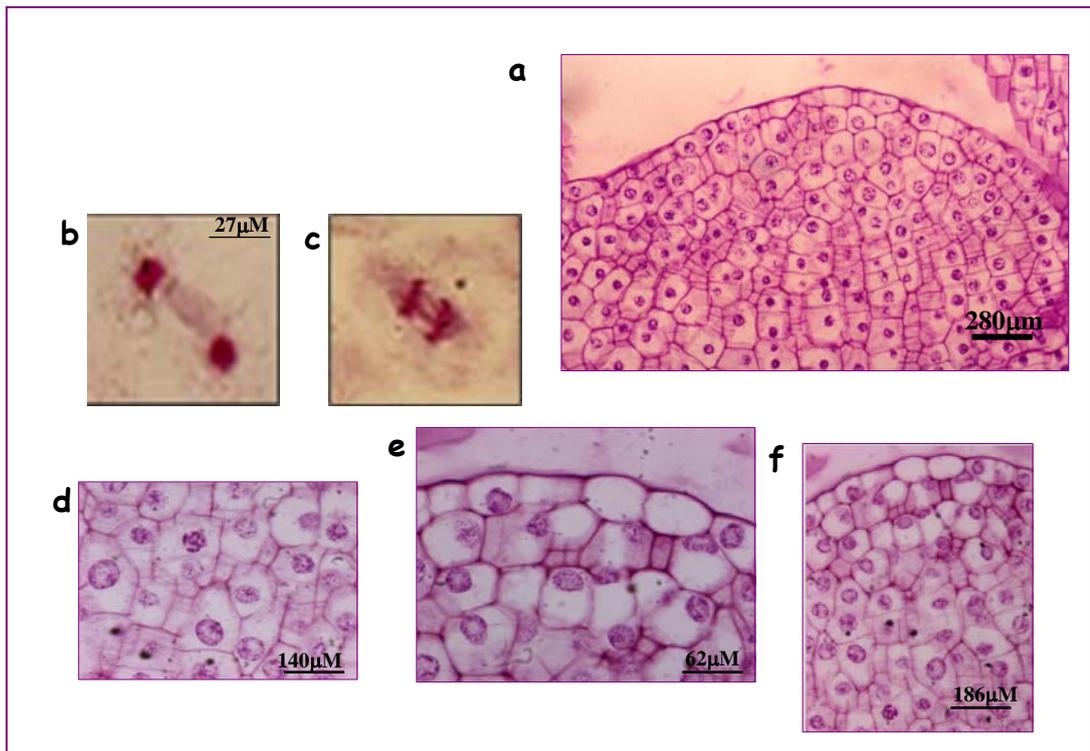
- i) provenienti da praterie ben preservate, (M3) e praterie sottoposte a stress antropico, (M4), prelevate nei mesi di Aprile, Giugno e Novembre;
- ii) piante sottoposti a stress controllato da cadmio a diverse concentrazioni e per tempi diversi ( t 106h ) , 2 giorni (t 102d) 4 giorni (t 104d) e 50 $\mu$ M per 6 ( t 506h ) , 2 giorni (t 502d) 4 giorni (t 504d).

Le popolazioni cellulari meristematiche del germoglio di *Posidonia oceanica* presentano un'organizzazione nucleare di tipo reticolata con aree di addensamento della cromatina (cromocentri) ben evidenti (Fig. 9e). Una normale attività mitotica è presente nel meristema non solo delle piante di controllo provenienti dal sito ben preservato M3 (Fig.2 a,d) ma anche da quello disturbato M4 ( Fig 2b,c,e).



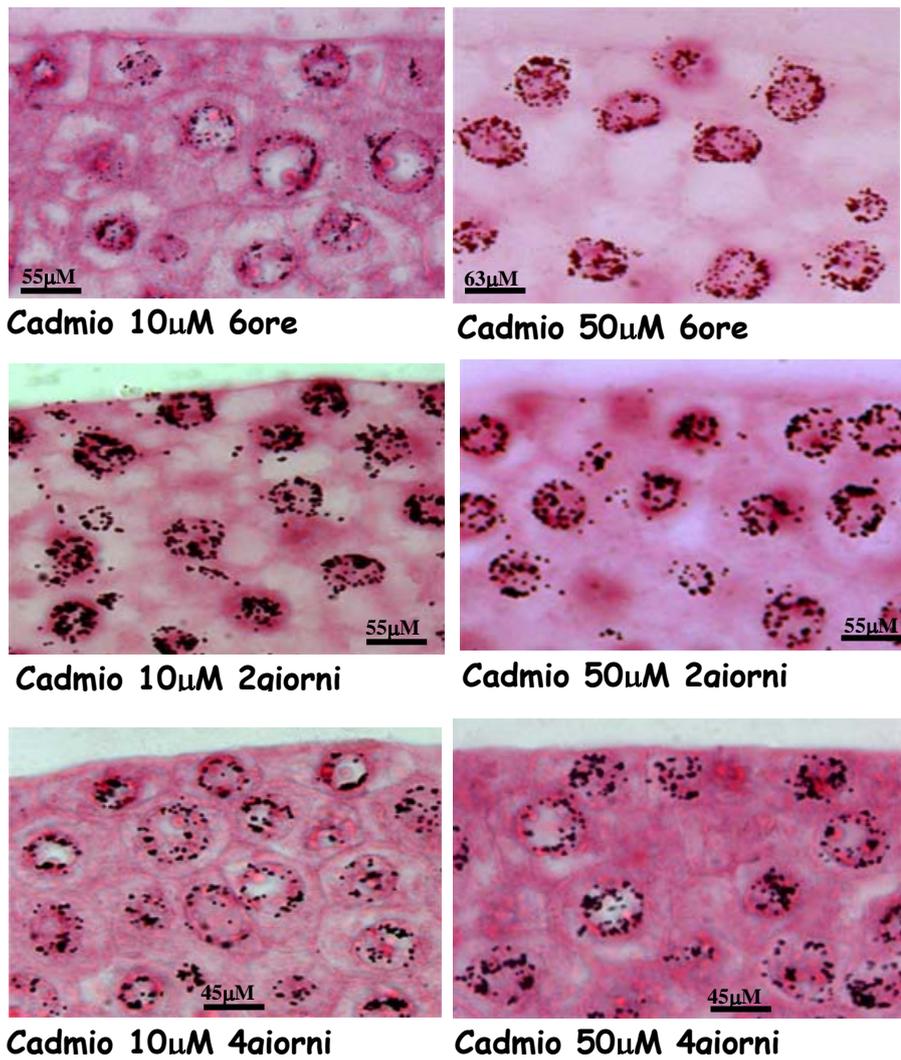
**Fig. 2.** Organizzazione della cromatina e figure mitotiche presenti nei nuclei di apici meristemati provenienti dal sito ben conservato, M3 (a,d) e da quello disturbato, M4 (b,c,e).

Nell'apice meristemato di piante sottoposte a stress da Cd, accanto a disturbi nel processo di mitosi, con formazione di micronuclei, è presente una anormale stratificazione del rib meristem, verosimilmente correlata ad alterazioni del piano di divisione cellulare, sia a basse concentrazioni di Cd, (10 μM) (Fig. 3a), sia ad alte (50 μM) (Fig. 3b,c,d,e).



**Fig.3.** Organizzazione della cromatina e figure mitotiche presenti nei nuclei di apici meristemati provenienti da campioni sottoposti a stress da Cd 10 μM (10a), e 50 μM, (10b,c,d,e).

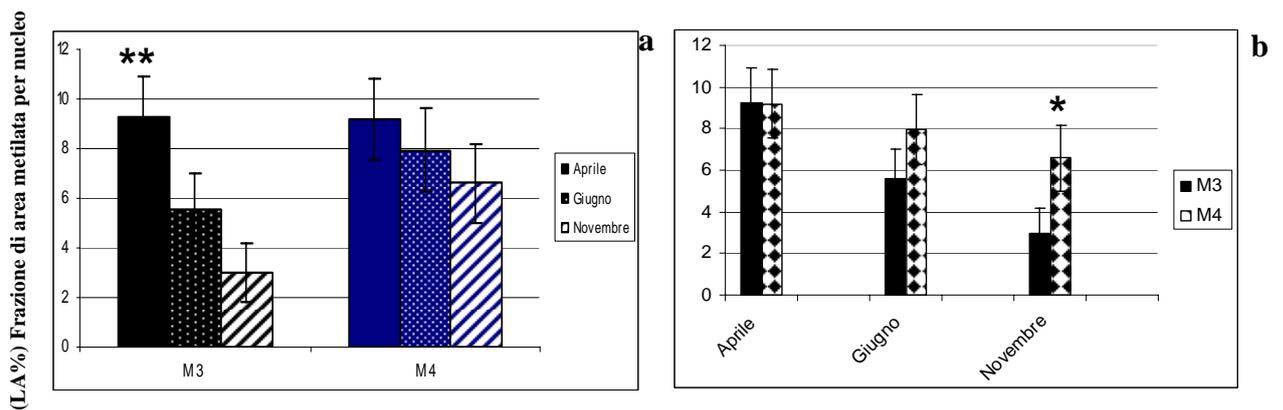
Utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la 5-metilcitosina, gentilmente fornitoci dalla Dott.ssa Monica Ruffini-Castiglione dell'Università di Pisa, è stato possibile localizzare su tali nuclei interfasici di tali popolazioni meristemati i siti di metilazione presenti ( Fig. 4).



**Fig. 4** Immunolocalizzazione della 5-metilcitosina in apici meristemati di piante sottoposte a stress da cadmio. Si nota il maggior livello di metilazione del DNA evidente dall'aumento dei silver grain dopo 2 giorni di trattamento, indipendentemente dalla concentrazione di Cd usata.

Mediante analisi d'immagine è stato possibile valutare il livello di metilazione espresso come percentuale dell'area nucleare marcata dall'anticorpo.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza nette variazioni stagionali nel livello di metilazione, che risulta essere massimo in Aprile e minimo in Novembre sia nei campioni di controllo (M3) (Fig. 5a). Interessantemente, ciò risulta essere correlato ad un notevole grado di ipermetilazione delle citosine riscontrato nei meristemi delle piante di *P.oceanica* provenienti dalle praterie disturbate (M4) rispetto a quelle di controllo (M3) e soprattutto per i campioni prelevati a Giugno e Novembre (Fig. 5b). Tali variazioni appaiono invece attenuarsi e perdere di significatività nei campioni delle praterie disturbate.



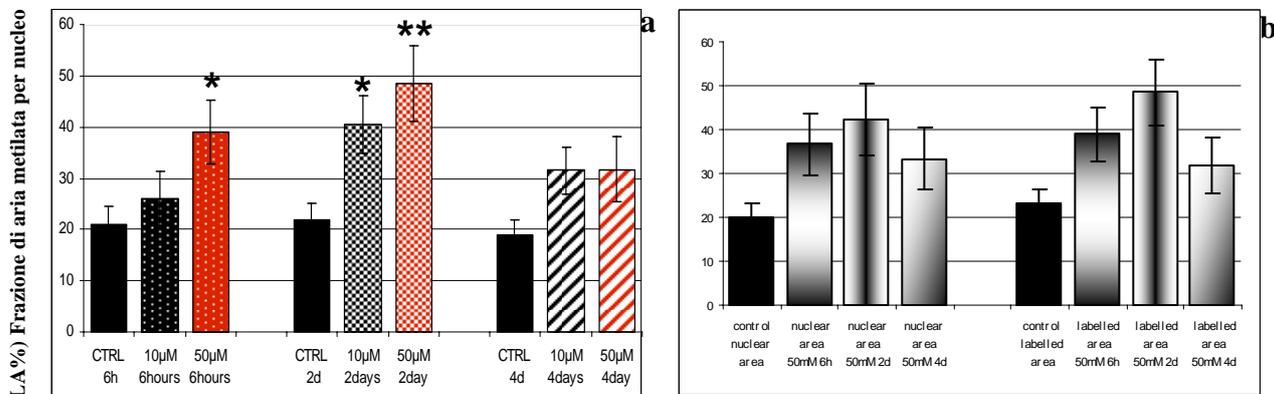
**Fig. 5.** Frazione (%) di area marcata dall'anticorpo 5-metilcitosina per nucleo (LA%), in apici meristemati di *P. oceanica* prelevate da praterie ben conservate (M3) e sottoposte a stress antropico, (M4), nei mesi di Aprile, Giugno e Novembre. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA seguita dal test Neuman-Keul's *post-hoc*. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Cambiamenti nei livelli di metilazione nucleare sono stati riscontrati anche nei campioni sottoposti a stress da cadmio (Fig 6a). In particolare, è stato

misurato un aumento significativo del livello di metilazione, sia in funzione della concentrazione di cadmio testata (10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M) che del tempo di trattamento essendo massimo dopo 2 giorni di trattamento sia alla concentrazione di 10 $\mu$ M che a quella di 50 $\mu$ M di cadmio (Fig. 6a,b; Fig. 4). Nel trattamento prolungato (4 giorni), invece il livello di metilazione è comunque inferiore che ai 2 giorni, seppur maggiore rispetto al controllo è del tutto paragonabile per le due concentrazioni testate (Fig 6a,b).

All'aumento del livello di metilazione è corrisposto, nei campioni trattati per 2 giorni con cadmio 50 $\mu$ M, anche un incremento dell'area nucleare media a cui è seguita una successiva riduzione dopo 4 giorni (Fig 6b).

Nel loro insieme i risultati di immunolocalizzazione della 5-metilcitosina hanno messo in evidenza un incremento nel livello di metilazione del DNA in piante di *P.oceanica*, sia nei campioni sottoposti a stress antropico che in quelli sottoposti a stress controllato da cadmio, e che tale effetto è influenzato sia dall'entità dello stress che dal tempo.



**Fig. 6.** Frazione (%) di area marcata dall'anticorpo 5-metilcitosina per nucleo (LA%), in apici meristematici di *P. oceanica* sottoposta a differenti condizioni di stress da cadmio (a). Confronto tra l'area nucleare media ( $\mu\text{m}^2$ ) ed il livello di metilazione in apici meristematici di *Posidonia oceanica*

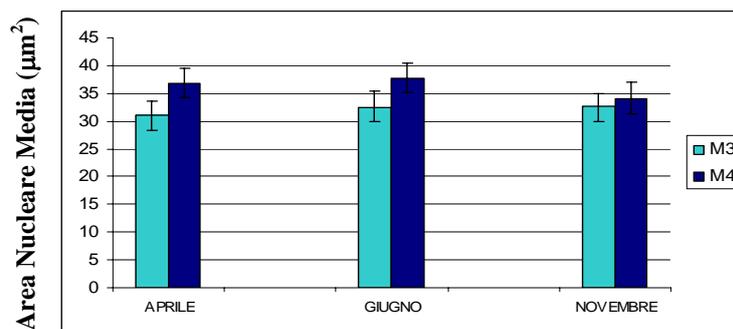
provenienti da campioni sottoposti a stress da cadmio  $50\mu\text{M}$  per 6 (t 506h), 2 giorni (t 502d) 4 giorni (t 504d) Un aumento significativo dell'area nucleare media è stata registrata dopo 2 giorni di trattamento (b). L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA seguita dal test Neuman-Keul's *post-hoc*. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 1.5.4 Rimodellamento cromatinico nei nuclei interfascici dei meristemi del germoglio

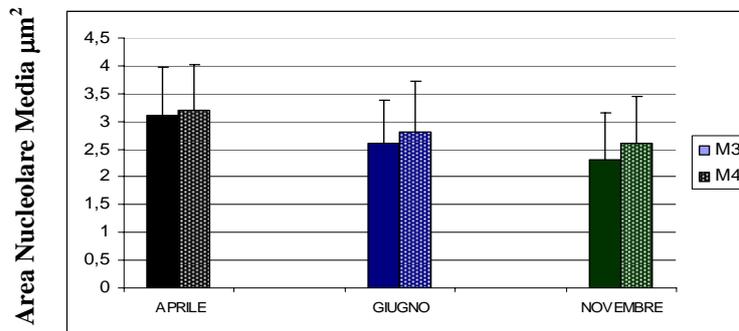
### 1.5.4a Parametri morfometrici in piante sottoposte a stress ambientale

Attraverso analisi d'immagine sono state effettuate misure dell'area nucleare e nucleolare nelle popolazioni cellulari del meristema del germoglio in piante di *P.oceanica* provenienti dalla prateria del sito dal sito impattato (M4) e da quello ben preservato (M3), usato come controllo. Al fine di minimizzare le differenze correlate a variazioni stagionali, i dati presentati sono cumulativi delle misure effettuate nelle piante prelevate, in diversi momenti stagionali, in due anni consecutivi (Fig. 7 e 8).

Appare evidente come non vi siano differenze significative nel valore dell'area nucleare, nè in quello nucleolare, che si accompagnino ai cambiamenti nell'organizzazione cromatinica, nei due siti considerati, né in funzione del fattore di disturbo, e nemmeno in funzione della stagionalità.



**Fig. 7.** Area nucleare media (in  $\mu\text{m}^2$ ) in apici meristematici di piante prelevate da praterie ben preservate (M3) e disturbate (M4) di *Posidonia oceanica* durante tre diversi momenti dell'anno.

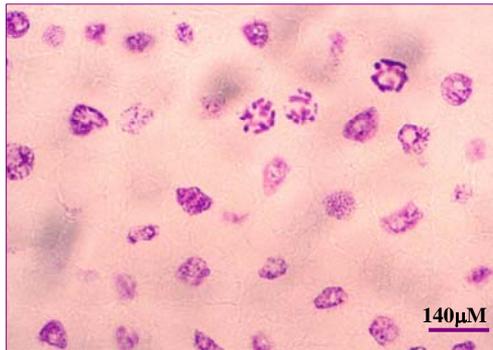


**Fig.8.** Area nucleolare media (in  $\mu\text{m}^2$ ) in apici meristematici di piante prelevate da praterie ben preservate (M3) e disturbate (M4) di *Posidonia oceanica* durante tre diversi momenti dell'anno.

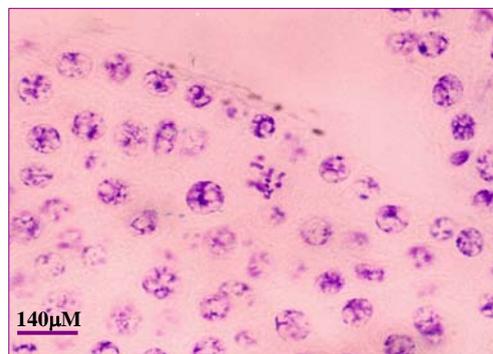
Solo in relazione ai cambiamenti stagionali è associato, sia nei campioni del sito M3 che M4, un chiaro “reppatterning “ nucleare come evidenziato dalla diversa struttura della cromatina dei nuclei interfasicci. In particolare in questi la frazione eterocromatica del DNA si presenta, in relazione al diverso momento stagionale, sotto forma di due diversi stati: a) come eterocromatina picnotica addensata sotto forma di grossi e compatti cromocentri, localizzati in maniera disomogenea su una frazione eucromatica quasi inapprezzabile; b) oppure in uno stato più decondensato con piccolissimi cromocentri diffusi omogeneamente su tutta l’area nucleare. Questi due modelli si estremizzano, in entrambi i siti (M3,M4), nei mesi di Aprile (Fig. 9) e Novembre (Fig. 9). In Aprile si ha la prevalenza di nuclei del primo tipo, che raggiungono il 59% del totale, mentre in novembre vi è la prevalenza di nuclei del secondo tipo, che raggiungono il 62%. Nel mese di Giugno (Fig. 9), si osserva una situazione intermedia.

