

PREMIO TESI DI DOTTORATO

- 28 -

PREMIO TESI DI DOTTORATO
Commissione giudicatrice, anno 2011

Luigi Lotti, *Facoltà di Scienze Politiche* (Presidente della Commissione)

Tito Arcchi, *Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali*

Paolo Felli, *Facoltà di Architettura*

Michele Arcangelo Feo, *Facoltà di Lettere e Filosofia*

Roberto Genesio, *Facoltà di Ingegneria*

Mario Pio Marzocchi, *Facoltà di Farmacia*

Salvo Mastellone, *Facoltà di Scienze della Formazione*

Luciano Mecacci, *Facoltà di Psicologia*

Adolfo Pazzagli, *Facoltà di Medicina e Chirurgia*

Mario Giuseppe Rossi, *Facoltà di Lettere e Filosofia*

Salvatore Ruggieri, *Facoltà di Medicina e Chirurgia*

Piero Tani, *Facoltà di Economia*

Franco Scaramuzzi, *Facoltà di Agraria*

Fiorenzo Cesare Ugolini, *Facoltà di Agraria*

Vincenzo Varano, *Facoltà di Giurisprudenza*

Susanna Pollastri

**Il ruolo di TAF12B e UVR3
nel ciclo circadiano dei vegetali**

Firenze University Press
2012

Il ruolo di TAF12B e UVR3 nel ciclo circadiano dei
vegetali / Susanna Pollastri. – Firenze : Firenze University
Press, 2012.
(Premio Tesi di Dottorato ; 28)

<http://digital.casalini.it/9788866552239>

ISBN 978-88-6655-222-2 (print)
ISBN 978-88-6655-223-9 (online)

Progetto grafico di copertina Alberto Pizarro Fernández, Pagina Maestra snc

Certificazione scientifica delle Opere

Tutti i volumi pubblicati sono soggetti ad un processo di referaggio esterno di cui sono responsabili il Consiglio editoriale della FUP e i Consigli scientifici delle singole collane. Le opere pubblicate nel catalogo della FUP sono valutate e approvate dal Consiglio editoriale della casa editrice. Per una descrizione più analitica del processo di referaggio si rimanda ai documenti ufficiali pubblicati sul sito-catalogo della casa editrice (<http://www.fupress.com>).

Consiglio editoriale Firenze University Press

G. Nigro (Coordinatore), M.T. Bartoli, M. Boddi, F. Cambi, R. Casalbuoni, C. Ciappei, R. Del Punta, A. Dolfi, V. Fargion, S. Ferrone, M. Garzaniti, P. Guarnieri, G. Mari, M. Marini, M. Verga, A. Zorzi.

© 2012 Firenze University Press
Università degli Studi di Firenze
Firenze University Press
Borgo Albizi, 28, 50122 Firenze, Italy
<http://www.fupress.com/>
Printed in Italy

Alla mia famiglia

Sommario

Lista delle abbreviazioni

Capitolo 1

Introduzione

1. I ritmi circadiani	1
2. Allineamento dei ritmi interni ed esterni nello sviluppo di <i>Arabidopsis</i>	2
3. Le proprietà dell'orologio circadiano	3
4. Il motivo della presenza dell'orologio	5
5. L'architettura dell'orologio	5
6. Il nucleo oscillatore	6
7. Basi molecolari della regolazione dei geni orologio	8
8. Componenti aggiuntivi del sistema circadiano	8
9. Studio dei ritmi circadiani in <i>Arabidopsis</i>	10
10. Obiettivi della ricerca	11

Capitolo 2

Materiali e metodi

1. Materiali	13
2. Metodi	14

Capitolo 3

Risultati

1. Identificazione omologo di CLOCK, <i>Homo sapiens</i> , in <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2. Identificazione omologo di CRYPTOCHROMO 1, <i>Homo sapiens</i> , in <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3. Analisi dell'espressione genica	36

Capitolo 4**Discussione**

1. TAF12B	43
2. UVR3	44
3. Conclusioni	46

Appendice	47
------------------	----

Bibliografia	59
---------------------	----

Ringraziamenti	66
-----------------------	----

Lista delle abbreviazioni

ATH1	Affymetrix ATH1® Arabidopsis Genome Array
bp	base pair
CAB	CHLOROPHYLL A/B BINDING
CAT3	CATALASE3
CBS	CCA1 Binding Site
CCA1	CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1
CCR2	COLD AND CIRCADIAN REGULATED2
CCT	CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TOC1
CDF1	CYCLING DOF FACTOR1
cDNA	complementary DNA
CKII	CASEIN KINASE II
CLK	CLOCK
CO	CONSTANS
Col (0)	COLUMBIA 0
COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1
CRY	CRYPTOCHROME
CT	Circadian Time
DD	Continuous darkness
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dNTPs	deoxyriboNucleotideTriPhosphates
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EFL	EARLY FLOWERING
EE	Evening Element
EPR1	EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1
FHY3	FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3
FKF1	FLAVIN BINDING KELCH-REPEAT F-BOX1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
GI	GIGANTEA
GFP	Green Fluorescent Protein
LB	Luria Bertani
LD	Long Day
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LKP2	LOV KELCH PROTEIN2
LL	Continuous light (red and blue light)
LOV	LIGHT OXYGEN VOLTAGE
LUX	LUX ARRHYTHMO
ME	Morning Element
NLS	Nuclear Localization signal

O.D.	Optical Density
PAS	PER ARNT SIM
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHOT	PHOTOTROPIN
PHY	PHYTOCHROME
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIL	PIF-LIKE
POLI-Q	Poli-glutammine
PRC	Phase-Response Curve
PRR	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR
RNA	RIBONUCLEIC ACID
SD	Short Day
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TAF12B	TBP-ASSOCIATED FACTOR 12B
TEMED	TEtraMethylEthyleneDiamine
TFBI	TransFormation Buffer I
TFBII	TransFormation Buffer II
TIC	TIME FOR COFFEE
TOC1	TIMING OF CAB EXPRESSION1
UVR3	UV REPAIR DEFECTIVE 3
WT	Wild Type
YFP	Yellow Fluorescent Protein
YT	Yeast extract Tryptone
ZT	<i>Zeitgeber</i> time
ZTL	ZEITLUPE

Capitolo 1

Introduzione

1. I ritmi circadiani

Molti aspetti del comportamento e della fisiologia delle piante e degli animali hanno un andamento ritmico nel corso dell'intera giornata. Alcune di queste oscillazioni avvengono solamente in risposta a fattori ambientali, come i cicli di luce/buio, ma una parte di queste persistono in condizioni costanti. I ritmi costanti con una periodicità corrispondente a quella della rotazione della terra intorno al proprio asse (circa 24 ore) sono chiamati circadiani. I ritmi circadiani sono presenti dai cianobatteri, ai mammiferi fino alle piante (Harmer et al., 2001, McClung et al., 2002). Questa caratteristica ispirò Franz Halberg nel 1959 a coniare il termine circadiano, dalle parole latine “circa” e “die”. Il cambiamento di condizioni ambientali nel corso di una giornata deriva principalmente dalla rotazione della Terra attorno al proprio asse. Inoltre, i cambiamenti ambientali avvengono con le stagioni a causa della rotazione della Terra attorno al Sole, e queste variazioni della lunghezza del giorno (fotoperiodo) sono evidenti nelle regioni a latitudine distante dall'Equatore.

L'inizio della cronobiologia risale all'antica Grecia quando Androstene descrisse che le piante di *Tamarindus indica* L. aprivano e chiudevano le loro foglie periodicamente nel corso delle 24 ore (Bretzl, 1903). Il primo esperimento condotto per testare direttamente i ritmi circadiani fu eseguito nel 1729 dal biologo francese de Mairan, il quale osservò come la *Mimosa pudica* L., manteneva il ritmo nel movimento fogliare in condizioni di buio continuo, dimostrando l'esistenza di un meccanismo interno che presiede al controllo dei ritmi circadiani (Halberg et al., 2001).

Le piante, e molti altri organismi, posseggono ritmi circadiani, i quali sono governati da un orologio interno, chiamato circadiano, cruciale per una fitness ottimale. L'orologio mantiene una stima interna del passaggio del tempo e programma che i processi fisiologici avvengano in un momento appropriato del giorno. Sono almeno tre le proprietà che definiscono l'orologio interno. La prima proprietà è la “self-sustainability”, ovvero l'orologio continua a segnare il passaggio del tempo anche in condizioni costanti (free-running). Questa continuità è peculiare, in quanto non è chiaro quale possa essere il vantaggio per la pianta che vive comunque con cicli naturali di luce/buio. Comunque in condizioni costanti, free-running, il periodo del ritmo diverge dalle 24 ore definite. Questo fatto è connesso con la seconda proprietà dell'orologio, ovvero che l'orologio è in grado di essere resettato dai cambiamenti nell'ambiente e adattarsi al fotoperiodo ambientale (‘local’ time). Per rimanere sincronizzati con l'ambiente, gli orologi circadiani sono resettati o trascinati da specifici segnali che rilasciano informazioni sull'ambiente esterno. Questi resettaggi avvengono soprattutto grazie ai cicli luce-buio, ma anche a causa del cambiamento ciclico della temperatura ambientale. Questo permette all'orologio di mantenere un'accurata relazione di fase fra fisiologia e ambiente in circostanze di cambiamenti esterni di

temperatura non prevedibili (Barak et al., 2000; Harmer et al., 2001, McClung et al., 2002; Edwards et al., 2006). Infine, il ritmo di circa 24 ore dell'orologio è robusto, l'orologio mantiene un periodo costante anche sotto differenti range di temperature, una caratteristica circadiana chiamata compensazione della temperatura. L'onnipresenza in natura dell'orologio circadiano indica il vantaggio biologico di un meccanismo interno che tiene il conto del passare del tempo. In particolare per le piante, essendo organismi immobili, l'orologio interno è importante per l'anticipazione di certe condizioni ambientali.

Molti aspetti della fisiologia delle piante mostrano un comportamento circadiano. Gli output dell'oscillatore centrale sono vie di segnale che regolano ritmicamente processi fisiologici e biochimici come la fotosintesi, il movimento fogliare, l'allungamento dell'ipocotile, l'apertura stomatica e la circumnatazione (Webb, 1998; Harmer et al., 2000; Webb, 2003; Niinuma et al., 2005). In generale, le vie di segnale attraverso le quali il nucleo oscillatore regola temporalmente la fisiologia cellulare non sono state ben descritte. I ritmi nella trascrizione sono sicuramente la parte iniziale degli output dell'oscillatore circadiano, dal momento che molti fattori di trascrizione del nucleo centrale regolano direttamente l'espressione dei componenti a valle (Harmer et al., 2000; Alabadi et al., 2001; Mizoguchi et al., 2002). L'oscillatore inoltre regola l'espressione di fattori di trascrizione chiave, che a loro volta regolano l'espressione circadiana di elementi distanti (Harmer et al., 2000; Schaffer et al., 2001; Harmer et al., 2005). Circa il 16% dei trascritti codificati nel genoma di *Arabidopsis* hanno un ritmo nell'espressione. Questo include la trascrizione di proteine coinvolte nella fioritura, sintesi dei flavonoidi, sintesi di lignina, allungamento cellulare, fissazione dell'azoto, metabolismo del carbonio, assimilazione dei minerali e fotosintesi (Harmer et al., 2000; Schaffer et al., 2001; Edwards et al., 2006). Trascritti che codificano con proteine coinvolte in pathways correlati tendono ad essere coregolati, con un picco della trascrizione che avviene in un momento preciso del ciclo luce/buio. Per esempio, trascritti che codificano componenti del complesso light-harvesting tendono ad essere co-espressi durante la prima metà della giornata, ovvero quando l'intensità della luce è maggiore. Similmente, trascritti che codificano proteine coinvolte nel trasporto auxinico e allungamento cellulare tendono ad essere espressi maggiormente nel tardo pomeriggio, in coincidenza con il tasso maggiore di allungamento cellulare (Harmer et al., 2000; Millar 2004). L'allungamento cellulare è responsabile dei ritmi sia nei movimenti fogliari (Englemann et al., 1998), sia nell'allungamento dell'ipocotile (Dowson-Day et al., 1999).

I ritmi fisiologici (outputs) provengono da ritmi originati a livello molecolare. Per esempio, questo può essere connesso con l'attività metabolica ritmica delle piante. Ogni giorno le piante devono catturare la luce di giorno e trasformarla in energia durante la notte. In accordo alle conoscenze di oggi l'orologio circadiano sembra essere costituito da una rete di fattori di trascrizione connessi in negative-feedback loops (Barak et al., 2000; Harmer et al., 2001).

2. Allineamento dei ritmi interni ed esterni nello sviluppo di *arabidopsis*

Circa cento anni fa, fu osservato che la lunghezza del fotoperiodo era in grado di influenzare il tempo di fioritura di colture come soia e tabacco. Più precisamente fu

trovato che la soia fiorisce solamente nei giorni corti e molte varietà di tabacco nei giorni lunghi (Garner et al., 1920). Questo fenomeno, chiamato fotoperiodismo, fu successivamente riscontrato per altri organismi e in molte specie il fotoperiodismo descrive il momento stagionale della riproduzione.

È stato mostrato che l'induzione a fiore nelle piante che fioriscono nei giorni brevi, è controllata dalla lunghezza del periodo di buio somministrato. Infatti la fioritura poteva essere prevenuta se durante la notte veniva dato un impulso di luce. Ulteriori esperimenti con notti più lunghe e numerosi impulsi di luce hanno portato alla conclusione che l'induzione a fiore avviene in maniera ritmica e circadiana (Hamner, 1940). Per esempio, con un ciclo triggiornaliero (8L-64B) e applicando impulsi di luce durante il periodo di buio, è stato mostrato che il tempo di fioritura della soia è controllato con intervalli ritmici di 24 ore. Durante le prime 12 ore di buio, la fioritura è stata indotta dagli impulsi di luce, nelle successive 12 ore, la fioritura è stata inibita, formando insieme una serie consecutiva di fasi di 12 ore fotofile e fotofobe (Coulter et al., 1964). Questi ritrovamenti hanno portato alla creazione di due modelli per spiegare il meccanismo del fotoperiodismo, il modello della coincidenza esterna e quello della coincidenza interna (Bunning, 1936). Il modello della coincidenza esterna dice che la fase specifica di due ritmi, uno esterno ed uno interno, deve coincidere per portare ad un'induzione, ad esempio, tempo di fioritura. Nel modello di coincidenza interna entrambi i ritmi sono interni e vengono portati nella stessa fase grazie all'induzione determinata dalla durata del giorno. Oggi, lunghe ricerche sul fotoperiodismo condotte su *Arabidopsis* (facultative long-day plant), hanno portato alla conclusione che il modello della coincidenza esterna spieghi l'induzione a fiore in questa specie; questo vale anche per molte altre specie studiate. Prove a favore del modello della coincidenza interna sono state trovate solamente negli insetti e in qualche varietà di riso, pianta a giorno breve che viene indotta da una combinazione di ritmi coincidenti interni ed esterni (coincidenza duplice) (Doi et al., 2004; Saunders, 2005).

Il tempo della fioritura è un esempio ben conosciuto degli output fisiologici del sistema circadiano. Molti altri aspetti della vita delle piante sono sotto controllo circadiano.

Questo riflette la stretta connessione fra lo sviluppo e segnali ambientali in modo da assicurare il tempo di crescita della pianta più favorevole; infatti la pianta ha la capacità di anticipare il giorno e le stagioni. Inoltre studi ecologici confermano una correlazione positiva fra le proprietà dell'orologio (periodicità corretta) e fitness della pianta (Green et al., 2002; Michael et al., 2003; Dodd et al., 2005; Johnson, 2005).

3. Le proprietà dell'orologio circadiano

I ritmi cronobiologici sono componenti biologici periodici misurati nel tempo. Il periodo di un ritmo si riferisce alla lunghezza di un ciclo (per esempio da picco a picco). L'ampiezza di un ritmo è la differenza tra la metà del valore della distanza fra il massimo e il minimo dei picchi. La fase corrisponde ad un punto specifico sulla curva e può essere traslato su un tempo soggettivo, tempo in relazione alla lunghezza del periodo. Le forme caratteristiche delle curve dei ritmi biologici facilitano l'analisi delle stesse grazie all'utilizzo di COSOPT, programma statistico che adatta i dati ad una curva matematica coseno con il metodo dei minimi quadrati.

Definizione di tempo

Sperimentalmente, la biologia circadiana viene studiata sotto condizioni costanti, perciò la durata del tempo deve essere definita in relazione al segnale esterno, ambientale, costante, assegnato. Questo segnale in genere è la luce e/o la temperatura. Collettivamente questi segnali sono chiamati “zeitgebers” (dal tedesco, datori di tempo), perché loro descrivono da quale evento l’orologio biologico misura il tempo. In generale vengono usati due termini per descrivere il tempo, tempo circadiano (CT) e tempo zeitgeber (ZT), anche se un po’ di confusione esiste nella distinzione tra CT e ZT. Le definizioni maggiormente accettate sono che CT si riferisce al tempo in relazione al periodo di lunghezza del ritmo saggiato, che è importante quando periodi di mutanti sono comparati, ad esempio la fase circadiana di un mutante a periodo breve e periodo corto può essere la stessa. ZT si riferisce al tempo in base all’ultimo segnale zeitgeber, ad esempio ZT è zero al momento che la luce viene accesa.

Entrainment

Il processo attraverso il quale l’oscillatore si sincronizza con l’ambiente viene chiamato entrainment (Barak et al., 2000). Sebbene molti segnali contribuiscano all’entrainment, la luce e la temperatura sono tipicamente i segnali di resetting più forti. L’orologio circadiano di *Arabidopsis* ha un periodo intrinseco che va dalle 22 alle 29 ore, a seconda dell’accessione di pianta e delle condizioni di allevamento (Michael et al., 2003). Di conseguenza, il meccanismo orologio viene resettato ogni alba e/o tramonto, in modo da prevenire il fatto che l’orologio si desincronizzi gradualmente con i cicli esterni di luce/buio. Resettare l’orologio coinvolge un cambiamento della fase che non altera la sequenza interna dei processi, ma riallinea la sequenza con la progressione giornaliera ambientale. Questa flessibilità dell’orologio consente all’organismo di aggiustarsi verso i cambiamenti della lunghezza del giorno e il tempo dell’alba durante i cambiamenti di stagione (Devlin et al., 2002; Millar, 2004).

Robustezza

La compensazione della temperatura è un’ulteriore caratteristica dell’orologio circadiano. Questo significa che l’orologio ha un meccanismo tampone che assicura la persistenza dei ritmi con lunghezza costante su un range di temperature. Questa caratteristica è distinta dalle reazioni biochimiche in generale. Il meccanismo che sta alla base della compensazione è poco conosciuto in pianta (Edwards et al., 2005; 2006; Gould et al., 2006).

Oscillatori periferici

Infine, non tutti i ritmi di 24 ore sono classificabili come output diretti dell’oscillatore centrale del sistema circadiano. Infatti, gli oscillatori periferici sono accoppiati all’oscillatore centrale a valle nel sistema circadiano, e questi loop secondari sono chiamati “oscillatori schiavi” (ritmi guidati). I geni del nucleo centrale controllano gli oscillatori schiavi e loro regolano delle vie di output, ma viceversa l’oscillatore schiavo non influenza i geni del cuore centrale. L’oscillatore schiavo è semplicemente ritmico per un processo successivo. È probabile che gli oscillatori schiavi siano importanti per la sostenibilità del sistema circadiano in condizioni costanti. Due oscillatori schiavi sono stati caratterizzati in pianta, ovvero COLD AND CIRCADIAN REGULATED (CCR2) e EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE (EPR1) (Heintzen et al., 1997; Kuno et al., 2003).

4. Il motivo della presenza dell'orologio

Per poter comprendere perché gli organismi abbiano un orologio circadiano, è necessario comprendere la pressione selettiva a cui sono stati sottoposti nel corso dell'evoluzione. Pittendrigh (1993) ha ipotizzato che la forza primaria che sta dietro l'evoluzione dell'orologio circadiano è il vantaggio inerente di pianificare reazioni che sono colpite negativamente dalla luce in modo da farle avvenire durante la notte. Inoltre esistono numerosi vantaggi selettivi sulla programmazione temporale.

