20. Genetica dello sviluppo

Il controllo genetico dello sviluppo

Domande

- Quali geni controllano lo sviluppo e come sono stati identificati?
- Dove e quando sono attivi questi geni nel corso dello sviluppo?
- Come sono controllati i geni che regolano gli schemi organizzativi?
- I geni che regolano gli schemi organizzativi come influenzano la forma degli organismi?
- Differenti taxa possono avere in comune geni che regolano gli schemi e interi processi del loro sviluppo?

Biologia dello sviluppo

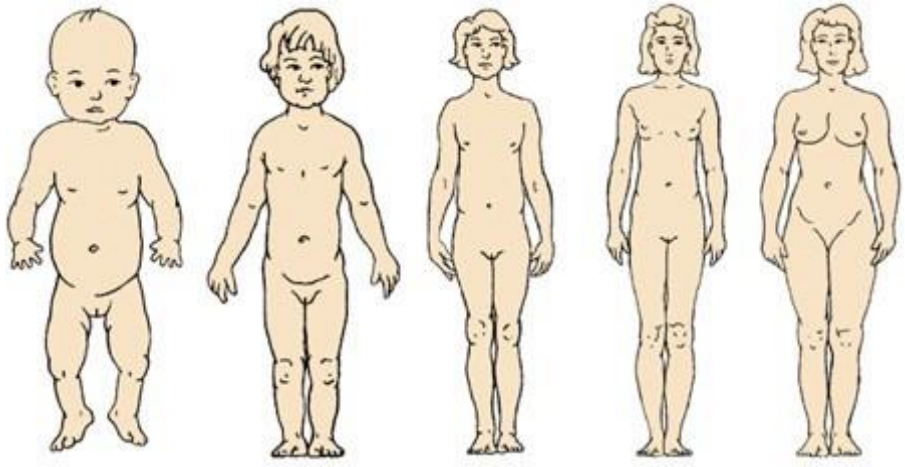
- La biologia dello sviluppo studia tutti i processi che riguardano lo sviluppo,
- Questo a partire dalla cellula uovo fecondata fino alla nascita ed oltre.









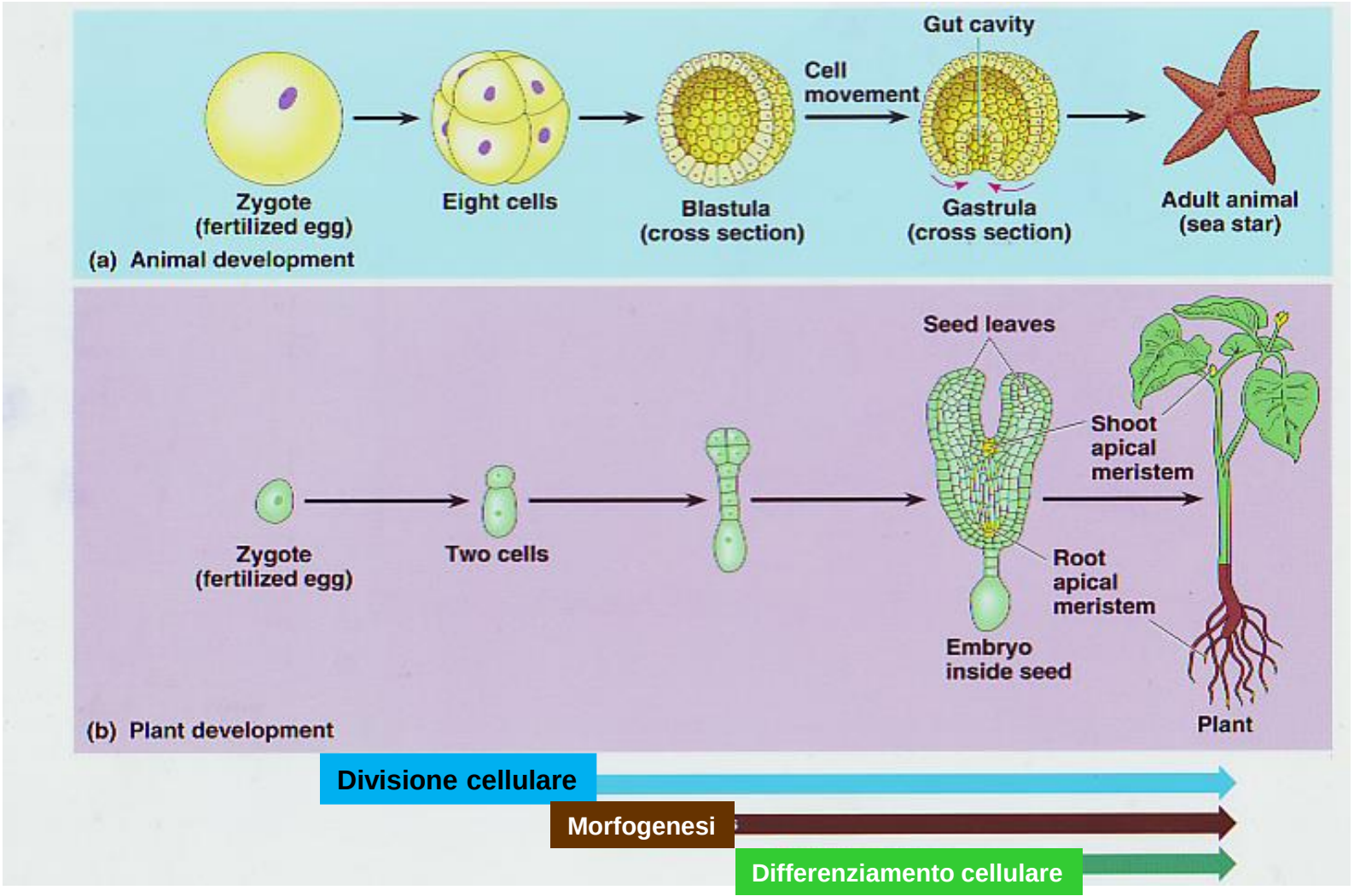


Sviluppo embrionale

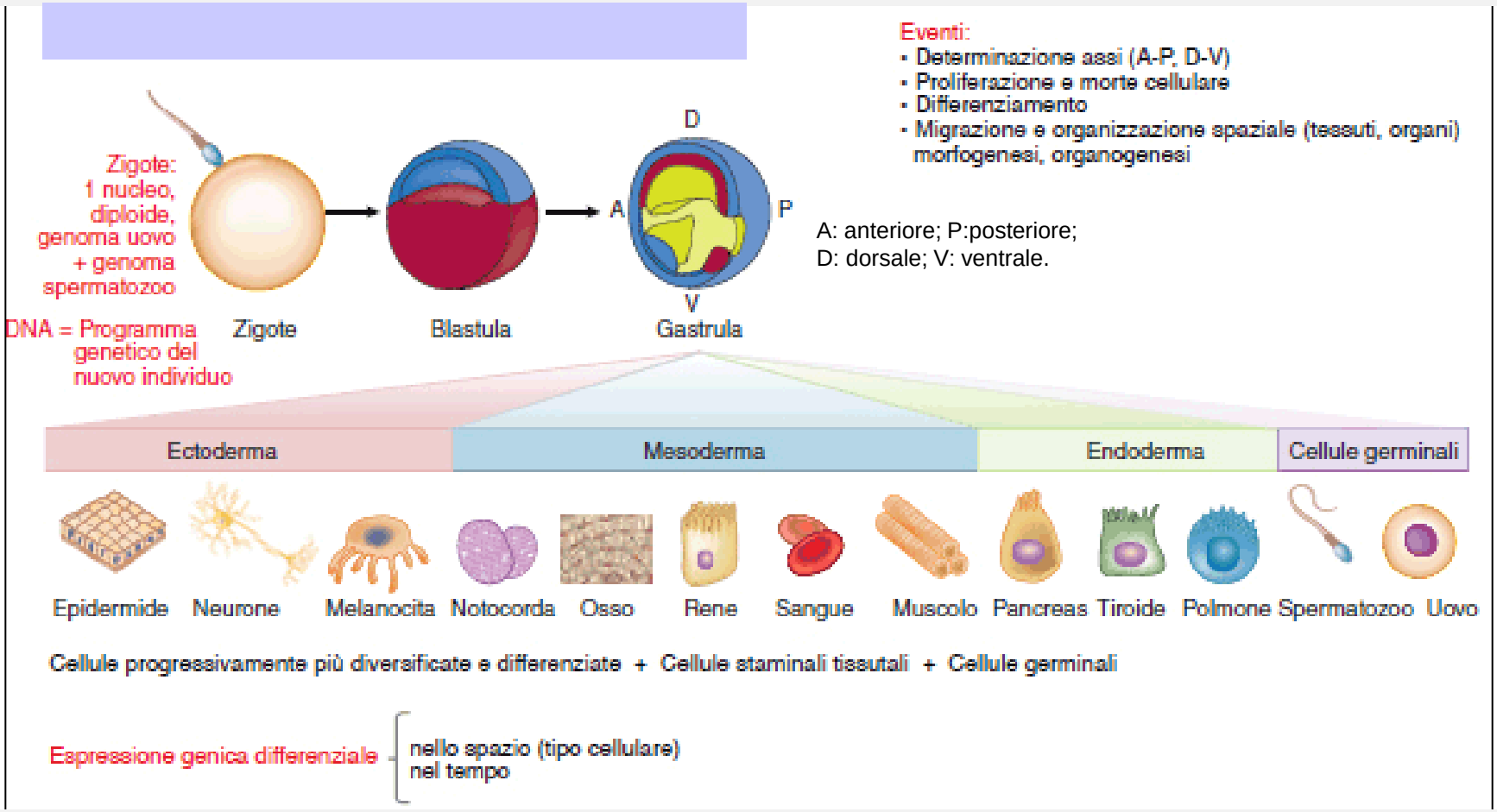
- **Divisione cellulare**
  - Lo zigote si divide per mitosi → più cellule
  - **Morfogenesi**
    - Le cellule si organizzano in tessuti & organi
    - Cellule stabiliscono un piano basale del corpo/assi (anteriore-posteriore, dorsale-ventrale)
    - Animali: movimento di cellule & tessuti --> stabiliscono la forma
    - Piante: morfogenesi & crescita avvengono attraverso la vita della pianta (meristemi apicali).
- **Differenziamento cellulare**
  - Specializzazione delle cellule in strutture & funzioni

Stadi rilevanti dello sviluppo in animali e piante

- **Lo sviluppo di animali e piante segue 2 vie differenti:**
  - **animali**: movementi di cellule & tessuti sono necessari per la trasformazione;
  - **piante:** morfogenesi & crescita non sono limitati agli stadi embrionale e giovanile: esse hano regioni embrionali perenni chiamate **meristemi apicali,**



Genetica dello sviluppo: 1 zigote-->1 individuo



- Lo zigote contiene una **copia del genoma materno e una copia del genoma paterno** che insieme costituiscono il programma genetico del nuovo individuo.
- La **genetica dello sviluppo** **studia come il genoma dello zigote dirige la formazione di un nuovo individuo mediante lo sviluppo embrionale.**
- **Lo sviluppo** (che coinvolge proliferazione cellulare, organizzazione spaziale con formazione degli assi embrionari e morfogenesi e differenziamento di centinaia di tipi cellulari altamente specializzati) **si realizza tramite l'espressione regolata** (differenziale) dei geni nello spazio e nel tempo

Le basi genetiche dello sviluppo

- L'informazione genetica, trasmessa di generazione in generazione, contiene un preciso **programma** che determina l'**ontogenesi.** (le varie fasi dello sviluppo di un organismo).