**Fig.9**

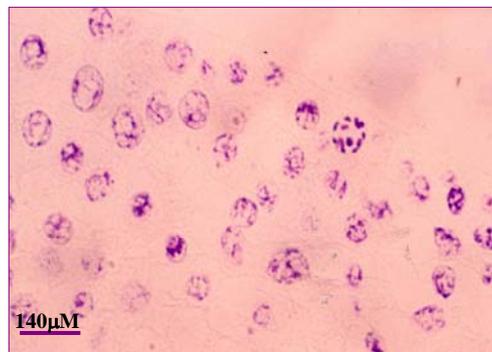
**Aprile M3**



**Giugno M3**



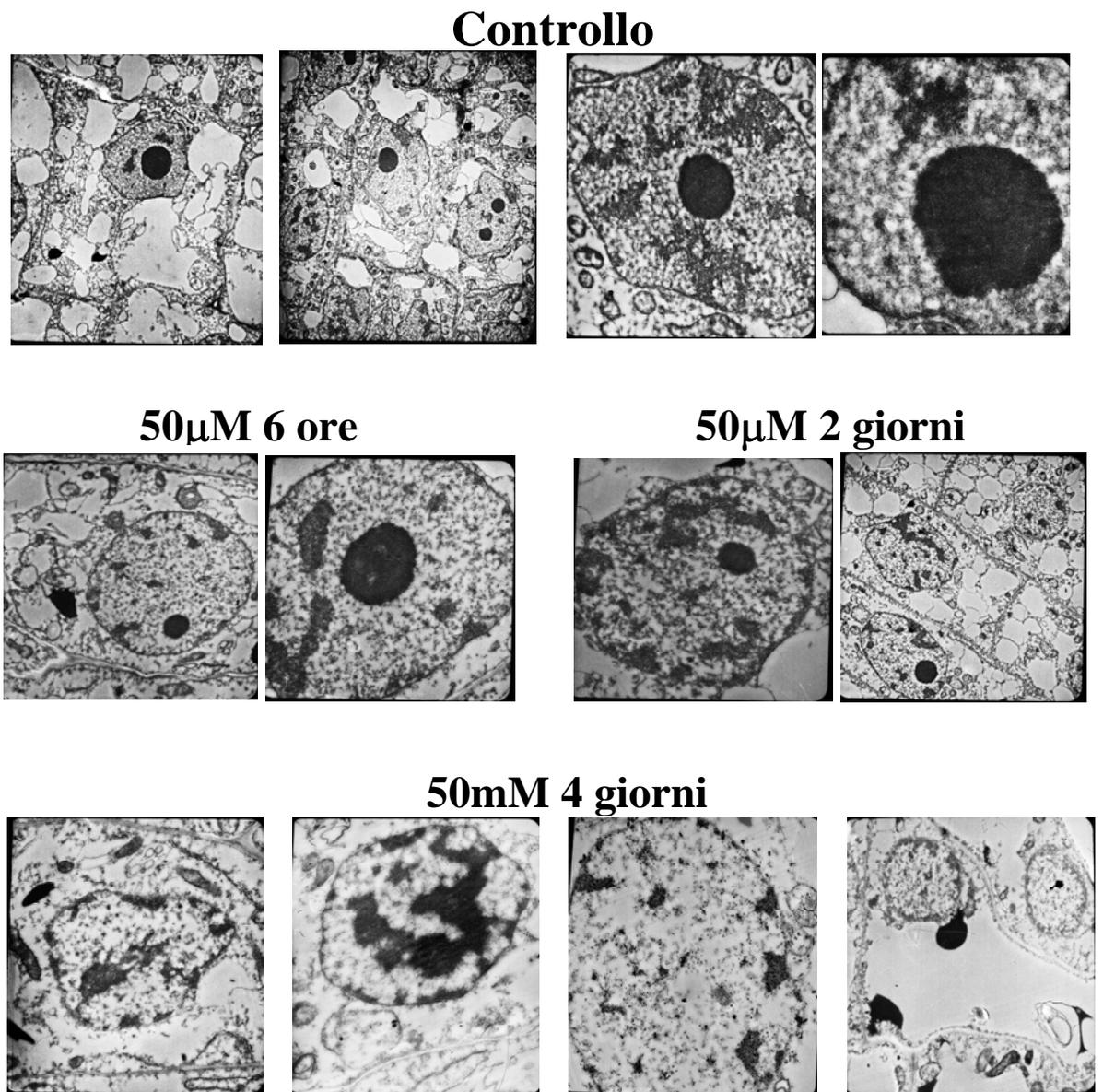
**Novembre M3**



**Fig. 9.** Struttura della cromatina nei nuclei interfaseici di apici meristemati a diverso impatto antropico (M3, M4) nei diversi momenti stagionali presi in considerazione.

#### **1.5.4b Aspetti ultrastrutturali in piante sottoposte a stress da cadmio**

L'analisi al microscopi elettronico delle popolazioni meristematiche del germoglio di piante esposte al Cd ha permesso di evidenziare una progressiva condensazione della cromatina tempo e dose dipendente. Nel controllo infatti i nuclei presentano aree eterocromatiche all'interno di una matrice eucromatica uniformemente distribuita. Nei nuclei di piante stressate si osserva invece una rarefazione dell'eucromatina con le aree eterocromatiche sempre più compattamente addensate e localizzate lungo la membrana nucleare con il proseguire del trattamento.



**Fig. 10.** Analisi ultrastrutturale di nuclei interfase di apici meristemati sottoposti a stress da Cd 50 $\mu$ M paragonate con quelli di controllo.

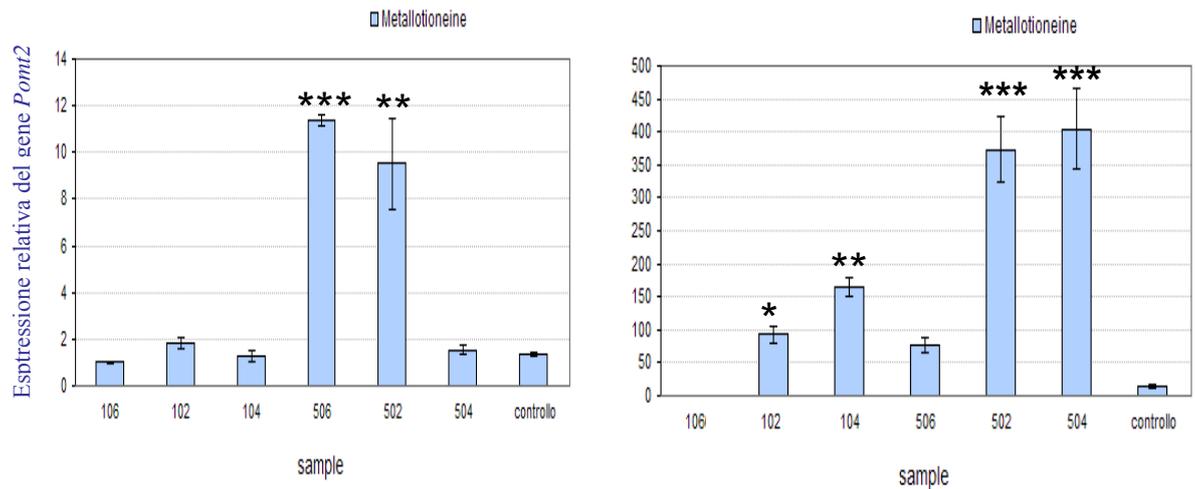
### **1.5.5 Livelli di espressione del gene *Pomt2* (*P. oceanica* Metallotioneina) in piante sottoposte a stress da cadmio.**

Come marcatore delle condizioni di stress indotte nelle piante di *Posidonia oceanica* dal trattamento con il cadmio è stato preso in esame il pattern di espressione del gene *Pomt2* ([AJ628145](#)) (*MT*, che codifica per una *metallotioneina di tipo 2*). Le metallotioneine sono proteine che svolgono un ruolo chiave nella risposta delle piante ai metalli pesanti; in particolare in *Posidonia oceanica* i trascritti di *Pomt2* sono stati localizzati a livello del meristema apicale e delle giovani foglie e correlati alla funzione della proteina nel trasporto a lunga distanza dei metalli pesanti (Giordani et al. 2000). I livelli di espressione di tale gene sono stati pertanto monitorati, via RT-PCR, sia nell' apice meristemico (Fig. 11a) che nelle foglie (Fig. 11b) delle piante sottoposte ai diversi trattamenti con cadmio e confrontati con quelli delle piante di controllo, allevate in acqua.

Dai risultati ottenuti appare evidente come, in entrambi gli organi presi in esame i livelli di espressione di *Pomt2* cambiano a seguito del trattamento, sia pure con una sensibilità ed una cinetica diversa ( Fig. 11a e b). Nell'apice (Fig. 11a), infatti, i trattamenti con cadmio 10 $\mu$ M non inducono significative differenze nei livelli di espressione mentre si nota un picco di espressione (di 6 volte quello del controllo) ad alte concentrazioni di cadmio (50 $\mu$ M) già dopo 6 ore (506h), seguito da una “deregulation” tempo dipendente (502d e 504d).

Le foglie (Fig. 11b) mostrano invece un aumento lineare dell'espressione genica sia a basse concentrazioni di cadmio (10

$\mu\text{M}$ : 106h,102d,104d) che ad alte ( $50\mu\text{M}$ :506h,502d,504d). Si evidenzia, infatti, in entrambi i trattamenti un aumento significativo dell'espressione di tale gene col procedere del tempo che a  $10\mu\text{M}$  (4 giorni), risulta essere di 15 volte il controllo ed a  $50\mu\text{M}$  arriva ad essere 40 volte il controllo.



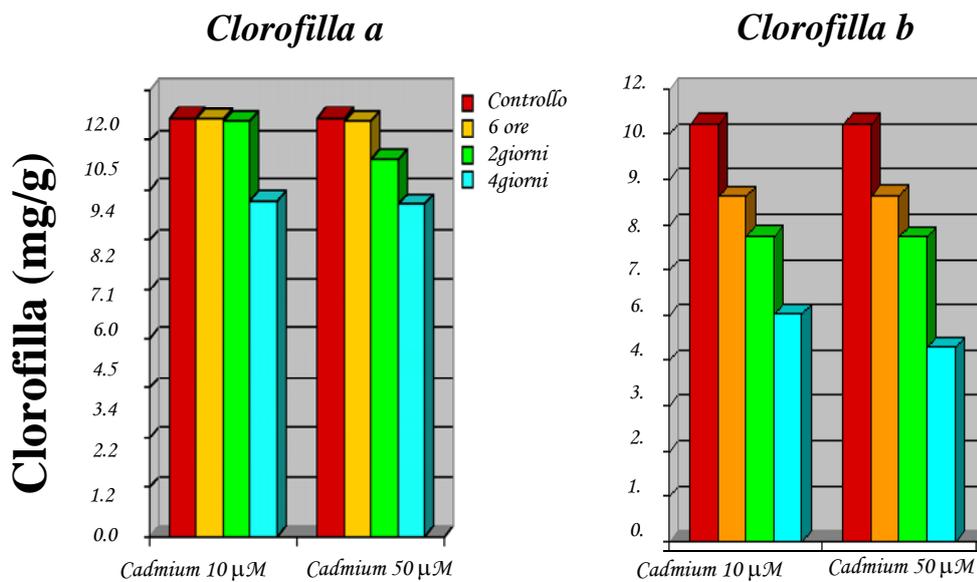
**Fig. 11.** I livelli di espressione relativa del gene *Pomt2*, ottenuti via pRT-PCR (a) nell' apice meristematico e (b) nelle foglie di *Posidonia oceanica* sottoposte a stress da cadmio. I valori ottenuti sono stati normalizzati con quelli di un gene *housekeeping* che nel nostro caso è stato quello per l' *rRNA 5.8S* di *Posidonia oceanica* presente in banca dati ([AJ225091](#)) Trattamenti:  $10\mu\text{M}$  per 6 ore ( t 106h) , 2 giorni (t 102d) 4 giorni (t 104d) e  $50\mu\text{M}$  per 6 ( t 506h) , 2 giorni (t 502d) 4 giorni (t 504d). ANOVA followed by Neuman-Keul's *post-hoc* test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 1.5.6 Contenuto in Clorofilla *a* e Clorofilla *b* in piante sottoposte a stress da cadmio.

Nelle foglie di *P.oceanica* sottoposte ai diversi trattamenti con il cadmio sono stati valutati anche il livello di Clorofilla *a* e *b*.

Il cadmio infatti inibisce la sintesi di clorofilla (Stobart et al. 1985; Horvath et al., 1996) e contestualmente ne attiva la degradazione enzimatica (Somashekaraiah et al. 1992).

In *Posidonia oceanica* ( Fig. 12) abbiamo osservato una significativa riduzione del contenuto in Clorofilla *a* solo dopo un prolungato trattamento con il cadmio. Al contrario il trattamento induce un immediata riduzione del contenuto in clorofilla *b* (Fig. 12 a,b). Questo è in accordo con studi precedentemente condotti in orzo, da Stobart et al. (1985), i quali riportano che il cadmio influenza principalmente la biosintesi di Chl *b* attraverso il suo effetto negativo sulla sintesi dell'acido 5-aminolevulinico e sulla stabilità del complesso protoclorofilla reductasi e il suo substrato.

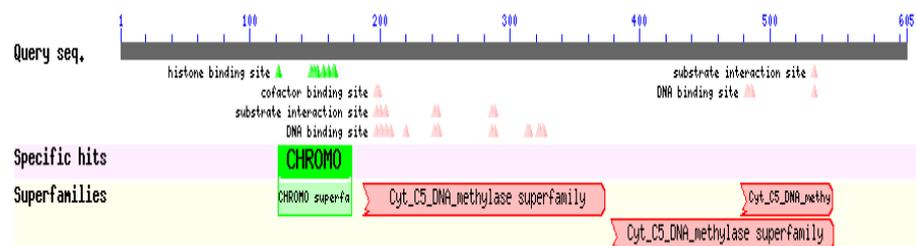


**Fig. 12.** Contenuto in Clorofilla-*a* e Clorofilla-*b* espresso in (mg/g) in foglie di *Posidonia*. Trattamenti: 10μM per 6 ore ( t 106h) , 2 giorni (t 102d) 4 giorni (t 104d) e 50μM per 6 ( t 506h) , 2 giorni (t 502d) 4 giorni (t 504d)

### 1.5.7 Caratterizzazione parziale del gene *CMT* in *Posidonia oceanica* e sua proteina dedotta.

Il gene *CMT* in *Posidonia oceanica* è stato parzialmente isolato a partire da cDNA ottenuto via retrotrascrizione da apice meristemato. Usando i primers specificati in materiali e metodi è stato possibile isolare un frammento genico di 1.997 nucleotidi, il quale include un frammento al 3' UTR di 211 nucleotidi, mentre il 5' UTR non è ancora stato identificato. L'ORF parziale codifica per una proteina dedotta di 602 amminoacidi (Fig. 14).

L'analisi in "silico" della sequenza amminoacidica dedotta, effettuata tramite comparazione con le altre proteine presenti in banca dati, ha permesso di identificare tre domini (Fig. 13, 16) altamente conservati tipici delle cromometilasi, due sono i domini Citosina DNA metiltransferasi, e il terzo è il dominio chromo. caratteristico di queste proteine. L'analisi filogenetica basata sull'allineamento di sequenze amminoacidiche del gene *CMT* presente in banca dati. La più alta omologia di sequenza si ha con la *CMT* di vite, che mostra un'identità del 62% (Fig. 15).



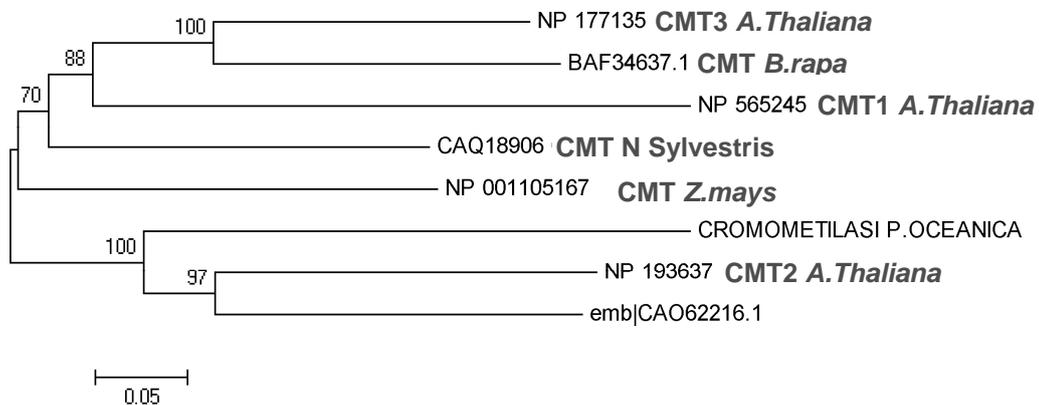
**Fig. 13.** Domini presenti nei 602 amminoacidi del frammento proteico parziale isolato nella cromometilasi di *Posidonia oceanica*. È possibile riconoscere alcuni dei tipici domini presenti nelle cromometilasi di *A.thaliana*, due domini **Cytosine-C5 specific DNA methylases**, che catalizza il trasferimento di un gruppo metilico

dal donatore AdoMet o AdoHcy nella posizione 5 di un residuo di citosina sul DNA e un dominio **Chromo** (Chromatin organization modifier domain).

> parziale sequenza proteica (602aa)

TLAPTPVGELSHMVDLQAAANSLVIGPFRQCPLVYAMGPTF  
 PGLNIETMWA VDMNKDACRSLQLNHSEAKVRNENAEHFL  
 ALLKEWEKLCEKYSGSKDLLEETMQEDNSEDNDD **ADSDE**  
**EFVVEKLLDICYGDPKIGKDGKFKVVRWKGYGSDEDTWE**  
**PIENLGKCEERMGNFVRWGMKTYLLPLPGDVDAVCGGPP**  
**COGISGFNRFRNSDNPLDDEKNROMVTYMDIVDHLKPKYV**  
**LMENVVDILKFSKGFLLGRYALSFLVSRNYQARLGIMAAGC**  
**YGLPQFRLRAFFWGSDPYKMLPQFPLPTHDVVFKCGAPTE**  
**FERNVVA YDENQPRVLEKALVIEDALSDLPSVTLLLETRDQL**  
**SYGKAPOTEFORYIRA** SKSEIMCSKDYDAKKSRTSVLYDHC  
 SLQLSKENYSRICQIPRRKGACFRDLPGVIVLPDNSTQRDPS  
 KEMELLPSGKPLVPNFC **FTYENGKSLRPFGRLLWDETVP**  
**VLTTAGPHFQAILHPEODRVLTVRENARLOGFPDFYRFSGT**  
**IKERYCQIGNAVAIPVSRALGYAMGVAWPEEAGPKMNL**  
**SW** SRPSSSLFTHPCTNTSQDLLLLKFSSNLLSLHCVILMStop

**Fig. 14.** Sequenza del frammento proteico dedotto di *CMT* in *Posidonia* lungo 602 amminoacidi. E' possibile identificare in verde il dominio **CROMO**, mentre in rosa sono presenti i due dominio **C5-DNA-metiltransferasi**.



**Fig. 15.** Filogramma

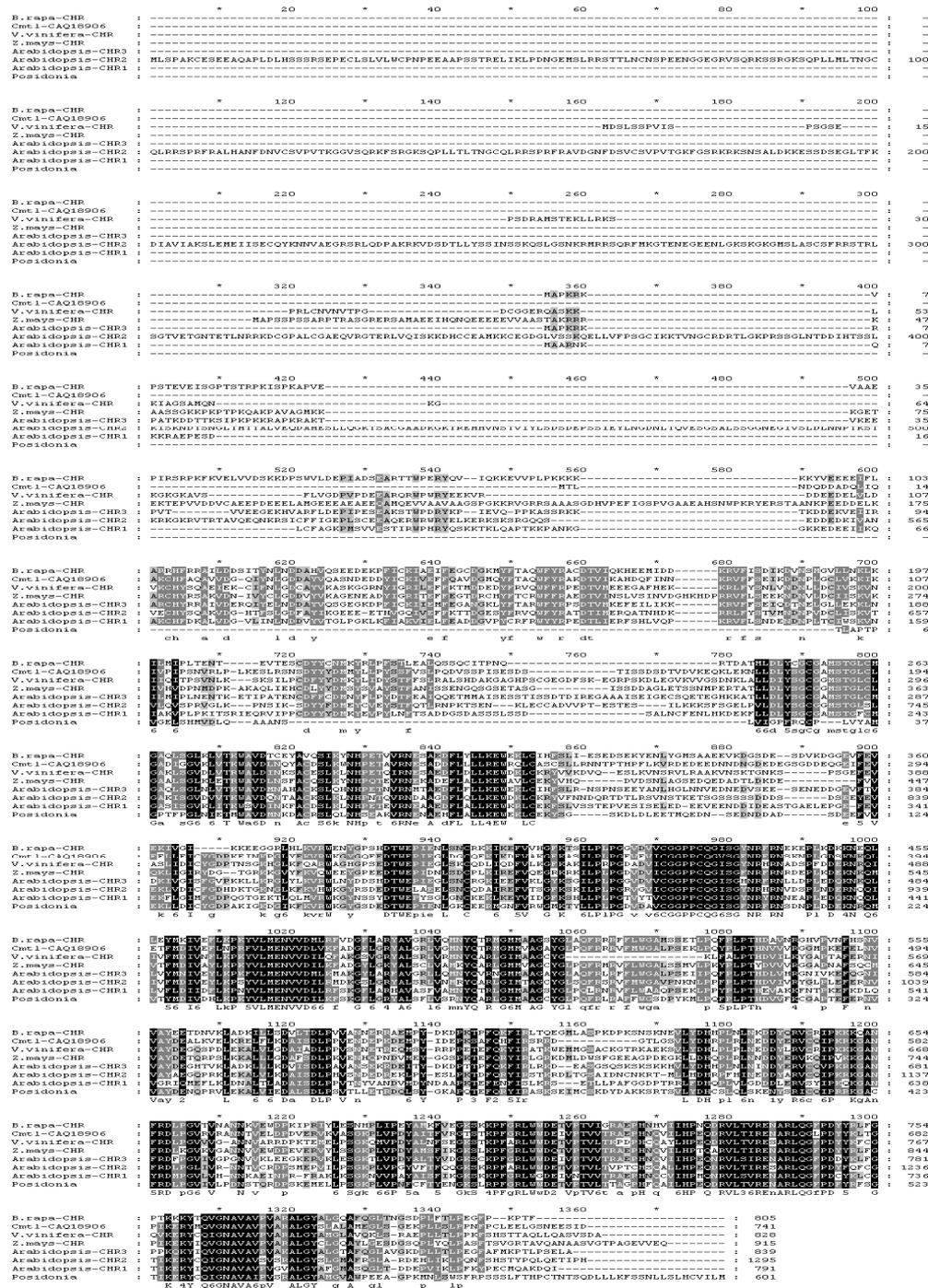


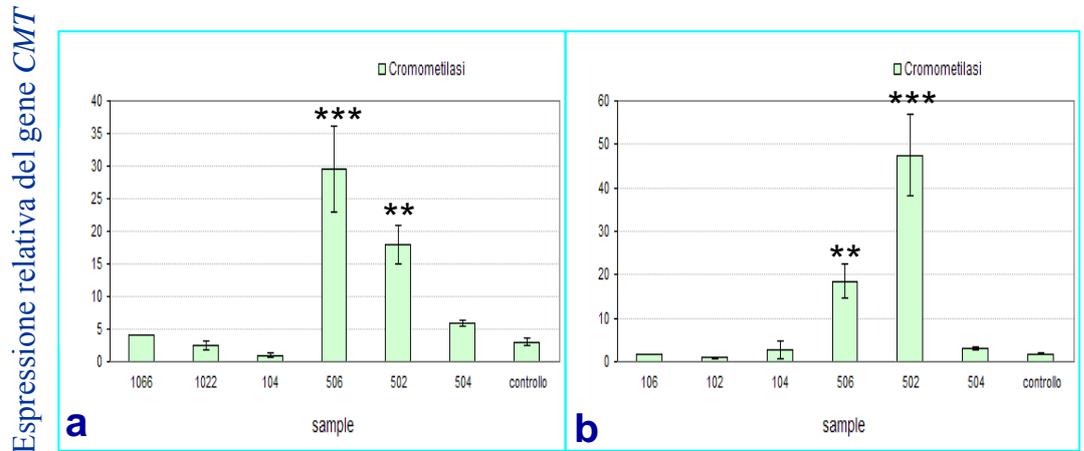
Fig. 16. I domini conservati della CMT di Posidonia oceanica sono stati allineati con quelli delle CMT di Arabidopsis thaliana, Z.Mays, B.rapa, e

V.vinifera. L'allineamento nero mostra i residui identici, mentre quelli in grigio indicano gli amminoacidi simili. È possibile localizzare i sei motivi conservati tipici delle *CMT*. Il cromo dominio è localizzato a monte del dominio IV.