Le anticipazioni dei cambiamenti regolari dell'ambiente diminuisce il ritardo fra il cambiamento nell'ambiente e l'appropriata alterazione della fisiologia (Ouyang et al., 1998; Johnson 2001; Dodd et al., 2005). In pianta, l'induzione della via di segnale generata da un impulso di luce prima dell'alba permette di utilizzare a pieno il periodo di luce, mentre l'induzione di un meccanismo in risposta ad uno stress può anticipare uno stress idrico nel tardo pomeriggio (Harmer et al., 2000; Kreps et al., 2002; Millar, 2004).

La programmazione di eventi biologici può essere vantaggiosa per far sì che reazioni incompatibili siano divise temporalmente. Sebbene il vantaggio del controllo temporale sembra essere intuitivo, ci sono pochi esempi, in pianta o in altri organismi, nei quali sia stato dimostrato in modo conclusivo che ciò avviene. Altri studi hanno invece evidenziato come i ritmi circadiani assicurino una fitness più alta (Green et al., 2002; Dodd et al., 2005).

5. L'architettura dell'orologio

Gli orologi presenti in organismi modello appartenenti a regni diversi sono costituiti da *negative transcriptional/translational feedback loop*, una rete di fattori di trascrizione organizzati in cicli connessi a feedback negativo. Questo loop è costituito da una parte negativa ed una positiva (figura 1.3). La parte positiva del loop induce l'espressione di quella negativa, e in seguito, la parte negativa sopprime l'espressione di quella positiva. Per far parte del feedback loop, i componenti espressi la mattina e la sera devono oscillare in maniera circadiana; inoltre, l'espressione costitutiva o la perdita dell'espressione di un componente del cuore dell'orologio potrebbe causare comportamenti aritmici (Aronson et al., 1994; Wang and Tobin, 1998; Barak et al., 2000), sebbene non sia sempre questo il caso (Green and Tobin, 1999; Barak et al., 2000). Soprattutto nel sistema circadiano delle piante, mutazioni in qualsiasi gene del cuore oscillatore determinano un fenotipo ritmico di breve periodo, mentre l'espressione costitutiva di qualcuno di questi geni determina un fenotipo aritmico (Wang and Tobin, 1998; Strayer et al., 2000).

Gli orologi circadiani dei diversi organismi risultano essere più complicati rispetto allo schema del cuore oscillatore che risulta essere molto semplificato (figura 1.1). Negli organismi modello, il cuore oscillatore è costituito da numerosi interlocking transcriptional/translational feedback loops di RNA e proteine controllate circadianamente. I componenti dell'orologio circadiano non sono conservati fra i vari regni, suggerendo che gli orologi devono essersi evoluti indipendentemente in numerose occasioni (Young et al., 2001; Millar, 2004). Ad oggi, gli elementi conservati dell'orologio delle piante e animali sono i criptocromi e le proteine chinasi CK2 α (Sugano et al., 1998; Harmer et al., 2001; Webb, 2003).

La comprensione della complessità dell'orologio aumenterà man mano che altri nuovi geni verranno scoperti. Molti autori hanno suggerito che la complessità che sta alla base degli oscillatori circadiani serva a conferire flessibilità (Rand et al., 2006). Questa forma di flessibilità è la chiave dell'entrainment dell'orologio. È inoltre probabile che la complessità sia indicativa del fatto che gli orologi necessitano di un vasto controllo in modo da conferire una separazione temporale sui diversi programmi fisiologici.

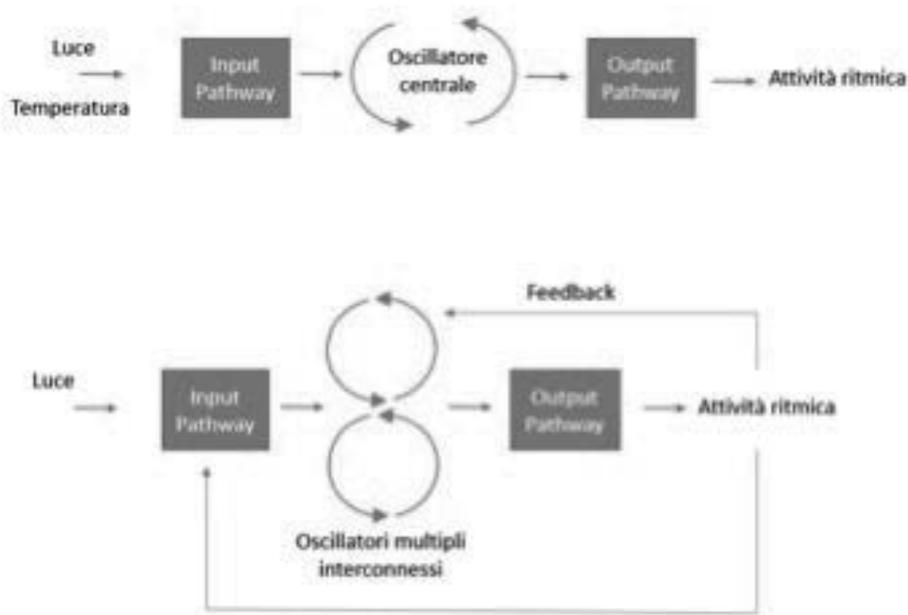


Figura 1.1. Rappresentazione schematica della struttura dell'orologio circadiano (Gardner et al., 2006)

6. Il nucleo oscillatore

Arabidopsis thaliana è la miglior specie modello per studiare i ritmi circadiani in pianta grazie al fatto che possiede le seguenti caratteristiche: grandezza ridotta del genoma (circa 125 milioni di paia di nucleotidi, in soli cinque cromosomi), il primo ad essere completamente sequenziato nel regno vegetale nel 2000, la creazione di mappe genetiche e fisiche, l'efficiente trasformazione con l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens*.

Alabadi *et al.* proposero nel 2001 la struttura base dell'orologio di *A. thaliana*, presentando un modello costituito da 3 geni, Circadian Clock-Associated 1 (CCA1) and Late elongated Hypocotyl (LHY), e Timing of CAB expression 1 (TOC1) (Alabadi et al., 2001) (figura 1.2).

CCA1 e LHY codificano per due fattori di trascrizione tipo-MYB con una notevole similarità di sequenza con una funzione ridondante nell'orologio. TOC1 promuove

l'espressione di CCA1 e LHY grazie ad un meccanismo ad oggi sconosciuto. Il feedback loop CCA1-LHY-TOC1 sembra funzionare così: CCA1 e LHY sono espressi ritmicamente con un picco di espressione dopo l'alba. CCA1 e LHY a loro volta nel giro di 2-3 ore inibiscono l'espressione di TOC1 andandosi a legare alla regione del promotore di TOC1 chiamata elemento serale (EE). Questo causa un graduale abbassamento del livello di TOC1 e, di conseguenza, un declino nella produzione di CCA1 e LHY. Come il livello di CCA1 e LHY diminuisce, la repressione dell'espressione di TOC1 viene diminuita, i livelli di proteina TOC1 sono maggiormente espressi la sera, e il ciclo inizia nuovamente (Millar, 2004; Alabaldi et al., 2001; Hayama et al., 2003). L'analisi di mutanti per questi geni ha mostrato alterazione dei ritmi circadiani (Mizoguchi et al., 2002; Alabadi et al., 2002).

Due gruppi di ricerca indipendenti hanno proposto che l'orologio circadiano delle piante sia composto da almeno 3 feedback loop interconnessi (Locke et al., 2005; Locke et al., 2006; Zeilinger et al., 2006). Il loop principale, quello descritto in precedenza, è responsabile della generazione dei ritmi durante i cicli di 24 ore giorno-notte, mentre i 2 loop addizionali sono specializzati per la sincronizzazione rispettivamente per la mattina e la sera. Il loop della mattina è costituito da CCA1/LHY, PRR9 e PRR7.

TOC1, chiamato anche PRR1, fa parte di questa famiglia di geni chiamati pseudo-response regulator (PRR). È stato dimostrato che CCA1 e LHY si legano ai promotori di PRR9 e PRR7, attivandone l'espressione. Al contrario PRR9 e PRR7 reprimono l'espressione di LHY/CCA1 (Farre et al., 2005).

Il loop serale è costituito da TOC1 e un fattore "Y" che sembra essere GIGANTEA (GI) (Locke et al., 2005). Molti studi hanno mostrato che GI è coinvolto con il segnale della luce nell'orologio circadiano (Martin-Tryon et al., 2007).

TOC1 risulta non essere l'unico elemento positivo del nucleo oscillatore, questo suggerisce che altri geni risultino essere gli attivatori diretti dell'espressione di CCA1/LHY e, per questo, altri geni espressi la sera come LUX e ELF4 sono stati coinvolti come parte dell'oscillatore (Hazen et al., 2005; Kikis et al., 2005; Onai and Ishiura, 2005; McWatters et al., 2007).

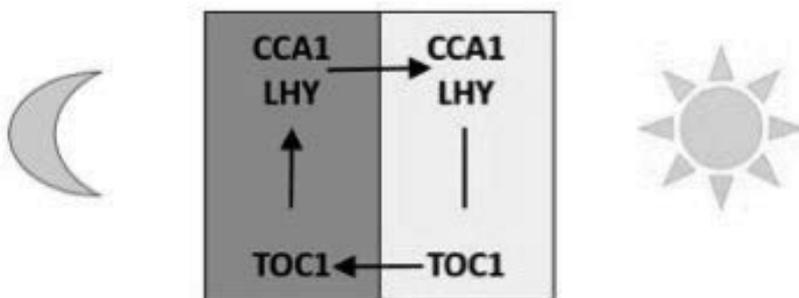


Figura 1.2 Primo modello dell'orologio circadiano di Arabidopsis. Il loop classico CCA1/LHY-TOC1, il primo modello molecolare. La trascrizione di CCA1 e LHY viene attivata dalla luce all'alba, e insieme reprimono la trascrizione di TOC1 legandosi al suo promotore. Il gene TOC1 a sua volta non è attivo fin verso la fine della giornata, con un picco dopo il tramonto e successivamente promuove l'espressione di CCA1/LHY grazie ad un meccanismo sconosciuto. Adattato da Alabaldi et al., (2000), Locke et al., (2005; 2006) e Zeilinger et al., (2006).

7. Basi molecolari della regolazioni dei geni orologio

La maggior parte dei geni orologio hanno ritmi nella quantità dei trascritti che sono seguiti dai ritmi nella quantità delle proteine affini (Dunlap, 1999; Harmer et al., 2001). Queste proteine si vanno a legare ad elementi promotori di altri geni orologio per attivare la loro espressione. Queste proteine secondarie, a loro volta, si legano agli elementi del promotore del gene iniziale e regolano negativamente la sua espressione, generando così una produzione ritmica di entrambi i geni (Roenneberg et al., 2000; Harmer et al., 2001; McClung et al., 2002). Esistono tuttavia numerosi livelli di controllo per far sì che sia mantenuta ritmica la trascrizione e/o la abbondanza della proteina stessa con una periodicità di 24 ore in modo da prevenire attenuazioni nel ritmo (Roenneberg et al., 2003).

Gli elementi cis-attivi che conferiscono l'espressione circadiana sono stati caratterizzati in numerosi organismi (Millar et al., 1991; Harmer et al., 2000; Harmer et al., 2005). In *Arabidopsis* è presente l'elemento serale (AAAATATCT) nei geni che codificano trascritti che vengono espressi verso la fine del pomeriggio seguente, e l'elemento mattutino CBS (AAAAATCT) nei geni i cui trascritti vengono espressi intorno all'alba (Carré et al., 1995; Wang et al., 1997; Harmer et al., 2000).

8. Componenti aggiuntivi del sistema circadiano

Nel corso degli ultimi anni, numerose proteine associate alle funzioni circadiane sono state individuate in *Arabidopsis* (Barak et al. 2000; Young et al., 2001; Eriksson et al., 2003; Hayama et al., 2004; Salome et al., 2004; Staiger et al. 2006). Alcune di queste fanno parte di famiglie multigeniche comprendenti proteine con funzioni conosciute nell'orologio, suggerendo una parziale ridondanza. Altre sono state identificate in base al loro ruolo nella via di segnale della luce o l'induzione fotoperiodica a fiore. Anche se il loro esatto ruolo all'interno del sistema circadiano deve essere ancora spiegato (tabella 1.1).

Tabella 1.1. Lista dei geni associati all'orologio circadiano in *Arabidopsis* (McClung, 2002)

Gene	Locus ID	Function	Loss of Function	Overexpression
CCA1	At2g46830	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
CKB3	At3g60250	Casein kinase II regulatory subunit	Not known (gene family)	Short period
CRY1	At4g08920	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
CRY2	At1g04400	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
DET1	At4g10180	Repressor of photomorphogenesis	Short period	Not known

Tabella 1.1. Lista dei geni associati all'orologio circadiano in *Arabidopsis* (McClung, 2002) (*segue*)

Gene	Locus ID	Function	Loss of Function	Overexpression
ELF3	At2g25930	Unknown	Arrhythmic in continuous light	Long period
ELF4	At2g40080	Unknown	Arrhythmic	Not known
GI	At1g22770	Unknown	Short period, low amplitude	Short period, low amplitude
LHY	At1g01060	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
LUX	At3g46640	Myb transcription factor	Arrhythmic	Arrhythmic
PHYA	At1g09570	Red light photoreceptor	Long period in farred light	Short period in farred light
PHYB	At2g18790	Red light photoreceptor	Long period in red light, leading phase in white light	Short period in red light, lagging phase in white light
PIF3	At1g09530	Basic helix-loop-helix transcription factor	Wild type	Wild type
PRR3	At5g60100	Pseudo-response regulator	Short period	Wild type
PRR5	At5g24470	Pseudo-response regulator	Short period	Low amplitude, long period
PRR7	At5g02810	Pseudo-response regulator	Long period	Not known
PRR9	At2g46790	Pseudo-response regulator	Long period	Short period
SRR1	At5g59560	Unknown	Leading phase, low amplitude	Not known
TIC		Gene not yet identified	Short period, low amplitude	Not known
TOC1	At5g61380	Pseudo-response regulator	Short period	Arrhythmic
ZTL	At5g57360	F-box protein	Long period	Arrhythmic

I fotorecettori

Una caratteristica comune attraverso le specie, di tutti i regni studiati, è la stretta connessione fra i fotorecettori e l'orologio circadiano. In pianta esistono tre classi di fotorecettori che sono coinvolti nella detection dello spettro di luce (Chen et al., 2004). Connesse con l'orologio circadiano, le due principali famiglie di fotorecettori, i fitocromi (PHY) e i criptocromi (CRY), hanno l'interesse maggiore.

La più grande famiglia di fotorecettori è quella dei fitocromi, che comprende due tipi più rappresentati (PHYA e PHYB) e tre meno (PHYC, PHYD e PHYE). I fitocromi delle piante si sono evoluti dalle istidin-chinasi regolate dalla luce e percepiscono principalmente le lunghezze d'onda rosse. Almeno due regioni attive si trovano nei fitocromi. In posizione amino terminale è presente un dominio, costituito da un cromoforo che assorbe la luce, e in posizione C-terminale è presente il dominio PER ARNT SIM (PAS), coinvolto nella dimerizzazione (Rockwell et al., 2006). I fitocromi esistono in due conformazioni: la forma Pr, non attiva all'assorbimento della luce rossa; la quale dopo attivazione si converte nella forma attiva Pfr. L'attivazione alla luce dei fitocromi consiste in una ridistribuzione dei fitocromi dal citoplasma al nucleo dove sono formate caratteristiche speckles (macchioline) (Kircher et al., 2002; Che et al., 2003; Bauer et al., 2004). Ad oggi viene ritenuto che le speckles sono importanti per la regolazione dell'attività dei fitocromi, oltre ad essere un meccanismo per la desensibilizzazione alla luce o come sito di degradazione dei fitocromi (Chen et al., 2004).

I criptocromi si sono evoluti da DNA fotoliasi e percepiscono la lunghezza d'onda blu (Li et al., 2003). A differenza dei criptocromi degli animali, i criptocromi di *Arabidopsis* (CRY1 e CRY2) non sono componenti dell'orologio circadiano, ma hanno la funzione di entrainment (Lin et al., 2003). La complessità della percezione della luce blu si vede, per esempio, dal fatto che doppi mutanti di CRY1 e CRY2 mostrano l'espressione dei geni regolati dalla luce blu, indicando che altre classi di fotorecettori sono coinvolti nella segnalazione della luce (Somers et al., 1998; Devlin, 2002).

Tramite l'uso di mutanti è stato visto che sia i fitocromi che i criptocromi sono coinvolti nell'orologio circadiano (Somers et al., 1998; Yanovsky et al., 2000).

Sebbene i CRY e i PHY governino il segnale di entrata della luce, sono anche un output ritmico dell'orologio. Inoltre è stato visto che esistono dei geni che intermediano il segnale della luce come ad esempio ELF3 (Hicks et al., 1996; Covington et al., 2001), TIC (Hall et al., 2003) e ZTL (Kim et al., 2003b).

9. Studio dei ritmi circadiani in *arabidopsis*

L'accrescimento dell'ipocotile

Due giorni dopo la germinazione con cicli luce/buio, la crescita dell'ipocotile di *Arabidopsis* mostra un'oscillazione circadiana in condizioni di luce o buio costante. Gli ipocotili mostrano un rapido allungamento verso il tramonto e un arresto della crescita verso l'alba. In molti casi, mutazioni e overespressioni di componenti dell'orologio, che distruggono le funzioni circadiane, possono causare anche una crescita anormale dell'ipocotile.

Il meccanismo attraverso il quale l'orologio regola l'allungamento dell'ipocotile rimane ampiamente sconosciuto (Dowson-Day et al., 1999). Inoltre gli ormoni giocano un importante ruolo nella regolazione della crescita dell'ipocotile; recentemente è stato mostrato che la biosintesi di etilene è regolata dall'orologio circadiano (Thain et al., 2002), suggerendo un meccanismo complesso alla base del controllo circadiano della crescita dell'ipocotile.

Il tempo di fioritura

Le piante hanno evoluto la capacità di percepire i cambiamenti della durata del giorno, consentendo loro di passare dallo stadio vegetativo a quello riproduttivo nella stagione

appropriata. Negli ultimi anni, l'analisi genetica del controllo fotoperiodico della fioritura di *Arabidopsis* ha cominciato a rivelare le basi molecolari della coincidenza fra l'orologio circadiano e la luce: ad esempio *Arabidopsis* fiorisce presto nei giorni lunghi. Le mutazioni di alcuni geni possono causare un ritardo della fioritura in condizioni di giorno lungo, ad esempio dei geni *FKF1*, *CO*, *GI*, *FT* e *SOC1*. L'espressione di tutti questi geni è regolata dall'orologio. Mutazioni che colpiscono le funzioni normali dell'orologio spesso causano l'alterazione dell'espressione di questi geni, suggerendo che questi possano agire a valle dell'orologio (Searle and Coupland, 2004).

Per studiare il fenotipo generato da un gene si ricorre all'utilizzo di mutanti, ovvero piante dove il gene risulta silenziato o overespresso. Per lo studio di *Arabidopsis* è possibile attingere alla banca dei semi del NASC, Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, dove per la maggior parte dei geni sono presenti uno o più linee di mutanti dove il gene risulta silenziato. È possibile ottenere abbastanza facilmente piante di *Arabidopsis* che risultino trasformate, nelle quali il nostro gene risulti essere over-esprimente.

Il fenotipo di mutanti collegati all'orologio circadiano in *Arabidopsis* è costituito da: alterata lunghezza degli ipocotili, controllo foto periodico anomalo del tempo di fioritura e alterata ritmicità dei profili di espressione di certi geni controllati dall'orologio in condizioni ambientali costanti.

10. Obiettivi della ricerca

I ritmi circadiani dicono alle piante in quale stagione si trovano e ad esempio quando è il momento migliore per fiorire in condizioni ambientali migliori e avere maggiore opportunità di attirare insetti impollinatori. Una migliore comprensione dei ritmi circadiani può avere applicazioni importanti in agricoltura, ad esempio permettere di scaglionare il raccolto della coltivazione per aumentarne la disponibilità e in questo modo assicurarsi da perdite eccessive causate da fattori esterni sia biotici che abiotici.

Esiste una parziale ridondanza di elementi fra i sistemi circadiani appartenenti ai diversi regni, sia in termini di struttura che di omologia di geni. I sistemi orologio in mammifero sono stati maggiormente studiati rispetto a quelli in pianta e risultano essere costituiti da un loop centrale, formato dai geni *CLOCK*, *BMAL* e *CRY1*.