- Il programma di sviluppo consiste di tre tipi principali di fenomeni:

  1) Proliferazione cellulare
  2) Differenziamento cellulare
  3) Morfogenesi

- Oggi sappiamo che lo **sviluppo** è il risultato dell'espressione differenziale dei geni **nello spazio e nel tempo**.

- A mano a mano che le cellule di organismo in via di sviluppo proliferano, vengono effettuate scelte
- queste determinano sempre meglio il destino di una data linea cellulare

La regolazione genica nello sviluppo embrionale

- Nello sviluppo di un organismo, **i geni sono espressi secondo un preciso programma;**
  - questo assicura che una cellula uovo fecondata si divida ripetutamente
  - le cellule risultanti diventino specializzate in un percorso orchestrato per formare un organismo altamente differenziato.

- Il processo chiave nello sviluppo è **il modello di formazione**: cioè **l'emergere di cellule**
  - organizzate e specializzate spazialmente nell'embrione
  - questo avviene a seguito di divisione cellulare e differenziamento dello zigote.

La regolazione genica nello sviluppo embrionale (cont .)

- Durante la vita embrionale, le cellule vanno incontro a:
  - **proliferazione:** per mitosi;
  - **differenziamento:** formazione di **tipi cellulari specializzati** e diversificati a partire da una singola cellula(zigote);
    - le cellule assumono specifiche funzioni,
    - ma mantengono lo stesso corredo genetico;

  - **morfogenesi:** le cellule si organizzano in organi e apparati;

  - **apoptosi:** morte programmata delle cellule.

Espressione genica differenziale

- I nuclei di tutte le cellule contengono il genoma completo formatosi nell'uovo fecondato.
- In termini molecolari, **i DNA di tutte** le **cellule differenziate sono uguali.**
- I geni che non vengono usati in cellule differenziate non vengono mutati né distrutti, e mantengono la potenzialità di essere espressi.
- Solo una piccola percentuale del genoma si esprime in ciascuna cellula:

una porzione dell'RNA sintetizzato nella cellula è specifico per quel tipo cellulare.

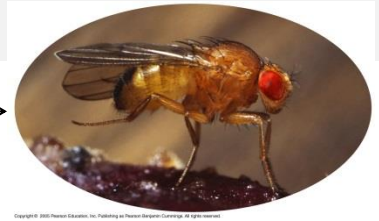
- **Quindi: LE CELLULE SONO DIVERSE PERCHE' ESPRIMONO RNA DIVERSI**

Espresione genetica differenziale durante lo sviluppo

- **Regolazione trascrizionale**
  - **Geni regolatori** codificano per proteine→ incrementano target dei geni = più espressione
- **Determinanti citoplasmatici**
  - mRNA, proteine, & organelli in cellule uovo distribuite in modo ineguale
  - Nuove cellule dalla mitosi→ una differente quantità di materiali citoplasmatici → determina destino evolutivo
- **Segnali cellula-cellula**
  - Interazioni tra cellule embionali vicine causano alterazioni nell'espressione genica.

Organismi modello per lo studio dello sviluppo

- Moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster)*



- nematode (*C. elegans*)



- topo (*Mus musculus*)



- zebrafish (*Danio rerio)*



- *Arabidopsis thaliana* (una piccola pianta annuale o biennale, appartenente alla Famiglia delle *Brassicacee*)



.

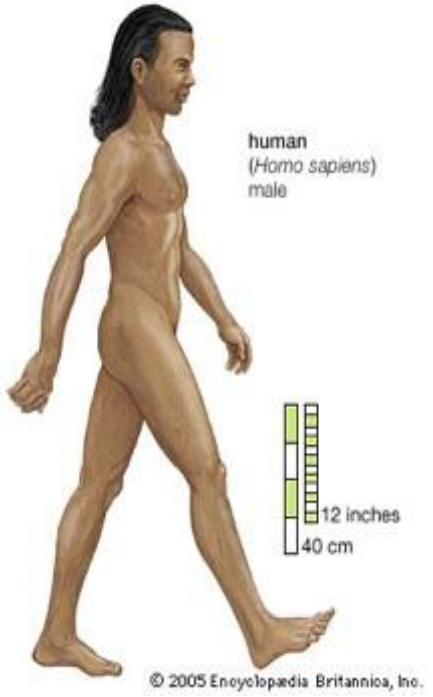
IDENTIFICAZIONE E STUDIO DEI GENI DELLO SVILUPPO

Genetica dello sviluppo

- **Il controllo esercitato dai geni sullo sviluppo dell'embrione.**
- La **genetica dello sviluppo** ha nello **studio dei mutanti** il suo punto di forza.
- I notevoli progressi della ricerca hanno messo in evidenza come i geni che controllano le fasi precoci dello sviluppo embrionale **siano evolutivamente conservati**







Genetica dello sviluppo

❑ Mutanti dello sviluppo

- mutazioni spontanee
- mutazioni indotte:

-mutageni chimici (mutazioni puntiformi)

-radiazioni (delezioni)

- mutazioni recessive:

- perdita di funzione (solitamente recessiva se non sussiste aplo-insufficienza, altrimenti dominante)

- mutazioni dominanti:

-guadagno di funzione

-dominante negativa

Mutanti spontanei di geni dello sviluppo

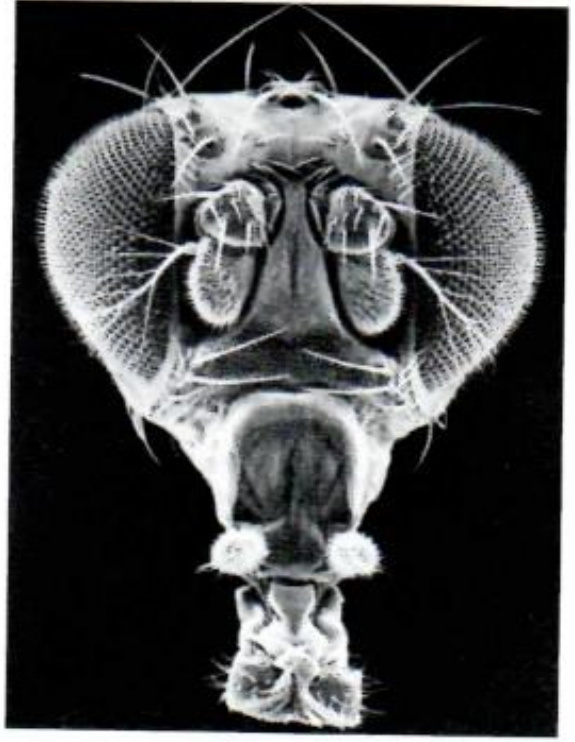
Mutazioni omeotiche

- Mutazioni, che causano trasformazioni di una zona del corpo in un'altra zona

- I geni mutati sono indicati come geni ***Homeo-box,*** brevemente geni ***Hox***

(a) **Testa di una *Drosophila* selvatica,** in cui sono presenti le antenne e le altre parti della testa.

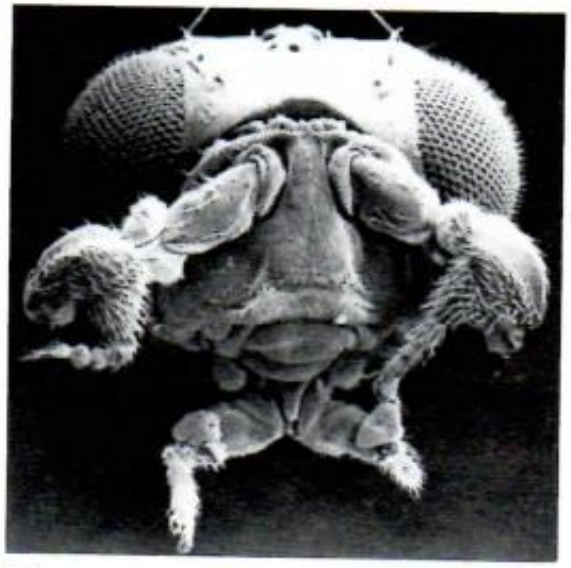
La mutazione *Antennapedia (Antp)* in *Drosophila.*



(a)

(b) **Testa di un mutante *Antp,*** in cui è evidente la sostituzione delle normali antenne con le zampe.

- Questo è provocato **da attivazione del gene *Antp*** nella regione della testa.



(b)

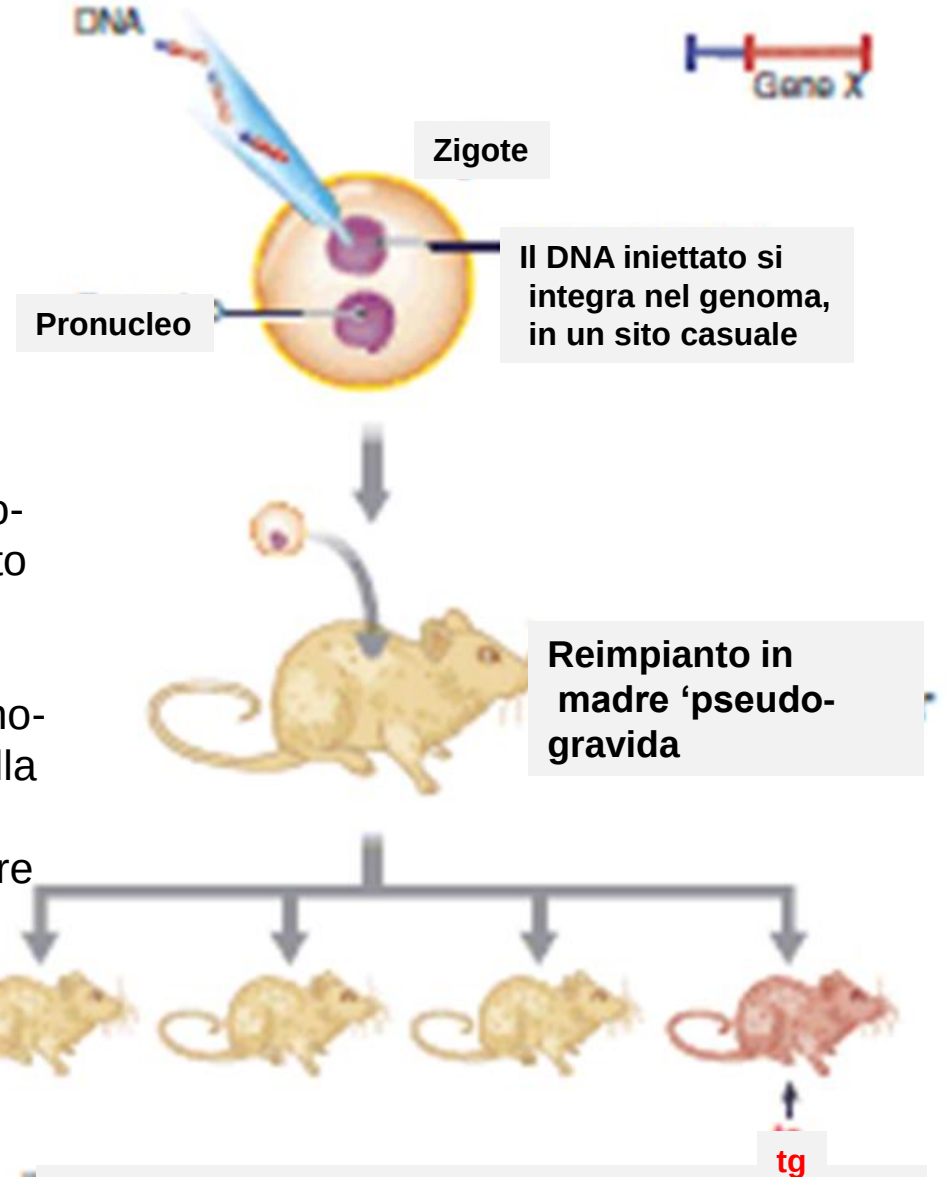
Mutanti generati in laboratorio

- Altri geni di sviluppo sono stati identificati mediante **mutagenesi:**
  - mutageni chimici
  - successivo screening di fenotipi mutanti embrionali (inizialmente in *Drosophila* e in seguito in un organismo modello vertebrato (*Zebrafish*) .
  - Mutanti di topo: topi transgenici e knock-out