### 1.5.8 PCR quantitativa (qRT-PCR)

I livelli di espressione del gene *CMT* sono stati monitorati sia nel SAM ( Fig. 17a) che in foglie (Fig. 17b) di piante di *Posidonia oceanica* sottoposte a stress da metalli pesanti ( $\text{CdCl}_2$ ), confrontandole con piante di controllo acclimatate in acquario. L'espressione è stata valutata sia in funzione del tempo (6 ore, 2 giorni e 4 giorni), che della concentrazione usata ( $10\mu\text{M}$  e  $50\mu\text{M}$  di  $\text{CdCl}_2$ ). Appare evidente una differenza di espressione nei due organi presi in esame. Nell'apice si nota un'intensa espressione solo ad alte concentrazioni di cadmio ( $50\mu\text{M}$ ), con un picco di espressione dopo 6 ore di trattamento, e un decremento lineare con il procedere dei giorni (4 giorni). Anche le foglie mostrano un incremento di espressione solo ad alte dosi di trattamento ( $50\mu\text{M}$ ). Tale incremento, paragonabile a quello dell'apice, si manifesta tuttavia più lentamente, raggiungendo il suo picco di espressione dopo 2 giorni, cui segue un ritorno ai valori simili al controllo dopo 4 giorni.

La più rapida risposta modulatoria a livello cromatinico, registrata nell'apice, evidenzia come quest'organo sia più prontamente sensibile alle condizioni di stress rispetto alle foglie.



**Fig.17.** Livello di espressione relativa di *CMT* via qRT-PCR nell'apice meristemato (a) e nelle foglie (b) di piante di *Posidonia oceanica* sottoposte a stress da cadmio. I valori ottenuti sono stati normalizzati con quelli di un gene *housekeeping* che nel nostro caso è stato quello per l' *rRNA* 5.8S di *Posidonia oceanica* presente in banca dati ([AJ225091](#))

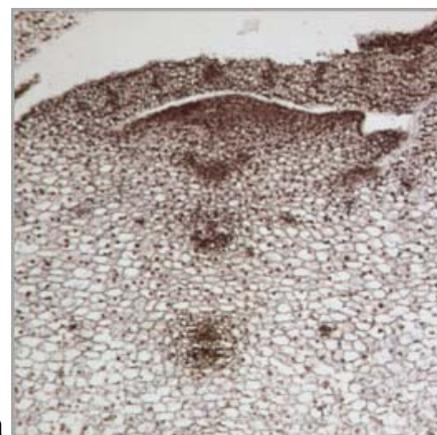
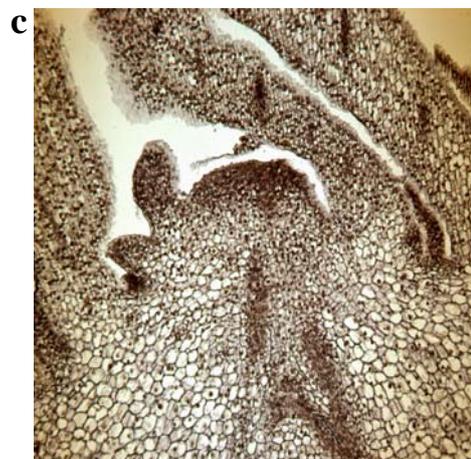
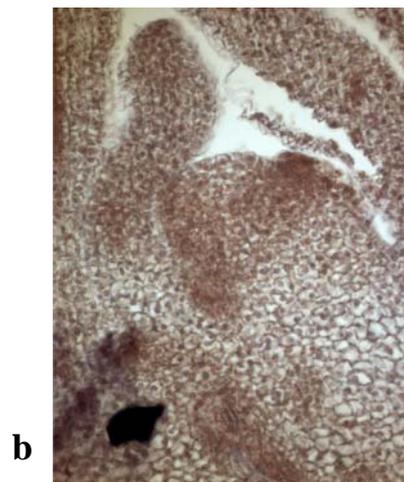
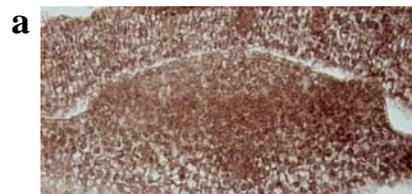
Trattamenti: 10µM per 6 ore ( t 106h) , 2 giorni (t 102d) 4 giorni (t 104d) e 50µM per 6 ( t 506h) 2 giorni (t 502d) 4 giorni (t 504d). ANOVA follone by Neuman-Keul's *post-hoc* test. \* P<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0,001.

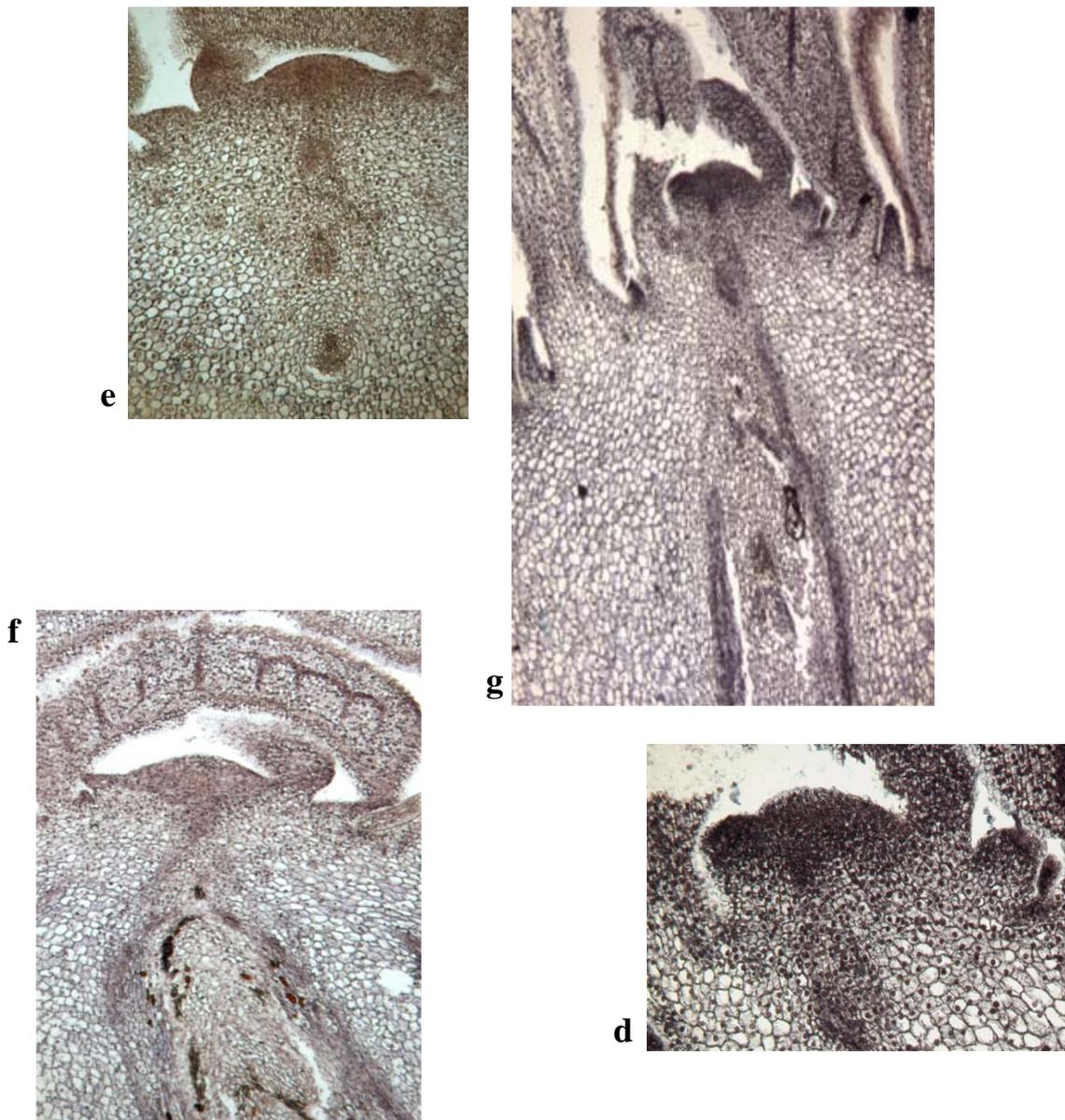
### 1.5.9 Ibridazione in situ su apici di *Posidonia oceanica*

I risultati dell' ibridazione *in situ*, sono riassunti nelle Figure 18 a-h, dove la colorazione marrone e bluastro, evidenziata dalla fosfatasi, segnala il trascritto *CMT*. Nell'apice vegetativo dei campioni trattati con cadmio 10 $\mu$ M per 6 ore e 2 giorni, (Fig. 18 a,b) il trascritto *CMT* si evidenzia essenzialmente nella "peripheral zone" (PZ), lasciando quasi priva di segnale la zona centrale (CZ). Nei campioni trattati con cadmio 10 $\mu$ M per 4 giorni (Fig. 18 c) il segnale si accumula invece nell'intero domo apicale.

Nei campioni trattati con una più alta concentrazione di cadmio (50 $\mu$ M) un intenso accumulo di trascritti sia a livello della zona centrale che periferica si osserva già alle 6 ore di trattamento e tale si mantiene anche dopo 2 giorni. Una generalizzata diminuzione dei trascritti si registra nei campioni trattati con cadmio 50 $\mu$ M per 4 giorni.

In tutti i campioni, la marcatura risulta interessante sia le bozze fogliari che i fasci vascolari (Fig.18 e,f).





**Fig.18** Ibridazione *in situ* su apici meristemati di *P.oceanica* sottoposta a stress da Cd.  
**a:** 10 $\mu$ M CaCd2 per 6 ore; **b:**10 $\mu$ M CaCd2per 2 giorni; **c:**10 $\mu$ M CaCd2per 4 giorni;  
**d,g:** 50 $\mu$ M CaCd2per 2 giorni; **e:** 50 $\mu$ M CaCd2per 6 ore; **f:** 50 $\mu$ M CaCd2 per 4 giorni;  
**h:** piante di controllo; **i:** controllo della reazione.

---

**Capitolo 2: Modificazioni post-traduzionali del core istonico e ruolo dell'istone "linker H1"**

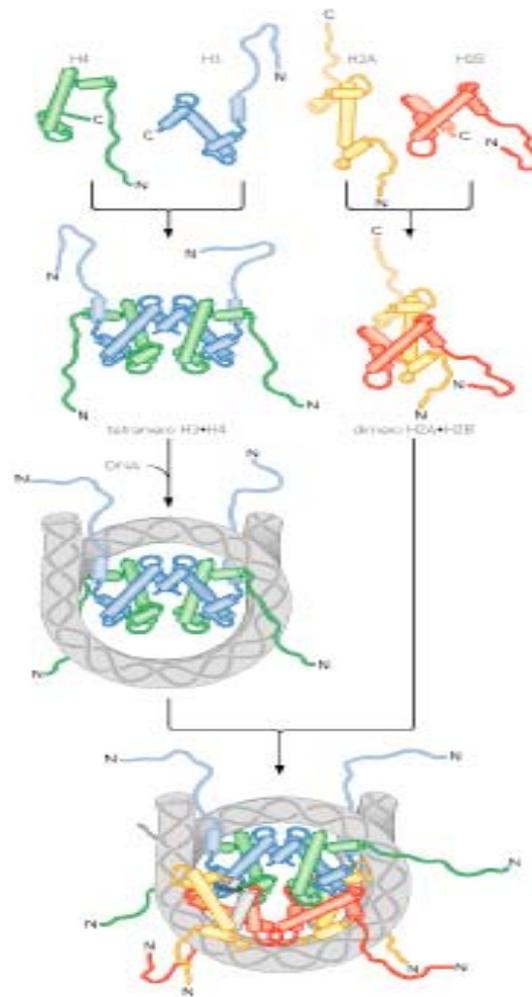
*Introduzione*

## **2.1 Ruolo delle modificazioni post-traduzionali del core istonico.**

Un altro meccanismo epigenetico coinvolto nella regolazione dell'espressione genica, è il rimodellamento della cromatina, operato dalle modificazioni post-traduzionali degli istoni (Loidl 2004; Tariq *et Paszkowsk* 2004; Margueron *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2006; Nightingale *et al.*, 2006;).

Come noto, i distinti livelli di organizzazione della cromatina dipendono dalla struttura dinamica dei nucleosomi che rappresentano l'unità fondamentale della cromatina stessa e quindi, in ultima analisi, sono influenzati sia dall'ottamero di istoni attorno al quale si avvolge il DNA e sia dall'istone "linker" H1.

Gli istoni sono piccole proteine altamente basiche, caratterizzate da un dominio centrale apolare, a struttura globulare, e da regioni N-terminali e C-terminali che contengono una maggiore quantità di amminoacidi basici. Tra questi i più abbondanti risultano essere la lisina e l'arginina. Le regioni basiche N-terminali degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 sono molto flessibili, fuoriescono dal nucleosoma e costituiscono i principali siti di interazione con il DNA (Fig. 1). Le regioni non polari e quelle C-terminali sono invece coinvolte nelle interazioni sia tra gli istoni che tra gli istoni ed il DNA (Luger *et al.*, 1997, 1999).

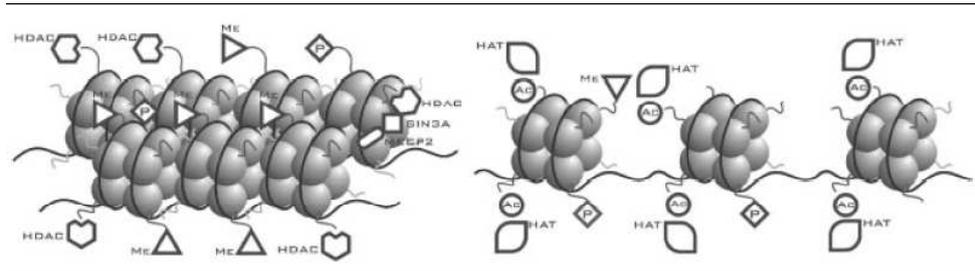


**Fig.1.** L'assemblaggio del nucleosoma consiste nell'associazione ordinata dei complessi proteici istonici con il DNA.

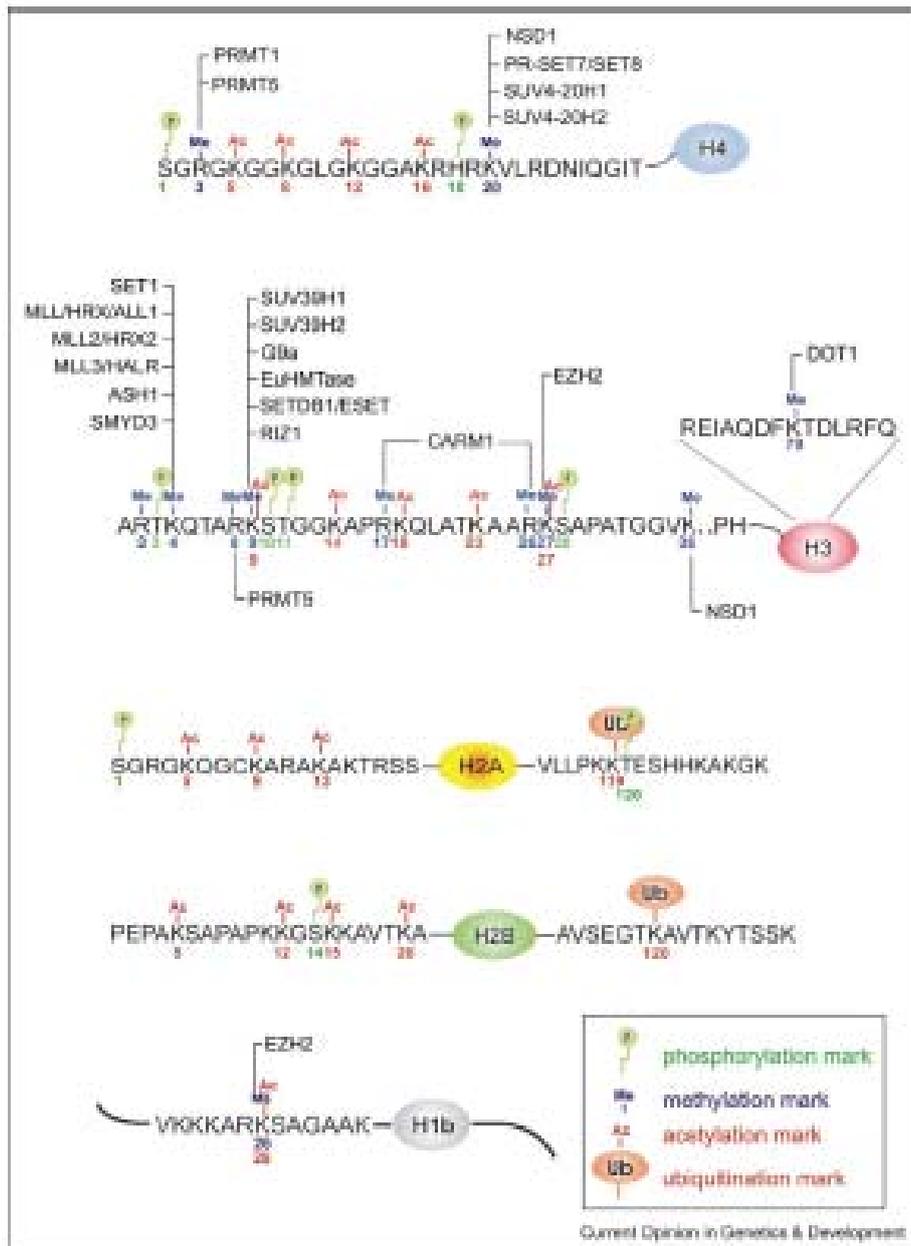
Gli istoni “linker” H1 giocano un ruolo fondamentale nella condensazione del DNA. Essi stabilizzano infatti, la struttura finale del DNA grazie all’interazione dei propri domini C-terminali, carichi positivamente, con i filamenti di DNA linker, che connettono un nucleosoma all’altro (Contreras *et al.*, 2003).

In passato si riteneva che le proteine istoniche avessero un prevalente ruolo strutturale, oggi invece è ampiamente riconosciuto che esse costituiscono elementi integranti e dinamici dei meccanismi coinvolti non solo nella trascrizione genica, ma anche in processi importanti quali la replicazione, la riparazione del DNA, la ricombinazione e la segregazione dei cromosomi (Masayoshi Iizuka *et M Mitchell Smith*. 2003; Jasencakova *et al.*, 2003)

Nei nuclei delle cellule i cromosomi hanno una struttura dinamica. Essi sono, infatti, interessati dal continuo passaggio da uno stato condensato della cromatina (eterocromatina), tipico di una fase di repressione trascrizionale, ad una forma rilassata (eucromatina), caratteristica dello stato trascrizionale attivo. Questi cambiamenti strutturali dipendono da una serie di modificazioni post-traduzionali (PTM) istone specifiche. Tra le PTM rientrano reazioni di acetilazione, metilazione, fosforilazione, poli-ADP, ribosilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, carbonilazione e glicosilazione (Fig. 2-5) (tabella 1) (Turner 2000; Jendwein *et Allis* 2001; Berger 2002; Nightingale *et al.*, 2006)

**A. ETEROCROMATINA****B. EUCROMATINA**

**Fig. 2.** La struttura della cromatina regola l'attività trascrizionale. **A:** Fenomeni quali la metilazione del DNA e la deacetilazione degli istoni inducono un compattamento della cromatina e la repressione della trascrizione. **B:** L'acetilazione degli istoni e la demetilazione del DNA promuovono un rilassamento della cromatina e permettono l'attivazione della trascrizione.