Al fine di comprendere maggiormente la struttura dell'orologio circadiano in pianta lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di:

- individuare proteine omologhe di *CLOCK* e *CRY1* (*Homo sapiens*) in *Arabidopsis thaliana* e in *Populus trichocarpa*;
- studiarne l'eventuale coinvolgimento nei ritmi circadiani in pianta, *Arabidopsis thaliana*;
- analizzarne l'espressione genica in condizioni costanti con riferimento ai geni del loop principale in *Arabidopsis thaliana*.

La ricerca si è focalizzata soprattutto su *Arabidopsis* in quanto il ciclo vitale breve e il maggior numero di risorse disponibile rendono più fattibile lo studio. Una delle prospettive future sarà quella di indagare il ruolo di questi due geni su una specie arborea quale il pioppo.

Capitolo 2

Materiali e metodi

1. Materiali

1.1 Materiale biologico

Le piante di *Nicotiana tabacum* (cv. Petit Havana) sono state allevate in camera di crescita utilizzando terriccio universale (torba-pomice, 3:1), con 16 ore di luce a 27°C e 8 di buio a 24°C, con una irradiazione di luce di 200 $\mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$.

Le piante di *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 (Col-O), sono state coltivate in camera di crescita in contenitore con terreno composto per metà da terriccio e l'altra metà da perlite, e in vitro, su piastre contenenti terreno MS $\frac{1}{2}$ forza (Murashige e Skoog) (tabella A1), in questo caso i semi sono stati sterilizzati mediante lavaggio con una soluzione contenente il 30% di candeggina per 10 minuti e successivamente sono stati sciacquati 5 volte con acqua sterile. Prima di essere trasferite in camera di crescita sono state messe ad incubare al buio a 4°C per 3-4 giorni. Le piantine sono state allevate con diversi cicli di luce: luce continua (24 h di luce: LL), giorno lungo (16 ore di luce e 8 ore di buio: 16L/8D), giorno medio (12 ore di luce e 12 di buio: 12L/12D), giorno breve (8 ore di luce e 16 di buio, 8L/16D), o buio continuo (D/D). La temperatura è stata impostata a 23°C nel periodo della luce e a 21°C nel periodo di buio. L'irradiazione di luce è stata di 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Le linee dei mutanti di *Arabidopsis* T-DNA, SALK line, per i 2 geni sono state ottenute dall'EUROPEAN ARABIDOPSIS STOCK CENTRE (NASC) (tabella 2.1)

Il cDNA per il gene TAF12B (At1g17440) è stato acquistato dal Centro di ricerca RIKEN (<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/>).

I ceppi batterici e i plasmidi utilizzati sono elencati nella tabella 2.2.

Tabella 2.1 Linee dei mutanti di *Arabidopsis*

Locus	Mutante	Ecotipo
At1g17440	SALK_025793	Col-0
	SALK_132293	Col-0
At3g15620	SALK_139803	Col-0
	SALK_052691	Col-0
	SALK_041060	Col-0
	SALK_004707	Col-0

Tabella 2.2 Ceppi batterici e plasmidi utilizzati. (a) Novagen (www.novagen.com), (b) (Kaelin et al., 1992), (c) (Batoko et al., 2000), (d) Brandizzi lab's stock, (e) Invitrogen (www.invitrogen.com), (f) Stratagene (www.stratagene.com)

Ceppo batterico	Resistente a
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101d	gentamicina
<i>Escherichia Coli</i> MC1061e	streptomicina
Plasmidi	
pVKH18EN6ac	Kanamicina, igromicina
pVKH18EN6bc	Kanamicina, igromicina

1.2 Mezzi di crescita

Le formulazioni dei mezzi di crescita utilizzati in questo studio sono elencati nella tabella A.1 dell'Appendice. Luria Bertani medium (LB) è stato utilizzato per la crescita di *E. coli* e *A. tumefaciens*. YT medium è stato utilizzato per la crescita di MC1061 *E. coli* durante la preparazione delle cellule competenti. MS mezza forza è stato utilizzato per far crescere in vitro *Arabidopsis*.

1.3 Soluzioni, enzimi, prodotti chimici, kit di reazione e primer

Soluzioni, enzimi, prodotti chimici, kit di reazione e primer sono elencati nelle tabelle A2, A3, A4 nell'appendice. I prodotti sono stati acquistati dalle seguenti ditte: Fermentas (www.fermentas.com), Invitrogen (www.invitrogen.com), NEB (www.neb.com), Promega (www.promega.com), Qiagen (www.qiagen.com), Sigma Aldrich (www.sigma-aldrich.com) and VWR International (www.vwr.com).

2 Metodi

2.1 Clonaggio molecolare

Per questa ricerca sono state utilizzate tecniche molecolari standard come descritto da Sambrook *et al.* (1989). Per ottenere le proteine marcate fluorescenti sono stati usati mGFP5 (Haseloff *et al.*, 1997) e EYFP (Clontech Inc., California, USA). Il vettore binario pVKH18En6 era già presente in laboratorio ed è stato utilizzato per clonare il DNA e per esprimere le proteine in oggetto di studio legate alla proteina fluorescente in foglie di tabacco (figura 2.1) (Batoko *et al.*, 2000) e per trasformare *Arabidopsis*.

È stato usato un protocollo standard per le reazioni di PCR modificato a seconda della sequenza specifica dei primer (tabella A5 e A6 in appendice). Il PCR Purification Kit (Qiagen) è stato utilizzato per la purificazione dei prodotti di PCR. Il Gel Extraction Kit (Qiagen) è stato usato per la purificazione di DNA da gel di agarosio.

Sono state prodotte: la proteina fluorescente di TAF12B in posizione carbossiterminale (TAF12B-YFP) e le proteine fluorescenti UVR3, sia in posizione amino che carbossi-terminale (GFP-UVR3, UVR3-YFP) per studiare la loro distribuzione intra-

cellulare e generare piante trasformate stabili di *Arabidopsis* overesprimenti la proteina oggetto di studio.

La sequenza codificante di TAF12B è stata amplificata direttamente dal clone RA-FL08-15-G22 del Riken Institute. La sequenza codificante il gene *uvr3* è stato amplificato dal cDNA di *Arabidopsis* ottenuto dalla retro-trascrizione del mRNA totale. Dopo l'amplificazione le sequenze codificanti sono state inserite in posizione amino-terminale alla YFP usando gli unici siti di taglio XbaI e Sall nel vettore binario pVKH18-En6a (figura 2.1) ottenendo così UVR3-YFP.

Inoltre, per ottenere il costrutto GFP-UVR3, ovvero la proteina fluorescente in posizione amino-terminale della proteina UVR3, sono stati utilizzati i siti di taglio Bam e SacI nel vettore binario pVKH18-En6a (figura 2.1). Per far ciò sono stati tolti all'interno della sequenza codificante di UVR3 i siti di taglio per gli enzimi Bam e SacI, grazie a mutazioni silenziose generate con PCR overlapping (Higuchi et al., 1988; Ho et al., 1989). I primer utilizzati sono riportati nella tabella A4.

2.2 Elettroforesi su gel di agarosio

Per analizzare il DNA è stata utilizzata l'elettroforesi su gel di agarosio. La concentrazione standard di agarosio è stata dell'1% in 1X buffer TAE. I Gel sono stati colorati con bromuro di etidio (concentrazione finale 0.5 µg/ml) per permettere la visualizzare del DNA con la luce UV. Per preparare i campioni per l'elettroforesi è stato aggiunto 1/10 di 5x loading buffer (tabella A2). L'elettroforesi è stata condotta ad un voltaggio di 100 V.

2.3 Preparazione delle cellule competenti *E. coli*

Cellule di *E. coli* MC1061 sono state distribuite in maniera omogenea grazie all'utilizzo di un'ansa sterile su piastre contenenti LB con antibiotico (streptomicina 50 µg/ml) e quindi incubate tutta la notte a 37°C. Una singola colonia è stata inoculata in 3 ml di YT medium e incubata a 37°C con agitazione di 200 rpm fino a quando l'O.D. (Optical Density) 550 è 0.300. A questo punto la coltura è stata trasferita in 200 ml di YT medium pre-riscaldato a 37°C e incubato a 37°C con una agitazione di 200 rpm. Quando la O.D. 550 è 0.480 la coltura è stata trasferita in 4 tubi falcon da 50 ml (BD Falcon) lasciati in ghiaccio per 5 minuti. Le cellule sono state quindi centrifugate a 5.000 rpm nella centrifuga, a 4°C per 20 min. Alla fine della centrifugazione il surnatante è stato eliminato, e le cellule sono state risospese in 80 ml buffer TFBI e poste in ghiaccio per 5 minuti. La sospensione è stata nuovamente centrifugata come prima e il pellet risospeso in 8 ml di TFBII buffer e lasciato in ghiaccio per 15 minuti. Aliquote di 100 µl sono distribuite in tubi eppendorf pre-raffreddati e buttate in azoto liquido. Queste aliquote sono state conservate a -80°C.

2.4 Trasformazioni di cellule competenti *E. coli*

Le cellule competenti sono state prelevate dal -80°C e lasciate scongelare in ghiaccio. La soluzione del plasmide (3 µl) o la mix di ligazione (7 µl) aggiunte alle cellule competenti sono state lasciate incubare in ghiaccio per 20 minuti. La sospensione cellulare è stata sottoposta a shock termico a 42°C per 30 secondi e trasferita velocemente in ghiaccio per 5 minuti. Il medium LB (800 µl) è stato aggiunto in ogni tubo e incubato a 37°C per 1 ora con una agitazione di 170 rpm. Successivamente, le cellule sono state piastrate su

una piastra contenente LB e gli appropriati antibiotici per la selezione e messa a crescere per tutta la notte a 37°C.

2.5 Estrazione del DNA plasmidico (Minipreps)

Una singola colonia, cresciuta su piastra con il metodo illustrato nel paragrafo precedente, è stata inoculata con 3 ml di LB liquido con antibiotico specifico per la selezione del plasmide e incubato tutta la notte a 37°C con una agitazione di 180 rpm. Successivamente la sospensione cellulare è stata trasferita in tubi eppendorf e centrifugata a 14.000 rpm. Il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in 250 µl di soluzione P1 con aggiunta di 0.25 µl di RNase A (stock: 10 mg/ml in ddH₂O) e lasciata incubare a temperatura ambiente per 15 minuti. La soluzione P2 (250 µl) è stata aggiunta e incubata a temperature ambiente per 5 minuti. A questo punto 350 µl della soluzione P3 è stata aggiunta e i campioni messi a 4°C per 10 minuti, con successiva centrifugazione a 14.000 rpm per 10 minuti. Il surnatante (750 µl) è stato trasferito in un nuovo tubo eppendorf con l'aggiunta di 750 µl di isopropanolo, e successiva centrifugazione per 30 minuti a 14.000 rpm. Il pellet è stato lasciato asciugare a 37°C per 10 minuti, e quindi risospeso in 50 µl di acqua distillata e conservato a -20°C.

2.6 Preparazione di cellule competenti di *A. tumefaciens*

Una colonia singola di *A. tumefaciens* (GV3101) è stata inoculata in 5 ml di LB medium con aggiunta di antibiotici (gentamicina 15 µg/ml) e incubata tutta la notte a 28°C con 250 rpm di agitazione. La mattina successiva 2 ml della coltura sono stati inoculati in 50 ml di LB in una beuta sterile e lasciati crescere a 28°C fino al raggiungimento di una O.D.600 fra 0.5 – 1.0 e successivamente trasferiti in ghiaccio per 10 minuti. Le cellule sono state centrifugate per 10 minuti a 5000 rpm a 4°C. Il surnatante è stato rimosso e le cellule risospese in 10 ml di 20 mM CaCl₂ sterile. Aliquote (40 µl) della sospensione cellulare sono state congelate nell'azoto liquido e stoccate a -80°C.

2.7 Trasformazione delle cellule competenti di *A. tumefaciens*

Il DNA plasmidico (7 µl) è stato mescolato con una aliquota di cellule competenti di *A. tumefaciens* GV3101 e lasciato in ghiaccio per 5 minuti. A questo punto le cellule sono state messe in azoto liquido per 5 minuti e trasferite in un bagnetto termico a 37°C per 5 minuti. Il medium LB (800 µl) è stato quindi aggiunto alle cellule. Le cellule sono state incubate per 4 ore a 28°C con una agitazione di 120-130 rpm. La sospensione cellulare è stata distribuita su una piastra selettiva di LB e lasciata in incubazione a 28°C per due giorni fino all'ottenimento di colonie visibili.

2.8 Trasformazione transiente di piante di *N. tabacum*

Piante di *N. tabacum* di 4 settimane sono state usate per essere trasformate transientemente da *A. tumefaciens* (strain GV3101) (Batoko et al., 2000). Per la procedura di infiltrazione di *Agrobacterium*, la coltura è stata fatta crescere a 28°C in LB con kanamicina (100 µg/ml) e gentamicina (25 µg/ml) con agitazione di 200 rpm per circa 20 ore.

Le cellule batteriche sono state raccolte per centrifugazione a 8.000 g per 5 minuti a temperatura ambiente e risospese con il buffer IF (infiltrazione). La densità ottica dei

batteri usati per l'infiltrazione è stata 0.1 per i costrutti di TAF12B e UVR3. La sospensione delle cellule di *Agrobacterium* infettato sono state iniettate su tutta la foglia negli spazi abaxiali con l'utilizzo di siringhe ipodermica da 1 ml (Kapila et al., 1997).

72 ore dopo l'infezione con *A. tumefaciens* le foglie trasformate sono state analizzate grazie all'utilizzo del microscopio confocale.

2.9 Trasformazione stabile di *Arabidopsis*

Piantine di *Arabidopsis* sono state trasformate con *Agrobacterium* con il metodo floral-dip come descritto da Clough e Bent, 1998.

2.10 Microscopia confocale

Le proteine fluorescenti hanno la capacità di assorbire la luce ad una specifica lunghezza d'onda e di emetterla ad una lunghezza maggiore. Per esempio, la proteina fluorescente verde (GFP) assorbe la luce blu ed emette fluorescenza verde (Morise et al., 1974). A differenza di microscopi confocali di altre marche (Zeiss, Olympus, Nikon), il confocale Leica SP5 è privo dei filtri dicroici. Infatti la luce emessa dal laser passa attraverso un cristallo chiamato "acousto optical beam splitter" (AOBS), un dispositivo ottico che divide il raggio di luce (beam). La luce di eccitazione emessa dal laser, passa attraverso un cristallo, e la luce riflessa viene focalizzata sul campione da lenti obiettivo. La luce emessa dal campione viene raccolta dall'obiettivo e viene messa a fuoco sul pinhole. Questo significa che il piano di fuoco del campione e del pinhole sono confocali, ovvero sono messi su piani coniugati. L'unica luce che attraversa il pinhole e che viene raccolta dai fotomoltiplicatori proviene dal piano confocale.

Il microscopio confocale utilizzato in questo studio è stato il Leica SP5, invertito, con obiettivo 63x immersione a olio. Per l'acquisizione di immagini di costrutti GFP e YFP sono stati usati i seguenti settaggi: la linea di eccitazione del laser ad argon è stata settata a 458 nm per la GFP e 514 nm per la YFP. La fluorescenza della GFP è stata individuata usando AOBS con un range spettrale da 500 a 520 nm e la fluorescenza della YFP con un range dai 560 ai 600 nm. L'intensità del laser era del 33%, e il diametro del pinhole era fra 1-3 μm . Lo zoom è stato utilizzato per acquisire immagini che permettessero così di osservare in maniera più dettagliata le cellule. Il guadagno del detector è stato settato tra 700 e 800. La line averaging usata è stata di 16.

2.11 Estrazione del DNA genomico dalle foglie di *Arabidopsis*

Un piccolo pezzo di foglia, 0.25 mm^2 , è stato omogeneizzato in un tubo eppendorf con un pestello. 100 μl del buffer di estrazione (Tabella A2 in Appendice) vengono aggiunti nel tubo ed il tessuto è stato ulteriormente distrutto. In seguito all'aggiunta di altri 100 μl il campione è stato mescolato vorticosamente per pochi secondi e poi centrifugato per 2 minuti a 13000 rpm (Beckman Coulter, Microfuge 22R Refrigerated Microcentrifuge). 170 μl di surnatante sono stati trasferiti in un nuovo tubo e 170 μl di isopropanolo aggiunti. Il campione è stato lasciato a temperatura ambiente per 5 minuti e poi centrifugato per altri 5 minuti a 13000 rpm. Il surnatante è stato buttato via e il DNA lasciato asciugare. Il DNA è stato quindi risospeso in 50 μl di acqua sterile.

2.12 Estrazione di RNA e retrotrascrizione

L'estrazione di RNA dalle foglie di *Arabidopsis* è stata effettuata usando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). La retro trascrizione per ottenere il cDNA è stata condotta usando il Superscript III Kit (Invitrogen) seguendo il protocollo descritto in tabella A9 e A10 dell'appendice. È stato eseguito anche un trattamento con la DNAsi per eliminare eventuali contaminazioni da DNA.

2.13 Determinazione spettrofotometrica delle concentrazioni di DNA e RNA

La concentrazione e la purezza del DNA e dell'RNA è stata determinata spettrofotometricamente alle lunghezze d'onda 260-280 nm (Sambrook et al., 1989) utilizzando il Tecan Infinite 200.

2.14 Real time PCR

Le reazioni di PCR sono state condotte usando il RotorGene 6000. Per la reazione è stato utilizzato il Quantifast Sybr Green (Qiagen), il ciclo e il volume di reazione sono specificati in tabella A11 e A12 in appendice. I dati sono stati analizzati usando l'analisi quantitativa comparativa del Rotor-Gene 6000 Software. L'ubiquitina 10 (At4g05320) è stata utilizzato come gene di riferimento per la normalizzazione dell'espressione dei geni di interesse nei vari campioni, permettendo così di poter comparare dati di espressione provenienti da campioni diversi. Inoltre i dati di espressione sono stati analizzati tenendo conto della differente efficienza di ciascuna reazione di PCR (Pfaffl, 2004).

2.15 Analisi fenotipica

Le misurazioni della lunghezza dell'ipocotile sono state eseguite seguendo il protocollo pubblicato da Somers et al., 1991. I semi sono stati trasferiti su terreno MS mezza forza e messi a 4°C per 3 giorni, quindi sono stati esposti a luce bianca per 4 ore e poi sottoposte a trattamento specifico dei luce, o 16 ore di luce e 8 di buio, oppure buio continuo per 7 giorni. La lunghezza dell'ipocotile è stata misurata utilizzando Image tool (<http://ddsdx.uthsca.edu/dig/itdesc.html>). Per ogni trattamento di luce sono stati misurati 50 ipocotili e le misure sono state ripetute due volte.

Per quanto riguarda l'analisi del tempo di fioritura, sono state seminate in terra 15 piantine per ciascun genotipo e messe in camera di crescita, con un trattamento di luce di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

2.16 Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato condotto un test t di Student per campioni indipendenti e i dati sono riportati come medie \pm deviazione standard. Valori di P significativi statisticamente sono stati calcolati per ogni figura.

Il programma statistico COSOPT è stato invece utilizzato per definire circadianamente l'espressione dei trascritti (Panda et al., 2002, Straume, 2004). COSOPT importa i dati e calcola l'intensità di espressione media e la corrispondente deviazione standard (SD). Il peso variabile dei punti individuali di tempo vengono aggiustati durante l'analisi, per l'identificazione della presenza di ritmi, con periodi che vanno

da 8 a 40 ore con incrementi di 0.01 ora. Per ogni periodo testato, vengono considerate 101 funzioni di coseno di base (con ampiezza di un'unità), che variano su di un range di valori di fase da più a meno della metà del periodo. COSOPT calcola, per ogni test, una funzione di base del coseno, la corrispondenza lineare ottimizzata con il metodo dei minimi quadrati tra i dati sperimentali, $y(t)$, e la funzione test di base coseno, $y_b(t)$, come funzione del tempo, t , (per esempio, l'approssimazione di $y(t)$ con la funzione test di base coseno, $y_b(t)$, è ottimizzata su tutti i valori t , attraverso l'uso di due parametri, ALPHA e BETA, dove $y(t) \approx \text{ALPHA} + \text{BETA} \times y_b(t)$). La qualità dell'ottimizzazione possibile con la funzione test di base coseno è quantitativamente caratterizzata dalla somma dei quadrati residui tra $y(t)$ e l'approssimazione data da $(\text{ALPHA} + \text{BETA} \times y_b(t))$ (ovvero Chi-quadro). I valori di Chi-quadro sono usati per identificare il momento, ovvero la fase, dove la corrispondenza fra $y(t)$ e $y_b(t)$ ottenuta è ottimale per ogni test del periodo (per esempio, la fase che dà il valore chi-quadro più piccolo corrisponde alla fase ottimale). Quindi, per ogni test sul periodo, vengono assegnati questi valori di ALPHA, BETA e Chi-quadro nella fase ottimale. Un centinaio di cicli di Monte Carlo vengono condotti, dove vengono generati realizzazioni surrogate di $y(t)$ sia con mescolamento random delle sequenze temporali che aggiungendo un rumore distribuito in maniera pseudo-Gaussiana ad ogni punto surrogato in proporzione all'incertezza del valore corrispondente al punto (per esempio replicati di SEM). Quindi, come con la sequenza originale dei valori $y(t)$, valori ottimali di ALPHA, BETA e Chi-quadro vengono calcolati mantenendo in memoria per ogni punto il surrogato a ogni test sul periodo e fase ottimale. La media e le deviazioni standard dei valori BETA surrogati vengono quindi calcolati, seguiti dal calcolo della probabilità di significatività basandosi su un'assunzione di normalità. Le misure multiple di correzione dei valori BETA (pMMC- β) descrivono la bontà di adattamento. Un valore soglia significativo per pMMC- β viene empiricamente stimato per accomodarlo su geni conosciuti circadiani. Il valore soglia sotto il quale un gene viene considerato con un'espressione con ritmicità circadiana è <0.05 .