Mutanti di topo: topi transgenici e *knock-out*

1. Transgenesi.

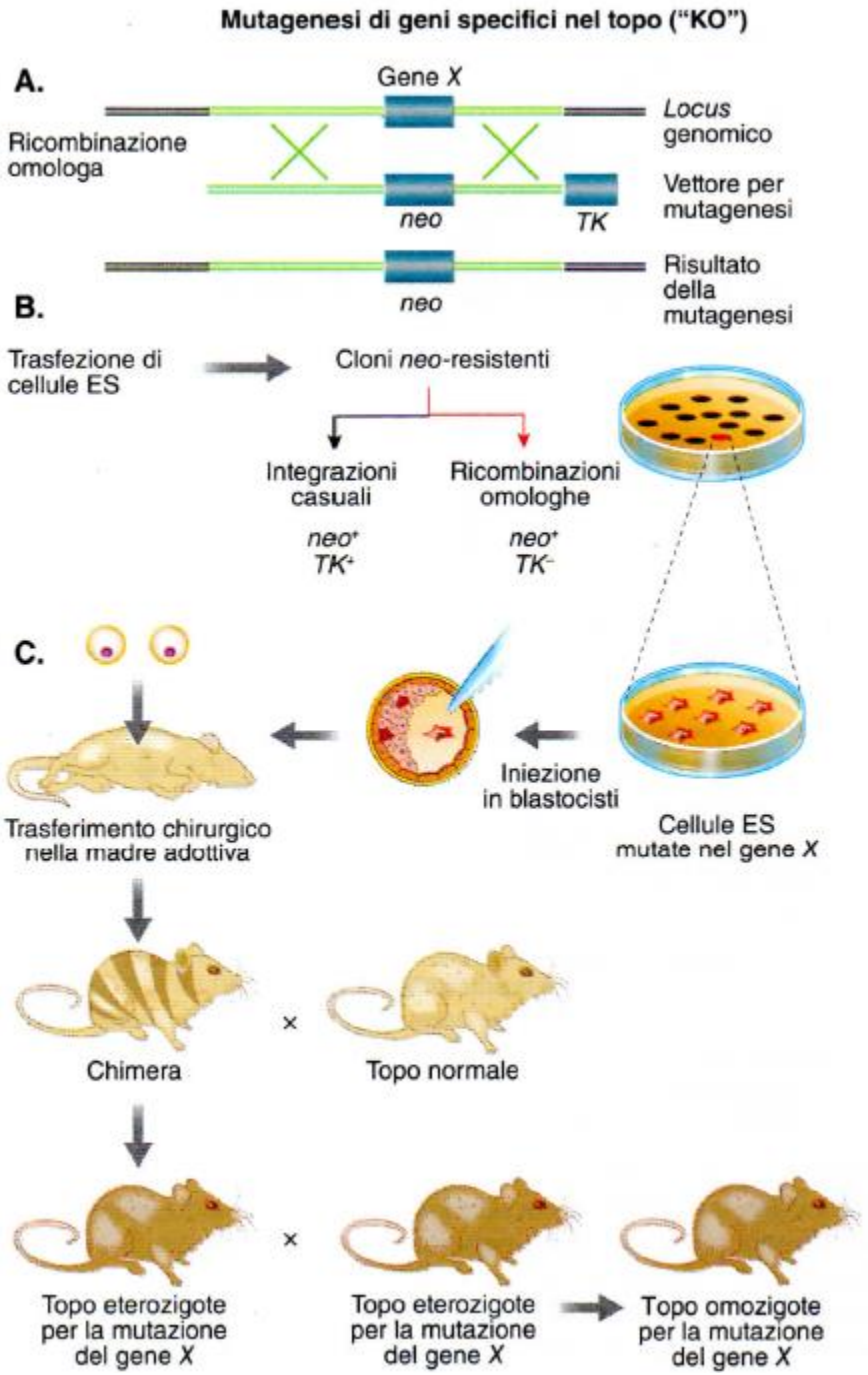
- Il DNA esogeno (il futuro transgene, in forma lineare in soluzione) viene iniettato (al microscopio) in uno dei due pronuclei dell'uovo fecondato (zigote), preventivamente prelevato da una femmina donatrice;
- qui si potrà integrare in un sito casuale del genoma, in una o più copie, generalmente prima della prima divisione cellulare dello zigote.
- Gli zigoti iniettati sono reimpiantati in una madre "pseudogravida", che porterà a termine la gravidanza; fino a 1/3-1/4 dei topi che nascono saranno transgenici e avranno - ogni cellula, incluse le cellule germinali- il trasgene nella stessa posizione genomica.
- La madre "pseudogravida" è resa ormonalmente recettiva alla gravidanza tramite l'accoppiamento con un maschio vasectomizzato, quindi non porta uova fecondate proprie.



Il topo trasgenico (tg) ha il trasgene in ogni **cellula e lo trasmette alla progenie**

- **Espressione di geni mutanti**
- **Espressione ectopica**
- **Studio dell'espressione genica**

2. Mutazione sperimentale di geni specifici nel topo *(knock-out, gene targeting)*

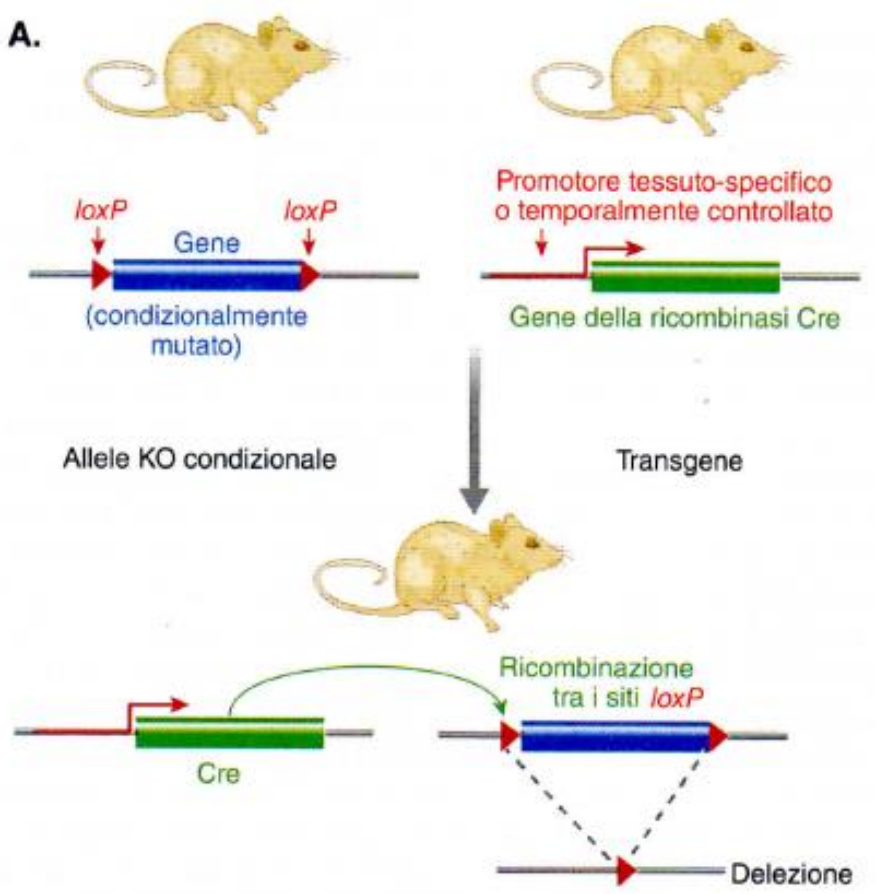


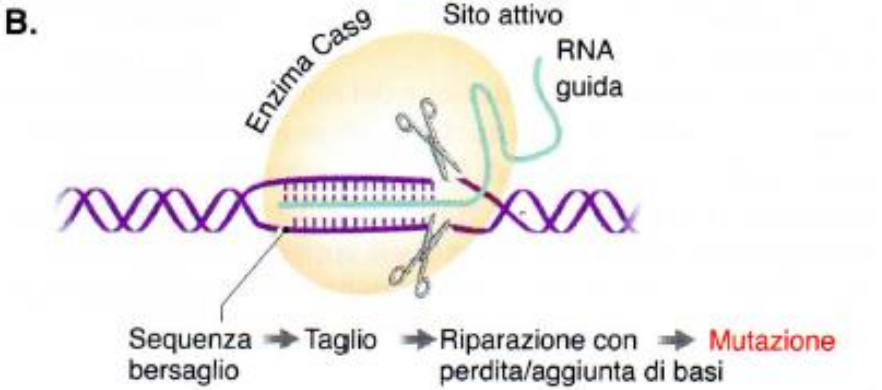
3. Knock-out condizionale e mutagenesi CRISPR/Cas.

(A)Knock-out condizionale. Il gene viene fiancheggiato (mediante gene *targeting*) da siti *loxP.* In topi omozigoti per la mutazione, e portatori del transgene *Cre*, il gene viene deleto solo dove, e quando, Cre è prodotta.

(B)) **Mutagenesi mirata con CRISPR/Cas (genome editing).**

- L'RNA guida, complementare alla sequenza genomica che si intende mutare, guida alla sequenza stessa l'enzima (nucleasi) Cas9, che la taglia.
- Enzimi cellulari deputati alla riparazione del DNA riconnettono i filamenti tagliati, ma spesso commettono errori (es. delezioni o inserzioni di basi), che generano mutazioni).