Le PTM avvengono a livello delle code terminali degli istoni che fuoriescono dal nucleosoma e sono quindi accessibili alle proteasi (Hansen *et al.*, 1998)

In tempi recenti è stato proposto anche per gli istoni l'esistenza di un vero e proprio **“codice istonico”** detto anche **“codice epigenetico”** e definito dall'insieme delle modificazioni capaci di regolare l'attività trascrizionale di specifici geni (Bannister *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001; Cosgrove *et Wolberger* 2005). L'ipotesi proposta è che i complessi multiproteici dei fattori di trascrizione siano in grado di leggere questo codice. In particolare, specifiche modificazioni a livello delle code amminoterminali degli istoni sembrerebbero costituire siti di riconoscimento per diverse proteine che a loro volta determinano il passaggio della cromatina da eu- ad eterocromatina. La natura combinatoriale di queste modificazioni sembra rivelare che il codice istonico non sia altro che un'estensione del codice genetico del DNA (Nakayama *et al.*, 2001; Santisteban *et al.*, 2000).

Il rimodellamento della cromatina dipendente, generalmente, da complessi multiproteici, ed è, per definizione, un'alterazione stabile della struttura dei nucleosomi e del posizionamento del DNA (Aaifs JD, Kingston RE. 2000; Ballestar E, Wolffe AP., 2001).

I complessi proteici coinvolti nel rimodellamento cromatinico possono essere suddivisi in due gruppi principali: i complessi ATP-dipendenti, che utilizzano l'energia ottenuta dall'idrolisi dell'ATP per alterare la connessione fra istoni e DNA (Van Attikum *et Gasser* 2005; Jerzmanowski 2007), ed i complessi responsabili delle modificazioni covalenti delle estremità istoniche (Chen ZJ, Tian L. 2007; Hollender C, Liu Z. 2008). Dunque, tutti i complessi proteici appartenenti al primo gruppo

modificano i nucleosomi in maniera ATP-dipendente. Essi sono formati da più subunità il cui peso molecolare è compreso tra 220 kDA e 2 Mda ed appartengono a tre classi principali con attività ATPasica (Jerzmanowsky 2007; Gavin *et al* 2001)

Alla prima classe appartiene la famiglia di proteine SWI/SNF2, caratterizzata dal punto di vista molecolare, dal complesso SWI2/SNF2 di lievito ed in RSC (Jerzmanowski 2007; Fry CJ, Peterson CL 2001). La seconda classe di complessi rimodellatori della cromatina (ACF, NURF e RSF) è caratterizzata dalla presenza dell'ATPasi ISWI, omologa ad ISWI di *D. melanogaster* (Corona *et al* 2007; Dang W, Bartholomew B, 2007; Infine la terza classe Mi-2 è caratterizzata da un'ATPasi simile alla CHD (Lutz *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007).

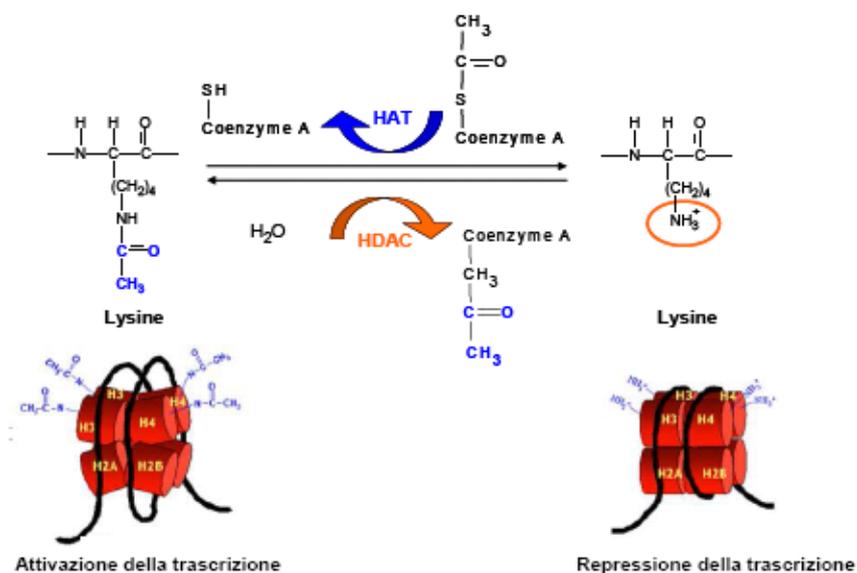
Un altro elemento tipico dell'ATPasi di queste tre classi proteiche riguarda il dominio presente all'estremità C-terminale. I complessi SWI/SNF presentano un bromodominio, ISWI ha un dominio SANT mentre la classe Mi-2 ha un cromodominio (Horn *et Peterson*, 2001; Loyola *et Almouzni* 2004). Il probabile ruolo svolto da questi domini, fortemente conservati, potrebbe essere quello di riconoscere specifiche strutture cromatiniche attraverso l'interazione con le code N-terminali degli istoni.

Numerose modificazioni si riscontrano anche alle estremità N-terminali delle code istoniche, per attività di enzimi quali le acetilasi HAT (histone acetyl-transferases) e le deacetilasi HADC (histone deacetylases), responsabili proprio dei livelli di acetilazione istonica (Kuo *et al.*, 1998; Lusser *et al.*, 2001; Iizuka *et Smith* 2003; Loidl 2004; Chen ZJ, Tian L. 2007; Hollender C, Liu Z 2008).

Il livello di acetilazione è strettamente correlato alla trascrizione. Generalmente ad un core istonico altamente acetilato corrisponde

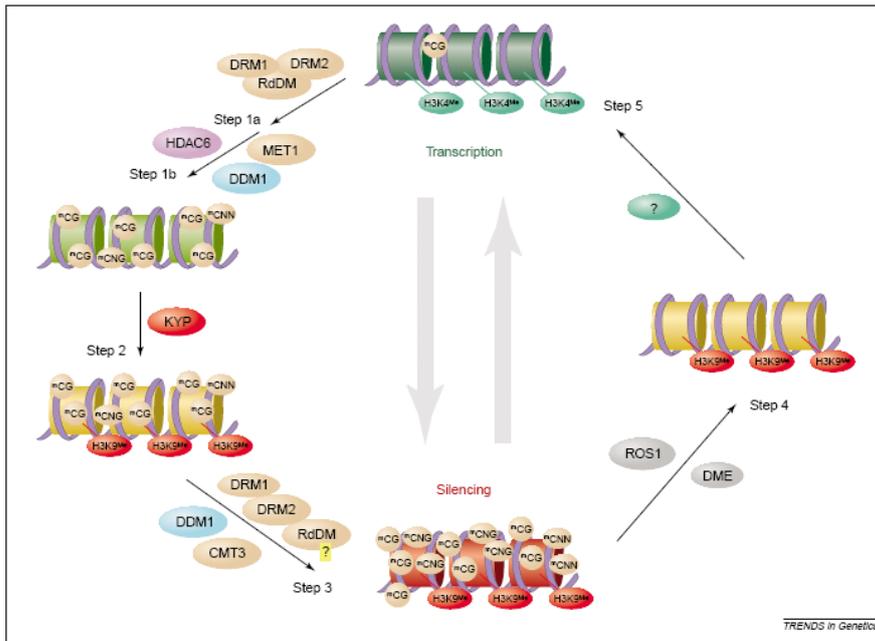
un'attivazione della trascrizione mentre, quando gli istoni sono scarsamente acetilati si verifica una repressione trascrizionale (Fig. 4). Una possibile spiegazione proposta per questo comportamento è che nel nucleosoma le cariche positive degli istoni ipoacetilati interagiscono con i gruppi fosfato carichi negativamente del DNA mantenendo la cromatina in una struttura compatta e quindi silente (Kuo *et al.*, 1998; Lusser *et al.*, 2001; Iizuka *et al.* Smith 2003; Loidl 2004; Chen ZJ, Tian L. 2007; Hollender C, Liu Z 2008).

L'acetilazione agirebbe, quindi, neutralizzando la carica positiva degli istoni e provocando il rilassamento della cromatina. In tal modo le regioni dei promotori diventano accessibili ai TF, ai complessi di regolazione della trascrizione ed alla RNA polimerasi (Turner 2000).



**Fig.4.** Ruolo delle HDAC e delle HAT nella regolazione dell'accessibilità del nucleosoma e nella trascrizione genica. Le code ammino-terminali degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 contengono numerosi residui di lisina che sono potenziali substrati delle HDAC e delle HAT. Quando si trovano nello stato deacetilato le lisine cariche positivamente permettono alle code istoniche di interagire strettamente con i filamenti di DNA.

L'acetilazione neutralizza la carica e le code si staccano dal DNA che diventa più accessibile per la trascrizione.



**Fig. 5.** Modello sul silenziamento epigenetico in *A.thaliana* dato dalla relazione tra la metilazione del DNA e l'istone H3. Step 1a e 1b: porta allo stabilimento e al mantenimento dell'iniziale metilazione del DNA a livello dei siti CG (grazie all'attività dell'enzima MET1) insieme ad una progressiva ipermetilazione delle isole CG possibilmente mediate dalla metilazione del DNA diretta dall'RNA (RdDM). Questo step porta all'ipermetilazione del DNA principalmente nelle sequenze CG. Step 2: I nucleosomi con metilazione del DNA a livello delle sequenze CG, sono modificati da specifiche HMT a livello dell'istone H3K9 ( in Arabidopsis KYP1). Step3: La cromatina con ipermetilazione CG del DNA e H3K9<sup>Me</sup> è riconosciuta da un insieme di DNA metiltransferasi (CMT3, DRM1, e DRM 2) e il DNA è successivamente ipermetilato anche a livello delle sequenze CNG e CNN. Questo step richiede DDM1 e può anche coinvolgere la RdDM. Il risultato dello step 3 è il silenziamento genico. Lo step 4 è il primo putativo step all'indietro verso l'attivazione trascrizionale come risultato della de-metilazione del DNA data da specifiche glicosilasi (ROS1 e DME). Nello step 5 si ha la reversione di H3K9<sup>Me</sup> probabilmente grazie la sostituzione dell'istone con un'altra variante oppure con la metilazione dell'istone H3 seguito a livello della lisina 4 da parte di putative H3K4 HMT, che portano all'attivazione trascrizionale.

Abbreviazioni: CMT3, CHROMOMETHYLASE3; DDM1, decrease in DNA methylation 1; DME, demeter; HDAC, histone deacetylases; HMT, histone methyltransferase; KYP, KRYPTONITE.

**Tabella 1.** Principali modifiche post-traduzionali riscontrate a livello del core istonico.

Table 1. A current view of histone modifications.

Modification	Histone	Site	Enzyme	Possible function	
Acetylation	H2A	K4 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Esa1	Transcriptional activation	
		K5 (mammals)	Tip60	Transcriptional activation	
			p300/CBP	Transcriptional activation	
		K7 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Hat1	?	
		H2B	K5	Esa1	Transcriptional activation
				ATF2	Transcriptional activation
			K11 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Gcn5	Transcriptional activation
	p300/CBP			Transcriptional activation	
	K12 (mammals)		ATF2	Transcriptional activation	
			Gcn5	Transcriptional activation	
	K16 ( <i>S. cerevisiae</i> )		Esa1		
			p300/CBP	Transcriptional activation	
	H3		K20	ATF2	Transcriptional activation
				p300	Transcriptional activation
		K4	Esa1	Transcriptional activation	
			Hpa2	?	
		K9	?	Histone deposition	
			Gcn5	Transcriptional activation	
			SRC-1	Transcriptional activation	
			Gcn5, PCAF	Transcriptional activation	
		K14	Esa1, Tip60	Transcriptional activation	
				DNA repair	
	SRC-1		Transcriptional activation		
	Elp3		Transcription elongation		
	Hpa2		?		
	hTFIIIC90		RNA polymerase III transcription		
	TAF1		RNA polymerase II transcription		
Sas2	Euchromatin?				
Sas3	Transcriptional activation/elongation?				
p300	Transcriptional activation				
K18	Gcn5 (SAGA/STAGA complex)	Transcriptional activation			
		DNA repair			
	p300, CBP	DNA replication			
		Transcriptional activation			
		Transcriptional activation			
K23	Gcn5 (SAGA/STAGA complex)	Transcriptional activation			
	Sas3	DNA repair			
	p300, CBP	Transcriptional activation/elongation?			
H4	K27	Gcn5	Transcriptional activation		
		Hat1	Histone deposition		
	K5	Esa1, Tip60	Transcriptional activation		
		DNA repair			
	K6	ATF2	Transcriptional activation		
		Hpa2	?		
		p300	Transcriptional activation		
		Gcn5, PCAF	Transcriptional activation		
	K8	Esa1, Tip60	Transcriptional activation		
			DNA repair		
		ATF2	Transcriptional activation		
		Elp3	Transcription elongation		
p300		Transcriptional activation			
K12		Hat1	Histone deposition		
	Esa1, Tip60	Telomeric silencing			
		Transcriptional activation			
		DNA repair			

Table 1. A current view of histone modifications (continued).

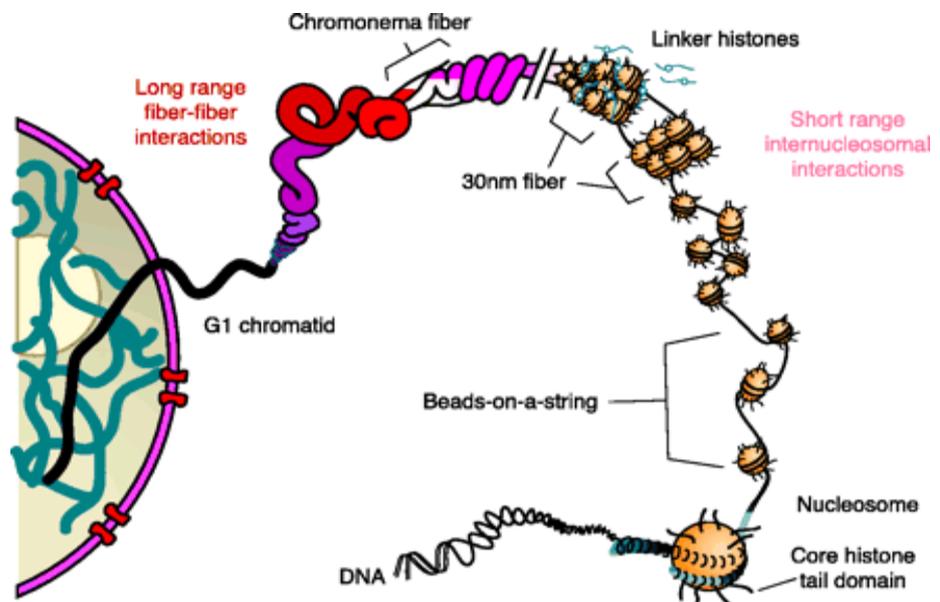
Modification	Histone	Site	Enzyme	Possible Function	
Methylation	H3	K12	Hpa2	?	
		K16	Gcn5 MOF ( <i>D. melanogaster</i> )	Transcriptional activation Transcriptional activation	
		K4	Esa1 (yeast), Tip60 (mammals)	DNA repair	
			ATF2	Transcriptional activation	
			Sas2	Euchromatin	
			Set1 (yeast)	Permissive euchromatin (di-Me)	
			Set9 (vertebrates)	Active euchromatin (tri-Me) Transcriptional elongation/memory (tri-Me) Transcriptional activation	
			MLL, Trx	Transcriptional activation	
			Ash1 ( <i>D. melanogaster</i> )	Transcriptional activation	
			K9	Suv39h, Clr4	Transcriptional silencing (tri-Me) DNA methylation (tri-Me)
				G9a	Transcriptional repression Imprinting
			R17	SETDB1	Transcriptional repression (tri-Me)
		Dim-5, Kryptonite		DNA methylation (tri-Me)	
		K27	Ash1 ( <i>D. melanogaster</i> )	Transcriptional activation	
			CARM1	Transcriptional activation	
		K36	Ezh2	Transcriptional silencing X inactivation (tri-Me)	
			Set2	Transcriptional elongation Transcriptional repression?	
		K79	Dot1p	Euchromatin Transcriptional elongation / memory	
			H4	R3	PRMT1
		K20		PR-Set7 Suv4-20h Ash1 ( <i>D. melanogaster</i> )	Transcriptional silencing (mono-Me) Heterochromatin (tri-Me) Transcriptional activation
Phosphorylation	H2A	K59	?	Transcriptional silencing?	
		S1	?	Mitosis	
		?	Chromatin assembly?		
		MSK1	Transcriptional repression		
		T119	NHK-1	Mitosis	
		S129 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Mec1	DNA repair	
		S139 (mammalian H2AX)	ATR, ATM, DNA-PK	DNA repair	
		H2B	S14 (vertebrates)	Mst1	Apoptosis
			S33 ( <i>D. melanogaster</i> )	TAF1	Transcriptional activation
		H3	T3	?	Mitosis
			S10	Aurora-B kinase MSK1, MSK2 Snf1	Mitosis, meiosis Immediate-early activation Transcriptional activation
		T11 (mammals)	Dlk/ZIP	Mitosis	
S28 (mammals)	Aurora-B kinase? MSK1, MSK2		Mitosis Immediate-early activation		
Ubiquitylation	H4	S1	?	Mitosis	
	H2A	K119 (mammals)	HR6A,B?	Spermatogenesis	
	H2B	K120 (mammals) K123 ( <i>S. cerevisiae</i> )	HR6A,B? Rad6	Meiosis Transcriptional activation	
Sumoylation	H3	?	?	Euchromatin Spermatogenesis	
	H4	?	Ubc9	Transcriptional repression	

## 2.2. Ruolo dell'istone "linker H1"

L'istone linker H1 è associato con il DNA linker compreso tra due nucleosomi e modula la formazione di una cromatina fortemente compattata. Esso è il principale componente strutturale della cromatina degli organismi eucarioti ed è presente con la media di una molecola per nucleosoma.

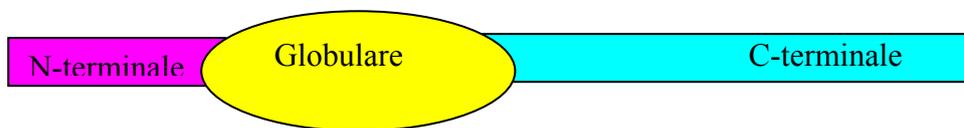
La posizione dell'istone linker rispetto al core istonico, è stata dedotta dall'osservazione che la sua presenza ritardava la digestione del DNA cromatinico da parte della nucleasi di micrococco, esercitando una protezione di circa 20bp in aggiunta alle 146bp protette dall'interazione con il core istonico.

L'istone H1 è piuttosto variabile tra le specie a differenza delle altre classi. Basti pensare che l'istone H4 di vitello e quello della pianta di pisello differiscono di soli 2 aminoacidi su 102 (DeLange *et al.*, 1969a; DeLange *et al.*, 1969b).



### 2.2.1. Struttura dell'istone linker

Negli eucarioti superiori l'istone H1 ha una struttura tripartita, cioè formata da tre domini: un dominio centrale globulare e non polare, essenziale per l'interazione con il DNA e due domini non-strutturati, le code N- e C- terminale altamente basiche che probabilmente sono il sito di modificazioni post-traduzionali. Il dominio globulare è più conservato degli altri due ed ha una struttura definita "winged helix". Tutte le proteine che presentano tale dominio sono proteine che legano il DNA (Gajiwala *et* Burley, 2000).



Studi filogenetici hanno messo in evidenza che nelle piante sono presenti due classi di istone linker. In *Arabidopsis thaliana* la prima classe è formata dalle principali forme somatiche dell'istone linker come le varianti H1.1 e H1.2. Gli istoni di questa classe rappresentano i principali istoni linker della cromatina. Il gruppo appartenente alla seconda classe è definito variante H1 "drought-inducibile" perché indotto dal deficit idrico e dallo stress. Esso comprende una piccola frazione di istoni linker come ad esempio l'istone H1.3 di *Arabidopsis*, l'istone H1.D di *Lycopersicon* e l'istone H1.C di *Nicotiana* (Wei *et* O'Connell 1996; Ascensi *et* Gantt 1997, 1999). Resta comunque ancora da definire quale possa essere il ruolo delle varianti H1 "drought inducibile" in *pianta*.