Capitolo 3

Risultati

1. Identificazione omologo di CLOCK, Homo sapiens, in Arabidopsis thaliana

1.1 analisi bioinformatica

È stata condotta una ricerca bioinformatica, usando l'algoritmo BLASTP, Basic Local Alignment Search Tool Protein, sul database delle proteine di *A. thaliana* fornito dal sito <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/>, al fine di identificare una proteina con caratteristiche simili alla proteina CLOCK di *Homo sapiens* (NP_004889.1). La proteina con una somiglianza maggiore, è quella codificata dal gene At1g17440, TBP-ASSOCIATED FACTOR 12B (TAF12B). L'identità degli aminoacidi lungo la sequenza è di 124/482 corrispondente a circa il 25%, e la positività, costituita dalla somma degli aminoacidi uguali e quelli sostituiti con altri con caratteristiche simili, è di 199/482, pari al 41%. È stata effettuato l'allineamento delle sequenze di CLOCK, *Homo sapiens*, e TAF12B di *Arabidopsis* utilizzando il software clustaw2 (figura 3.1). In particolare è stata ricercata l'eventuale presenza di due elementi caratteristici della classe di proteine CLOCK (Hirayama et al., 2005), ovvero il dominio PAS, sensore dei segnali, e la presenza di Poli-Q, poli-glutammine, spesso over-rappresentate nelle proteine orologio coinvolte nei ritmi circadiani in mammifero, pesci e funghi (Avivi et al., 2001; Ambra et al., 2004; Michael et al., 2007; O'Malley and Banks, 2008).

L'analisi rivela che nella porzione di proteina allineata a livello dei domini PAS (PER-ARNT-SIM) la similitudine risulta bassa, ma la cosa interessante è che la sequenza aminoacidica della proteina TAF12B risulta essere ricca di poli-glutammine sparse nella sequenza, al contrario di quanto avviene nella proteina clock dove la presenza delle poli-Q risulta essere limitata semplicemente nella porzione carbossi-terminale della proteina stessa.

Con il software Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) sono stati analizzati i possibili domini funzionali presenti a livello della proteina TAF12B, rivelando la presenza del dominio TFIID, fattore di inizio di trascrizione, costituito da un Histone-fold, forma parte del complesso pre-iniziale degli elementi promotori richiesti per la trascrizione dipendente dalla RNA polimerasi II.

È stata inoltre analizzata la sequenza del promotore del gene TAF12B al fine di individuare degli elementi caratteristici dei geni che vengono espressi con l'orologio circadiano.

Per fare ciò è stato utilizzato il database "AtcisDB - Arabidopsis *cis*-regulatory element database" del sito <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/> che oltre a fornire la sequenza dei promotori di ciascun gene di Arabidopsis è in grado di individuare gli elementi caratteristici.

È stato individuato il motivo sito di legame della proteina CCA1, o anche definito morning element, aaaaatct. Nonostante la bassa identità di sequenza è stato

comunque deciso di investigare un possibile ruolo di TAF12B nell'orologio circadiano.

A questo punto è stato individuato l'omologo di TAF12B in *Populus trichocarpa*, Poplar_fggenes4_pg.C_Lg_I001055, utilizzando le risorse fornite da <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Sono stati inoltre controllati i livelli di espressione dei geni in entrambe le specie identificati grazie all'utilizzo di Micro-Array (figura 3.2 e 3.3).

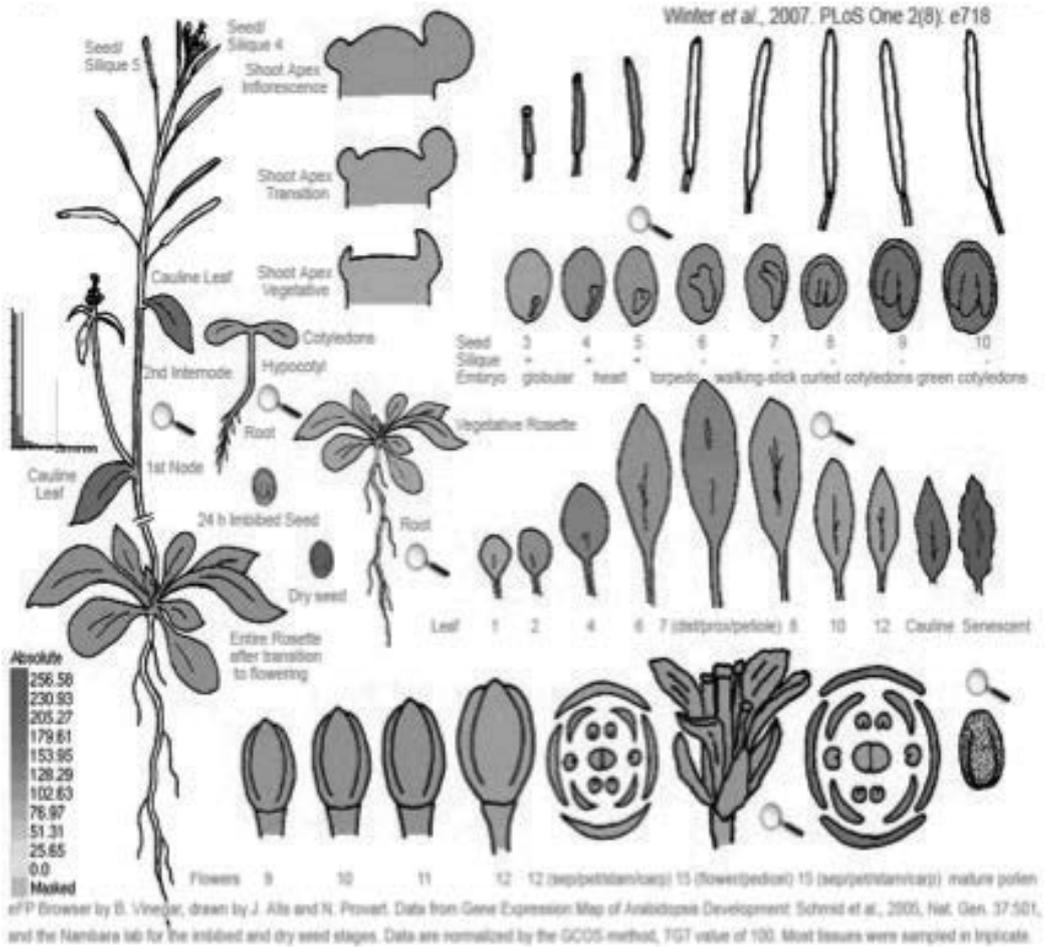


Figura 3.2. Livello di espressione del gene TAF12B nelle varie parti di Arabidopsis evidenziata dal microarray ATH1GeneChip (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

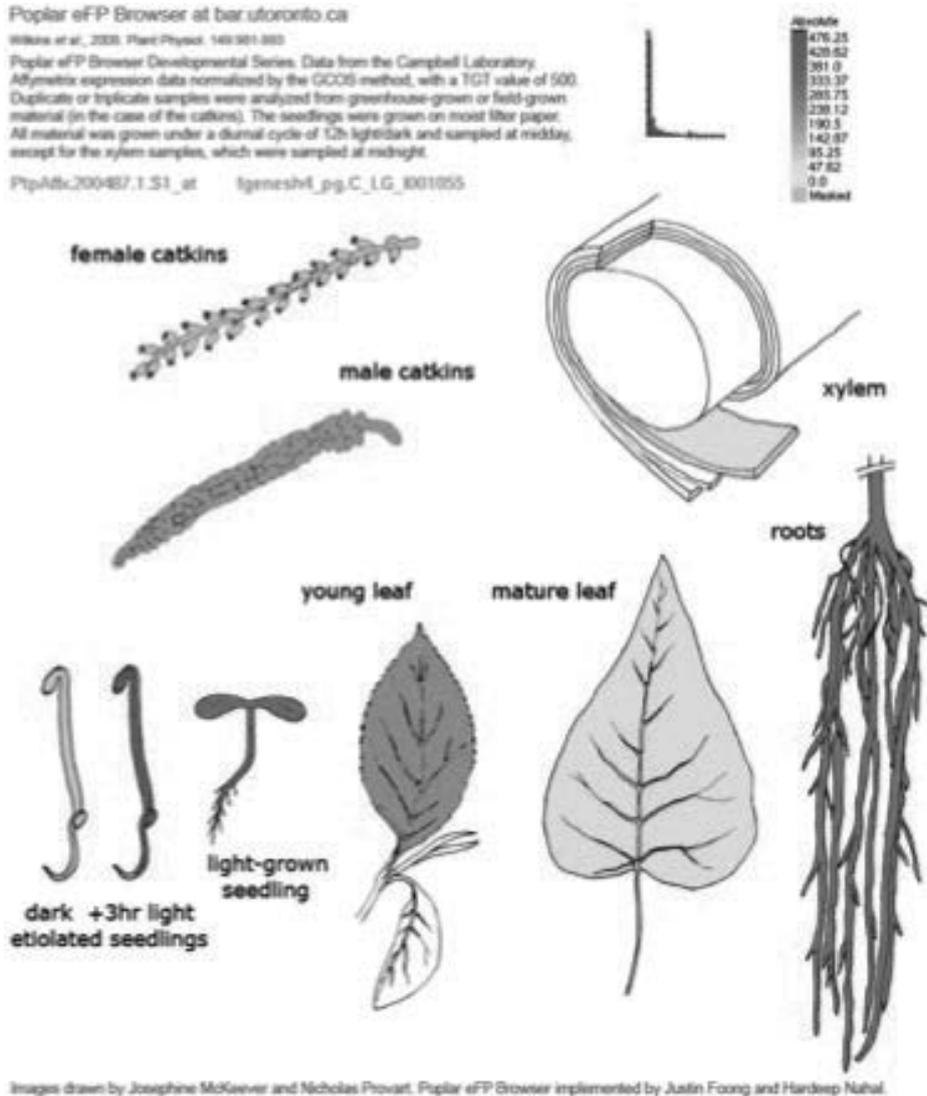


Figura 3.3. Espressione media del gene *Poplar_fgenesH4_pg.C_Lg_I001055* nelle varie parti del pioppo utilizzando il Poplar GeneChip (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgibin/efpWeb/>).

1.2 Localizzazione intracellulare di TAF12B

In letteratura era già stata individuata la localizzazione cellulare per TAF12B (Robles et al., 2007) che avviene a livello nucleare. Per la localizzazione a livello intracellulare è stato comunque preparato un costrutto con la proteina fluorescente (YFP-Yellow Fluorescent Protein), in posizione carbossi-terminale TAF12B-YFP. Dalle immagini ottenute con il microscopio confocale su foglie di tabacco infiltrate con *A. tumefaciens* recante il costrutto TAF12B-YFP è possibile vedere che la proteina si localizza a livello del nucleo (figura 3.4).

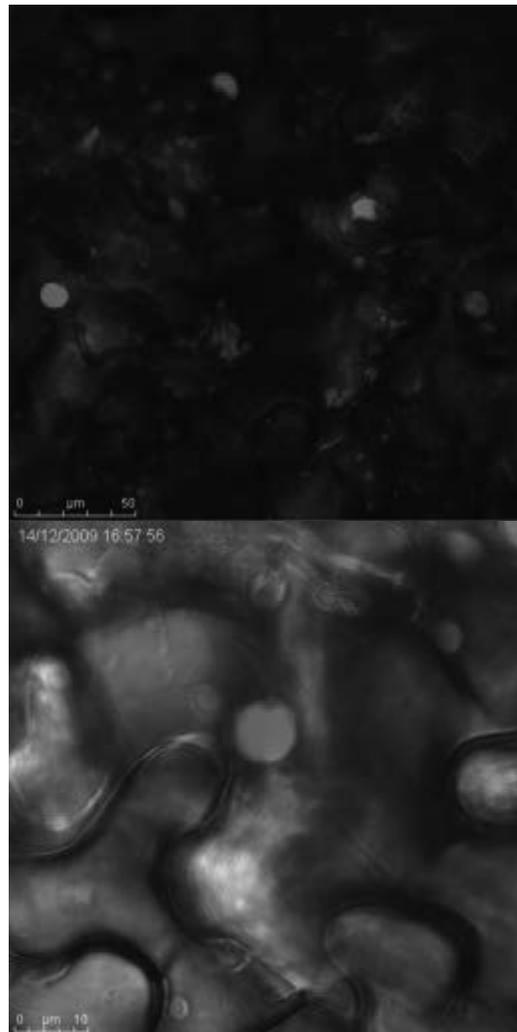


Figura 3.4 Distribuzione intracellulare di TAF12B-YFP. Immagini al microscopio confocale di cellule epidermiche di foglie di tabacco dopo 3 giorni dall'infiltrazione con *A. tumefaciens* TAF12B-YFP (O.D.600=0.1). La localizzazione è a livello nucleare, colore rosso, i cloroplasti che autofluorescono a seguito dell'eccitazione con il laser sono evidenziati dal colore verde. Scale bars: 5 e 2 μm .

1.3 Studio della funzione di TAF12B grazie all'utilizzo delle SALK-LINE

Dopo la genotipizzazione e la selezione delle piante omozigoti per l'inserzione del T-DNA (SALK_025793, SALK_132293), è stata analizzata l'espressione genica grazie all'estrazione di RNA e retrotrascrizione (figura 3.5). Nonostante l'inserzione del T-DNA, *eer4* era espressa in entrambe le linee salk che è stata esaminata e il prodotto di amplificazione di PCR era visibile dopo 25 cicli sia nel wild-type che nelle piante mutanti (figura 3.5).

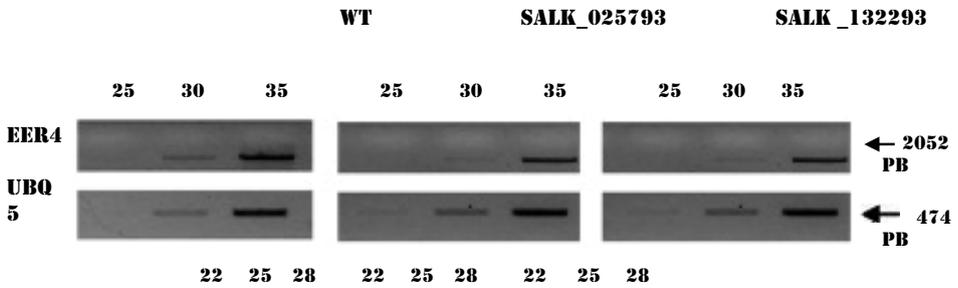


Figura 3.5. TAF12B non è downregolato nelle SALK 025793 e 132293. Dopo la retro trascrizione del mRNA totale estratto da piante wildtype e mutanti (tabella A9 nell'appendice), il cDNA di TAF12B è stato amplificato utilizzando primer specifici di PCR (per le condizioni di PCR guardare tabella A7 e A8 dell'appendice). Per poter comparare l'espressione nelle piante wildtype e in quelle mutanti, la reazione di PCR è stata interrotta dopo 22,25,28,30 e 35 cicli. Una banda specifica di amplificazione risulta essere visibile dopo 30 cicli e maggiormente a 35 sia nel wild type che nelle salk line, dimostrando così che nelle salk line il gene non risulta essere silenziato. Come gene di riferimento è stato utilizzato ubiquitina 5.

1.4 Studio delle piante di Arabidopsis TAF12B-YFP

Grazie ad *Agrobacterium* TAF12B-YFP è stata tentata la trasformazione stabile di *Arabidopsis*, al fine di ottenere piante dove la proteina fosse over-espressa rispetto alla sua normale espressione, grazie alla presenza del promotore 35s. In seguito a selezione su antibiotico, le piantine sono state controllate al confocale per vedere se tutte le cellule risultavano essere trasformate. Nonostante numerosi tentativi per ottenere piante trasformate, è stato possibile ottenere piante solo parzialmente trasformate (figura 3.6).

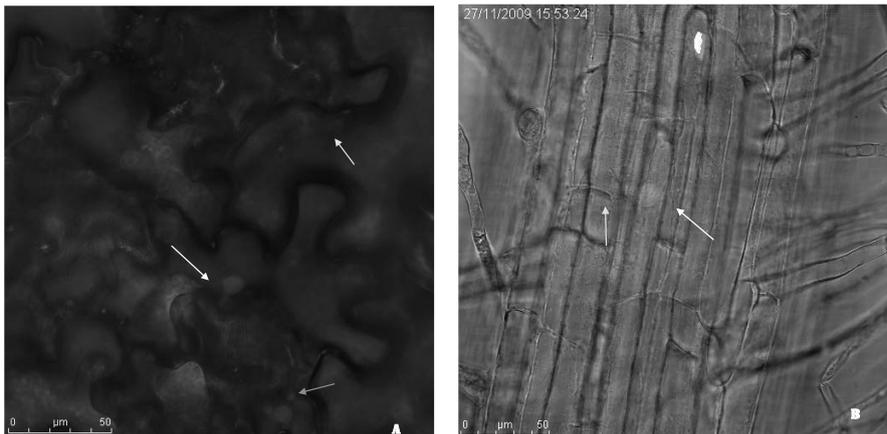


Figura 3.6. Foglia e radice di piante di Arabidopsis parzialmente overesprimenti TAF12B-YFP. Immagini al microscopio confocale di cellule epidermiche di foglie (A) e radice (B) di piante di Arabidopsis trasformate con *Agrobacterium* TAF12B-YFP. È possibile vedere che non tutte le cellule risultano essere trasformate. Le cellule trasformate sono quelle dove è visibile la proteina nel nucleo (freccia bianca), e le cellule non trasformate sono quelle dove il nucleo non fluoresce (freccia gialla). I cloroplasti che autofluorescono a seguito dell'eccitazione con il laser sono evidenziati dal colore verde (freccie blu). Scale bars: 10 μm

Queste piante, parzialmente esprimenti la proteina TAF12B-YFP, presentano un fenotipo particolare. Infatti, se allevate su terreno MS(-), ovvero privo di saccarosio, lo sviluppo dell'intera piantina, e in particolar modo della radice, risulta essere bloccato. Nella figura (3.7) sono mostrate piante della stessa età, 20 giorni, sia WT che di TAF12B -YFP. Il tasso di crescita per le piante TAF12B -YFP risultava essere diminuito e la divisione cellulare arrestata sia nei germogli che nelle radici rispetto alle piante wild type.