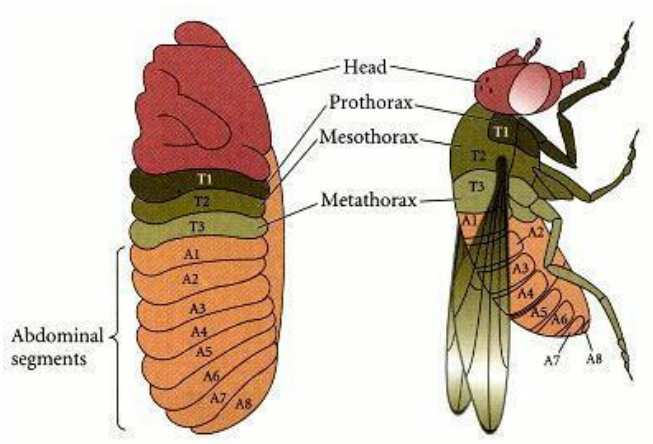




I GENI DELLO SVILUPPO IN *DROSOPHILA*



Nobel 1995



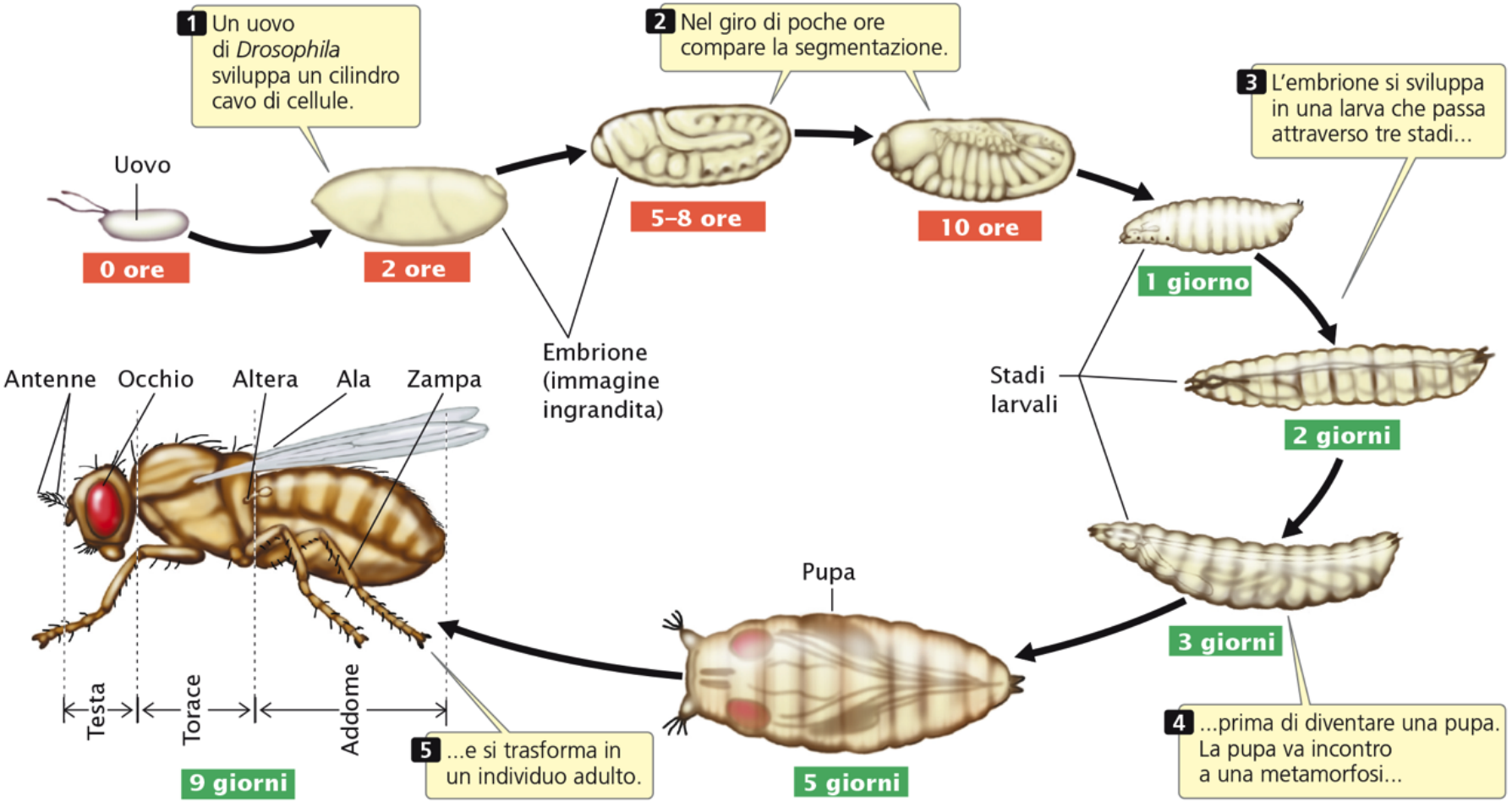
- Ed **Lewis**, Christiane **Nusslein-Volhard** e Eric **Wieshaus** hanno compiuto **un'analisi genetica dello sviluppo di *Drosophila*** tramite

- identificazione di numerosi **geni materni e zigotici coinvolti** nella determinazione del
  - **numero, posizione, polarità e identità dei segmenti del corpo**.

- Il loro lavoro ha aperto la strada allo studio dei processi di regolazione dell'espressione genica nello sviluppo negli eucarioti

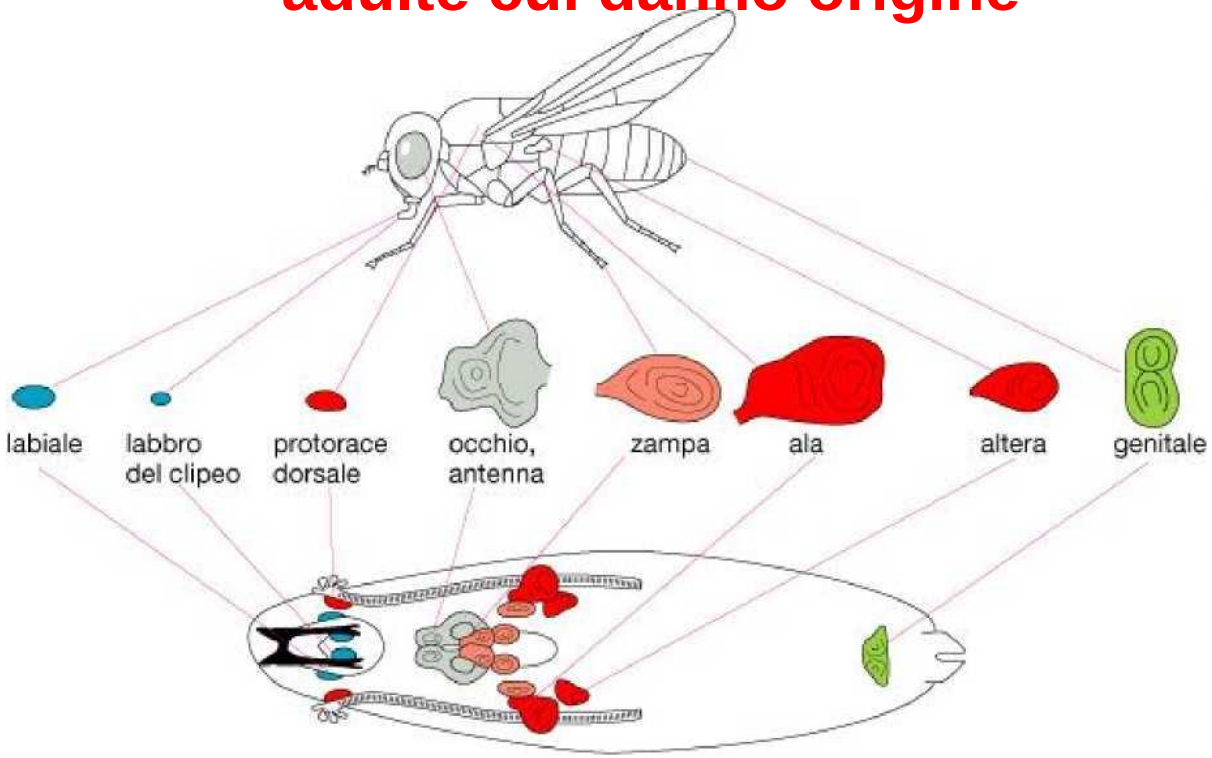
Organizzazione genetica per lo sviluppo di *Drosophila*

Visione d'insieme dello sviluppo



- La larva si forma in un giorno;
- poi va incontro a diversi stadi di sviluppo durante i quali i dischi imaginali e altri precursori di strutture adulte proliferano.
- Queste strutture si **differenziano durante lo stadio di pupa** e il moscerino adulto si schiude (eclosion) e inizia un nuovo ciclo

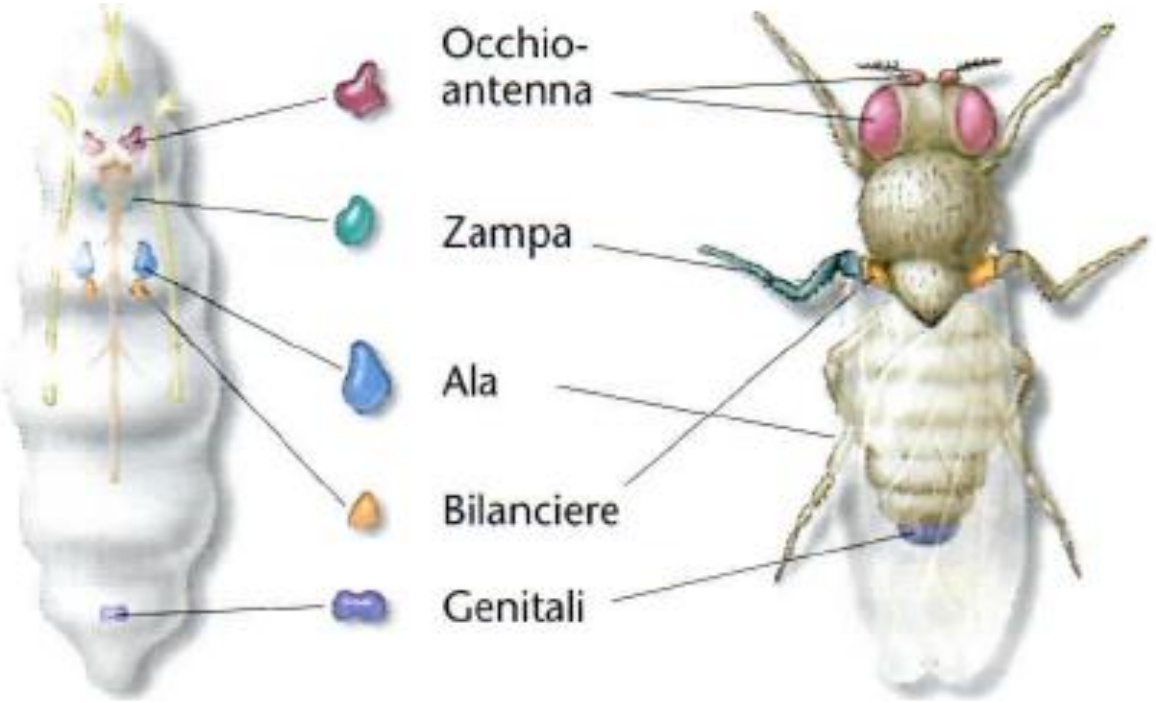
Dischi immaginali nella larva di *Drosophila* e le strutture adulte cui danno origine



- Le **strutture esterne** della mosca adulta si **formano in gran parte da rudimenti chiamati dischi imaginali:** gruppi di cellule che sono messe da parte in ciascun segmento della larva.
- **I dischi sono tasche di epitelio** continue con l'epidermide della larva.
- I dischi crescono e sviluppano il loro schema interno mentre la larva cresce.