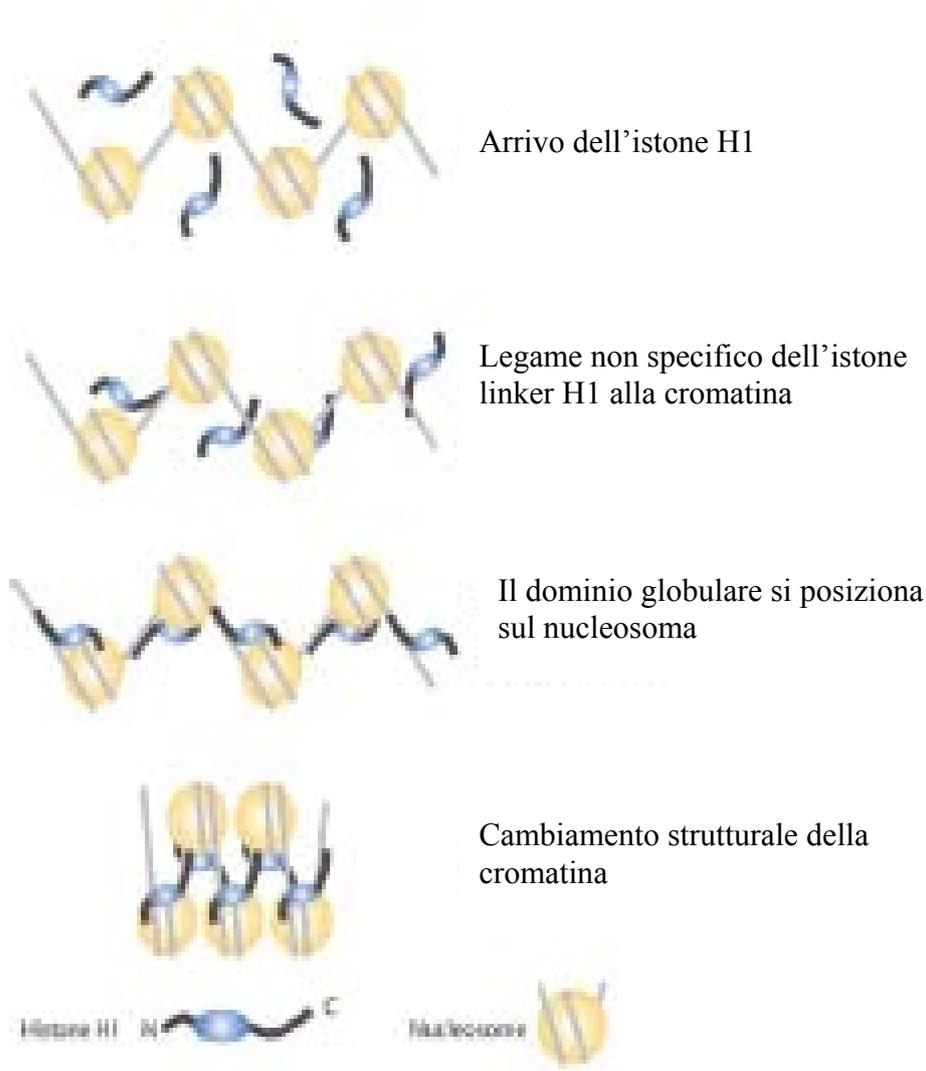
### 2.2.2. Legame dell'istone linker alla cromatina

Le differenti componenti dell'istone linker svolgono un differente ruolo nel legame dell'istone H1 alla cromatina. Sulla base di informazioni condotte *in vivo*, l'interazione dell'istone H1 e la cromatina avviene mediante diverse tappe.

La prima tappa coinvolge il dominio C-terminale. In generale, per quanto riguarda l'affinità dell'istone H1 per la cromatina, è stato supposto che essa sia controllata da forze elettrostatiche che si stabiliscono tra le cariche positive della proteina H1 e le cariche negative del DNA (Clark *et al.* 1990). La maggior parte delle cariche positive sono distribuite nella lunga coda C-terminale. Per la presenza di queste interazioni il dominio C-terminale lega in maniera semplice e non specifica la cromatina. L'uso di costrutti GFP ed analisi FRAP sull'istone H1.1 hanno messo in evidenza che il dominio C-terminale è il primo responsabile del legame dell'istone H1.1 alla cromatina *in vivo* e singole sostituzioni aminoacidiche possono alterare l'affinità di tale molecola per la cromatina (Hendzel *et al.*, 2004). Inoltre, le diverse sottoclassi dell'istone H1 hanno una differente affinità per la cromatina, perché hanno una diversa lunghezza della regione C-terminale ed una affinità di carica variabile (Hendzel *et al.*, 2004).

La forza di legame del dominio C-terminale è fortemente influenzato dalla fosforilazione di specifici siti. In particolare, sembrerebbe che la fosforilazione di H1 diminuisca la sua affinità per la cromatina.

Questo primo legame aspecifico favorisce lo stabilirsi di un preciso posizionamento del dominio globulare sul nucleosoma il quale stabilizza il nucleosoma stesso e porta a cambiamenti conformazionali della cromatina.



Recenti studi relativi all'interazione dell'istone H1 con la cromatina *in vivo*, hanno messo in evidenza che le molecole dell'istone H1 non sono associate stabilmente a specifici siti. Infatti, molecole di H1 sono costantemente scambiate all'interno dei siti di legame sulla cromatina in un processo di "stop and go" in cui l'istone H1 è associato in un sito della cromatina per un limitato periodo di tempo, poi si dissocia e si muove

rapidamente e in maniera casuale verso un altro sito di legame. Studi *in vivo* hanno dimostrato che, in linea generale, vi sono sempre molecole di istone H1 associate alla cromatina, insieme a molecole di istone che si muovono all'interno del nucleo (Catez *et al.*, 2006).

### **2.2.3. Funzioni dell'istone linker**

Sebbene sia ben conosciuto il ruolo del core istonico nella modulazione della struttura cromatinica e dell'espressione genica, poco è noto sul ruolo dall'istone linker H1.

Evidenze sperimentali suggeriscono che l'istone linker non è essenziale per la sopravvivenza cellulare sia nei protisti che nei funghi (Shen *et al.* 1995; Barra *et al.* 2000; Ramon *et al.* 2000), nonostante esso sia altamente conservato dal punto di vista evolutivo (Kasinsky *et al.*, 2001) e sia localizzato in una posizione strategica sulla superficie del nucleosoma (Zhou *et al.*, 1998). Esperimenti di delezione del gene Hho1p, omologo a H1 nel lievito, suggeriscono un suo coinvolgimento nei meccanismi di riparazione del DNA, via ricombinazione omologa (Down *et al.* , 2003).

Nei funghi una delezione dell'istone H1 determina eventi di ipermetilazione del DNA ed una morte cellulare precoce (Barra *et al.*, 2000).

Ancora del tutto esigue sono, inoltre, le informazioni riguardanti le funzioni dell'istone H1 nelle piante e negli animali. In questi organismi infatti, le diverse varianti esercitano un effetto compensativo reciproco che permette di conservare un normale rapporto H1-nucleosoma nell'organizzazione della cromatina mentre, l'assenza di più varianti non è compatibile con la vita. Infatti, topi privi di tre principali varianti dell'istone H1 sono caratterizzati da una riduzione nel rapporto H1/nucleosoma pari al

47% e muoiono dopo dieci giorni di sviluppo embrionale. L'istone linker risulterebbe quindi fondamentale per lo sviluppo degli eucarioti superiori (Fan *et al.*, 2003, 2005).

In tabacco variazioni nel rapporto tra varianti dell'istone H1 minori e maggiori disturbano la gametogenesi e determinano lo sviluppo di individui maschio-sterili mentre non interferiscono con la crescita e lo sviluppo vegetativo della pianta (Prymakowska-Bosak *et al.*, 1996, 1999). In *Arabidopsis thaliana* una riduzione del 90% nell'espressione dell'istone H1 determina cambiamenti nel pattern di metilazione di specifiche sequenze ed uno sviluppo fenotipico aberrante (Wierzbicki, 2004).

Da quanto sopra riportato è verosimile ipotizzare che negli eucarioti superiori l'istone H1 e le sue varianti possano essere reclutati in processi fisiologici molto più sottili rispetto a quelli che influenzano direttamente la vitalità cellulare.

Considerato che l'istone linker facilita la condensazione della cromatina *in vitro*, si è a lungo ipotizzato che questa proteina fosse un repressore generico della trascrizione. In realtà, l'istone H1 influenza la trascrizione solo di un piccolo e specifico numero di geni, agendo più che da silenziatore della trascrizione da attivatore (Hellauer *et al.*, 2001).

Recenti dati in letteratura suggeriscono il coinvolgimento dell'istone H1 nei meccanismi di apoptosi. In particolare, nei roditori l'irraggiamento con raggi X determina il rilascio dell'istone H1.2 nel citoplasma, questo a sua volta causa il rilascio del citocromo c dal mitocondrio ed innesca il meccanismo di apoptosi. L'istone linker avrebbe quindi il ruolo di segnalare lo stato di integrità del genoma a fattori citosolici che a loro volta inducono fenomeni di apoptosi cellulare (Konishi *et al.*, 2003).

Un esempio dello specifico ruolo regolatore dell'istone H1 è dato dalla regolazione dei geni per rRNA 5S in *Xenopus Laevis*. In questo caso, il passaggio dell'espressione dell'rRNA 5S dalle cellule embrionali alla forma somatica è controllato dall'istone H1 mediante la sua alta affinità di interazione per le zone di DNA ricche in AT (Bouvet *et al.*, 1994; Tomaszewski *et al.*, 1998).

### **2.3 *Arabidopsis thaliana*: Il Sistema Modello del Mondo Vegetale**

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, detta comunemente **arabetta comune** è una piccola pianta infestante annuale o biennale, molto diffusa sulla Terra, originariamente nativa dell'Europa e dell'Asia Centrale, è oggi presente nelle zone a clima temperato dei cinque continenti. In Italia è diffusa in tutto il territorio. Si tratta di una piccola erbaccia facente parte delle Brassicacee. Sebbene non sia di alcuna particolare importanza agronomica, è molto studiata in quanto è utilizzata come organismo modello per le scienze vegetali.

#### **Sistematica**

Regno: Plantae  
Tipo: Spermatophyta (piante con semi)  
Sottotipo: Angiospermae (piante con fiori)  
Classe: Dicotyledones  
Ordine: Brassicales  
Famiglia: **Brassicaceae**

Grazie ad alcune sue caratteristiche metaboliche, morfologiche e biochimiche gli scienziati europei, seguiti poi da americani e giapponesi, hanno scelto nel 1991 l'*Arabidopsis thaliana* come la pianta modello per la mappatura del primo genoma vegetale. L'essenziale del corredo genetico di questa pianta è presente anche nelle altre specie vegetali. Dunque si tratta di un sistema-modello.

La scelta di *Arabidopsis* come organismo modello per la genetica e la biologia molecolare e cellulare delle piante ha diverse ragioni:

- Piccola taglia
- Breve ciclo vitale
- Elevata produzione di semi di piccole dimensioni
- Facilmente mutagenizzabile
- Genoma aploide relativamente piccolo
- Facile da trasformare

*Arabidopsis thaliana* è una piccola (15-30 cm) pianta annuale, con un ciclo vitale breve, da 6 settimane a 3 mesi (Fig. 2a). Le foglie sono semplici, di forma ellittica o ovale, con bordo intero. Ha due tipi di foglie, quelle basali, più grandi, disposte a rosetta, e quelle disposte sul fusto, più piccole, sessili, con corto picciolo. Le infiorescenze si presentano a grappoli, alle estremità del fusto o dei rami. I fiori sono ermafroditi ed hanno un diametro di 0.5 cm, normalmente con quattro petali bianchi. Il frutto è una siliqua lineare che compare al centro del fiore, lungo circa 3 cm e spesso circa 1 mm, cilindrico, un poco arcuato e senza peli. Contiene due cavità nella quale alloggiavano i semi ovoidali, in numero elevato: circa 30 per siliqua. A maturazione assumono un colore arancio.

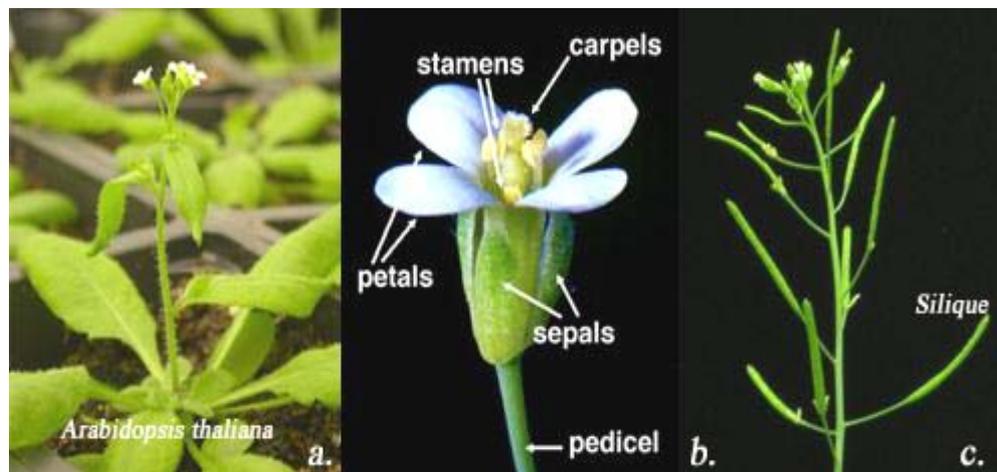


Fig.2. Caratteristiche morfologiche dei fiori (b) piante di *A. thaliana* (a) e la sua produzione di semi all'interno di silique (c).

Una singola pianta può produrre da 5,000-10,000 semi in 6-8 settimane. Anche se non è una pianta dall'importanza agronomica, ha una notevole importanza nella ricerca di base nel campo della genetica e della biologia molecolare.

Infatti, *Arabidopsis* è particolarmente adatta per analisi genetiche, visto che fra le sue uniche caratteristiche troviamo la crescita rapida e l'analisi di un largo numero di individui in uno spazio piccolo (100 piante per 0.5 m<sup>2</sup>) che permettono successive selezioni e propagazioni di genotipi vantaggiosi per ulteriori studi.

Le dimensioni relativamente contenute del suo genoma (circa 125 milioni di paia di nucleotidi, in soli cinque cromosomi) l'hanno resa una pianta ideale per la creazione di mappe genetiche e per il sequenziamento del

genoma, il primo ad essere stato completato, nel 2000, nel regno vegetale (Tabella1,2).

Tabella 1. Confronto tra il genoma di *Arabidopsis* è quello di altri organismi.

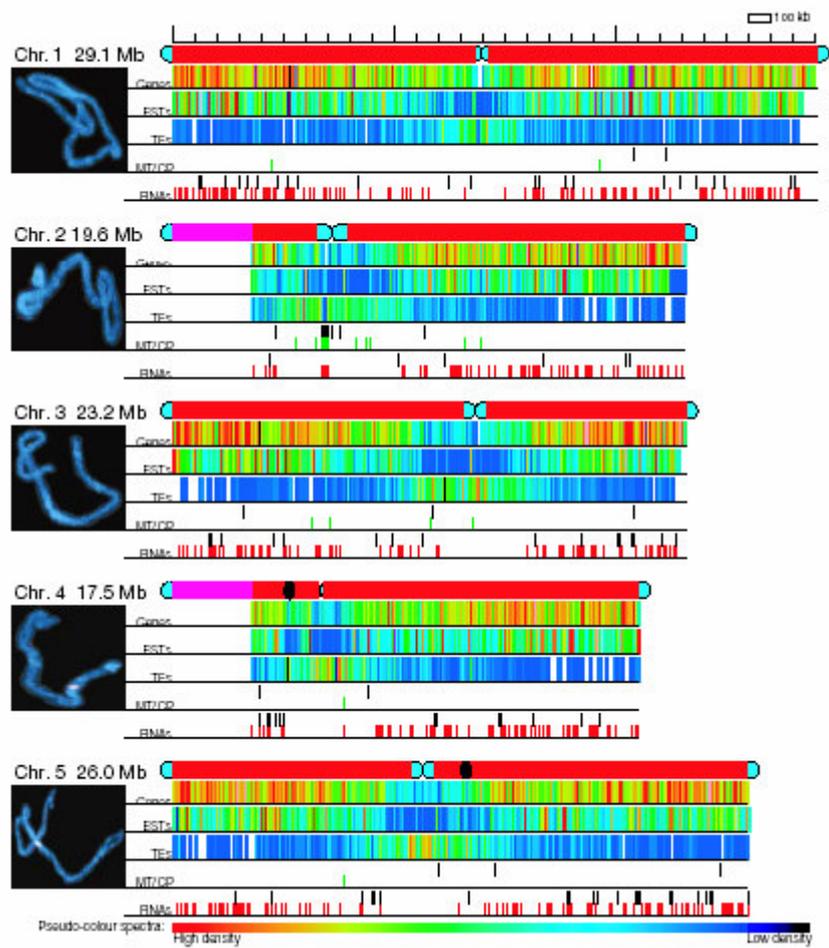
Organism	haploid genome (kbp)
<i>H. influenzae</i>	1.8 x 10 <sup>3</sup>
<i>E. coli</i>	3.5 x 10 <sup>3</sup>
yeast	1.4 x 10 <sup>4</sup>
<i>Arabidopsis</i>	1.2 x 10 <sup>5</sup>
tobacco	1.6 x 10 <sup>6</sup>
wheat	5.9 x 10 <sup>6</sup>
pea	4.5 x 10 <sup>6</sup>

Tabella 2. Caratteristiche del genoma di *A.thaliana*

<b>5 cromosomi 125 Mb (115,409 sequenziato)</b>
<b>25,498 geni putativi. La densità genica varia da 1 a 38 geni ogni 100kb</b>
<b>La densità delle expressed sequence tag “ESTs” da 1 a 200 ogni 100Kb</b>
<b>La densità dei transposable element “TEs” da 1 a 33 ogni 100Kb</b>
<b>Il 69% dei geni ha una funzione putativa.</b>
<b>Il 30% dei geni codifica per proteine sconosciute.</b>

Da allora il punto focale della ricerca è diventato scoprire qual è la funzione di ognuno dei circa 26 mila geni contenuti. Il suo genoma è stato completamente sequenziato, con l’eccezione di alcune regioni intorno ai telomeri, centromeri e delle regioni geniche ripetute dell’RNA ribosomale

(115.4 Mbp sequenziale su 125 Mbp). La pianta ha 5 cromosomi, che contengono 125 Mbp di DNA e 25,498 proteine identificate raggruppate in 11,000 famiglie. E' stata creata un'estesa mappa genetica e fisica dei 5 cromosomi ( la taglia dei cromosomi varia da 17.5 Mbp a 29.1 Mbp).



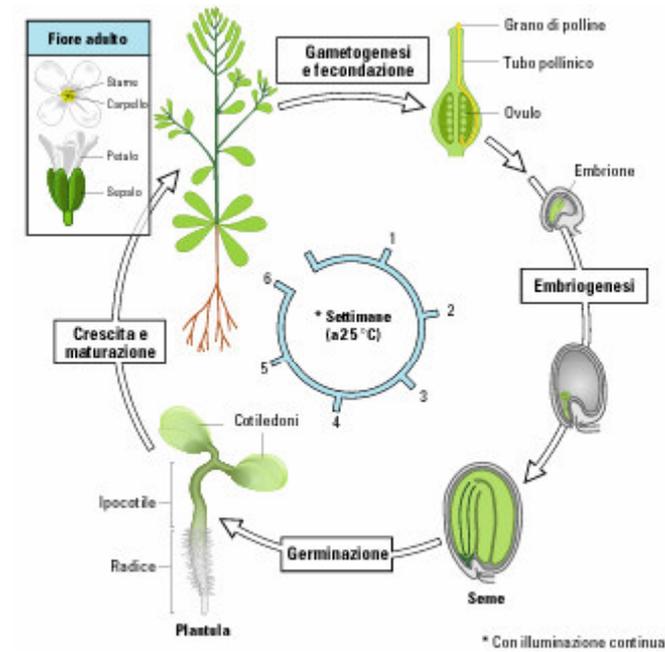
La densità genica è di un gene ogni 4.5 Kb, mentre la media della lunghezza genica è di 2 kb. Altre caratteristiche sulla struttura genica si trovano nella tabella 3.

Tabella 3. Caratteristiche del genoma di *A.thaliana*

	Arabidopsis	Altre piante	E.Coli
DNA unico			
basso n° di copie	50-55%	< 10%	> 95%
DNA mediamente ripetuto	23-27%	-20%	NA
DNA altamente ripetuto	10-15%	-70%	< 5%

Un ulteriore vantaggio di *Arabidopsis* è infine la semplicità con la quale si possono produrre piante transgeniche, tramite il processo di trasformazione genetica, sfruttando il batterio *Agrobacterium tumefaciens* per incorporare nuovo DNA nel genoma della pianta. In particolare, questo ha permesso la creazione di una larga collezione di mutanti ottenuti dall' integrazione random di inserti di T-DNA all'interno del genoma nucleare delle piante.

Un altro vantaggi è il ciclo di vita breve: servono soltanto circa sei settimane (con variazioni tra la stagione invernale e quella estiva) dalla germinazione di una piantina fino a che questa, diventata adulta, produca propri semi. Questo fatto accelera notevolmente la ricerca che per altre specie vegetali richiede tempi molto più lunghi.



Grazie all'adozione come organismo modello, *Arabidopsis* è stata la prima pianta di cui si è sequenziato, con uno sforzo internazionale di numerosi gruppi di ricerca, il genoma. La prima bozza è stata pubblicata nel 2000, da allora più volte migliorata e corretta. Oggi sono migliaia i gruppi in tutto il mondo che concentrano le proprie ricerche su questa pianta.