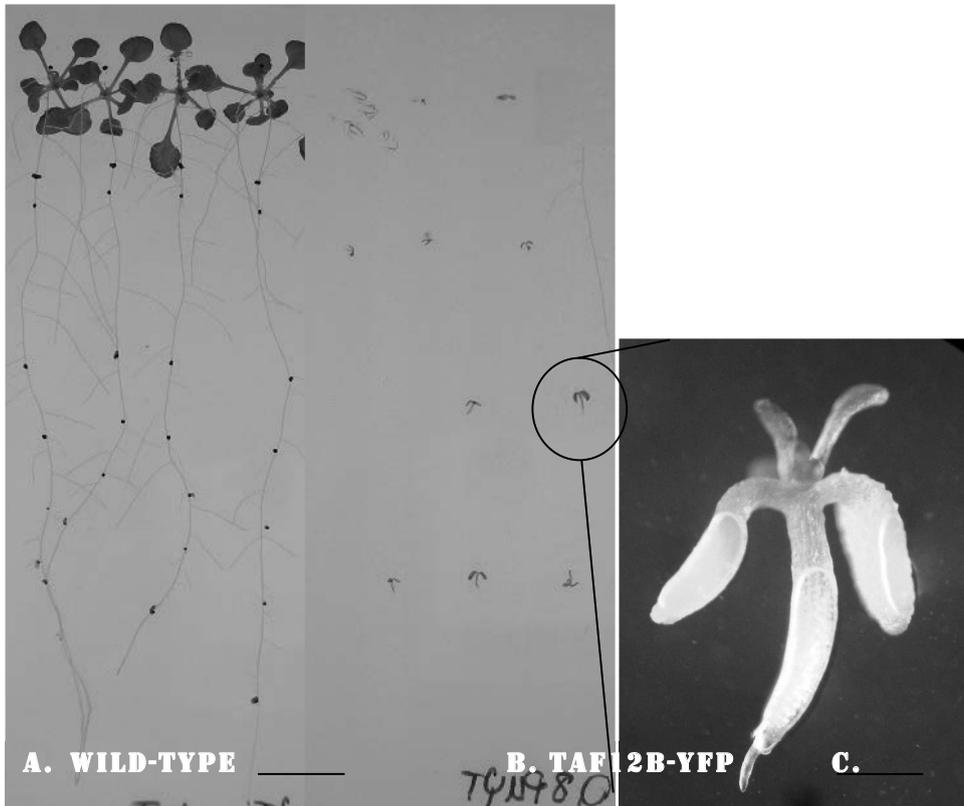


Figura 3.7. Piantine di *Arabidopsis* WT e TAF12B-YFP. Nell'immagine è possibile vedere come piantine della stessa età, 20 giorni, di WT e TAF12B-YFP differiscono nello stadio di sviluppo. Lo sviluppo delle piantine TAF12B-YFP risulta arrestato, e lo sviluppo della radice compromesso. Scale bars: 1.5 cm nella prima immagine e 1,5 mm nella seconda

2. Identificazione omologo di CRYPTOCHROMO 1, *Homo sapiens*, in *Arabidopsis thaliana*

2.1 Analisi bioinformatica

È stata condotta una ricerca bioinformatica, usando l'algoritmo BLASTP, Basic Local Alignment Search Tool Protein, sul database delle proteine di *Arabidopsis* fornito

dal sito <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/>, al fine di identificare una proteina con caratteristiche simili alla proteina criptocromo 1, CRY1, di *Homo sapiens* (NP_004066.1). La proteina con una maggiore somiglianza è quella codificata dal gene At3g15620, UV REPAIR DEFECTIVE 3 (UVR3). L'identità degli aminoacidi lungo la sequenza è di 253/501 corrispondente a circa il 50%, e la positività, costituita dalla somma degli aminoacidi uguali e quelli sostituiti con altri con caratteristiche simili, è di 343/501, pari al 68%.

Si è provveduto ad effettuare l'allineamento delle sequenze di CRY1, *Homo sapiens*, e UVR3 di *Arabidopsis* utilizzando il software Clustaw2 per individuare le regioni altamente conservate all'interno della sequenza (figura 3.8).

L'analisi rivela che a livello aminoacidico le due proteine presentano due motivi altamente conservati, in posizione amino-terminale è presente una sequenza caratteristica delle DNA fotoliasi e in posizione carbossi-terminale una sequenza di legame per il co-fattore FAD, FAD binding. Questi due domini sono caratteristici delle proteine recettori per la luce blu e con attività fotoliasica, caratteristica importante per le proteine coinvolte nei ritmi circadiani.

Sul sito ensemblplant (<http://plants.ensembl.org/index.html>) è stata effettuata una ricerca per individuare i paraloghi della proteina in questione. Caratteristici di questa proteina sono i domini DNA fotoliasi e fad binding DNA in posizione amino-terminale, i quali sono presenti entrambi anche nelle seguenti proteine: AT1G04400 CRY2 (CRYPTOCHROME 2), AT5G24850 CRY3 (CRYPTOCHROME 3), AT4G08920 CRY1 (CRYPTOCHROME 1), AT1G12370 UVR2 (UV RESISTANCE 2), AT2G47590 PHR2 (PHOTOLYASE/BLUE-LIGHT RECEPTOR 2). Ad oggi CRY1 e CRY2 risultano essere coinvolti nell'orologio circadiano in *Arabidopsis*.

Inoltre è stata analizzata la sequenza del promotore del gene UVR3 al fine di individuare degli elementi caratteristici dei geni che vengono espressi con l'orologio circadiano. Per fare ciò abbiamo usato il database "AtcisDB - Arabidopsis cis-regulatory element database" <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/> che, oltre a fornire la sequenza dei promotori di ciascun gene di *Arabidopsis* è in grado di individuarne gli elementi caratteristici. È stato individuato il motivo sito di legame della proteina CCA1, o anche definito morning element, aaaaatct.

Questi dati supportano l'idea che UVR3 possa essere coinvolto nell'orologio circadiano.

A questo punto è stato individuato l'omologo di TAF12B in *Populus trichocarpa*, Poplar_fgenes4_pg.C_Lg_I001055, utilizzando le risorse fornite da <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Sono stati inoltre guardati i livelli di espressione dei geni in entrambe le specie identificati grazie all'utilizzo di Micro-Array (figura 3.9 e 3.10).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

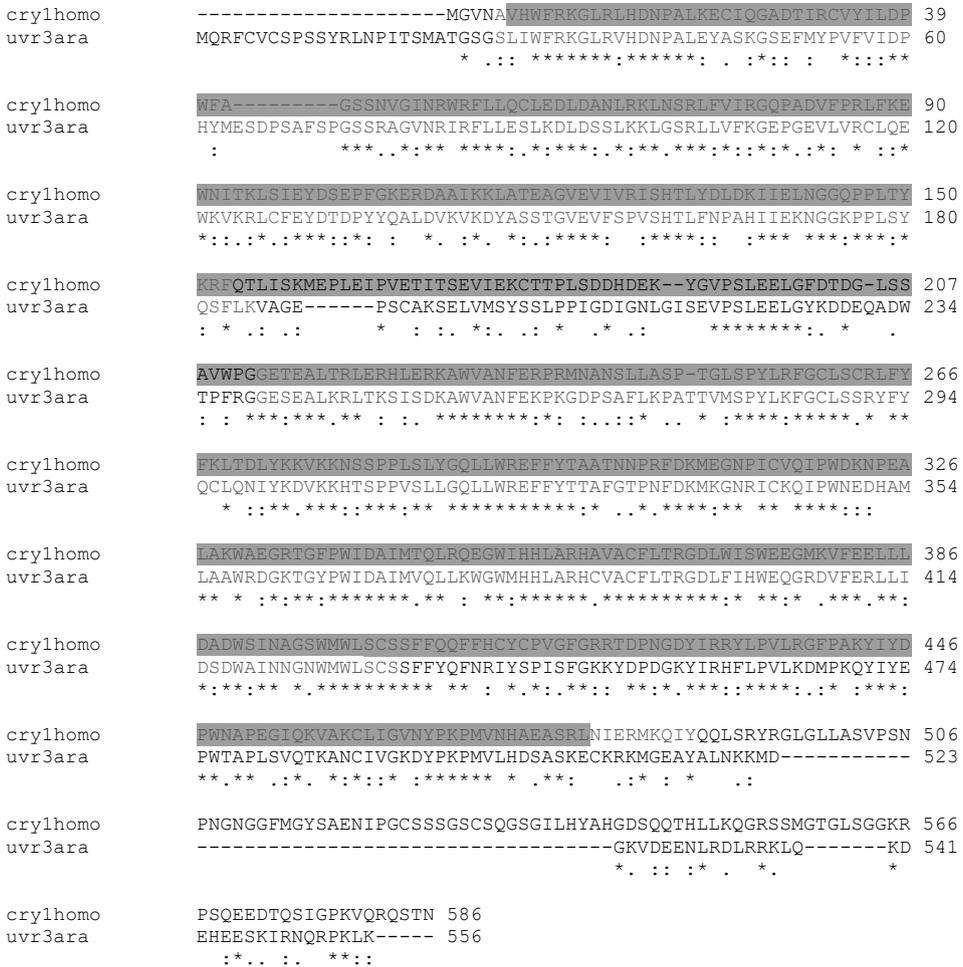


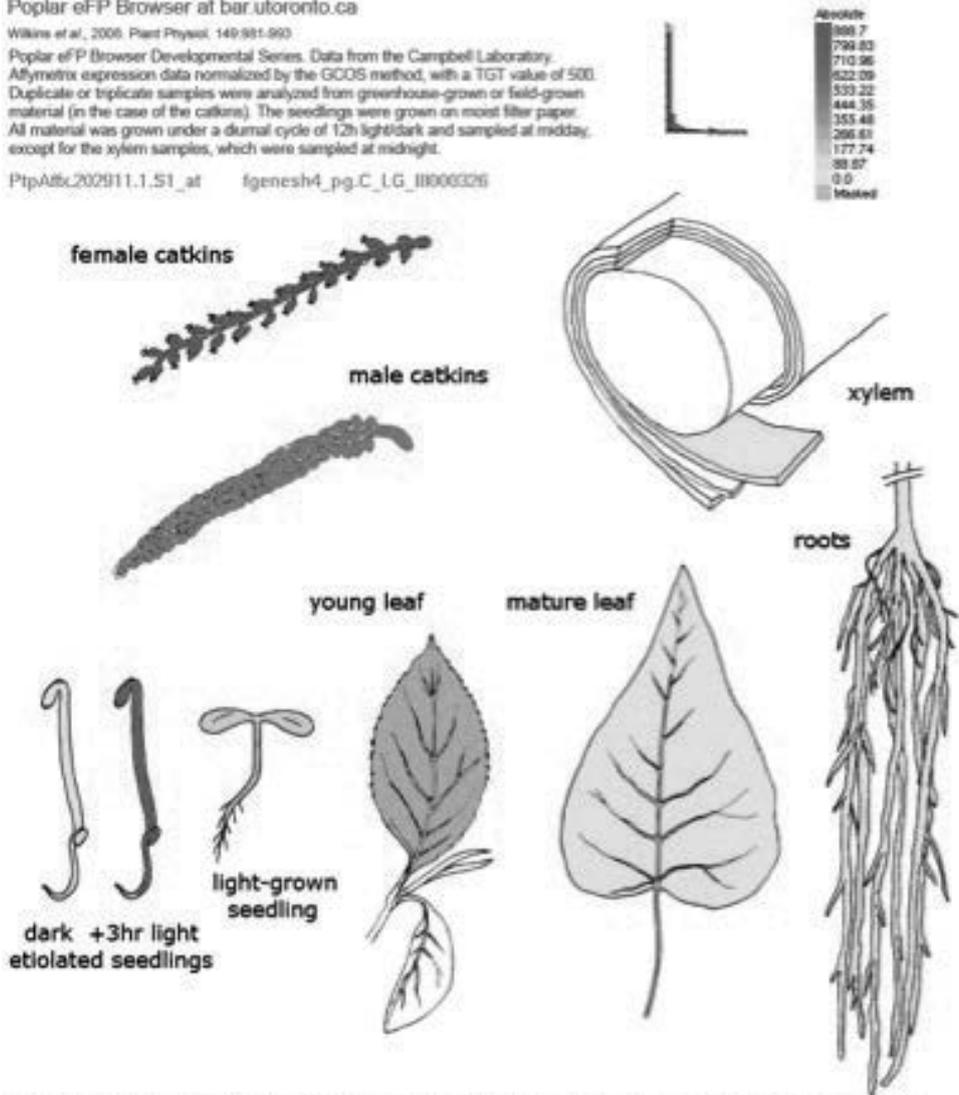
Figure 3.8 CRY1, *Homo sapiens*, e UVR3, *Arabidopsis thaliana*, possiedono il 50% di identità di sequenza. A) L'allineamento di sequenza mostra come queste due proteine presentino un'identità di sequenza alta, in particolare nelle sequenze motivo, DNA fotoliasi (caratteri rosso), FAD binding (caratteri in blu), Deossiribodipirimidinefoliasi (evidenziato celeste), Crypto DASH (evidenziato grigio). L'allineamento di sequenza è stato prodotto grazie ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) un programma per l'allineamento di sequenze multiple. (“*” = identico; “:” = sostituzione conservata (stesso gruppo aminoacidico) “.” = sostituzione semi-conservata)

Poplar eFP Browser at bar.utoronto.ca

Wilkins et al., 2005 Plant Physiol. 149:981-993

Poplar eFP Browser Developmental Series. Data from the Campbell Laboratory. Affymetrix expression data normalized by the GCOS method, with a TGT value of 500. Duplicate or triplicate samples were analyzed from greenhouse-grown or field-grown material (in the case of the catkins). The seedlings were grown on moist filter paper. All material was grown under a diurnal cycle of 12h light/dark and sampled at midday, except for the xylem samples, which were sampled at midnight.

PtpAttk.2025111.1.51_at fgenes4_pg.C_Lg_I001055



Images drawn by Josephine McKeever and Nicholas Provart. Poplar eFP Browser implemented by Justin Fozang and Hardeep Nahal.

Figura 3.10. Espressione media del gene Poplar_fgenes4_pg.C_Lg_I001055 nelle varie parti del pioppo utilizzando il Poplar GeneChip (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgibin/efpWeb>.)

2.2 Localizzazione intracellulare di UVR3

Per comprendere il ruolo di questa proteina è indispensabile stabilirne la distribuzione intracellulare. Sono stati effettuati due tipi di costrutto, uno con la proteina fluorescente in posizione carbossi-terminale (UVR-YFP, UV Repair Defective 3-Yellow Fluorescent Protein) e uno con la proteina fluorescente in posizione amino-terminale (GFP-UVR, Green Fluorescent Protein-UV Repair Defective 3); ciò è stato possibile grazie all'utilizzo di overlap pcr per la rimozione con mutazioni silenziose dei siti di taglio degli enzimi di restrizione all'interno della proteina stessa.

Dalle immagini ottenute con il microscopio confocale è possibile vedere che la distribuzione cellulare della proteina è a livello del nucleo (figura 3.11).

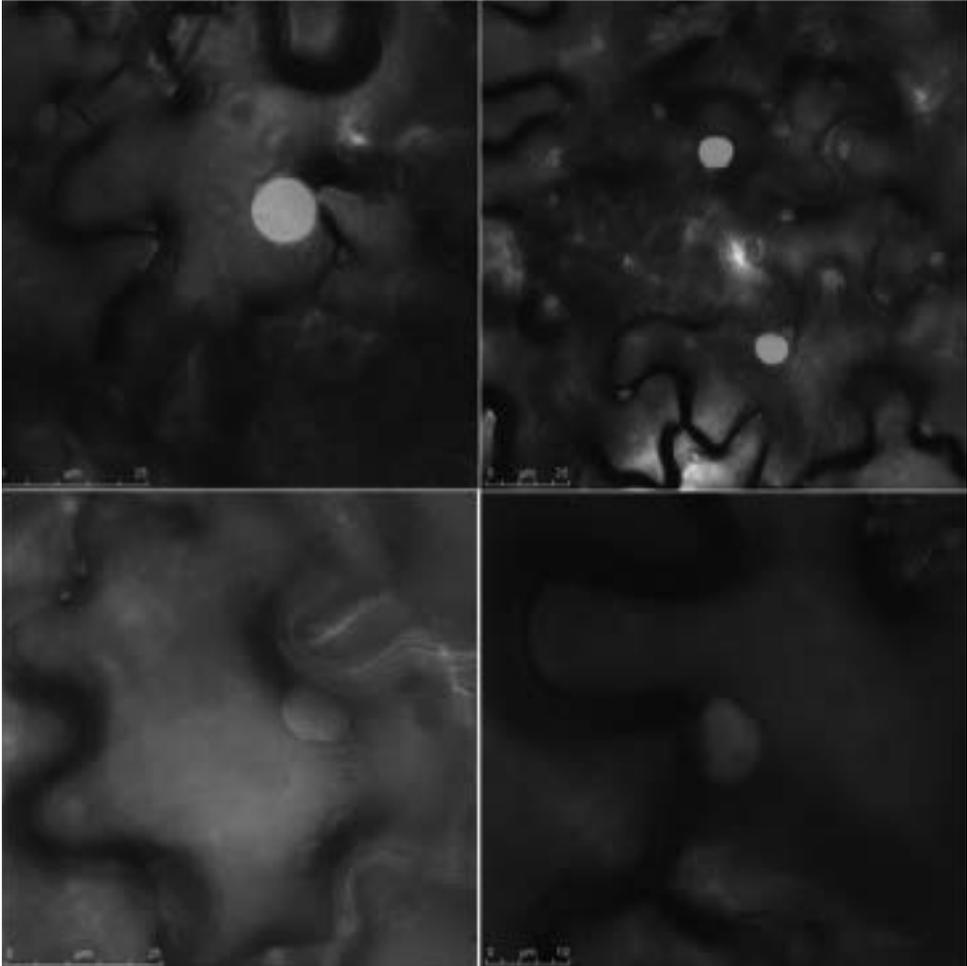


Figura 3.11. Distribuzione intracellulare di GFP-UVR e UVR-YFP. Immagini al confocale di cellule dell'epidermide fogliare di tabacco 3 giorni dopo infiltrazione con *A. tumefaciens* GFP-UVR e UVR-YFP (O.D.600= 0.2) La localizzazione sia di GFP-UVR (A-B, verde) e UVR-YFP (C-D viola) è a livello nucleare, i cloroplasti sono colorati in tutte le immagini di viola. Scale bars: 5 μ m (A,B,C) e 2 μ m (D)

2.3 Studio della funzione di UVR3 con l'utilizzo delle SALK LINE

Per caratterizzare la funzione del gene UVR3, sono stati studiati mutanti di Arabidopsis ottenuti dalla collezione SALK T-DNA.

Dopo la genotipizzazione e la selezione delle piante omozigoti per l'inserzione del T-DNA, è stata analizzata l'espressione genica attraverso estrazione di RNA e successiva retrotrascrizione. Nonostante l'inserzione del T-DNA, UVR3 era espressa in entrambe le linee salk che sono state esaminate e il prodotto di amplificazione di PCR era visibile dopo 25 cicli sia nel wild-type che nelle piante mutanti (figura 3.12). Invece, l'inserzione del T-DNA nel promotore del gene UVR3 nella SALK_004707 porta ad un silenziamento del gene. Anche dopo 40 cicli nel mutante il gene non risulta espresso (figura 3.12).

L'ottenimento di una linea mutante dove il gene non viene espresso è un notevole vantaggio che permette di poter comprendere il ruolo di questo gene nei ritmi circadiani.