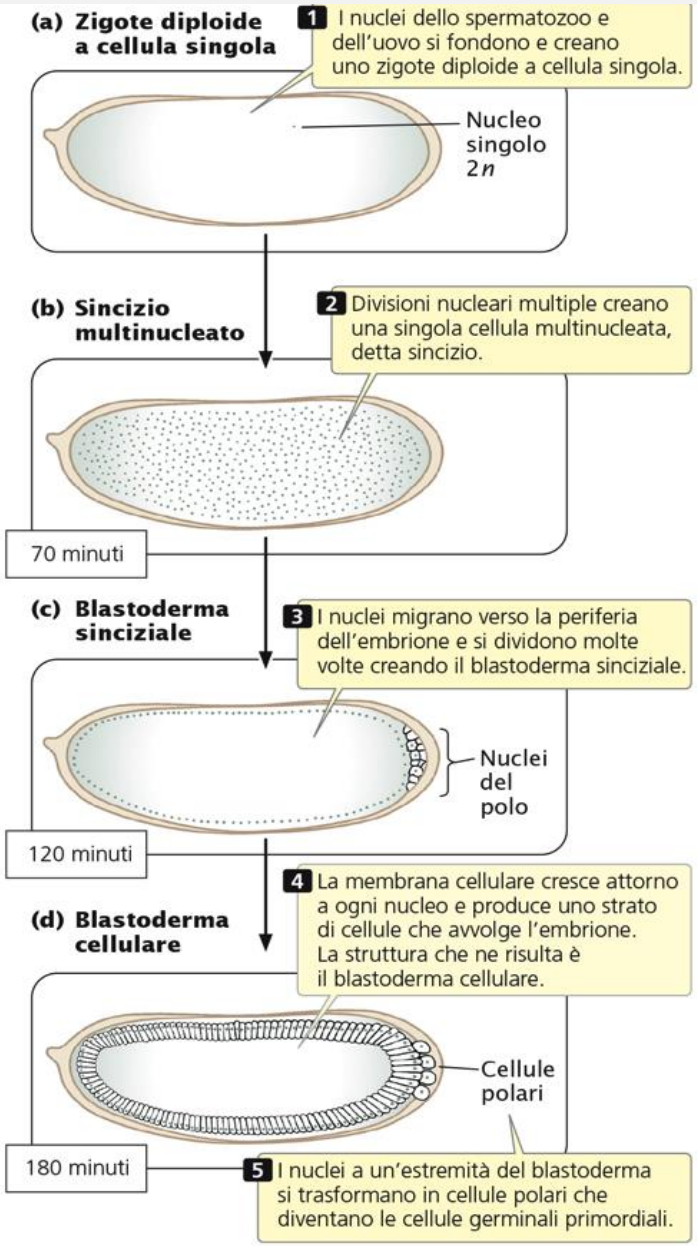
Dischi imaginali nella larva di *Drosophila* e le strutture adulte da essi derivate.

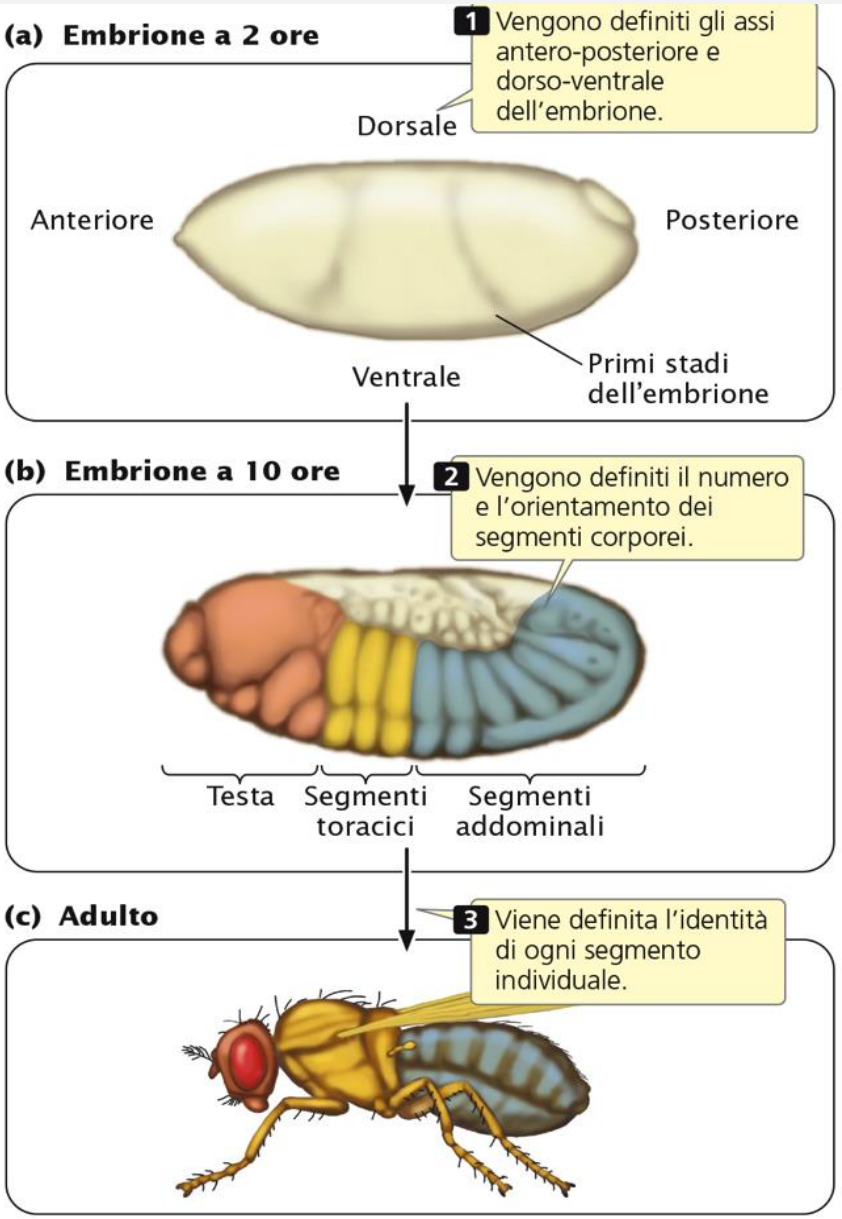
- Dischi immaginali della larva danno origine ad organi e tessuti dell'adulto



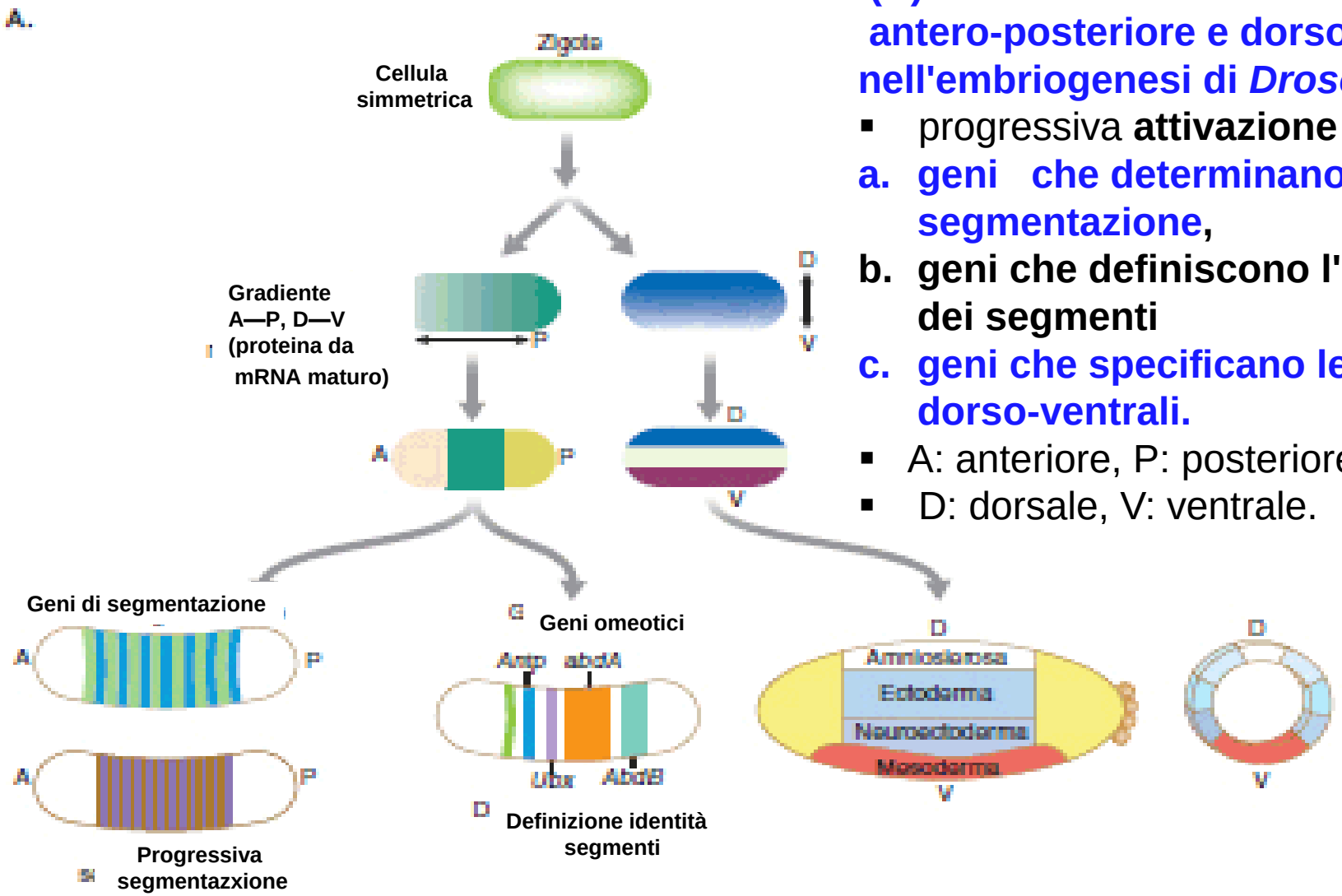
- Il corpo adulto di Drosophila deve la sua **organizzazione generale al piano del corpo larvale**
  - **è composto dai segmenti :**
    - **testa,**
    - **torace**
    - **addome**

Le tappe dello sviluppo di *Drosophila melanogaster*





Sviluppo di *Drosophila*



(A) Genesi di asimmetrie antero-posteriore e dorso-ventrale nell'embriogenesi di *Drosophila*

- progressiva **attivazione di**

a. **geni che determinano segmentazione,**
b. **geni che definiscono l'identità dei segmenti**
c. **geni che specificano le regioni dorso-ventrali.**

- A: anteriore, P: posteriore,
- D: dorsale, V: ventrale.