## 2.4. Piano delle attività

La cromatina è il substrato di molti processi biologici come la regolazione genica, la trascrizione, la replicazione, la mitosi e l'apoptosi. Le proteine istoniche sono le maggiori componenti della cromatina. Gli istoni sono sottoposti numerose modificazioni post-traduzionali che ne determinano ed influenzano la funzione come la metilazione a livello dei residui di lisina ed arginina, l'acetilazione della lisina, l'ubiquitinazione, la SUMOilazione e l'ADP-ribosilazione sulle serina, treonina e tiroxina, la fosforilazione e la citrullinazione dei residui di arginina metilati (Turner 2000; Jendwein *et Allis* 2001; Berger 2002; Nightingale *et al.*, 2006).

L' identificazione di queste modificazioni a livello delle varianti istoniche è cruciale per la comprensione del loro significato biologico. In particolar modo poco si conosce sul ruolo che l'istone H1 svolge a livello del nucleosoma, pertanto lo studio delle variazioni post-traduzionali che le varianti dell'istone H1 subiscono possono fornire utili informazioni sui meccanismi cellulari che da tale istone dipendono. A tal proposito, al fine di identificare eventuali modificazioni presenti nelle diverse varianti istoniche, mediante spettrometria di massa è essenziale l'isolamento di proteine H1 che siano le più pure possibili.

## 2.5. Materiali e Metodi

Durante il secondo anno di questo dottorato il mio interesse è stato rivolto allo studio dell'istone linker H1 ed in tale contesto ho contribuito a mettere a punto un nuovo, articolato e specifico protocollo di estrazione proteica dell'istone linker H1, da cellule di *Arabidopsis thaliana* T87. Questa parte del lavoro di dottorato è stata condotta presso il laboratorio di Biologia Molecolare delle Piante dell'Istituto di Biochimica e Biofisica di Varsavia, sotto la supervisione del Prof. Andrzej Jerzmanowski.

Il lavoro sperimentale è stato svolto su *Arabidopsis thaliana* perché questa pianta possiede solo tre varianti dell'istone H1 (H1.1; H1.2; H1.3). Il lavoro da me svolto è stato una parte di un progetto più ampio mirante a purificare via *reversed-phase HPLC* e caratterizzare, mediante *spettrometria di massa*, le tre varianti presenti in *Arabidopsis thaliana* (H1.1; H1.2; H1.3) nonché analizzarne le modificazioni a livello delle code N-terminale e C-terminale che rappresentano i siti maggiormente sottoposti a modificazioni per il loro elevato contenuto in amminoacidi reattivi (lisina e arginina) e del dominio globulare che lega il DNA.

L'isolamento delle proteine istoniche H1 è stato anche condotto su cellule di *Arabidopsis thaliana* sottoposte a stress da NaCl (25 mM, 100 mM e 250 mM rispettivamente per 3, 7 e 15 ore), allo scopo di verificare eventuali cambiamenti nella stechiometria delle varianti in risposta allo stress. E' noto in letteratura che l'istone H1.3 è "drought-inducibile", rispetto alle varianti H1.1, H1.2.

Un altro approccio sperimentale seguito è stato quello di produrre linee cellulari silenti per tale l'istone H1. In tale contesto ho contribuito alla preparazione di costrutti via "artificial micro RNA" allo scopo di silenziare i

geni codificanti per le diverse varianti dell'istone linker. Sono stati quindi preparati particolari vettori di silenziamento contenenti sia singoli amiRNA (ami RNA H1.1, H1.2 e H1.3) che combinazioni delle tre varianti (ami RNA H1.1/ H1.2 e H1.1/ H1.3 e H1.2/H1.3) oltre che un vettore di silenziamento per tutte e tre le varianti (ami RNA H1.1/ H1.2/ H1.3).

Alcuni dei costrutti prodotti sono stati anche utilizzati per trasformare in maniera stabile cellule di *Arabidopsis thaliana* T87.

### **2.5.1. Cellule di *Arabidopsis thaliana***

Cellule di *Arabidopsis thaliana* T87 sono state coltivate secondo Axelos *et al.*, (1992) in terreno Gamborg's B5 addizionato di 15 g/l di saccarosio e 2.26  $\mu$ M di 2,4-D, a 22°C in continua agitazione a 120 rpm e sotto luce costante. Le cellule sono state subcolturate in Gamborg's B5 ogni 7 giorni ed utilizzate per mettere a punto uno specifico protocollo di estrazione delle varianti proteiche dell'istone H1.

### **2.5.2. Trattamento con NaCl**

Cellule di *Arabidopsis thaliana* sono state trattate con NaCl ad una concentrazione finale di 25mM, 100mM e 250mM rispettivamente per 3, 7 e 15 ore (Tabella 2.5.1). La vitalità delle cellule è stata valutata attraverso colorazione specifica con 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) in accordo con il metodo Wu *et Wallner* (1983). Questo test è basato sulla riduzione del sale di tetrazolio 2,3,5-trifenil-tetrazolio cloruro (TTC).un colorante biologico che rivela l'attività respiratoria. Il TTC è inizialmente

incolore ed in presenza di una deidrogenasi, si trasforma in una sostanza rossa insolubile, il formazano (Ruf M, Brunner I. 2003)

Dopo ogni trattamento le cellule sono state immediatamente congelate in azoto liquido ed utilizzate per l'estrazione proteica e le analisi semiquantitative. Per ogni tempo e concentrazione testata sono state utilizzate 8 beute di cellule e le analisi sono state ripetute in triplicato.

Tabella 2.5.1. Trattamento di cellule di *Arabidopsis thaliana* con NaCl a diverse concentrazioni e per tempi differenti.

<i>NaCl 25mM</i>	<i>NaCl 100mM</i>	<i>NaCl 250mM</i>
<i>3 h</i>	<i>3 h</i>	<i>3 h</i>
<i>7 h</i>	<i>7 h</i>	<i>7 h</i>
<i>15 h</i>	<i>15 h</i>	<i>15 h</i>

### 2.5.3. Protocollo di estrazione acida degli istoni

Le cellule di *Arabidopsis thaliana* (circa 9-10 g) sono state polverizzate in azoto liquido ed alla polvere è stato aggiunto PCA 5% freddo per 1 ora a 4°C. Successivamente i campioni sono stati centrifugati ed incubati con TCA 20% per 2 ore 4°C. Il precipitato proteico ottenuto è stato accuratamente lavato con acetone freddo e quindi dissolto in 1ml di guanidina idrocloride ed 1 µl di PMSF.

L'estratto proteico è stato quindi adeguatamente purificato, liofilizzato ed analizzato mediante gel SDS-PAGE dopo colorazione con Blu di Coomassie.

#### **2.5.4. Preparazione di costrutti diretti al silenziamento di tutte le varianti dell'istone H1 attraverso meccanismi di RNA interfering.**

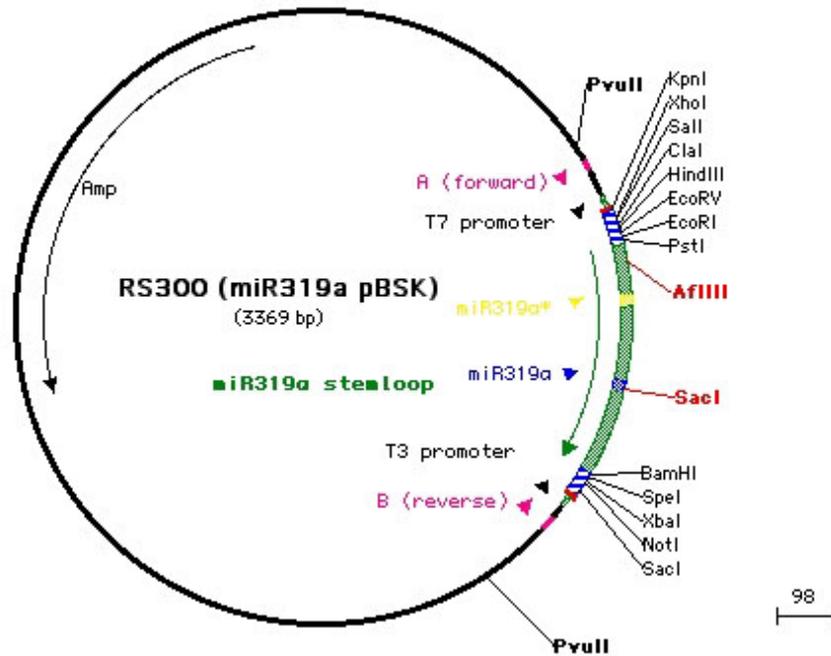
*Arabidopsis thaliana* rappresenta un organismo modello per il silenziamento di tutte le varianti dell'istone linker perché ha solo tre varianti dell'istone H1 (H1.1; H1.2; H1.3), al contrario di altre specie come il tabacco in cui ne sono presenti sei (da H1.A ad H1.F). Questo ha reso più semplice la preparazione di costrutti per il silenziamento genico mediante "artificial micro RNA" (amiRNA).

Preliminarmente sono stati disegnati, per ognuna delle tre varianti dell'istone H1, tre diversi amiRNA: amiRNA H1.1; amiRNA H1.2; amiRNA H1.3 i quali sono stati inseriti, dapprima, in un vettore di ingresso, successivamente, nel vettore binario pCambia, corredato di un promotore ed un *enhancer* 35S.

***Clonaggio di microRNAs artificial*** (Protocollo di Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology Tuebingen, 2005).

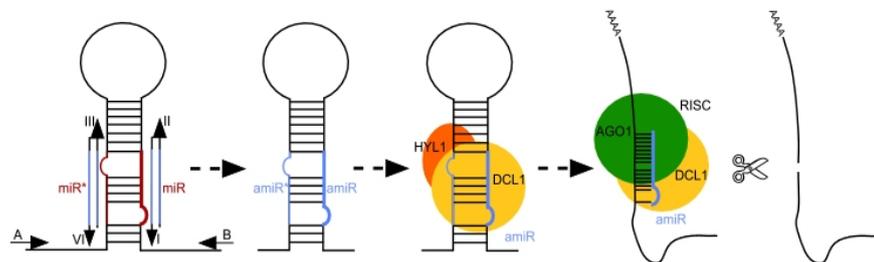
Per la preparazione dei tre amiRNA sono stati disegnati 4 oligonucleotidi (I-IV) specifici per le diverse varianti dell'istone H1 (amiRNA H1.1; amiRNA H1.2; amiRNA H1.3). Tali oligonucleotidi sono stati usati per ingegnerizzare l'amiRNA all'interno del micro precursore miR319a attraverso mutagenesi sito-specifica. Come templat

per la PCR è stato usato il plasmide pRS300 che contiene il microRNA, miR319a ([weigel@weigelworld.org](mailto:weigel@weigelworld.org)).



Mappa del plasmide pRS300:

**Strategia di clonaggio:**



- I: microRNA forward
- II: microRNA reverse
- III: microRNA\* forward
- IV: microRNA\* reverse

	<i>forward oligo</i>	<i>reverse oligo</i>	<i>templato</i>
(a)	A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS300
(c)	I	B	pRS300
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

L' amiRNA finale è stato costruito mediante reazioni di PCR. Le prime tre amplificazioni hanno portato alla formazione di tre frammenti da (a) a (c), i quali sono stati, successivamente, fusi in un unico frammento, nella reazione finale di amplificazione (d).

Gli oligonucleotidi A e B sono oligonucleotidi standard, basati sulla sequenza del plasmide templato pRS300. Tali primers sono localizzati al di fuori del sito di clonaggio multiplo, allo scopo di generare un frammento di grandi dimensioni che comprende il sito multiplo di clonaggio (MCS)

*Sequenza degli oligo A e B:*

A    5'    CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C    3'  
 B    5'    GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G    3'

**Protocollo di clonaggio:**

reazione di PCR (a), (b), (c)

5µl 10xPCR buffer (contenente Mg<sup>++</sup>)

5µl dNTPs @ 2mM

2µl oligo @10µM

2µl DNA plasmidico (1:100)

0.5µl Pfu

33.5µl water

-----

-&gt; 50µl

Programma della reazione di amplificazione

95°C 2'

95°C 30''

55°C 30'' -&gt; lower temp. per (b)

72°C 40''

72°C 7' per 24 cicli

Gel elettroforetico 2%

Eluizione bande (a), (b), (c) in 20µl di acqua.

Reazione di amplificazione finale (d):

5µl 10xPCR buffer (con Mg<sup>++</sup>)

5µl dNTPs @ 2mM

2µl oligo A @ 10µM

2µl oligo B @ 10µM

0.5µl PCR (a)

0.5µl PCR (b)

0.5µl PCR (c)

0.5µl Pfu

34.5µl water

-----

➔ 50

Programma di PCR

95°C 2'

95°C 30''

55°C 30''

72°C 1'30'' 24 cicli

72°C 7'

Gel elettroforetico 2%

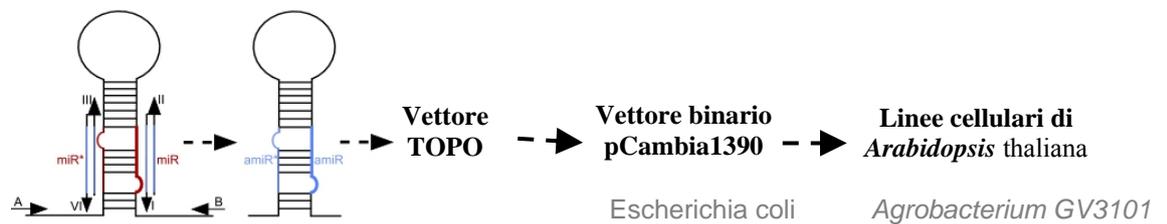
Eluizione bande in 20µl di acqua

**Clonaggio del prodotto di PCR:**

Il frammento finale ottenuto dalle reazioni di amplificazione (d) costituito dal nostro specifico amiRNA, è stato clonato nel plasmide TOPO TA cloning (Invitrogen). I primers T3 e T7, la cui sequenza complementare è presente all'interno del frammento amplificato, sono stati utilizzati per verificare la presenza del amiRNA.

Gli amiRNA sono stati usati per preparare un costrutto finale, trasferendo “la cassetta genica”, contenente lo specifico amiRNA dal vettore TOPO ad un vettore binario pCambia 1390, all'interno del quale è stato trasferito anche un promotore 35S, un *enhancer* ed un frammento GUS.

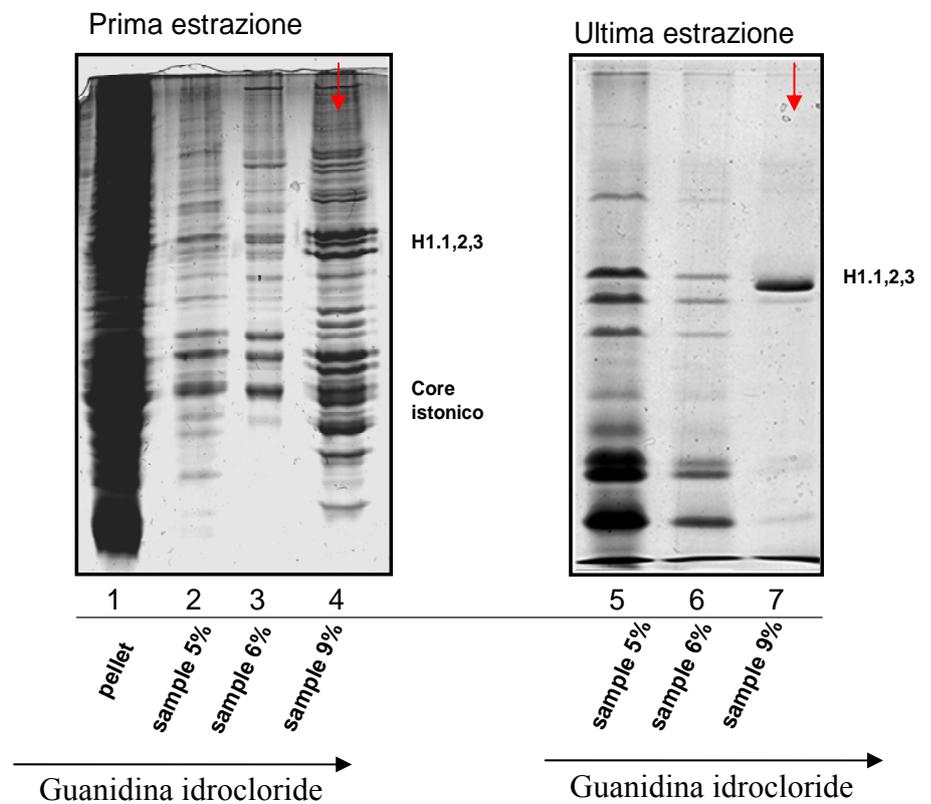
Questo vettore ingegnerizzato è stato, inizialmente, usato per trasformare *Escherichia coli* e poi trasferito, via trasformazione con *Agrobacterium GV3101*, in linee cellulari di *Arabidopsis thaliana* T87.



## 2.6. Risultati

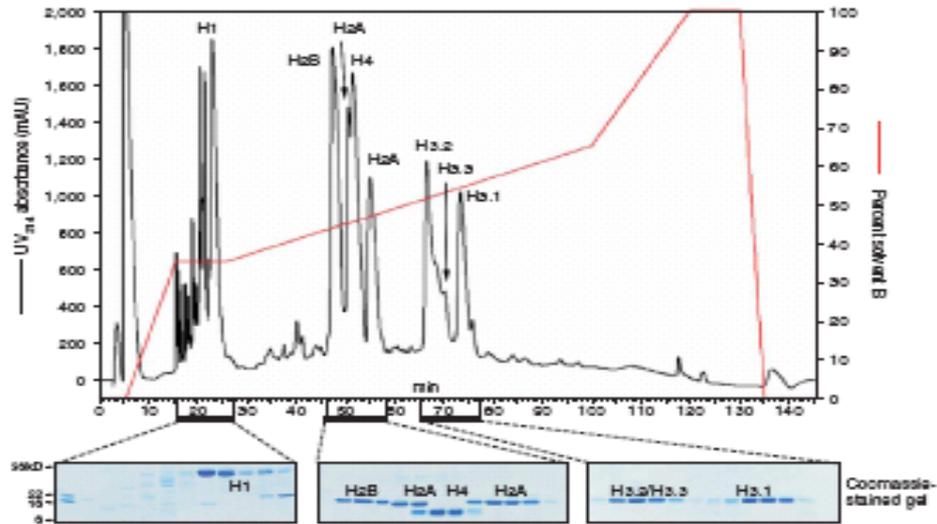
### 2.6.1. Estrazione proteica dell'istone H1

L'estrazione proteica dell'istone linker H1 è stata effettuata su cellule T87 di *A.thaliana*. Il metodo di estrazione adottato è stato basato sul principio di estrazione acida in presenza di PCA e TCA ed immobilizzazione delle proteine istoniche sulla resina bio-rex (Biorad) a scambio ionico. Le proteine istoniche sono state quindi eluite con l'aiuto della guanidina idrocloride  $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$ , a concentrazioni comprese tra il 4,5% ed il 9%. La concentrazione del 9% si è dimostrata quella più efficace per una specifica eluizione dell'istone H1. In Fig.1 è possibile apprezzare la progressiva specificità e selettività nella tecnica estrattiva dal confronto dell'eluato iniziale con guanidina idrocloride al 9% (prima estrazione) con quello finale (ultima estrazione).



**Fig. 1.** Gel di poliacrilammide in cui si evidenzia la progressiva selettività del metodo estrattivo dell'istone linker H1 da cellule di *Arabidopsis thaliana*.

In seguito gli istoni sono stati separati mediante RP-HPLC (Reversed phase- High-performance liquid chromatography) sulla base della loro idrofobicità e purificati. E' riportato di seguito un tipico cromatogramma di separazione istonica attraverso RP-HPLC.

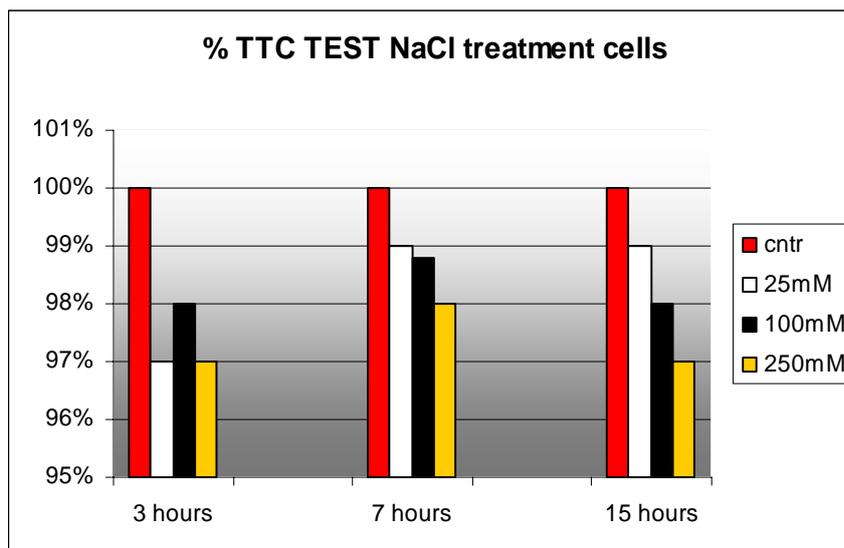


Da Shechter *et al.* 2007 Nature Protocoll Vol.2 NO.6 pag.1445

Sono a tutt'oggi in fase di analisi via spettrometria di massa le modificazioni delle varianti dell'istone H1, presso l'istituto di Biochimica e Biofisica di Varsavia.