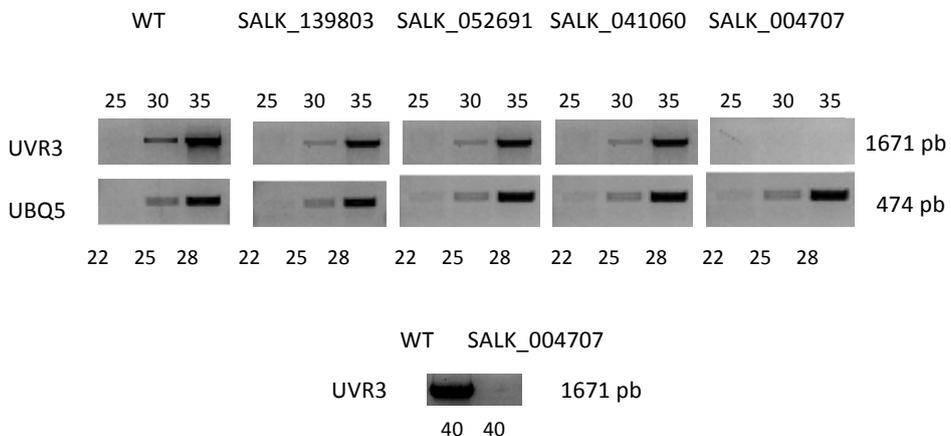


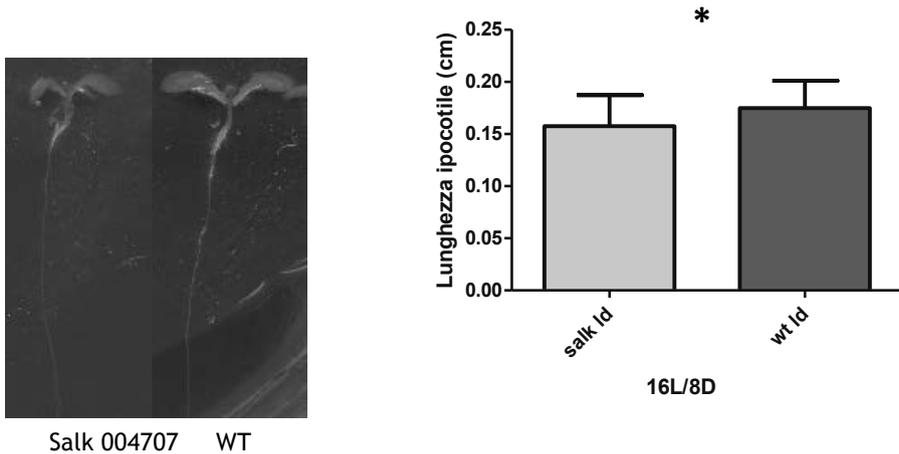
Figura 3.12. UVR3 è silenziato nella SALK 004707. Dopo la retrotrascrizione del mRNA totale estratto da piante wildtype e mutanti (tabella A9 dell'appendice), cDNA di UVR3 è stato amplificato utilizzando primer specifici di PCR (per le condizioni di PCR guardare tabella A7 e A8 dell'appendice). Per poter comparare l'espressione nelle piante wildtype e in quelle mutanti, la reazione di PCR è stata interrotta dopo 22,25,28,30 e 35 cicli. Una banda specifica di amplificazione era visibile dopo 30 cicli e ancor di più a 35 sia nel wild type che nelle salk line 139803, 052691, 041060, dimostrando così che in queste salk line il gene non risulta essere silenziato, invece risulta essere completamente silenziato nella salk004707, infatti anche dopo 40 cicli di pcr non risulta essere visibile nessuna banda. Come gene di riferimento è stato utilizzato ubiquitina 5

2.4 Allungamento dell'ipocotile

In Arabidopsis, la crescita dell'ipocotile dipende dal fotoperiodo (Nozue et al., 2007), per cui sono state condotte prove sull'accrescimento dell'ipocotile, su WT e SALK 004707, sia in condizioni di buio continuo che in condizioni di 16 ore di luce e 8 di buio. Dopo sette giorni sono stati misurati e analizzati per vedere se le differenze di

accrescimento erano significative. Il numero di piantine analizzato per trattamento di luce è 50, e le prove sono state ripetute due volte. In entrambe le condizioni gli ipocotili dei mutanti sono più corti, con differenza che è risultata significativa (figura 3.13).

A.



B.

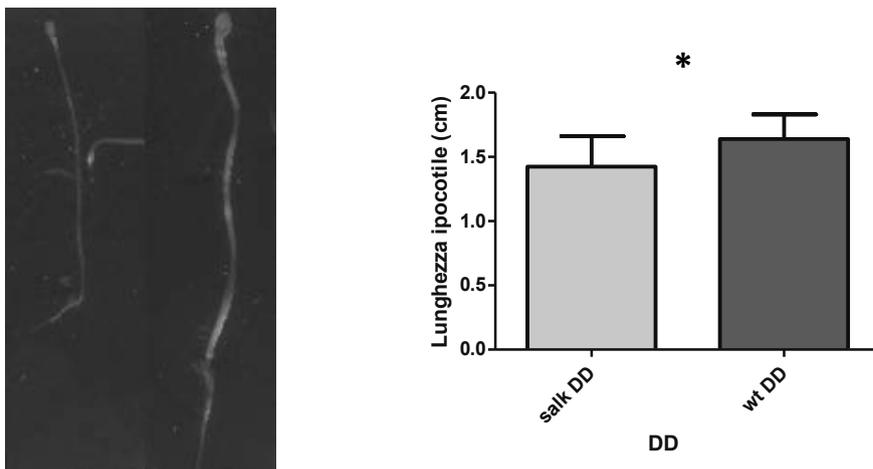


Figura 3.13. Allungamento dell'ipocotile. Prove sull'allungamento dell'ipocotile, su Salk 004707 e WT, sono state condotte sia in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio (A) e in condizioni di buio continuo (B). In entrambi i casi le piantine dei mutanti risultavano avere un allungamento dell'ipocotile ridotto. Le barre indicano la deviazione standard. Gli asterischi indicano la differenza significativa dell'allungamento dell'ipocotile fra la Salk 004707 e il WT ($P < 0.05$). Tale differenza risulta significativa

2.5 Fioritura

Dal momento che l'orologio circadiano è associato con il controllo fotoperiodico della fioritura, è stato esaminata la salk 004707 per vedere un'alterata fioritura connessa al fotoperiodo comparando il tempo di fioritura sia in condizioni di giorno lungo (LD; 16

ore di luce/8 ore di buio) e giorno breve (SD; 10 ore di luce/14 ore di buio; 10L/14D). Ad oggi sono disponibili solamente i dati parziali di fioritura in condizioni di giorno lungo, mostrando un ritardo della fioritura di circa 10 giorni rispetto al WT (figura 3.14).

Da questi primi dati si osserva come la crescita dell'ipocotile e il tempo di fioritura del mutante *uvr3* indicano che *UVR3* è coinvolto nel controllo fotoperiodico di questi fenotipi.



Figura 3.14. Tempo di fioritura. Confronto fra SALK 004707 e WT Col (0) in condizioni di crescita con 16 ore di luce e 8 ore di buio

3. Analisi dell'espressione genica

Piante di *Arabidopsis* sono state allevate in vitro per 7 giorni con un ciclo di 16 ore di luce e 8 di buio, e 22°C di giorno e 21°C la notte. Dopo sono state mantenute in condizioni di luce e temperatura costante. Ogni 4 ore è stato effettuato il campionamento di circa 40 piantine per volta. I geni analizzati oltre a TAF12B e UVR3, oggetto dello studio, sono stati anche CCA1, TOC1 e CRY1, elementi del nucleo oscillatore centrale di *Arabidopsis*. Dopo l'estrazione di RNA e retroscrizione si è provveduto ad effettuare real-time PCR con l'utilizzo di Sybr-green. L'espressione dei geni è stata normalizzata grazie all'utilizzo di UBQ10 come gene di riferimento. Per il calcolo è stato tenuto conto delle diverse efficienze di reazione utilizzando i valori forniti dal software Corbett. In alcuni casi, per una migliore visualizzazione grafica, i geni sono poi stati normalizzati sul valore massimo. La prova è stata ripetuta due volte.

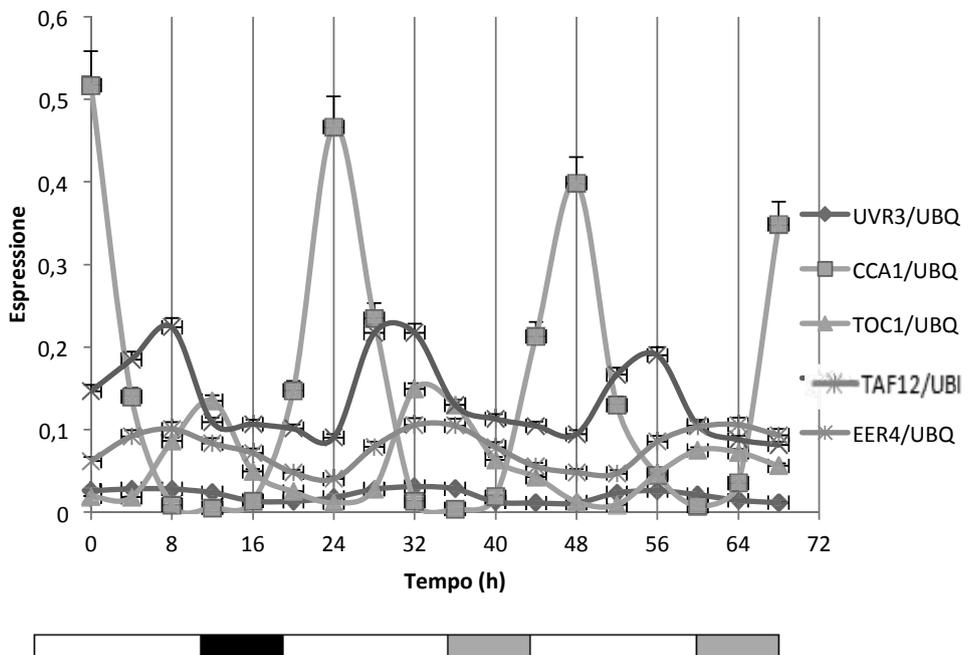


Figura 3.15. Espressione dei geni del nucleo centrale dell'orologio circadiano, CCA1, TOC1 e i geni TAF12B, CRY1 e UVR3. Su piante di 7 giorni di *Arabidopsis* Col-0 allevate in piastra con cicli di 16 ore di luce e 8 ore di buio è stata monitorata l'espressione genica tramite l'utilizzo di qPCR per 24 ore in condizione di luce/buio (16 ore di luce e 8 ore di buio) e poi per 48 ore in condizioni di luce continua LL. I campionamenti sono stati effettuati ogni 4 ore. I valori e le barre di errore rappresentano la media e l'errore standard per n=2 esperimenti. Le barre bianche indicano luce, quella nera indica la notte e quelle grigie si riferiscono al momento in cui ci sarebbe stato buio, ma invece c'è luce. La stima dei periodi e della probabilità che il ritmo best-fit ha un'ampiezza significativa con l'utilizzo di COSOPT sono riportati nella tabella 3.1.

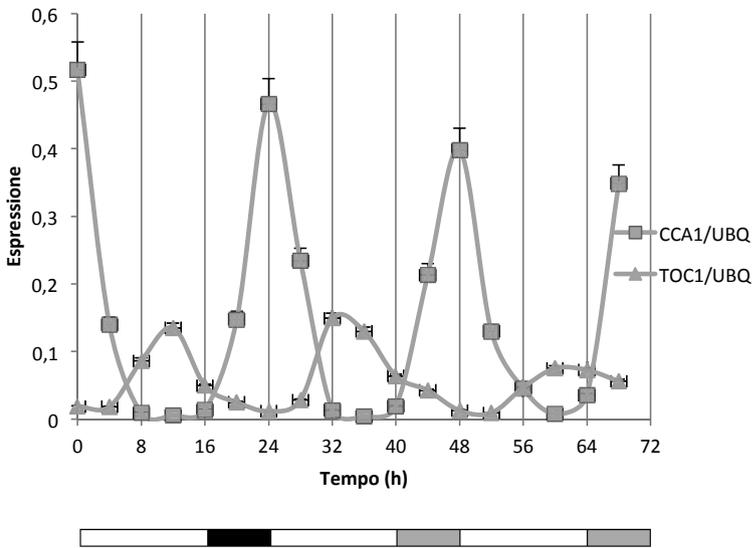


Figura 3.16. Espressione dei geni del nucleo centrale dell'orologio circadiano, CCA1, TOC1. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio

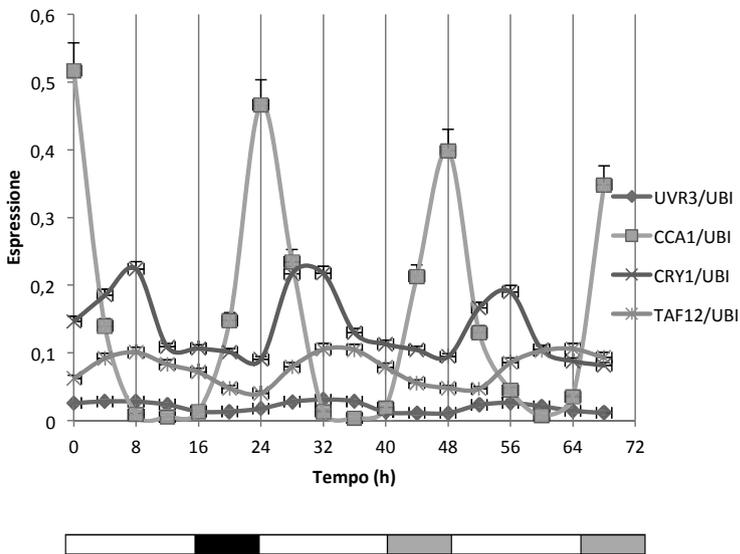


Figura 3.17. Espressione dei geni CCA1, UVR3, TAF12B e CRY1. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. È da notare come l'espressione dei geni UVR3, TAF12B e CRY1 risulti sfalsata nel tempo rispetto a quella di CCA1. Questo conferma il fatto che in ognuno dei promotori dei tre geni è presente la sequenza di legame per il gene CCA1, in grado di promuovere l'espressione degli stessi

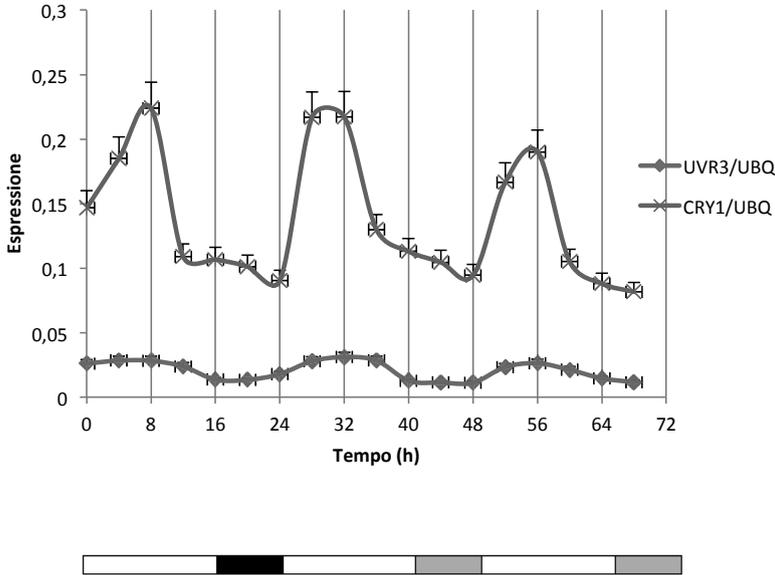


Figura 3.18. Espressione del gene CRY1 e UVR3. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. È da notare come l'espressione del gene CRY1 risulti maggiore di quella di UVR3

CCA1

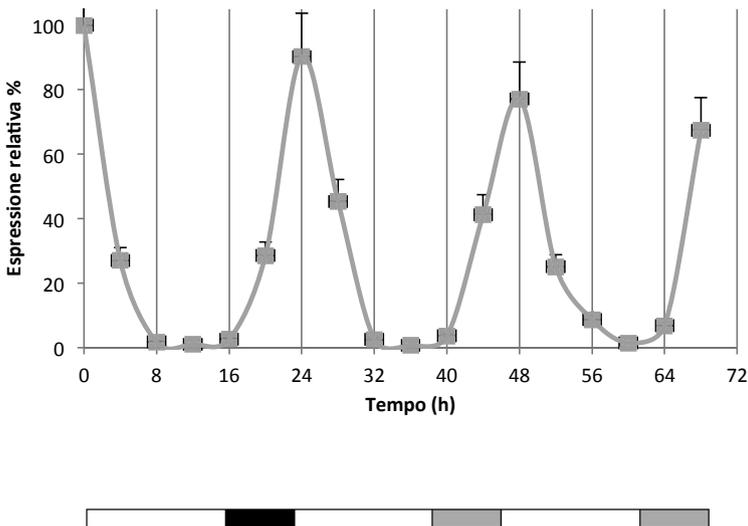


Figura 3.19. Espressione del gene CCA1. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. L'espressione è massima all'alba. I valori sono stati normalizzati successivamente sul valore massimo (impostato a 100)

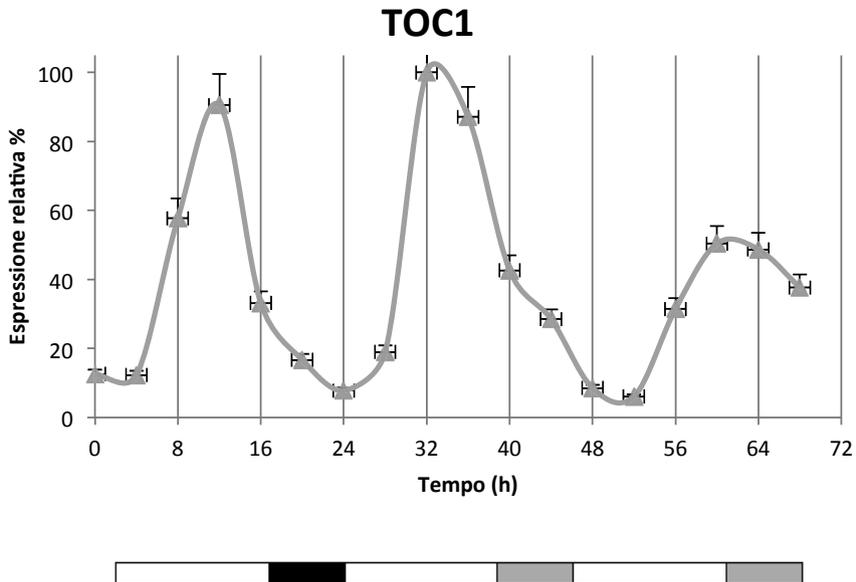


Figura 3.20. Espressione del gene TOC1. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. L'espressione è massima verso il tramonto. I valori sono stati normalizzati successivamente sul valore massimo (impostato a 100)

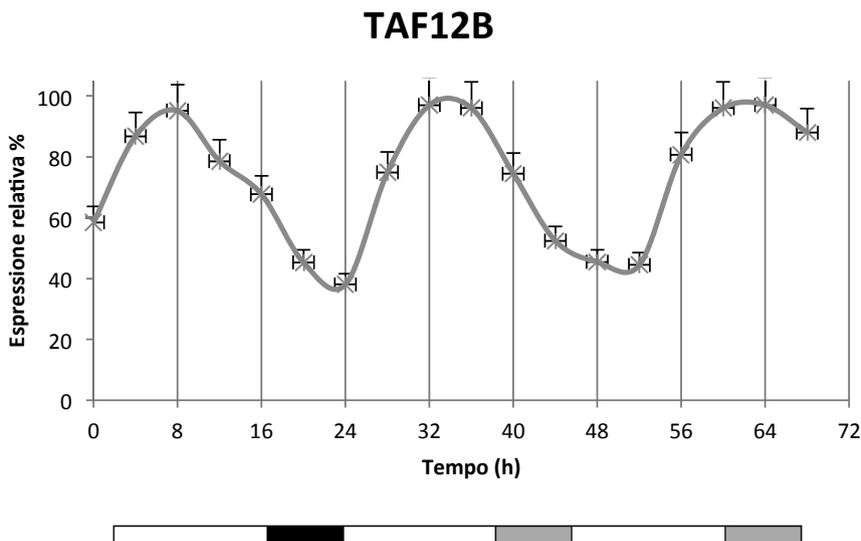


Figura 3.21. Espressione del gene TAF12B. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. I valori sono stati normalizzati successivamente sul valore massimo (impostato a 100)

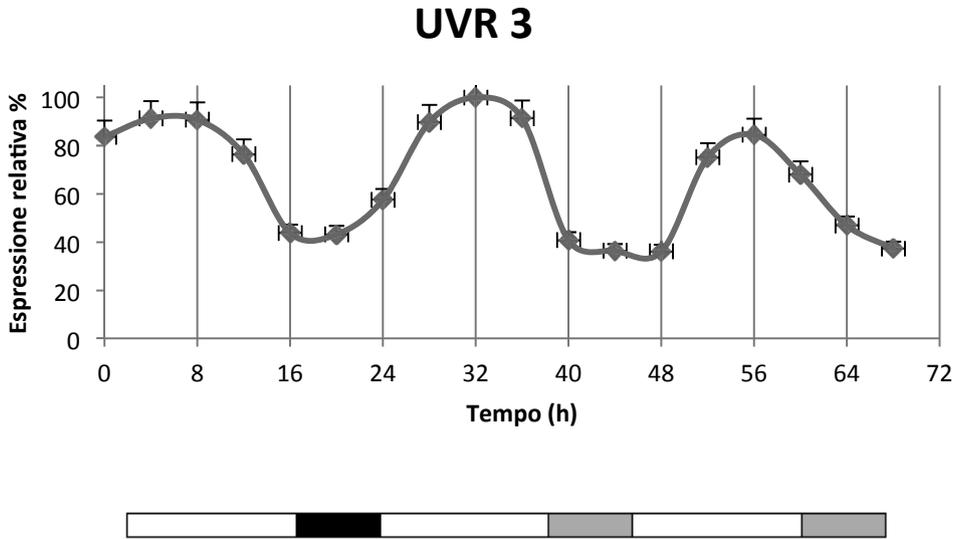


Figura 3.22. Espressione del gene UVR3. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. I valori sono stati normalizzati successivamente sul valore massimo (impostato a 100)

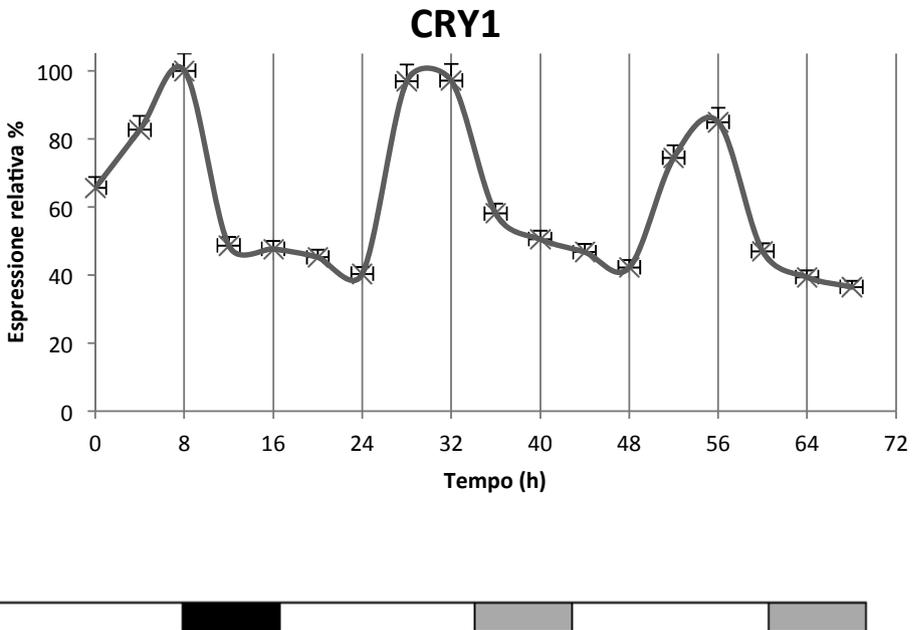


Figura 3.23. Espressione del gene CRY1. L'espressione genica è stata monitorata per 24 ore in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e successive 48 ore di luce costante, grazie all'utilizzo di qPCR. I valori e le barre di errore sono le medie e l'errore standard per n=2 esperimenti. Barre bianche-luce, barre nere-buio, barre grigie-luce al posto di buio. I valori sono stati normalizzati successivamente sul valore massimo (impostato a 100)

I dati forniti dalla qPCR provenienti dai campionamenti delle 48 ore di luce continua (LL) sono stati analizzati con COSOPT per stimare il periodo e la probabilità che il ritmo di espressione genica abbia un andamento circadiano. Per far ciò è stato utilizzato il software COSOPT. Il valore soglia di pMMC- β per accettare che un gene sia trascritto con una ritmicità circadiana è $<$ di 0.05. Dai risultati ogni gene analizzato può essere considerato avere una ritmicità circadiana.