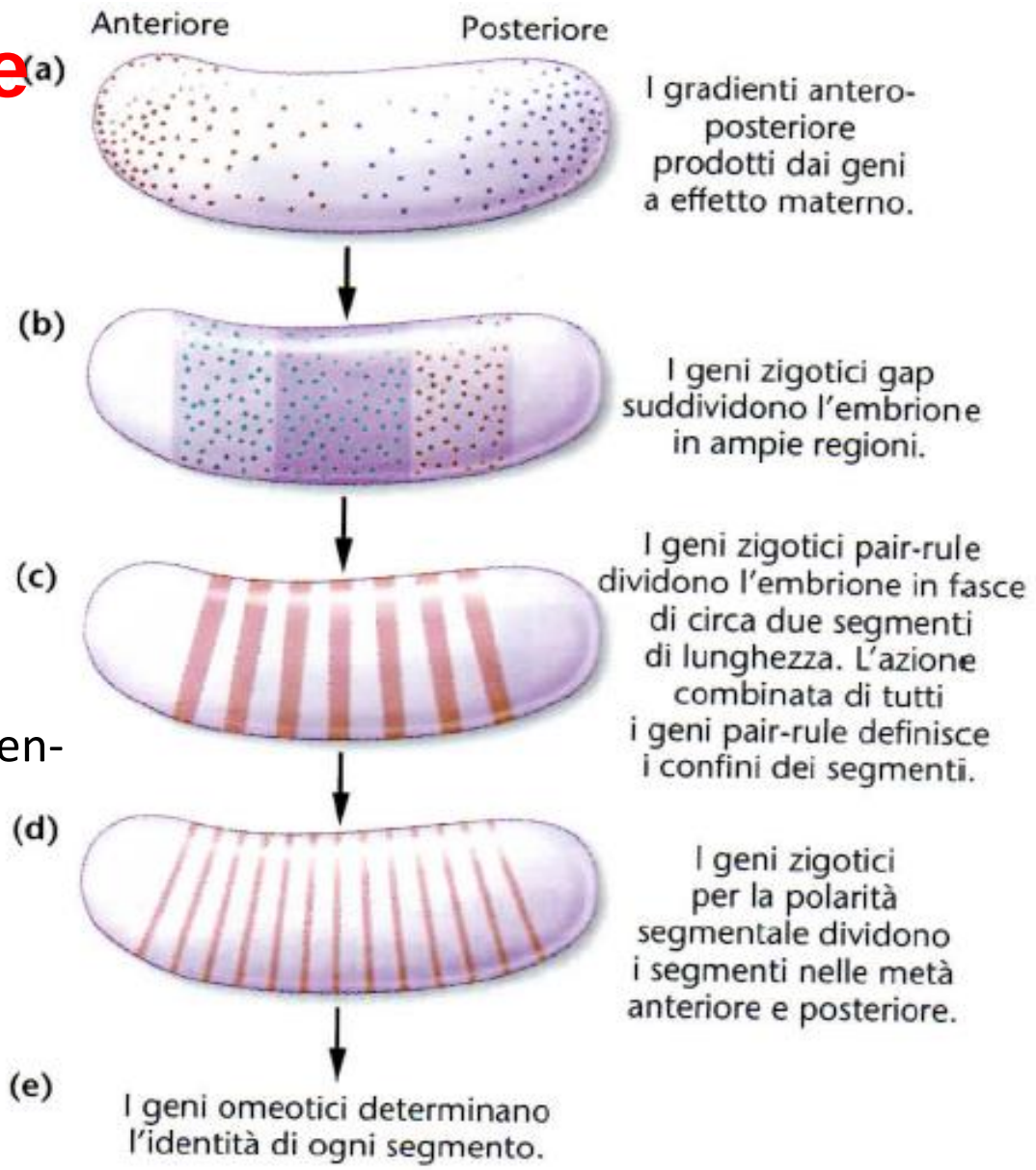
Primi stadi dello sviluppo embrionale

- **progressiva restrizione del destino** cellulare durante lo sviluppo di *Drosophila*.

a) Vengono **stabiliti i gradienti delle proteine a effetto materno**

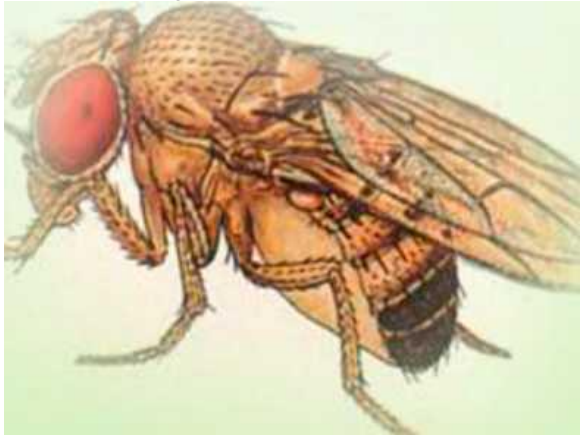
- Lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione, (b), (c) e (d) i **tre gruppi di geni di segmentazione definiscono progressivamente** i segmenti del corpo,

(e) I **singoli segmenti acquistano** la loro i**dentità** grazie ai **geni omeotici**



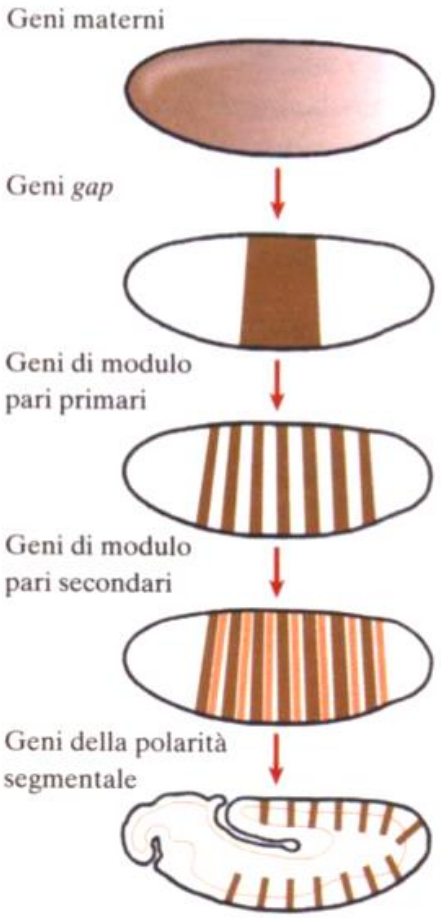
Genetica della specificazione degli assi in *Drosophila*

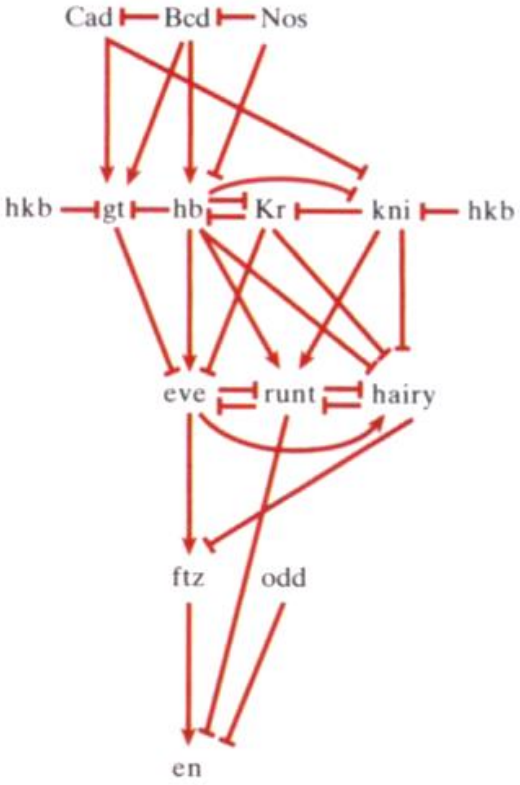
- Controllato da una varietà di geni
- Geni ad effetto materno
- Geni gap
- Geni pair-rule
- Geni polarità segmentale
- Geni selettori omeotici

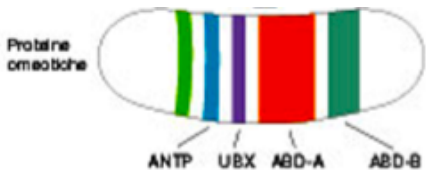


Una cascata di eventi regolativi gerarchici

- **I geni materni attivano i geni gap** determinano l'asse principale del corpo
- **I geni gap attivano i geni pair-rule** cui attività si manifesta secondo uno schema modulare ripetitivo in **sette strisce alternate** e definiscono il numero dei segmenti
- ***I geni pair rule primari*** sono **regolati dai geni *gap***; i **pair rule secondari** sono attivati dai primari
- I **geni *pair rule* regolano i geni *polarità segmentale*** espressi in 14 strisce e determinano la **polarità** (anteriore posteriore) dei segmenti
- I geni ***polarità segmentale*** insieme ai ***pair-rule*** regolano **i *geni omeotici*** che determinano **l'identità dei singoli segmenti**







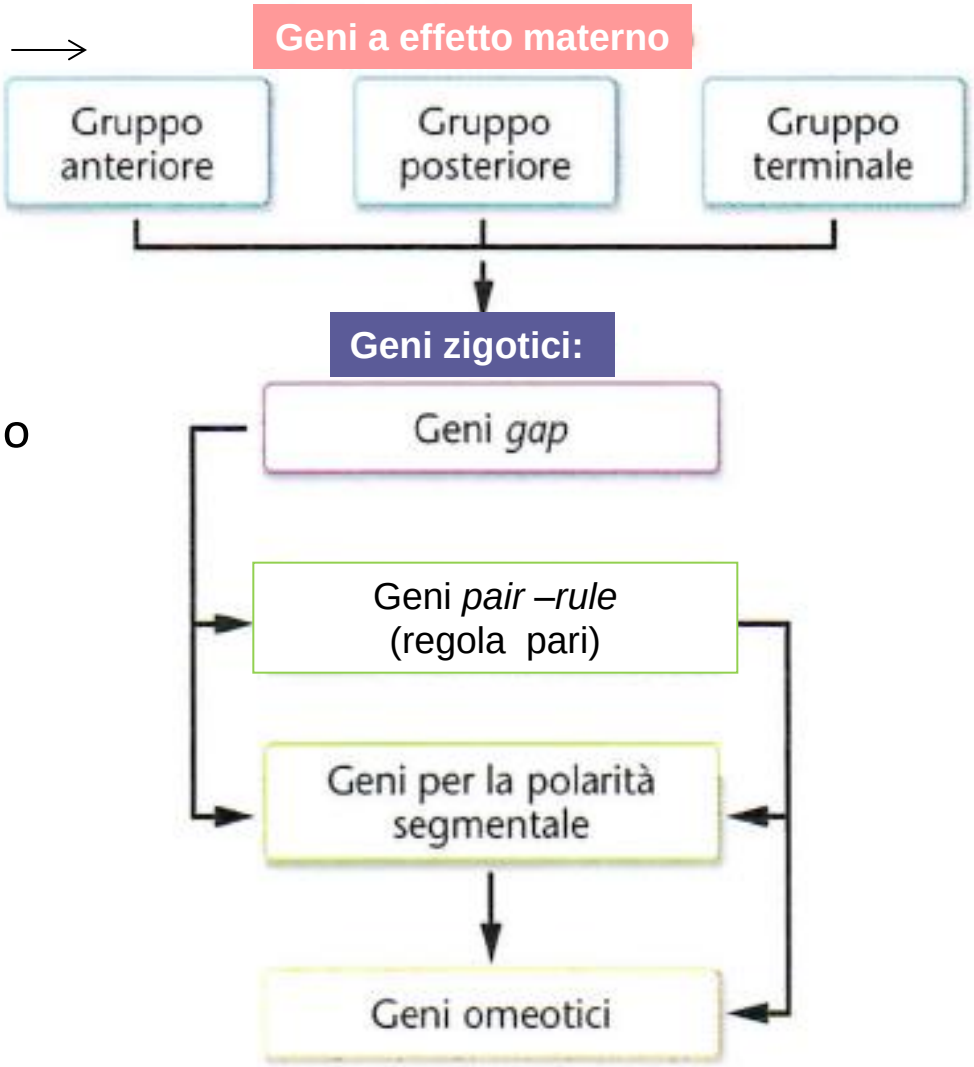
La gerarchia dei geni coinvolti nella definizione del piano del corpo segmentato della Drosophila.