### 2.6.2. Test di vitalità cellulare in cellule di *A.thaliana* sottoposte a stress da NaCl.

Al fine di valutare la vitalità delle cellule di *A.thaliana* sottoposte a stress da NaCl. È stato condotto il test TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) di vitalità cellulare. I risultati ottenuti (Fig. 2) hanno messo in evidenza che il trattamento con NaCl 250mM (97%) non compromette la vitalità cellulare anche dopo 15 ore di esposizione al sale.



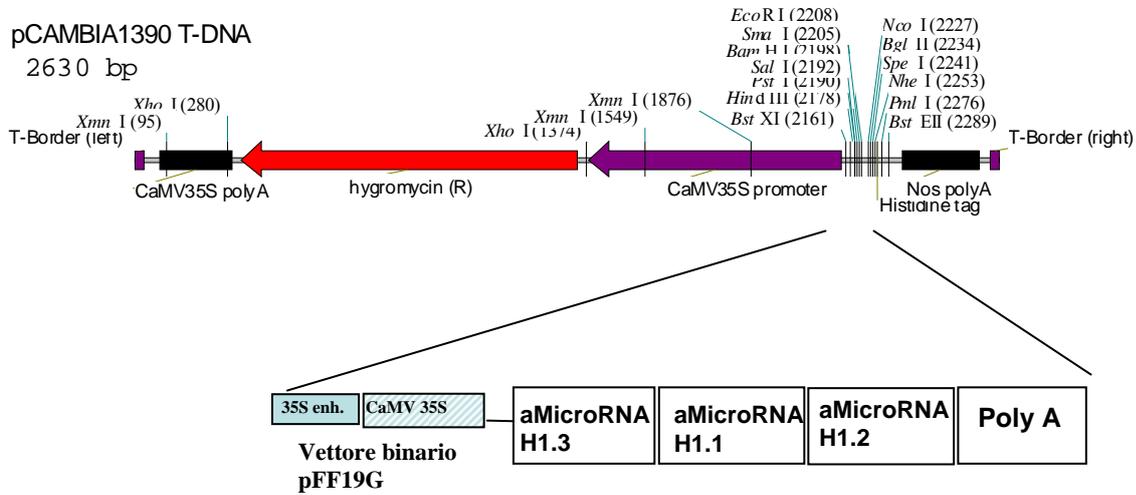
	3 hours	7 hours	15 hours
cntr	100%	100%	100%
25mM	97%	99%	99%
100mM	98%	98,80%	98%
250mM	97%	98%	97%

**Fig. 2.** Test TTC di vitalità su cellule di *A.thaliana* sottoposta a stress con NaCl.

### 2.6.3. Preparazione di linee cellulari silenti

In Figura 3 è rappresentato il costrutto genico per i tre amiRNA H1.1; H1.2; H1.3 che è stato inserito nel vettore binario pCambia 1390 in presenza di un promotore e di un enhancer 35S (derivanti dal vettore binario pFF19G), al fine di creare linee transgeniche di *Arabidopsis*, silenti per tutte le varianti dell'istone H1. Parallelamente sono stati preparati anche i costrutti recanti l'amiRNA per silenziare una variante per volta e poter valutare, nelle linee transgeniche di *A. thaliana*, l'effetto che il

silenziamento di ogni singola variante esercita su numerosi parametri cellulari, tra cui la risposta agli stress.



**Fig. 3. Costrutto finale:**

- Inserimento del promotore CaMV 35S ed enhancer 35S dal vettore pFF19G nel vettore pCambia.
- Inserimento dei tre aMicroRNA H1.1,2,3 da TOPO vector in pCambia.

Nel prosieguo del lavoro finora condotto è prevista la trasformazione di cellule di *Arabidopsis thaliana* con i costrutti per il silenziamento parziale o completo delle varianti dell'istone H1 allo scopo di analizzare gli effetti fenotipici, metabolici, genetici ed epigenetici derivanti dal silenziamento ed ottenere ulteriori informazioni sul ruolo svolto dall'istone H1 all'interno della cellula.

---

## Conclusioni

I nostri risultati hanno, con chiarezza, messo in luce come in piante di *P.oceanica* esposte a condizioni di stress si instaurino, negli organi in attiva crescita, significativi cambiamenti nei livelli e nel pattern di metilazione del DNA nucleare, che si accompagnano ad un evidente rimodellamento della cromatina.

In particolare, attraverso l'analisi immunocitochimica basata sull'uso di un anticorpo contro la 5-metilcitosina, è stato verificato che nelle piante provenienti da praterie sottoposte a stress antropico (M4), le popolazioni cellulari meristematiche del germoglio presentano una ipermetilazione del DNA rispetto a quelle derivanti dalle praterie ben conservate (M3), quale che sia il momento stagionale analizzato. Parimenti, in tali popolazioni cellulari sono state riscontrate differenze nelle dimensioni e nella dislocazione dei cromocentri che rappresentano, nell'organizzazione nucleotipica, aree di forte addensamento dell'eterocromatina. Tale repatterning nucleare, espressione degli effetti della metilazione sul rimodellamento cromatinico, lascia pertanto intravedere l'instaurarsi in tali piante di una diversa modulazione dell'attività trascrizionale in relazione alle condizioni di stress (Kapoor *et al.*, 2005; Jerzy Paszkowski and Steven A, Whitham 2001; Morel *et al.*, 2000).

Questa relazione tra cambiamenti nel livello/stato di metilazione e condizioni di stress è ulteriormente supportata dall' analogo fenomeno osservato nelle piante di *P.oceanica* sottoposte a condizioni di stress controllato da Cd. In tali campioni si è, infatti, osservata un' ipermetilazione del DNA che è risultata aumentare in risposta sia alla crescente concentrazione di Cd usata (10µM-50µM) che alla durata del trattamento (dalle 6 ore ai 2 giorni), con un picco nel livello di metilazione dopo 2

giorni di esposizione al Cd 50µM. Anche in questo caso lo stato di ipermetilazione è accompagnato da un rimodellamento cromatinico, come evidenziato dai cambiamenti ultrastrutturali a livello del nucleo, che presentano, se confrontati al controllo, un progressivo addensamento della cromatina, con dislocazione di tali regioni eterocromatiche lungo la membrana nucleare.

Nei trattamenti estremamente prolungati (4 giorni) il livello di metilazione è risultato, invece, diminuire, indipendentemente dalla concentrazione di Cd usata. Contestualmente l'analisi ultrastrutturale ci ha permesso di osservare una netta disorganizzazione della cromatina che si presenta altamente condensata e frammentata; con estroflessioni nucleari che preludono alla formazione di micronuclei. Si riscontrano quindi, aspetti tipici dell'insorgenza a livello cellulare di fenomeni connessi con la morte cellulare programmata o apoptosi. (Banfalvi G. et al., 2005; Foitová M, Kovarik A. 2000). Tale risultato è in linea con quanto noto in letteratura sugli effetti tossici che il cadmio esercita sulle piante, inducendo apoptosi e che sono, probabilmente, innescati e regolati attraverso un meccanismo epigenetico (Gopisetty *et al.*, 2006; Foitová and Kovarik, 2000; Takiguchi *et al.*, 2003). La morte cellulare programmata implica, infatti, un attivazione/inattivazione di particolari geni. Dati sempre più numerosi in letteratura evidenziano che la metilazione del DNA è uno dei meccanismi epigenetici responsabili della regolazione di tali geni nelle cellule delle piante sottoposte a stress (Gopisetty *et al.*, 2006; Alex Boyko and Igor Kovalchuk 2008).

L'inibizione della crescita delle piante come conseguenza del trattamento con cadmio (Somashkaraiah *et al.*, 1992; Sandalio *et al.*, 2001) è mediata anche da una chiara riduzione del contenuto in clorofilla *b*. La

sintesi e la distruzione della clorofilla gioca, a sua volta, un ruolo importante nella morte cellulare programmata nelle piante e l'espressione di alcuni geni partecipanti a questo processo può essere modulata, in risposta a condizioni di stress, dalla metilazione del DNA (Banfalvi G. 2005; Zhao C.Q. 1997; Kuthanova 2004; Gichner 2004; Waalkes *et al.*, 1984). Interessantemente, anche nelle nostre piante esposte al cadmio le variazioni nel livello di metilazione si accompagnano ad una riduzione nel contenuto di clorofilla b.

Le considerazioni che i fenomeni osservati nelle piante di *P.oceanica* trattate con il cadmio siano da ricondursi ad una reale condizione di stress sono supportate dai risultati relativi ai livelli di espressione di un gene *Pomt2*, che codifica una metallotioneina (MT). Le MTs sono proteine coinvolte nella detossificazione da metalli pesanti tra cui il Cd per cui i livelli di espressione dei geni che le codificano possono essere chiari indicatori della sensibilità di un organismo nei confronti di tale metallo (Marentes E, Rauser WE 2007; Gonzalez-Mendoza D, *et al.*, 2007; Cobbett C, Goldsbrough P. 2002; Zimeri AM *et al.*, 2005). L'analisi da noi condotta ha evidenziato un "deregulation" nell'espressione del gene *Pomt2* nelle piante trattate con il cadmio, con un aumento nei livelli di espressione sia nell'apice che nelle foglie, organo chiave nell'up-take del cadmio. Nell'apice, tuttavia, tale effetto è significativamente evidente solo ad alte concentrazioni, mentre nelle foglie si è registrato un aumento lineare dell'espressione genica sia in funzione della concentrazione che e della durata del trattamento. Alla generale risposta della pianta si associa quindi una maggiore sensibilità della foglia, verosimilmente quale organo di maggiore accumulo e detossificazione del metallo stesso.

Ai cambiamenti finora descritti nei livelli di metilazione a seguito della condizione di stress sia ambientale (praterie antropizzate) che

controllato (trattamenti con cadmio) si accompagna quello nel pattern di metilazione. L'analisi MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) ha evidenziato un chiaro repatterning dello stato di metilazione stress dipendente, permettendoci di identificare alcune delle sequenze geniche target coinvolte in tale cambiamento e quindi alcuni dei geni differenzialmente modulati e regolati dalla metilazione in risposta ad uno stress.

Fra essi ricordiamo il fitocromo B, un fotorecettore, che partecipa ai meccanismi di trasduzione del segnale agendo da chinasi regolata dalla luce (Deng e Quail, 1999; Nagy e Schafer 2002). La sua modulazione via metilazione in risposta ad un impatto antropico (M4) è in accordo con risultati preliminari riguardanti la differenziale espressione in *P.oceanica* del gene PoCHL P (Geranylgeranyl reductase gene) gene coinvolto nel pathway biosintetico delle clorofilla e dei tocoferoli (Soll, 1987; Keller et al., 1998) supportando l'ipotesi che l'intensità luminosa è il principale fattore che influenza l'efficienza delle praterie nel sito M4 come conseguenza della torbidità delle acque.

Tra i geni individuati dall'analisi MSAP come differenzialmente regolato in piante di *P. oceanica* esposte a stress da cadmio, sono da includere anche geni coinvolti nei meccanismi di regolazione epigenetica. Quello su cui abbiamo rivolto la nostra attenzione è la *cromometilasi (CMT)*, gene chiave nel meccanismo di metilazione del DNA. I livelli di espressione di tale gene sono stati pertanto monitorati nelle diverse condizioni di stress cui si riferiva l'analisi MSAP. I dati ottenuti, via real-time, hanno evidenziato come questo gene sia modulato differenzialmente in risposta allo stress indotto. In particolare il trattamento con elevate concentrazioni di Cd è risultato indurre un aumento transiente

dell'espressione, che risulta essere più rapido nell'apice che non nelle foglie, supportando l'idea esso sia più prontamente sensibile alle condizioni di stress rispetto alle foglie.

L'aumentata espressione del gene *CMT* ad alte concentrazioni di Cd è in linea con il globale aumento di metilazione riscontrato con l'analisi immunocitochimica, così come con il cambiamento del pattern di metilazione evidenziato grazie all'analisi MSAP. Tale chiara modulazione dell'espressione del gene *CMT* risposta allo stress è, pertanto, a sostegno dell'idea, supportata dai nostri dati, che il pattern di metilazione, regolato appunto attraverso l'azione di metiltransferasi specifiche, cambi dinamicamente in seguito all'esposizione a fattori di stress. Visto il ruolo della metilazione nel rimodellamento della cromatina e nella modulazione della trascrizione, tali cambiamenti possono, a cascata, regolare simultaneamente e selettivamente l'espressione di molti geni coinvolti nella tolleranza e nell'adattamento a vari fattori di stress (Steward *et al.*, 2002; Fojtova *et al.*, 2003; Labra *et al.*, 2004).

In tale contesto è da rimarcare che tra i meccanismi di regolazione epigenetica dell'attività trascrizionale di una cellula, accanto alla metilazione, un ruolo fondamentale è svolto dal codice istonico, soprattutto attraverso meccanismi di modificazione post-traduzionale delle diverse frazioni istoniche, ed in particolare dall'istone H1 (Fan *et al.*, 2005; Hizume *et al.*, 2005). Il lavoro da noi condotto sul ruolo degli istoni in risposta allo stress, portato avanti utilizzando il sistema modello *A.thaliana*, ci ha permesso di separare in maniera altamente selettiva le diverse varianti proteiche dell'istone H1, su cui è stata verificata l'instaurarsi di significative modificazioni in relazione alle condizioni di stress.

L'approfondimento delle risposte inerenti il silenziamento di linee cellulari con specifiche varianti dell'istone H1, ci fornirà ulteriori informazioni sul ruolo che tale istone riveste nel contesto della vitalità cellulare, così come del rimodellamento cromatinico e della risposta allo stress.

Di conseguenza possiamo concludere affermando che sia i cambiamenti nel pattern di metilazione, in particolare di specifici geni, che le modificazioni istoniche giocano un ruolo importante nei meccanismi di risposta delle piante allo stress, candidandosi come importanti marcatori di alterate condizioni ambientali.

Come prospettiva futura, ci proponiamo di ampliare l'identificazione di ulteriori marcatori attraverso lo studio di altri geni risultati essere, attraverso l'analisi MSAP, differenzialmente regolati dalla metilazione in conseguenza dello stress abiotico indotto.

Parimenti ci proponiamo, in fine, il trasferimento delle conoscenze e tecniche maturate nello studio dell'istone linker H1 in *A.thaliana*, ad un organismo come *P.oceanica* al fine di ampliare lo studio delle interazioni tra modificazioni epigenetiche e adattamento a specifiche condizioni ambientali.

---

## BIBLIOGRAFIA

- Aalfs JD, Kingston RE (2000).** What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem. Sci.* **25**:548–55
- Adams, R.L.P., Burdon, R.H., 1985.** Molecular Biology of Methylation. Springer-Verlag, New York.
- Ahmad K, Henikoff S (2002).** The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* **9**:1191–200
- Albergoni, FG, Basso B. and Tedesco G (1978).** On the anatomy of *Posidonia oceanica* (Zosteraceae). *Plant Sys. Evol.* **130**:191-201
- Alcoverro T, Cerbi E, Ballesteros E. (2001).** The photosynthetic capacity of the seagrass *Posidonia oceanica*: influence of nitrogen and light. *J Exp Mar Bio Ecol.* **261**:107-120.
- Alina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra M, Ghiani A, Citterio S. (2004).** Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plant* **121**:472–480
- Ancora, S., Bianchi, N., Butini, A., Buia, M. C., Gambi, M. C., and Leonzio, C. (2004).** *Posidonia oceanica* as a biomonitor of trace elements in the Gulf of Naples: temporal trends by lepidochronology. *Environ Toxicol Chem* **23**, 1093-1099.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. (2005).** Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and mate fertility. *Science* **308**:1466–1469
- Ascenzi Robert and J. Stephen Gantt (1997).** A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Molecular Biology* **34**: 629–641, 629
- Ascenzi Robert and J. Stephen Gantt (1999).** Molecular genetic analysis of the drought-inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana* *Plant Molecular Biology* **41**: 159–169.
- Ballestar, E., Wolffe, A.P., (2001).** Methyl-CpG-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1–6.
- Banfalvi Gaspar, Kinga Ujvarosi, Gyorgy Trencsenyi, Csilla Somogyi, Gabor Nagy, Alexei Basnakian (2007).** Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. *Apoptosis* **12**:1219–1228
- Banfalvi G, Gacsi M, Nagy G, Kiss ZB, Basnakian AG (2005).** Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells. *Apoptosis* **10**: 631–642
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001).** Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120–124.
- Barra, J.L., Rhounim, L., Rossignol, J.L., and Faugeron, G. (2000).** Histone H1 is dispensable for methylation-associated gene silencing in *Ascobolus immersus* and essential for long life span. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 61–69.

- 
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. (2004).** Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* **427**:164–67
- Baszynski T, Wajda L, Król M, Wolińska D, Krupa Z, Tukendorf A (1980).** Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant.* **48**: 365–370.
- Boudouresque C.F., Jedy De Grissac A. e Meinesz A., (1985a).** - Un nouveau type d'herbier à *Posidonia oceanica*: l'herbier de colline. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **29**: 173-175.
- Berger Shelley L. (2002).** Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**:142–148
- Berger F, Gaudin V. (2003).** Chromatin dynamics and Arabidopsis development. *Chromosome Res.* **11**:277–304
- Bertin G., Averbeck D. (2006).** Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) *Biochimie* **88**: 1549–1559
- Bertrand C, Bergounioux C, Domenichini S, Delarue M, Zhou DX. (2003).** Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J. Biol. Chem.* **278**:28246–51
- Bestor, T.H. (2000).** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2395–2402.
- Biagioli Marta, Simone Pifferi, Matilde Ragghianti, Stefania Bucci, Rosario Rizzuto, Paolo Pinton. (2008).** Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. *Cell Calcium* **43**:184–195
- Bouvet P, Dimitrov S, Wolffe AP (1994).** Specific regulation of *Xenopus* chromosomal 5S rRNA gene transcription in vivo by histone H1. *Genes Dev* **8**:1147–1159
- Caye G., Meinesz A., (1992).** Analyse des modalités de la multiplication végétative et de la reproduction sexuée de *Posidonia oceanica* et de ses conséquences sur la constitution génétique des herbiers. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* **33**: 32.
- Cao X., Aufsatz, W., Zilberman D., Mette M. F., Huang M. S., Matzke M., and Jacobsen S. E. (2003).** Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* **13**: 2212-2217.
- Cao Xiaofeng and Steven E. Jacobsen. (2002).** Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *PNAS* **99**: 16491–16498
- Catez, F., Ueda, T., and Bustin, M. (2006).** Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 305–310.
- Chakravarty B, Srivastava S. (1992).** Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. *Mutat Res.* **283**:287-94.
- Chanvittana Y, Bishopp A, Schubert D, Stock C, Moon YH. (2004).** Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. *Development* **131**:5263–76
- Chen ZJ, Tian L. (2007).** Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochim Biophys Acta.* **1769**: 295-307.

---

**Contreras Alejandro, Tracy K. Hale, David L. Stenoien, Jeffrey M. Rosen, Michael A. Mancini, and Rafael E. Herrera. (2003).** The Dynamic Mobility of Histone H1 Is Regulated by Cyclin/CDK Phosphorylation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* **23**: 8626–8636

**Choi CS, Sano H. (2007).** Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*. **277**: 589-600.

**Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, et al. (2002).** DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* **110**: 33–42

**Cobbett C, Goldsbrough P. (2002).** Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*. **53**: 159-82.

**Corona DF, Siriaco G, Armstrong JA, Snarskaya N, McClymont SA, Scott MP, Tamkun JW. (2007).** ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly in vivo. *PLoS Biol*. Sep **5**: 232.

**Cosgrove Michael S. and Cynthia Wolberger (2005).** How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol*. **83**: 468–476

**Cunliffe VT. (2003).** Memory by modification: the influence of chromatin structure on gene expression during vertebrate development. *Gene* **305**:141–50

**Dang W, Bartholomew B. (2007).** Domain architecture of the catalytic subunit in the ISW2-nucleosome complex. *Mol Cell Biol*. **27**:8306-17.

**Deckert Joanna.(2005).** Cadmium toxicity in plants:Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *BioMetals* **18**:475-481

**Delperee Christine and Stanley Lutts (2008).** Growth Inhibition Occurs Independently of Cell Mortality in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Exposed to High Cadmium Concentrations. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 300–310

**DEMEULEMEESTER M.A.C., VAN STALLEN N., DE PROFT M.P., (1999) - Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus L.*): influence of plant age and vernalization.** *Plant Science*. **142**: 101-108

**Dennis, E. S., Bilodeau, P., Burn, J., Finnegan, E. J., Genger, R., Helliwell, C., Kang, B. J., Sheldon, C. C., and Peacock, W. J. (1998).** Methylation controls the low temperature induction of flowering in Arabidopsis. *Symp Soc Exp Biol* **51**, 97-103.