Tabella 3.1. Analisi dei ritmi circadiani in luce costante

GENE	PERIODO	pMMC- β
CCA1	23.4	0.0105
TOC1	27.2	0.0182
TAF12B	28.5	0.0101
UVR3	23.7	0.0222
CRY1	22.2	0.0376

Capitolo 4

Discussione

1. TAF12B

L'omologia delle sequenze delle proteine TAF12b di *Arabidopsis* e CLOCK di *Homo sapiens* risulta essere solamente del 25%. L'analisi degli elementi tipici delle proteine coinvolte nei ritmi circadiani ha evidenziato, all'interno della sequenza di TAF12B, la presenza di numerose poli-glutammine, poliQ. In molti organismi, questo tratto contribuisce all'interazione proteina-proteina. I motivi poliQ sono spesso molto rappresentati nelle proteine clock coinvolti nei ritmi circadiani nei mammiferi, pesci e funghi (Avivi et al., 2001; Ambra et al., 2004; Michael et al., 2007, O'Malley and Banks, 2008). Nelle piante, i motivi poliQ sono stati descritti in varie proteine coinvolte nella regolazione del tempo di fioritura, come in FCA (Lindqvist et al., 2007) e nelle proteine coinvolte nella morfogenesi florale APETALA1, SEPALLATA3, LEUNIG and SEUSS (Conner et al., 2000; Sridhar et al., 2006).

Il numero dei residui di PoliQ nella proteina orologio ELF3 può variare 4 volte a seconda dell'accessioni di *Arabidopsis* e risulta essere correlato con il periodo e la fase dei ritmi circadiani (Tajima et al., 2007). Inoltre i motivi poliQ sono presenti in PFT1, un altro regolatore del tempo di fioritura (Cerdán and Chory, 2003). Purtroppo la funzione delle regioni poliQ nella regolazione della trascrizione in pianta non risulta ad oggi essere chiaro. Le proteine di mammifero, che contengono domini poliQ, interagiscono con fattori di trascrizione contenenti poliQ a loro volta, regolandone l'attività di regolazione dell'espressione (Bennett et al., 2005).

Grazie alla costruzione di un proteina chimera fluorescente è stato possibile, con l'ausilio del microscopio confocale, individuare la localizzazione a livello cellulare della proteina TAF12B. La suddetta proteina si localizza nel nucleo suggerendone un ruolo di regolazione della trascrizione in maniera diretta, legandosi direttamente al DNA, o in maniera indiretta andando ad interagire con altri fattori di trascrizione, ad esempio utilizzando le regioni poli-Q di cui risulta essere molto ricca.

L'analisi del fenotipo dei mutanti di TAF12B non è stata possibile. Infatti in nessuna delle Salk-Line per il gene in questione, disponibili ad oggi, il gene risulta completamente o parzialmente silenziato. Non è stato possibile lo studio di piante dove il gene risulta over-espresso, nonostante i numerosi tentativi effettuati per ottenere piante completamente trasformate. Le piante ottenute, che risultavano parzialmente trasformate, mostravano un fenotipo fortemente alterato. Infatti il promotore utilizzato per l'espressione della proteina chimera TAF12B-YFP non è quello endogeno, ma bensì il 35 S, del virus del mosaico del tabacco, che determina alti livelli costitutivi dell'espressione della proteina. Lo sviluppo di queste piantine risultava essere bloccato. La mancanza di linee dove il gene è silenziato può suggerire che l'assenza della proteina ne provoca la morte, invece l'abbondanza della proteina ne provoca un blocco dello sviluppo. Tutto ciò può suggerire che la proteina in questione svolga un ruolo di vitale importanza per il normale sviluppo della pianta.

L'analisi dell'espressione genica nel WT ha mostrato che il gene TAF12B viene espresso nel corso di un'intera giornata in maniera ritmica. L'analisi della sequenza del promotore ha permesso di individuare, al suo interno, la presenza del "morning element", elemento tipico dei geni che vengono attivati dalla proteina CCA1. Infatti è possibile vedere che il picco di espressione è a metà della giornata, ovviamente successivo a quello del gene CCA1. Questo suggerisce che la proteina TAF12B sia strettamente collegata con il nucleo oscillatore centrale e allo stesso tempo che la sua funzione si svolga durante il giorno; infatti il livello dell'espressione del gene risulta minimo durante la notte. La misura del periodo dell'espressione del gene TAF12 B nel free-running è di 28 ore e mezza risultando essere estremamente significativo, quindi la sua espressione può essere considerata circadiana.

2. UVR3

I criptocromi e le fotoliasi appartengono alla famiglia delle flavoproteine, largamente distribuite sia nei batteri che negli eucarioti (Cashmore et al., 1999; Brudler et al., 2003). I criptocromi mostrano una sequenza simile alle fotoliasi, la cui funzione è quella di riparare danni del DNA in seguito ad esposizione a UV, ma non possiedono questa funzione riparatrice del DNA e di solito possiedono un'estensione a livello C-terminale (Todo, 1999).

I criptocromi delle piante si differenziano in fotorecettori per la luce blu, verde e UV-A e sono responsabili della fotomorfogenesi (Briggs and Huala, 1999), un fenomeno per il quale la crescita delle piante sotto la luce determina la differenziazione dei cloroplasti, accumulo di clorofilla, espansione fogliare. Inoltre, i CRY sono coinvolti nei ritmi circadiani, nello sviluppo e nella regolazione della crescita.

Tutti i criptocromi posseggono una similarità di sequenza in posizione N-terminale grazie alla presenza del dominio PHR con attività fotoliasica, comportandosi da fotorecettori non solo in pianta ma anche nei batteri, insetti, coralli, pesci, uccelli e mammiferi (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998; Ceriani et al., 1999; Selby et al., 2000; Cermakian et al., 2002). Basandosi sull'analisi filogenetica, la superfamiglia delle fotoliasi/criptocromi è stata divisa in 5 sottofamiglie: CPD (cyclobutane pyrimidine dimer) fotoliasi (fotoliasi senza ulteriori qualificazioni si riferiscono a CPD fotoliasi), 6-4 fotoliasi, criptocromi delle piante, criptocromi degli animali, e CRY-DASH (Partch and Sanzar, 2005).

In seguito all'esposizione a radiazioni UV si possono generare due tipi principali di danni al DNA: i dimeri di ciclo butano-pirimidine (CPD), e in frequenza minore i dimeri pirimidine (6-4) pirimidinone (prodotti 6-4) che vengono riparati rispettivamente dalle fotoliasi CPD e fotoliasi 6-4 (Sancar, 2000). *Arabidopsis* possiede entrambi i tipi di fotoliasi oltre a CRY1, CRY2, e CRY-DASH (CRY3) (Ahmad et al., 1997). Infatti l'analisi condotta per individuare la presenza di eventuali paraloghi di UVR3 in *Arabidopsis* ha confermato questo risultato.

I criptocromi di tipo 1 negli animali agiscono come fotorecettori invece i criptocromi di tipo 2 agiscono come repressori della trascrizione indipendentemente dalla luce (light-independent transcription repressors) (Zhu et al., 2005; Yuan et al., 2007)

Molti criptocromi agiscono come: componenti essenziali dell'orologio circadiano nei mammiferi (Thresher et al., 1998; van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1999), funzione doppia di regolatore di trascrizione con attività fotoliasica in batteri, funghi e alghe (Hitomi et al., 2000; Bayram et al., 2008; Coesel et al., 2009), e recettori

dipendenti dalla luce in piante, uccelli e insetti (Ahmad et al., 2007; Liedvogel et al., 2007; Gegeer et al., 2008; Liedvogel and Mouritsen, 2009; Gegeer et al., 2010).

Le proteine appartenenti alla famiglia delle fotoliasi PHR e dei criptocromi CRY utilizzano il cofattore FAD per catalizzare la riparazione del DNA nelle PHR e nei CRY per regolare l'orologio circadiano e controllare lo sviluppo. UVR3 appartiene alla classe delle (6-4)PHR. L'omologia di sequenza fra le proteine UVR3 di *Arabidopsis* e CRY1 di *Homo sapiens* risulta essere molto alta, pari al 50%. In particolare l'allineamento di sequenza mostra come queste due proteine presentino un'identità di sequenza alta, in particolare nelle sequenze motivo, DNA fotoliasi, FAD binding, in posizione amino-terminale e Deossiribodipirimidinafotoliasi, Crypto DASH in posizione carbossi-terminale.

Lo studio di Li et al., 2010 ha mostrato come la struttura cristallografica della proteina presenti dei residui e motivi chiave che controllano l'accesso alla molecola FAD. La sua attività risulta essere conservata suggerendo che, la regolazione delle proprietà redox di FAD e, la sua stabilità sia essenziale non solo per riparare i foto prodotti (6-4) del DNA, ma anche nelle funzioni di regolazione dell'orologio dei CRY.

La localizzazione cellulare di UVR3, grazie alla creazione di costrutti della proteina con proteine fluorescenti, avviene a livello del nucleo. Questo potrebbe suggerire che UVR3 possa agire anche sulla regolazione dell'espressione oltre all'attività fotoliasica già precedentemente testata in altri studi di riparazione di danni da UV.

L'analisi della sequenza del promotore del gene UVR3 ha permesso di identificare anche in questo caso la presenza del "morning element". Infatti andando ad analizzare l'espressione del gene è possibile vedere che possiede un andamento circadiano e il picco massimo di espressione avviene a metà giornata. La cosa interessante da notare è come l'espressione di questo gene rispecchi quella di CRY1 di *Arabidopsis* anche se risulta essere molto inferiore. Anche in condizioni di free-running, luce continua, UVR3 mantiene la periodicità tipica dei geni coinvolti nei ritmi circadiani con un periodo di 23,7 ore, maggiore rispetto a quello di CRY1 che è di 22,2 ore.

La presenza per UVR3 di una linea SALK, 004707, in cui il gene risulta essere silenziato, è di notevole aiuto per comprendere il ruolo di questo gene nei ritmi circadiani. Infatti, molti mutanti di *Arabidopsis* con funzioni dell'orologio alterate contengono difetti nel controllo fotoperiodico della fioritura e nell'allungamento dell'ipocotile, portando ad un fenotipo dove la fioritura risulta essere anticipata o posticipata o ad un allungamento maggiore o minore dell'ipocotile rispetto al WT (Suarez-Lopez et al., 2001; Doyle et al., 2002; Nozue et al., 2007). Yanovsky and Kay, 2002). L'analisi del fenotipo della salk line di *uvr3* è risultata essere interessante. Infatti, in condizioni di trattamento di luce differenti, l'ipocotile mostra un allungamento significativamente minore rispetto al WT e un ritardo nella fioritura. Da questi primi dati si osserva come la crescita dell'ipocotile e il tempo di fioritura del mutante *uvr3* siano diversi rispetto al WT indicando che UVR3 possa essere coinvolto nel controllo foto periodico di questi fenotipi.

La struttura molecolare di UVR3 e il fenotipo di *uvr3* suggeriscono un'interessante possibilità: ovvero che la proteina in questione svolga un duplice ruolo, che funzioni sia come riparatrice di danni da UV e come criptocromo nella regolazione dei ritmi circadiani.

3. Conclusioni

Numerose proteine che si legano al DNA, proteine che posseggono domini PAS (PER-ARNT-SIM) e fotorecettori sono state identificate essere coinvolte nella funzione e regolazione dell'orologio circadiano negli eucarioti (Dunlap, 1999; Somers et al., 2000). I risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica dimostrano che le proteine UVR3 e TAF12B possano essere coinvolte nell'oscillatore circadiano. Saranno necessarie ulteriori prove per definire meglio il coinvolgimento di questi geni nel quadro dell'orologio, infatti ad oggi non è possibile definirne una specifica collocazione all'interno dell'orologio con un coinvolgimento primario o semplicemente con un ruolo di slave oscillator. L'eventuale identificazione di altri mutanti e proteine sicuramente chiarirà l'esatta funzione di TAF12B e UVR3 nell'orologio circadiano. Partendo da questa base sarà poi possibile investigare il ruolo di queste proteine anche in *Populus trichocarpa*.

APPENDICE

Tabella A1. Substrati di crescita

SUBSTRATO	FORMULAZIONE
LB liquido	10 g/l bacto peptone-trytone, 5 g/lyeast extract, 10 g/l NaCl pH 6.0
LB solido	10 g/l bacto peptone-trytone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, 10 g/l agar pH 6.0
YT	16 g/l bacto-trytone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, pH 7.0
MS1/2forza	4.33 g/L MS 30 g/L sucrose 7 g/L agar pH 5.7

Tabella A2. Soluzioni e Antibiotici

SOLUZIONI	FORMULAZIONE
Gentamicina	Soluzione stock 25 mg/ml in acqua
Kanamicina	Soluzione stock 100 mg/ml in acqua
IF	20 mM Na ₃ (PO ₄), 500 mM MES, 200mM acetosyringone, 5 mg/ml glucose
Loading Buffer 10X	35% glycerol, 2.5 g/l bromophenol blue in TAE 10X
P1	1 mM EDTA, 50 mM TRIS. pH 8.0
P2	0.2 N NaOH, 1% SDS
P3	11.5% acetic acid, 3 M potassium acetate. pH 5.5
TAE 50X	2 M Tris base, 1 M glacial acetic acid, 0.1M Na ₂ EDTA·2H ₂ O
TFBI	30 mM KC ₂ H ₃ O ₂ , 100 mM RbCl, 10mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 50 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O, 15% glycerol. pH 5.8 with 0.2 M CH ₃ COOH.
TFBII	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 15% glycerol. pH 6.6 with 1 M KOH
Buffer di estrazione (per il DNA genomico di Arabidopsis)	200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS

Tabella A3. Kit ed enzimi

KIT ED ENZIMI	FORNITORE
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (www.qiagen.com)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (www.qiagen.com)
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (www.qiagen.com)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas (www.fermentas.com)
Ribonuclease A	Fermentas (www.fermentas.com)
XbaI, Sal, Bam, SacI	Fermentas (www.fermentas.com)
SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen (www.invitrogen.com)
T4 DNA ligase	Invitrogen (www.invitrogen.com)
GoTaq DNA polymerase	Promega (www.promega.com)

Tabella A4. Lista dei primer usati in questo studio

PRIMER	SEQUENZA	GENE
GS3 F	CAGGACGTCTAGATGGCGGAACCGATTCCC	TAF12B Xba
GS4 R	CATGACCGTCGACTTGTATCGTGTGCATGTG	TAF12B Sal
GS5 F	GGTGCTGGATCCGGTGCCATGGCGGAACCG	TAF12B Bam
GS6 R	GCGCCGGAGCTCTTAGTATCGTGTGCATGTG	TAF12B Sac
GS13 F	ATGCAACGATTCTGCGTCTGTTACCTTCA	cDNA UVR3
GS14 R	CTATTTGAGTTTTGGTCGTTGGTTCCTGAT	cDNA UVR3
GS15 F	CAGGACGTCTAGATGCAACGATTCTGCGTC	UVR3 Xba
GS16 R	CATGACCGTCGACTTCTATTTGAGTTTTGGTC- GTTGGTT	UVR3 Sal
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	SALK
SP1LP	ACGAGGATCATGCTATGTTGG	SALK_041060
SP2RP	AATGCATATGCTTCACCCATC	SALK_041060
SP3LP	TTTTGAAGCGATATTGTTTCGTG	SALK_004707
SP4RP	CTGTTGGCTTAAGCATGCTTC	SALK_004707
33LP	GTAGGGTTGGGAGAGGAGATG	SALK_025793
34RP	CAGGTCCTAGAAAACCGGAAC	SALK_025793
37LP	ACATTGGGATTTGCTGTGAAG	SALK_132293
38RP	CGGAAAAATCTCCAAATAAGAATG	SALK_132293
39LP	TCTGACTCCATATAATGCGGG	SALK_139803
40RP	TCGGAACCTGATTACGTCAAC	SALK_139803
41LP	CGTGAACCAAGTTTCTTCAGG	SALK_052691
42RP	TGTTGTCTCACGGAGGAGAAG	SALK_052691
GS5F	GTACCCTCGCCGACTACAAC	UBQ5
GS6R	CAAGCTTCAACTCCTTCTTTC	UBQ5
SP66	CAATGGCTACTGGGTCCGGTTCCTG	Overlap UVR3
SP67	CAGTGAACCGGACCCAGTAGCCATTG	Overlap UVR3
SP68	GGGGTAAACCGAATCCGGTTCTTGC	Overlap UVR3
SP69	GCAAGAACCGGATTCGGTTTACCCC	Overlap UVR3
SP70	GGTGCTGGATCCGGTGCCATGCAACGATTC	UVR3 Bam

SP71	GCGCCGGAGCTCCTATTTGAGTTTTGG	UVR3 Sac
SP1F	CTGAGCCAAATTCAGCAACA	Rt TAF12b
SP2R	GAGCCACCAAAGTTCATGGT	Rt TAF12b
SP3F	TCCGGTTCTTGCTTGAGAGT	Rt UVR3
SP4R	CAAAGCAAAGCCTCTTCACC	Rt UVR3
SP5F	ATCCTCGAAAGACGGGAAGT	Rt CCA1
SP6R	TCAGGCTTTGATTGTTGTCG	Rt CCA1
SP11F	GATTCCACGAGTTTGGGAGA	Rt TOC1
SP12R	CCTTAGCCATTGGGAGATCA	Rt TOC1
SP13F	ACCCTAACGGGAAAGACGAT	Rt UBQ10
SP14R	GAGTTCTGCCATCCTCCAAC	Rt UBQ10
SP17	TTGGTGTTTGAGGATGACTCTG	Rt CRY1
SP18	CTATCGGCTTTTCTGCGGT	Rt CRY1

Tabella A5. Reagenti per PCR con l'utilizzo di *Pfu* DNA Polimerasi

Reagente	Volume finale e concentrazione
<i>Pfu</i> buffer 10X	20 μ l (1X)
DNA template	1 μ l (1-5 ng)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	1 μ l (2.5 U)
dNTPs (100 mM)	4 μ l (2 mM)
Primer sense (100 μ moles/ μ l)	0.6 μ l (0.3 μ M)
Primer antisense (100 μ moles/ μ l)	0.6 μ l (0.3 μ M)
H ₂ O	Fino a 200 μ l

Tabella A6. Protocollo amplificazione della PCR con utilizzo di *Pfu* DNA Polymerasi

Temperatura	Tempo	Numero di cicli
94°C	4 min	1
94°C	30 sec	
50-52°C	45 sec	20
72°C	variabile	
72°C	4 min	1

Tabella A7. Reagenti per PCR con l'utilizzo di *Taq* Polimerasi

Reagente	Volume finale e concentrazione
<i>Taq</i> buffer 5X	5 μ l (1X)
DNA template	1 μ l (1-5 ng)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0.2 μ l (0.25 U)
dNTPs (100 mM)	4 μ l (2 mM)
Primer sense (100 μ moles/ μ l)	0.6 μ l (0.3 μ M)
Primer antisense (100 μ moles/ μ l)	0.6 μ l (0.3 μ M)
MgCl ₂ solution(25 mM)	2 μ l (2 mM)
H ₂ O	Fino a 25 μ l

Tabella A8. Protocollo amplificazione della PCR con utilizzo di *Taq* Polymerasi

Temperatura	Tempo	Numero di cicli
94°C	2 min	1
94°C	30 sec	
55°C	45 sec	20
72°C	variabile	
72°C	5 min	1

Tabella A9. Reagenti per RT-PCR e protocollo di amplificazione

Reagente	Volume finale e concentrazione
Fino a 5 µg RNA totale	n µl
Oligo(dT)20 (50 µM)	1 µl (6,25 µM)
Buffer di annealing	1 µl
H2O priva di RNasi/DNasi	Fino a 8 µl

Questa reazione è stata messa in incubazione a 65°C per 5 minuti e quindi messa in ghiaccio per almeno 1 minuto.