- I prodotti dei **Geni a effetto materno** → **Geni a effetto materno**

Geni zigotici:

regolano l'espressione del primo dei tre gruppi di geni zigotici (**gap, pair-rule, polarità segmentale,** chiamati collettivamente **geni di segmentazione),**

- Questi a loro volta controllano **l'espressione dei geni omeotici**.



Embriogenesi
geni che controllano lo sviluppo dell'embrione

A) geni a effetto materno: Espressi durante l'oogenesi.

- determinano la formazione della"informazione posizionale" presente nell'oocita maturo
- sono **prodotti genici** (mRNA e/o proteine) **rilasciati nell'uovo durante l'oogenesi**

B) geni zigotici: Espressi durante l'embriogenesi e richiesti per l'interpretazione dell'informazione posizionale

- sono quindi trascritti dopo la fecondazione.
- Il fenotipo di mosche con mutazioni negative in questa classe di geni mostra embrioni non vitali.

1. **geni di segmentazione:**
   - **geni gap, pair rule e** per la **polarità segmentale**
   - questi geni suddividono l'embrione in una serie di fasce o segmenti che definiscono il numero, le dimensioni e la polarità di ogni segmento;

2. **geni omeotici: determinano l'identità o il destino di ogni segmento**

.

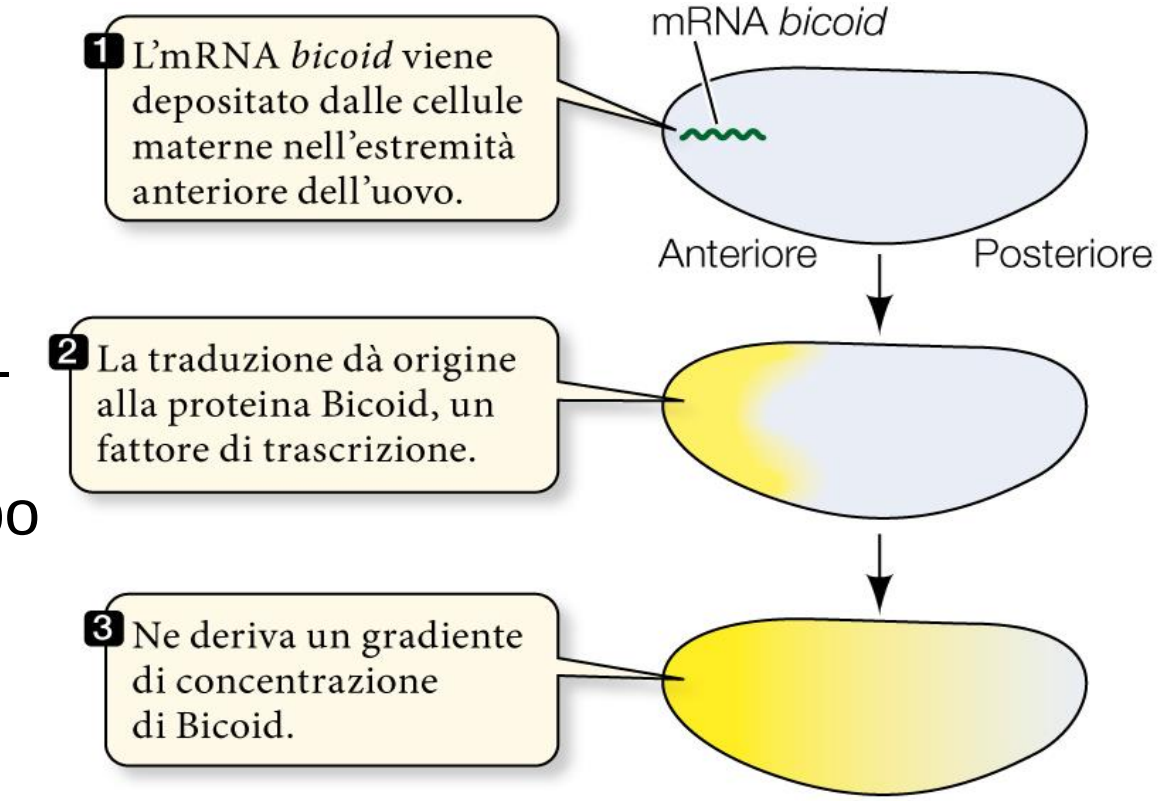
A. Geni materni che determinano l'asse antero-posteriore dell' embrione

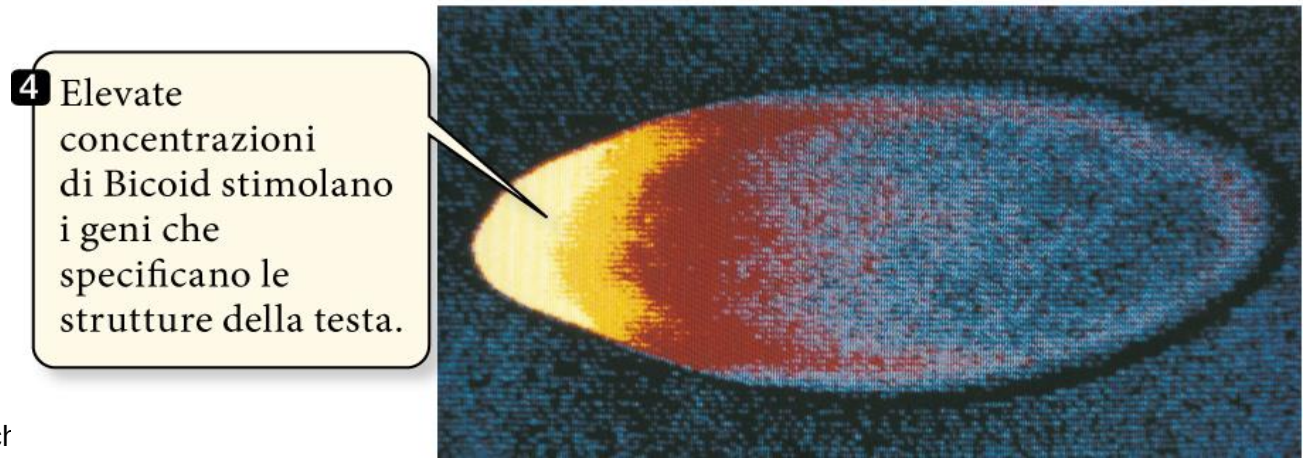
Table 1. Genes with maternal-effect alleles that alter the spatial pattern of embryo

Gene	Phenotype
Anterior group	
bicoid (bcd)	Head and thorax deleted, replaced by inverted telson
exuperantia (exu)	Anterior head structures deleted
swallow (swa)	Anterior head structures deleted
Posterior group	
tudor (tud)	No abdomen, no pole cells
oskar (osk)	No abdomen, no pole cells
vasa (vas)	No abdomen, no pole cells; oogenesis defective
valois (val)	No abdomen, no pole cells; cellularization defect
staufen (stau)	No abdomen, no pole cells; head defect
nanos (nos)	No abdomen
pumilio (pum)	No abdomen
Terminal group	
torso (tor)	No terminalia
trunk (trk)	No terminalia
torsolike (tsl)	No terminalia
fs(1)*Nasrat*[fs(1)*N*]	No terminalia; collapsed eggs
fs(1)*pole hole*[fs(1)*ph*]	No terminalia; collapsed eggs

A. I geni a effetto materno

- L'espressione in sequenza di diversi fattori di trascrizione determina l'organizzazione dei segmenti del corpo di *Drosophila*:
  - **i geni a effetto materno: determinano la posizione di testa e coda.**



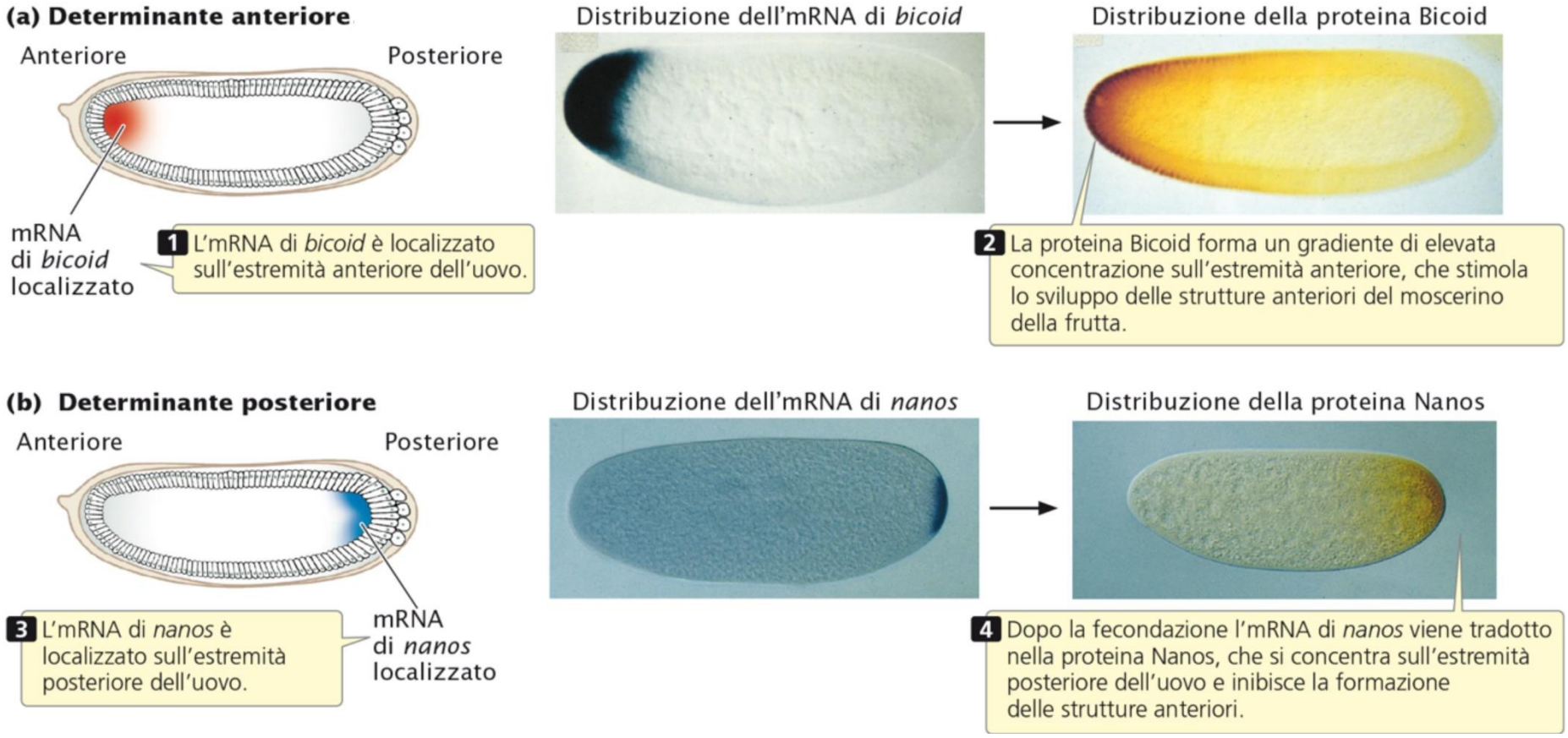


Sadava et al. *Biologia.blu* © Zanich

I geni materni: *bicoid e nanos*

- Gli stadi più precoci dello sviluppo di *Drosophila* sono guidati dai prodotti (**mRNA e proteine**) codificati da **geni materni espressi durante l'oogenesi** (nei tessuti ovarici della madre) e non nell'embrione precoce.