**Den Hartog C (1970).** The seagrasses of the world. North Holland, Amsterdam

**Deuring R, Fanti L, Armstrong JA, Sarte M, Papoulas O., (2000).** The ISWI chromatinremodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol. Cell* **5**:355–65

**Doyle JJ, Doyle JL (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**: 11–15

---

**Downs, J.A., Kosmidou, E., Morgan, A., and Jackson, S.P. (2003).** Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol. Cell* **11**: 1685–1692.

**Duarte, C.M. (1991).** Seagrass depth limits. *Aquatic Bot.* **40**:363-377

**Edwards Thea M. and John Peterson Myers. (2007).** Environmental Exposures and Gene Regulation in Disease Etiology. *Environmental Health Perspectives*. VOLUME 115 | NUMBER 9 | September

**Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E.M., Zhao, J., Magnuson, T.R., Woodcock, C.L., and Skoultchi, A.I. (2003).** H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 4559–4572.

**Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C.L., and Skoultchi, A.I. (2005).** Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* **123**: 1199–1212.

**Farrona S, Hurtado L, Bowman JL, Reyes JC. (2004).** The Arabidopsis thaliana SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development* **131**:4965–75

**Ferrat L., Gnassia-Barelli M., Pergent-Martini C., Romeo M. (2003).** Mercury and non-protein thiol compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **134**: 147-155.

**Finnegan, E. J., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1996).** Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8449-8454.

**Finnegan, E. J., Genger, R. K., Kovac, K., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1998a).** DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5824-5829.

**Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1998b).** DNA Methylation in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**:223-247.

**Finnegan, E. J., and Kovac, K. A., (2000).** Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* **43**: 189-201.

**Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. (2000).** DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**:217–23

**Foitová M, Kovarik A. (2000).** Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant Cell Environ* **23**: 531-537.

**Fry CJ, Peterson CL. (2001).** Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol*. Mar **11**:185-97.

**Fuchs Jorg, Dmitri Demidov, Andreas Houben and Ingo Schubert. (2006).** Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *TRENDS in Plant Science* Vol.11 No.4 April

**Gajiwala KS, Chen H, Cornille F, Roques BP, Reith W, Mach B, Burley SK. (2000).** Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature.* **403**:916-21.

- 
- Gavin I, Horn PJ, Peterson CL. (2001).** SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology..*Mol Cell.* **7**: 97-104.
- Giordani Tommaso, Lucia Natali, Bianca Elena Maserti, Sonia Taddei, and Andrea Cavallini. (2000).** Characterization and Expression of DNA Sequences Encoding Putative Type-II Metallothioneins in the Seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant Physiology* **123** : 1571–1581
- Giraud, G. (1977).** Contribution à la description et à la phenologie quantitative des herbiers de *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Thèse Doct. Spécialité Océanol. Univ. Aix-Marseille II, 1-150
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K. (2002).** ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* **111**, 803–814.
- Gonzalez-Mendoza D, Moreno AQ, Zapata-Perez O. (2007).** Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquat Toxicol.* **83**:306-14.
- Grant Patrick. (2001)** . A tale of histone modifications. *Genome Biology* **2**: 0003.1–0003.6
- Grewal SI, Moazed D. (2003).** Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* **301**:798–802
- Guidetti, P. (2001).** Detecting environmental impacts on the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: the use of reconstructive methods in combination with 'beyond BACI' designs. *260*: 27-39.
- Habu Yoshiki, Tetsuji Kakutani and Jerzy Paszkowski.(2001).** Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**:215–220
- HAIG D. (2004).** The (Dual) Origin of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LXIX.
- Hall JA, Georgel PT. (2007).** CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol.* **85**:463-76.
- Hansen JC, Tse C, Wolffe AP. (1998).** Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry.* **37**:17637-41
- Harvey Anne and Jessica Downs. (2004).** What functions do linker histones provide? *Molecular Microbiology* **53**: 771–775
- Hellauer, K., Sirard, E., and Turcotte, B. (2001).** Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1. *J. Biol. Chem.* **276**: 13587–13592.
- Henzel, M.J., Lever, M.A., Crawford, E. & Th'ng, J.P. (2004).** The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **279**: 20028–20034
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K. (2004).** Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.* **20**:320–26

- 
- Henikoff Steven and Luca Comai. (1998).** A DNA Methyltransferase Homolog With a Chromodomain Exists in Multiple Polymorphic Forms in Arabidopsis. *Genetics* **149**: 307–318
- Hizume Kohji, Shige H. Yoshimura, and Kunio Takeyasu. (2005).** Linker Histone H1 Can Induce Three-Dimensional Folding of Chromatin Fiber. *Biochemistry*, **44**, 12978–12989
- Hollender C, Liu Z. (2008)** Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. *J Integr Plant Biol.* **50**:875–85.
- Horn PJ, Peterson CL. (2001)** The bromodomain: a regulator of ATP-dependent chromatin remodeling? *Front Biosci.* **6**:1019–23.
- Horvath G, Droppa M, Oravecz A, Raskin V, Malder J (1996).** Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmiumpoisoned barley leaves. *Planta* **199**: 238–243.
- Hsieh TF, E Fischer R. (2005).** Biology of chromatin dynamics. *Annu.Rev.Plant Biol.* **56**:327–351
- Iizuka M, Smith MM. (2003).** Functional consequences of histone modifications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**:154–60
- Ito T, Bulger M, Pazin MJ, Kobayashi R, Kadonaga JT. (1997).** ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* **90**:145–55
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen S. (2002).** Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**:556–60
- Jasencakova1Zuzana, Wim J. J. Soppe1,y, Armin Meister1, Dorota Gernand1, Bryan M. Turner and Ingo Schubert. (2003).** Histone modifications in Arabidopsis – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *The Plant Journal* **33**: 471–480
- Jeddeloh JA, Bender J, Richards EJ. (1998).** The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* **12**:1714–25
- Jenuwein Thomas and C. David Allis. (2001).**Translating the Histone Code. VOL 293 SCIENCE
- Jerzmanowski Andrzej. (2007).** SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* xx (2007) xxx–xxx
- Johnson Li anna M.,Magnolia Bostick, Xiaoyu Zhang, Edward Kraft, Ian Henderson, Judy Callis and Steven E. Jacobsen. (2007).** The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone Methylation. *Curr Biol.* **17**: 379–384.
- Kanno T, Mette MF, Kreil DP, Aufsatz W, Matzke M, Matzke AJ. (2004).** Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr. Biol.* **14**:801–5
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L. and Richards, E.J. (2003)** Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* **163**, 1109–1122.
- Kargul J, Laurent GJ. (2008).**Epigenetics and human disease.The International Journal of Biochemistry & Cell Biology xxx: xxx–xxx

- 
- Kasinsky, H.E., Lewis, J.D., Dacks, J.B. & Ausio, J. (2001).** Origin of H1 linker histones. *FASEB J.* **15**: 34–42.
- Kapoor Avnish, Fernanda Agius, Jian-Kang Zhu (2005).** Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Letters* **579**: 5889–5898
- Katz A, Oliva M, Mosquna A, Hakim O, Ohad N. (2004).** FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J.* **37**:707–19
- Keller, Y., Bouvier, F., D’Harlingue, A. Ad camara, B. (1998).**Metabolic compartmentation of plastid prenyl lipid biosynthesis : evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur.J.Biochem.* **251**:413-417.
- Klaassen, C. D., Liu, J., and Choudhuri, S. (1999).** Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol.Toxicol.* **39**: 267–294.
- Kingston, R.E., Narlikar, G.J., (1999).** ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**: 2339–2352.
- Knizewski L, Ginalski K, Jerzmanowski A. (2008).** Snf2 proteins in plants: gene silencing and beyond. *Trends Plant Sci.* **13**:557-65.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A.I., (2003).** Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* **114**: 673–688.
- Kovarik, A., Koukalova, B., Fajkus, J.,Siroky,J. (1997).** Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS.* **414**: 289-92
- Kuo MH, Allis CD. (1998).** Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**: 615-626.
- Labra, M., Grassi, F., Imazio, S., Di Fabio, T., Citterio, S., Sgorbati, S., and Agradi, E. (2004).** Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere.* **54**: 1049-1058.
- Labra M, Vannini C, Sale F, Bracale M. (2002).** Methylation change in specific sequences in response to water deficit. *Plant Biosistem* **136**: 202
- Les,D.H., Cleland, M.A. and Waycott, M.(1997).** Phylogenetic studies in Alismatidae, II: evolution of marine Angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Sys.Bot.* **22**:443-463.
- Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, Gendall AR, Dean C. (2002).** Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* **297**:243–46
- Lindroth,A.M., Cao,X., Jackson,J.P., Zilberman,D., McCallum, C.M.,Henikoff,S. and Jacobsen,S.E. (2001)** Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**: 2077±2080.
- Liu, H., Liao, B.,Lu S.(2004).** Toxicity of surfactant, acid rain and cadmium combined pollution to the nucleus of *Vicia faba* root tip cells. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* **15**: 493-6

- 
- LIU DONGHUA and INGRID KOTTKE. (2004).** Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *J. Biosci.* **3**: 329–335
- Liu D H, Jiang W S and Li M X .(1992).** Effects of Cd<sup>2+</sup> on root growth and cell division of *Allium cepa*; *Acta Sci. Circumstantiae* **12**: 439–446
- Liu Wan, Y.S. Yang, P.J. Li , Q.X. Zhou, L.J. Xie, Y.P. Han (2008).** Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *Journal of Hazardous Materials* xxx: xxx–xxx
- Loidl Peter (2004).** A plant dialect of the histone language. *TRENDS in Plant Science* Vol.9 No.2 February
- Loyola Alejandra and Genevieve Almouzni (2004).** Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code. *TRENDS in Cell Biology* Vol.14 No.6 June
- Lorenti, M., Mazzella,L. and Buia M.C. (1995).** Light limitation of *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves growth at different depths. *Rapports Commission International Mer Mediterranee* 34,34
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999).** Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods Enzymol.* **304**: 3–19.
- Lusser Alexandra (2002).** Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 5:437–443
- Lutz T, Stöger R, Nieto A. (2006).** CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett.* Oct 30;580(25):5851-7. Epub 2006 Oct 2.
- Marentes E, Rauser WE. (2007).** Different proportions of cadmium occur as Cd-binding phytochelatin complexes in plants. *Physiol Plant.* **131**:291-301.
- Margueron Raphael, Patrick Trojer and Danny Reinberg. (2005).** The key to development: interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics & Development*, **15**:163–176
- Masayoshi Iizuka and M Mitchell Smith. (2003).** Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**:154–160
- Micheli C, Paganin P, Peirano A, Caye G, Meinesz A, Bianchi CN (2005).** Genetic variability of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in relation to local factors and biogeographic patterns. *Aquat Bot* 82:210–221
- Mitsuyoshi Nakao (2001).** Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* **278**:25–31
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I (2001).** Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**: 110–113.
- Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J, McLachlan JA. (1998).** Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* **19**:1655–1663.

---

**Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J, McLachlan JA. (2000).** Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* **21**:1355–1363.

**Ng, H.H., Bird, A., (1999).** DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 158–163.

**Nightingale Karl P, Laura P O'Neill and Bryan M Turner (2006).** Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Current Opinion in Genetics & Development*, **16**:125–136

**Ogryzko VV. (2001).** Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell. Mol.Life Sci.* 683–92

**Ott,J.A. (1980).** Growth and production in *Posidonia oceanica* (L.) Delile.*Mar.Ecol.***1**: 4-64.

**Papa Charles M.,Nathan M. Springer,Michael G. Muszynski,Robert Meeley, and Shawn M. Kaeppler . (2001).** Maize Chromomethylase *Zea methyltransferase2* Is Required for CpNpG Methylation. *The Plant Cell*, **13**, 1919–1928

**Podestà A, Ruffini-Castiglione M, Avanzi S, Montagnoli G (1993).** Molecular geometry of antigen binding by a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Int J Biochem* **25**: 929± 933

**Prymakowska-Bosak M, Przewloka MR, Slusarczyk J, Kuras M, Lichota J, Kiliarczyk B, Jerzmanowski A (1999).** Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *Plant Cell* **11**:2317–2329

**Prymakowska-Bozak, M., Przewloka, M.R., Iwkiewicz, J., Egierszдорff, S., Kuras, M., Chaubet, C., Gigot, C., Spiker, S. and Jerzmanowski, A. (1996).** Histone H1 overexpressed to high level in tobacco affects certain developmental programs but has limited effect on basal cellular functions. *Proc. Natl. Acad Sci.USA* **93**: 10250–10255.

**Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S., (2004).** Arabidopsis histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* **16**:1021–34

**Ramon A, Muro-Pastor MI, Scazzocchio C, Gonzalez R (2000).** Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **35**:223–233

**Ruden DM, Xiao L, Garfinkel MD, Lu X. (2005).** HSP90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the transgenerational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer. *Hum Mol Genet* **14**:149–R155.

**Ruf M, Brunner I. (2003).** Vitality of tree fine roots: reevaluation of the tetrazolium test.*Tree Physiol.* **23**:257-63.

**Sanit`a di Toppi L, Gabbrielli R (1999).** Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**: 105–130.

**Santisteban MS, Kalashnikova T, Smith MM. (2000).** Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* **103**: 411–22

- 
- Scippa S, Griffiths AI, Chiatante D, Bray E A.(2000).** The H1 histone variant of tomato, H1-S, is targeted to the nucleus and accumulates in chromatin in response to water-deficit stress. *Planta* **211**: 173±181
- Shen X, Yu L, Weir JW, Gorovsky MA (1995).** Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell* **82**:47–56
- Sirchia Rosalia, Alessandra Longo, Claudio Luparello. (2008).** Cadmium regulation of apoptotic and stress response genes in tumoral and immortalized epithelial cells of the human breast. *Biochimie* **90**:1578, 1590
- Smith MM. (2002).** Histone variants and nucleosome deposition pathways. *Mol. Cell* **9**:1158–60
- Soll, J., Schulz, G., Rudiger,W., Benz, J. (1983).** Hydrogenation of geranylgeraniol:two pathways exist in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **71**: 849-854.
- Somashekaraiah B, Padmaja K, Prasad A (1992).** Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* **85**: 85–89.
- Steward, N. Mikako, Ito.Yube Yamaguchi (2002).** Periodic DNA methylation in Maise Nucleosomes and demethylation by environmental stress.The Journal of Biological chemistry vol 277,N°40.1(issue of October 4)
- Stobart A, Griffiths W, Ameen-Bukhari I, Sherwood R (1985).** The effects of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* **63**: 293–298.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., (2000).** The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–45.
- Sung S, Amasino RM. (2004).** Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:4–10
- Tariq, M. Paszkowski, J. (2004).** DNA and histone methylation in plant. *Trends Genet.* **20**: 244-51
- Tian L,Wang J, Fong MP, Chen M, Cao H, et al. (2003).** Genetic control of developmental changes induced by disruption of Arabidopsis histone deacetylase 1 (AtHD1) expression. *Genetics* **165**:399–409
- Tomaszewski R, Mogielnicka E, Jerzmanowski A (1998).** Both the 5S rRNA gene and the AT-rich flanks of *Xenopus laevis* oocyte type 5S rDNA repeat are required for histone H1-dependent repression of transcription of polIII-type genes in in vitro reconstituted chromatin. *Nucleic Acids Res* **26**:5596–5601
- Turner, B.M. (2000).** Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**: 836–845.
- Turusov VS, Trukhanova LS, Parfenov YD, Tomatis L. (1992).**Occurrence of tumors in the descendants of CBA male mice prenatally treated with diethylstilbestrol. *Int J Cancer* **50**:131–135.
- Van Attikum Haico and Susan M. Gasser. (2005).**THE HISTONE CODE AT DNA BREAKS: A GUIDE TO REPAIR? *NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY VOLUME 6 | OCTOBER | 757*
- Vos, P.Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper, M. and Zabeau, M .(1995).** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**: 4407–4414.

- 
- Zhang, Y. Yang, X. (1994).** The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutat Res.* **312**:121-6
- Zhang Y., Xiao Y.M., (1998).** Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against Cd induced chromosomal aberration and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*, *Mutat. Res.* 4201–6.
- Zhou YB, Gerchman SE, Ramakrishnan V, Travers A, Muyldermans S., (1998).** Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* **395**:402-405.
- Zimeri AM, Dhankher OP, McCaig B, Meagher RB. (2005).** The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol.* **58**:839-55.
- Walker BE, Haven MI. (1997).** Intensity of multigenerational carcinogenesis from diethylstilbestrol in mice. *Carcinogenesis* **18**:791–793.
- Wei T, O'Connell MA. (1996).** Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene. *Plant Mol Biol.* **30**:255-68.
- Wierzbicki, A.T. & Jerzmanowski, A. (2004).** Suppression of histone H1 genes in *Arabidopsis* results in heritable developmental defects and stochastic changes in DNA methylation. *Genetics* **169**: 997–1008
- Wolffe, A.P., Matzke, M.A (1999).** Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**:481–486.
- Wolffe, A.P. (1997).** Histone H1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 1463–1466.
- Woodcock Christopher L. Arthur Skoultchi & Yuhong Fan. (2006).** Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Research* **14**:17–25
- Workman, J.L., Kingston, R.E., (1998).** Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 545–579.
- Wu MT, Wallner SJ. (1983).** Heat Stress Responses in Cultured Plant Cells : Development and Comparison of Viability Tests. *Plant Physiol.* **72**: 817-820.
- Xu Mingliang, Xiangqian Li, and Schuyler S. Korban (2000).** AFLP-Based Detection of DNA Methylation. *Plant molecular Biology Reporter* **18**:361-368

---

---

## Partecipazione a Congressi e Pubblicazioni

[Greco M.](#), [Chiappetta A. A. C.](#), [Bruno L.](#), [Giannino D.](#), [Bitonti M. B. A.](#), "[DNA methylation pattern and stress condition: study in Posidonia oceanica \(L.\) Delile plants derived from different stressed condition and intact areas](#)". Atti del convegno "European Plant Science Organisation 3rd EPSO Conference "Plant Dynamics: from Molecules to Ecosystems"", Visegrad-Hungary, 2006, 2006, pp.

[Greco M.](#), [Chiappetta A. A. C.](#), [Giannino D.](#), [Bitonti M. B. A.](#), "[DISTINCT PATTERNS OF DNA METHYLATION CHARACTERIZE POPULATION OF POSIDONIA OCEANICA \(L.\) DELILE DERIVED FROM ANTHROPOLOGICALLY STRESSED AND INTACT AREAS](#)". Atti del convegno "ATTI DEL CONVEGNO XVII INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS", VIENNA (AUSTRIA), 17/23, 07, 2005, 2005.

[Greco M.](#), [Chiappetta A. A. C.](#), [Giannino D.](#), [Bitonti M. B. A.](#), "[RELATIONSHIP BETWEEN DNA METHYLATION PATTERN AND STRESS CONDITION IN PLANTS OF POSIDONIA OCEANICA \(L.\) DELILE](#)". Atti del convegno "XLIX ANNUALE CONGRESSO SOCIETA' GENETICA AGRARIA", POTENZA, 12/15, SETTEMBRE 2005, 2005, 2005.

[Pangaro T.](#), [Greco M.](#), [Cozza R.](#), [Chiappetta A. A. C.](#), [Bitonti M. B. A.](#), "[Meccanismi di risposta allo stress in P. oceanica: espressione di geni specifici e pattern di metilazione](#)". Contributo a 100° Congresso Società Botanica Italiana, Roma, 20-23 settembre 2005.

[Bruno A.](#), [Bruno L.](#), [Greco M.](#), [Chiappetta A. A. C.](#), [Bitonti M. B. A.](#), "[Expression pattern of a chlorophyll biosynthesis gene in plants of Posidonia oceanica from intact and stressed meadows](#)". Atti del convegno ""VII CONGRESSO NAZIONALE FISV"", RIVA DEL GARDA, 22/25 Settembre, 2005, 2005, pp. D10.1-

[Chiappetta A. A. C.](#), [Greco M.](#), [Bitonti M. B. A.](#), "[ASPETTI CITO-FISIOLOGICI DEL SEME DI POSIDONIA OCEANICA \(L.\) DELILE](#)". Atti del convegno "36° CONGRESSO NAZIONALE SOCIETA' ITALIANA DI BIOLOGIA MARINA", TRIESTE, 09/13 MAGGIO, 2005, 2005.

---

[Greco M., Chiappetta A., Bruno L., Bitonti M.B. “Ruolo modulatore della metilazione del DNA in risposta a condizioni di stress nella pianta acquatica \*Posidonia oceanica\* \(L.\) Delile. “ Atti del convegno “103° Congresso della Società Botanica Italiana 17-19 Settembre 2008 Reggio Calabria –Italia. ”](#)

[Bruno A., Bruno L., Giannino D., Greco M., Chiappetta A. A. C., Bitonti M. B. A., " Expression pattern of CHL P gene as a putative marker of lighth stress conditions in \*Posidonia oceanica\* \(L.\) Delile.".](#) Contributo a Mediterranean Seagrass Workshop, Malta, 29th May – 3rd June 2006.

[Greco M., Chiappetta A. A. C., Bruno L., Giannino D., Bitonti M. B. A., " DNA methylation pattern in plants \*Posidonia oceanica\* \(L.\) Delile derive from anthropically stressed and intact areas.".](#) Contributo a Mediterranean Seagrass Workshop, Malta,, 29th May – 3rd June 2006.