Tabella A10. Protocollo amplificazione della PCR con utilizzo di *Taq* Polymerasi

Reagente	Volume finale e concentrazione
First-Strand Reaction Mix (2X)	10 µl (1X)
SuperScriptIII/RNaseOUT Enzyme Mix	2 µl

Questa reazione è stata messa ad incubare a 50°C per 50 minuti.

Tabella A11. Reagenti per RealTime PCR con l'utilizzo di SybrGreen

Reagente	Volume finale e concentrazione
<i>Sybr Green Mix</i>	5 µl (1X)
DNA template	1 µl (1-5 ng)
Primer sense (100 µmoles/µl)	0.6 µl (0.3 µM)
Primer antisense (100 µmoles/µl)	0.6 µl (0.3 µM)
H2O	Fino a 25 µl

Tabella A12. Protocollo amplificazione per PCR Real Time con l'utilizzo di Sybr Green

Temperature	Time	Number of cycles
94°C	10 min	1
94°C	5 sec	
60°C	30 sec	40

Bibliografia

- Ahmad M, Cashmore AR, (1997). The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 11, 421–427.
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P, Kay SA, (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293, 880–883.
- Alabadi D, Yanovsky MJ, Mas P, Harmer SL, Kay SA, (2002). Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol*, 12, 757-761.
- Ambra R, Grimaldi B, Zamboni S, Filetici P, Macino G, Ballario P, (2004). Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of Tbwc-1, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*; *Fungal Genet. Biol.* 41 688–697.
- Avivi A, Albrecht U, Oster H, Joel A, Beiles A, Nevo A, (2001). Biological clock in total darkness: the Clock/MOP3 circadian system of the blind subterranean mole rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 13 751–13 756.
- Barak S, Tobin EM, Andronis C, Sugano S, Green RM, (2000). All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci* 5, 517–522.
- Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I, (2000). A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *Plant Cell* 12, 2201-18.
- Bauer D, Viczian A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KCS, Adam E, Fejes E, Schafer E, Nagy F, (2004). CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and multiple photoreceptors control degradation of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 1433-1445.
- Baurle I, Dean C, (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125, 655-664.
- Bennett EJ, Bennett NF, Bence R, Jayakumar R, Kopito RR, (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation, *Mol. Cell* 17, 351–365.
- Bent AF, 2000. *Arabidopsis in planta* transformation: Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* 124:1540-1547.
- Bretzl H,(1903). Botanische Forschungen des Alexanderzuges. *B.G. Teubner, Leipzig*, 120–132.
- Briggs WR, Huala E, (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 33–62.
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, (2003). Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Mol. Cell*, 11, 59–67.

- Bunning E, (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 54, 590-607.
- Carre IA, Kay SA, (1995). Multiple DNA-protein complexes at a circadian-regulated promoter element. *Plant Cell*, 7, 2039-2051.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YL, Liu D, (1999). Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.
- Cerdán PD, Chory J, (2003). Regulation of flowering time by light quality, *Nature* 423, 881-885.
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti A, (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285: 553-556.
- Cermakian N, Pando MP, Thompson CL, Pinchak AB, Selby CP, Gutierrez L, Wells DE, Cahill GM, Sancar A, Sassone-Corsi P: Light Induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. *Curr Biol* 2002, 12:844-848.
- Chen M, Schwab R, Chory J, (2003). Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 14493-14498.
- Chen M, Chory J, Fankhauser C, (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 87-117.
- Clough SJ, Bent AF, (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43.
- Conner J, Liu Z, (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97, 12902-12907.
- Coulter MW, Hamner KC, (1964). Photoperiodic flowering response of Biloxi soybean in 72-hour cycles. *Plant Physiol.*, 39, 848-856.
- Covington MF, Panda S, Liu XL, Strayer CA, Wagner DR, Kay SA, (2001). *ELF3* modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 1305-1315.
- Devlin PF, (2002). Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J. Exp. Bot.*, 53, 1535-1550.
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kevei E, Toth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA, (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, 309, 630-633.
- Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A, (2004). *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT*-like gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev.*, 18, 926-936.
- Dowson-Day MJ, Millar AJ, (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J.* 17, 63-71.
- Dunlap JC, (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- Edwards KD, Lynn JR, Gyula P, Nagy F, Millar AJ, (2005). Natural allelic variation in the

- temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics*, 170, 387-400.
- Edwards K D, Anderson PE, Hall A, Salathia NS, Locke JCW, Lynn J R, Straume M, Smith JQ, Millar AJ, (2006). FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 18, 639–650.
- Emery P, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M, (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated *cryptochrome*, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95: 669–679.
- Englemann W, Johnsson A, (1998). Rhythms in organ movement. In *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants* (Lumsden, P. J. and Millar, A. J., eds.), pp. 35–50, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Eriksson ME, Hanano S, Southern MM, Hall A, Millar AJ (2003). Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Planta*, 218, 159-162.
- Farre, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2005) Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr. Biol.*, 15, 47-54.
- Gardner MJ, Hubbard KE, Hotta CT, Dodd AN, Webb AAR, (2006). How plants tell the time. *Biochem. J.* 397, 15–24.
- Garner WW, Allard HA, (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.*, 18, 553-606.
- Gould PD, Locke JC, Larue C, Southern MM, Davis SJ, Hanano S, Moyle R, Milich R, Putterill J, Millar AJ, Hall A, (2006). The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 18, 1177-1187.
- Green RM, Tingay S, Wang ZY, Tobin EM, (2002). Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol*, 129, 576-584.
- Halberg F, Cornelissen G, Otsuka K, Katinas G, Schwartzkopff O, (2001). Essays on chronomics spawned by transdisciplinary chronobiology - witness in time: Earl Elmer Bakken. *Neuroendocrinol. Lett.*, 22, 359-384.
- Hall A, Bastow RM, Davis SJ, Hanano S, McWatters HG, Hibberd V, Doyle MR, Sung S, Halliday KJ, Amasino RM, Millar AJ, (2003). The *TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clocks. *Plant Cell*, 15, 2719-2729.
- Hamner KC, (1940). Interaction of light and darkness in photoperiodic induction. *Bot. Gaz.*, 101, 658-687.
- Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ, (2006). Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells*, 11, 1381-1392.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA, (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110–2113.

- Harmer SL, Panda S, Kay SA, (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 215–253.
- Harmer SL, Kay SA, (2005). Positive and negative factors confer phasespecific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1926–1940.
- Harmon FG, Imaizumi T, Kay SA, (2005). The plant circadian clock: review of a clockwork *Arabidopsis*. In (Hall, A.J.W., and McWatters, H.G.; eds.): Endogenous plant rhythms. *Annu. Plant Rev.*, 21, 1-23.
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 18, 2122-7.
- Hayama R, Coupland G, (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 13–19.
- Hazen SP, Schultz TF, Pruneda-Paz JL, Borevitz JO, Ecker JR, Kay SA (2005). *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 10387-10392.
- Heintzen C, Nater M, Apel K, Staiger D, (1997). ATGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 8515-8520.
- Hicks KA, Millar AJ, Carre IA, Somers DE, Straume M, Meeks-Wagner DR, Kay SA, (1996). Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis early flowering 3* mutant. *Science*, 274, 790-792.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK, (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* , 16,7351-7367.
- Ho SN, Hum HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR, (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77, 51-59.
- Jiang CZ, Yee J, Mitchell DL, Britt AB, (1997). Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94,14, 7441-7445.
- Johnson CH, (2001). Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 695–728.
- Johnson CH, (2005). Testing the adaptive value of circadian systems. *Circadian Rhythms*, 393, 818-837.
- Kapila J, de Rycke R, Van Montagu M, Angenon G. (1997). An *Agrobacterium* mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122, 101-108.
- Kikis EA, Khanna R, Quail PH, (2005). *ELF4* is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components *CCA1* and *LHY*. *Plant J.*, 44,300-313.

- Kim JY, Song HR, Taylor BL, Carre IA, (2003). Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *EMBO J.*, 22, 935-944.
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schafer E, Nagy F, (2002). Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell*, 14, 1541-1555.
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF, (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130, 2129-2141.
- Kuno N, Moller SG, Shinomura T, Xu XM, Chua NH, Furuya M, (2003). The novel Myb protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15, 2476-2488.
- Li J, Liu Z, Tan C, Guo X, Wang L, Sancar A, Zhong D, (2010). Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6-4) photoproduct by photolyase. *Nature*, 466(7308):887-890.
- Lin C, Shalitin D, (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 469-496.
- Lindqvist L, Laakkonen A, (2007). Polyglutamine variation in a flowering time protein correlates with island age in a Hawaiian plant radiation, *BMC Evol. Biol.* 7, 105.
- Locke JCW, Southern MM, Kozma-Bognar L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ, (2005). Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol. Syst. Biol.*, 1, 0013.
- Locke JCW, Kozma-Bognar L, Gould PD, Feher B, Kevei E, Nagy F, Turner MS, Hall A, Millar AJ, (2006). Experimental validation of a predicted feedback loop in the multioscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.*, 2, 59.
- Martin-Tryon EL, Kreps JA, Harmer SL, (2007). *GIGANTEA* acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiol.*, 143, 473-486.
- McClung CR, (2006). Plant Circadian Rhythms *The Plant Cell* 18:792-803.
- McClung CR, Salome SA, Michael TP, (2002). The *Arabidopsis* circadian system. In *The Arabidopsis Book* (Somerville, C. R. and Meyerowitz, E. M., eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville.
- McWatters HG, Bastow RM, Hall A, Millar AJ, (2000). The *ELF3* Zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature*, 408, 716-720.
- Michael TP, Salome PA, McClung CR, (2003). Two *Arabidopsis* circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 6878-6883.
- Michael TP, Park S, Kim TS, Booth J, Byer A, Sun Q, Chory J, Lee K, (2007). Simple sequence repeats provide a substrate for phenotypic variation in the *Neurospora crassa* circadian clock. *PLoS ONE* 2, 795.

- Millar AJ, Kay SA, (1991). Circadian control of cab gene transcription and mRNA accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* 3, 541–550.
- Millar AJ, (2004). Input signals to the plant circadian clock. *J. Exp. Bot.* 55, 277–283.
- Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, Wright L, Mizoguchi M, Song HR, Carre IA, Coupland G, (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Dev. Cell* 2, 629–641.
- Nakajima S, Sugiyama M, Iwai S, Hitomi K, Otsoshi E, Kim ST, Jiang CZ, Todo T, Britt AB, Yamamoto K, (1998). Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* 26(2): 638–644.
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN, (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature*, 448(7151):358-61.
- Niinuma K, Someya N, Kimura M, Yamaguchi I, Hamamoto H, (2005). Circadian rhythm of circumnutation in inflorescence stems of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 46, 1423–1427.
- O'Malley KG, Banks MA, (2008). Duplicated Clock genes with unique polyglutamine domains provide evidence for nonhomologous recombination in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), *Genetica* 132, pp. 87–94.
- Onai K, Ishiura M, (2005). *PHYTOCLOCK 1* encoding a novel GARP protein essential for the Arabidopsis circadian clock. *Genes Cells*, 10, 963-972.
- Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH, (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8660–8664.
- Panda S, Poirier GG, Kay SA, (2002). *TEJ* defines a role for poly(adp-ribosyl)ation in establishing period length of the Arabidopsis circadian oscillator. *Dev. Cell*, 3, 51-61.
- Partch CL, Sancar A, (2005). Cryptochromes and circadian photoreception in animals. *Methods Enzymol* 393:726-745.
- Pfaffl MW, (2004). Quantification strategies in real-time PCR. A-Z of quantitative PCR, 3, 87 - 112 (Editor: S.A. Bustin), International University Line (IUL).
- Pittendrigh CS, (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 17–54.
- Rand DA, Shulgin BV, Salazar JD, Millar AJ, (2006). Uncovering the design principles of circadian clocks: mathematical analysis of flexibility and evolutionary goals. *J. Theor. Biol.* 238, 616–635.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC, (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 837-858.
- Roenneberg T, Merrow M, (2003). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr. Biol.* 13, 198–207.

- Saunders DS, (2005). Erwin Bunning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *J. Insect Physiol.*, 51, 599-608.
- Salome PA, McClung CR, (2005). What makes the *Arabidopsis* clock tick on time? A review on entrainment. *Plant Cell Environ.*, 28, 21-38.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press).
- Sancar GB, (2000). Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat. Res.* 451, 25-37.
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E, (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 113-123.
- Searle I, Coupland G.I (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J.* 23(6):1217-22.
- Selby CP, Thompson C, Schmitz TM, Van Gelder RN, Sancar A, (2000). Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:14697-14702.
- Sridhar VV, Surendraom A, Liu Z, (2006). APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development, *Development* 133 (2006), pp. 3159-3166.
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA, (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 282, 1488-1490.
- Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, Quail PH, (1991). The hy3 Long Hypocotyl Mutant of *Arabidopsis* Is Deficient in Phytochrome B. *Plant Cell.* (12):1263-1274.
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C, (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols* 1, - 2019 - 2025.
- Staiger D, Streitner C, Rudolf F, Huang X, (2005). Multiple and slave oscillators. In (Hall, A.J.W., and McWatters, H.G.; eds.): *Endogenous plant rhythms. Annu. Plant Rev.*, 21, 57-83.
- Stanewesky R, Kaneko M., Emery P, Beretta B, Wager-Smith T, (1998). The *cry^b* mutation identifies *cryptochrome* as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95: 681-692.
- Straume M, (2004). DNA microarray time series analysis: Automated statistical assessment of circadian rhythms in gene expression patterning. *Methods Enzymol.* 383 149-166.
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA, (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289, 768-771.
- Sugano S, Andronis C, Green RM, Wang ZY, Tobin EM, (1998). Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11020-11025.

- Tajima T, Oda A, Nakagawa M, Kamada T, Mizoguchi T, (2007). Natural variation of polyglutamine repeats of a circadian clock gene *ELF3* in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol.* 24, 237–240.
- Thain SC, Murtas G, Lynn JR, McGrath RB, Millar AJ, (2002). The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiol.*, 130, 102-110.
- Todo T, (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mut Res.* 434 (2): 89-97.
- Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM, (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* *LHCB* gene. *Plant Cell*, 9, 491-507.
- Wang ZY, Tobin EM, (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 93, 1207-1217.
- Webb AAR, (1998). Stomatal rhythms. In *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants* (Lumsden, P. J. and Millar, A. J., eds.), 69–79, Bios Scientific Publications, Oxford.
- Webb AAR, (2003). The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytol.* 160, 281–303.
- Yanovsky MJ, Mazzella MA, Casal JJ, (2000). A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr. Biol.*, 10, 1013-1015.
- Young MW, Kay SA, (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* 2, 702–715.
- Zeilinger MN, Farre EM, Taylor SR, Kay SA, Doyle FJ, (2006). A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. *Mol. Syst. Biol.*, 2.60.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato in questo percorso.
Un ringraziamento particolare va a Stefano e Giovanni per il loro amore.

PREMIO TESI DI DOTTORATO

ANNO 2007

- Bracardi M., *La Materia e lo Spirito. Mario Ridolfi nel paesaggio umbro*
Coppi E., *Purines as Transmitter Molecules. Electrophysiological Studies on Purinergic Signalling in Different Cell Systems*
Mannini M., *Molecular Magnetic Materials on Solid Surfaces*
Natali I., *The Ur-Portrait. Stephen Hero ed il processo di creazione artistica in A Portrait of the Artist as a Young Man*
Petretto L., *Imprenditore ed Università nello start-up di impresa. Ruoli e relazioni critiche*

ANNO 2008

- Bemporad F., *Folding and Aggregation Studies in the Acylphosphatase-Like Family*
Buono A., *Esercito, istituzioni, territorio. Alloggiamenti militari e «case Herme» nello Stato di Milano (secoli XVI e XVII)*
Castenasi S., *La finanza di progetto tra interesse pubblico e interessi privati*
Colica G., *Use of Microorganisms in the Removal of Pollutants from the Wastewater*
Gabbiani C., *Proteins as Possible Targets for Antitumor Metal Complexes: Biophysical Studies of their Interactions*

ANNO 2009

- Decorosì F., *Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)*
Di Carlo P., *I Kalasha del Hindu Kush: ricerche linguistiche e antropologiche*
Di Patti F., *Finite-Size Effects in Stochastic Models of Population Dynamics: Applications to Biomedicine and Biology*
Inzitari M., *Determinants of Mobility Disability in Older Adults: Evidence from Population-Based Epidemiologic Studies*
Macrì F., *Verso un nuovo diritto penale sessuale. Diritto vivente, diritto comparato e prospettive di riforma della disciplina dei reati sessuali in Italia*
Pace R., *Identità e diritti delle donne. Per una cittadinanza di genere nella formazione*
Vignolini S., *Sub-Wavelength Probing and Modification of Complex Photonic Structures*

ANNO 2010

- Fedi M., *«Tuo lumina». L'Accademia dei Risvegliati e lo spettacolo a Pistoia tra Sei e Settecento*
Fondi M., *Bioinformatics of genome evolution: from ancestral to modern metabolism. Phylogenomics and comparative genomics to understand microbial evolution*
Marino E., *An Integrated Nonlinear Wind-Waves Model for Offshore Wind Turbines*
Orsi V., *Crisi e Rigenerazione nella valle dell'Alto Khabur (Siria). La produzione ceramica nel passaggio dal Bronzo Antico al Bronzo Medio*
Polito C., *Molecular imaging in Parkinson's disease*
Romano R., *Smart Skin Envelope. Integrazione architettonica di tecnologie dinamiche e innovative per il risparmio energetico*

ANNO 2011

- Acciaioi S., *Il trompe-l'œil letterario, ovvero il sorriso ironico nell'opera di Wilhelm Hauff*
Bernacchioni C., *Sfingolipidi bioattivi e loro ruolo nell'azione biologica di fattori di crescita e citochine*
Fabbri N., *Bragg spectroscopy of quantum gases: Exploring physics in one dimension*
Gordillo Hervás R., *La construcción religiosa de la Hélade imperial: El Panhelion*
Mugelli C., *Indipendenza e professionalità del giudice in Cina*
Pollastri S., *Il ruolo di TAF12B e UVR3 nel ciclo circadiano dei vegetali*
Salizzoni E., *Paesaggi Protetti. Laboratori di sperimentazione per il paesaggio costiero euro-mediterraneo*