- I prodotti materni si localizzano nell'oocita e rappresentano i cosiddetti **determinanti citoplasmatici (informazione posizionale)** il cui **gradiente** determina **l'asse antero-posteriore** dell'embrione.



Come viene realizzata la localizzazione degli mRNA materni nell'oocita?

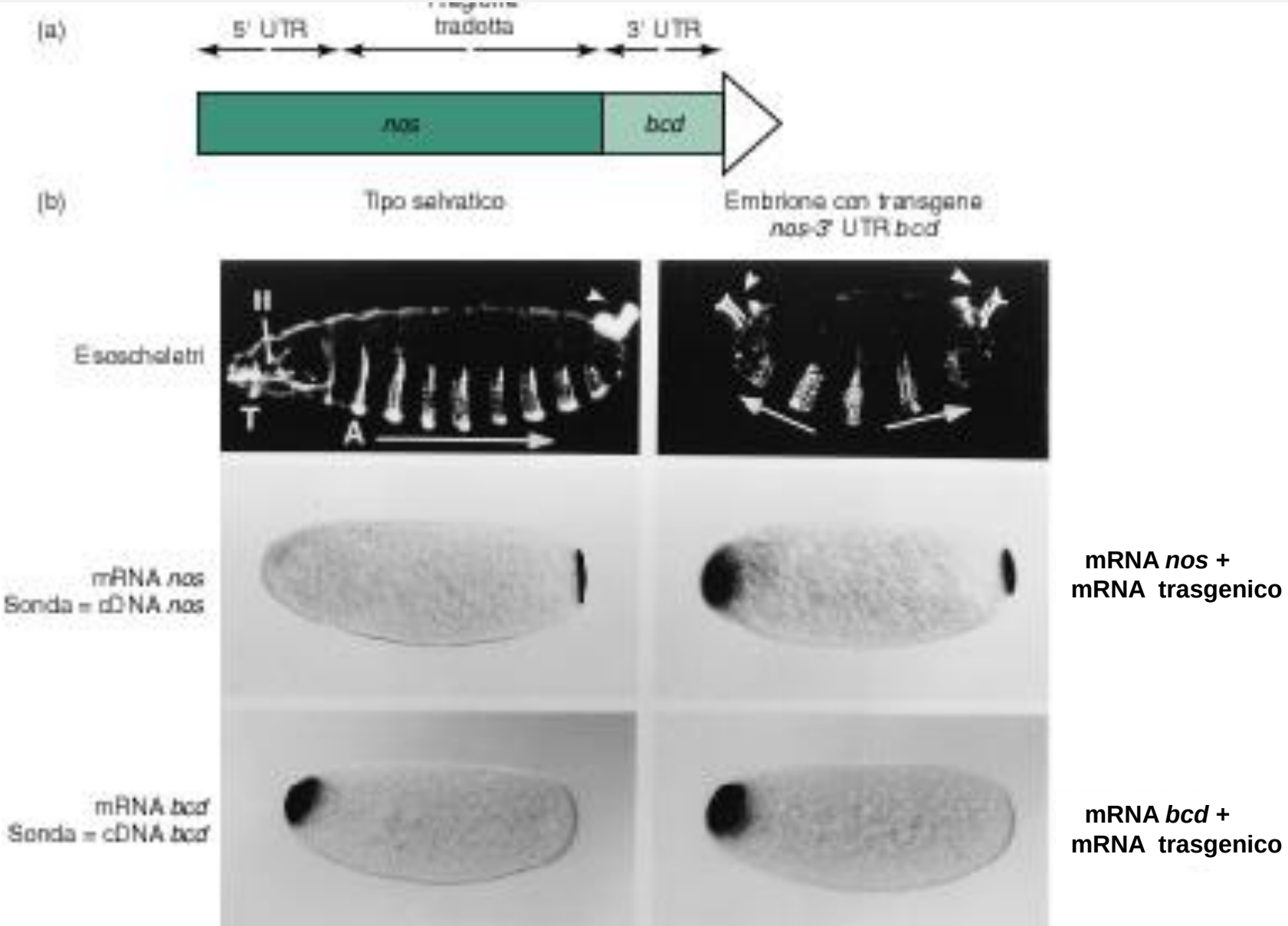
Come viene realizzata la localizzazione degli mRNA materni nell'oocita?

- **L'informazione posizionale** lungo l'asse A-P in *Drosophila* è generata da **gradienti di proteine.**

➢ La formazione di questi **gradienti** dipende da

- **diffusione di proteine tradotte** in specifiche localizzazioni
- questo a **partire da mRNA ancorati** per mezzo dei loro 3'-UTR **ai microtubuli del citoscheletro**

L'ancoraggio del 3' UTR dell'mRNA al citoscheletro permette la localizzazione



mRNA *nos* +
mRNA trasgenico

mRNA *bcd* +
mRNA trasgenico

B) I geni che regolano la formazione dell'asse antero-posteriore del corpo

- Dopo la formazione del blastoderma sinciziale, le membrane plasmatiche si organizzano intorno a ogni nucleo dando vita al bastoderma cellulare

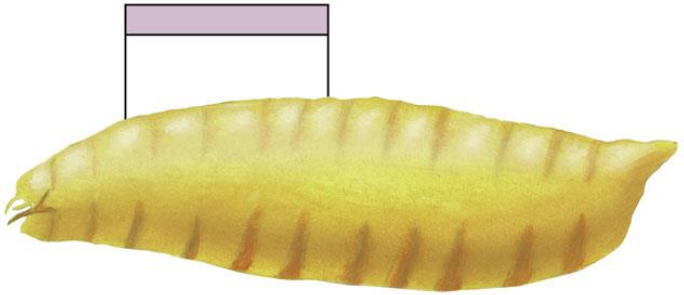
- Piu tardi l'embrione si organizza in una serie di segmenti definiti dai profili d'espressione dei vari geni embrionali

- Successivamente questi daranno vita ai segmenti dell'adulto
- All'interno dei segmenti le cellule vengono indotte a formare il compartimento anteriore e quello posteriore

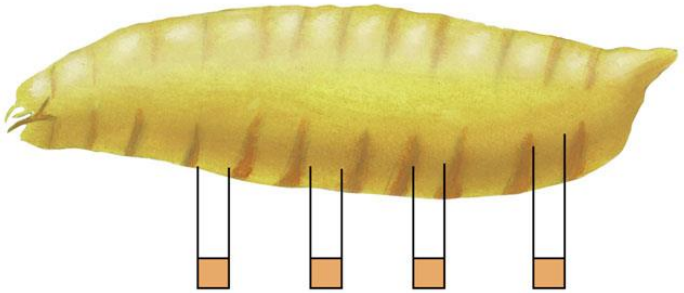
Siti in larve di *Drosophila* dove le tre classi di geni di segmentazione sono espressi

Patterns di espressione di differenti tipi di segmentazione

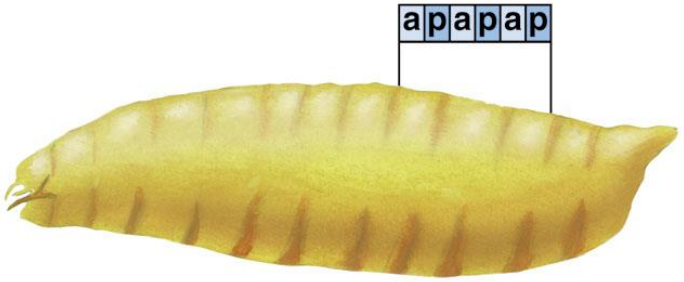
A) Geni Gap influenza-no gruppi di segmenti contigui



B) Geni pair-rule Influen-zano segmenti alterni



C) Geni polarità segmentale Influenzano la polarità antero-posteriore entro ogni segmento



I geni che regolano la formazione dell'asse antero-posteriore del corpo

a) Fotografia al ME a scansione di un embrione di *Drosophila* 10 h circa dopo la fecondazione. A questo stadio, il programma di segmentazione del corpo è perfettamente stabilito,

(b) I segmenti, compartimenti, e parasegmenti dell'embrione di *Drosophila.*

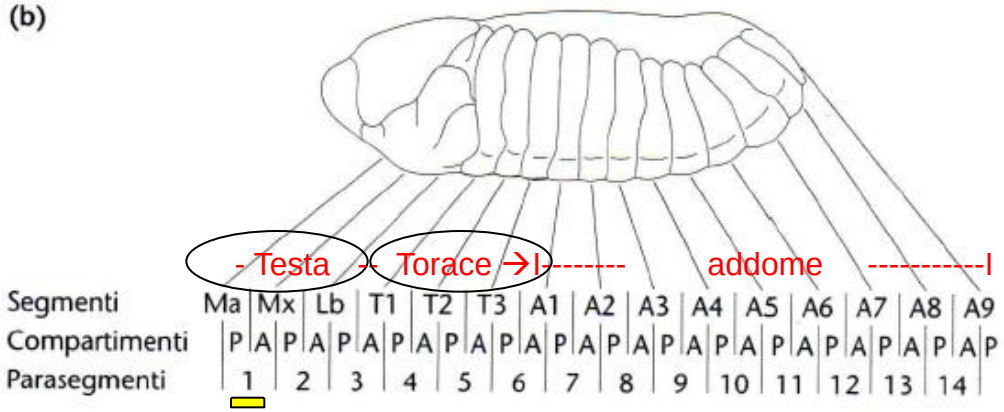
- **Ma, Mx e Lb rappresentano i segmenti che andranno a formare le strutture della testa.**
- **T1-T3 sono i segmenti toracici e**
- **A1-A9 i segmenti addominali.**

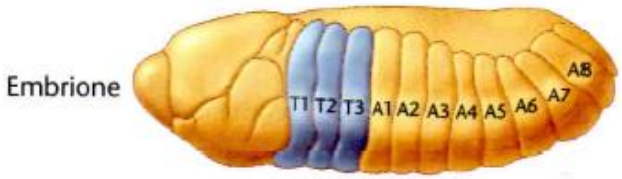
- Ogni segmento è diviso nei **compartimenti anteriore** (A) **e posteriore** (P).
- I parasegmenti rappresentano un programma di determinazione preliminare che viene successivamente ridefinito nel piano segmentale del corpo.

NB: tutti i parasegmenti sono spostati in avanti di un compartimento,

(c) **L'embrione segmentato e le** strutture adulte che ogni segmento andrà a formare

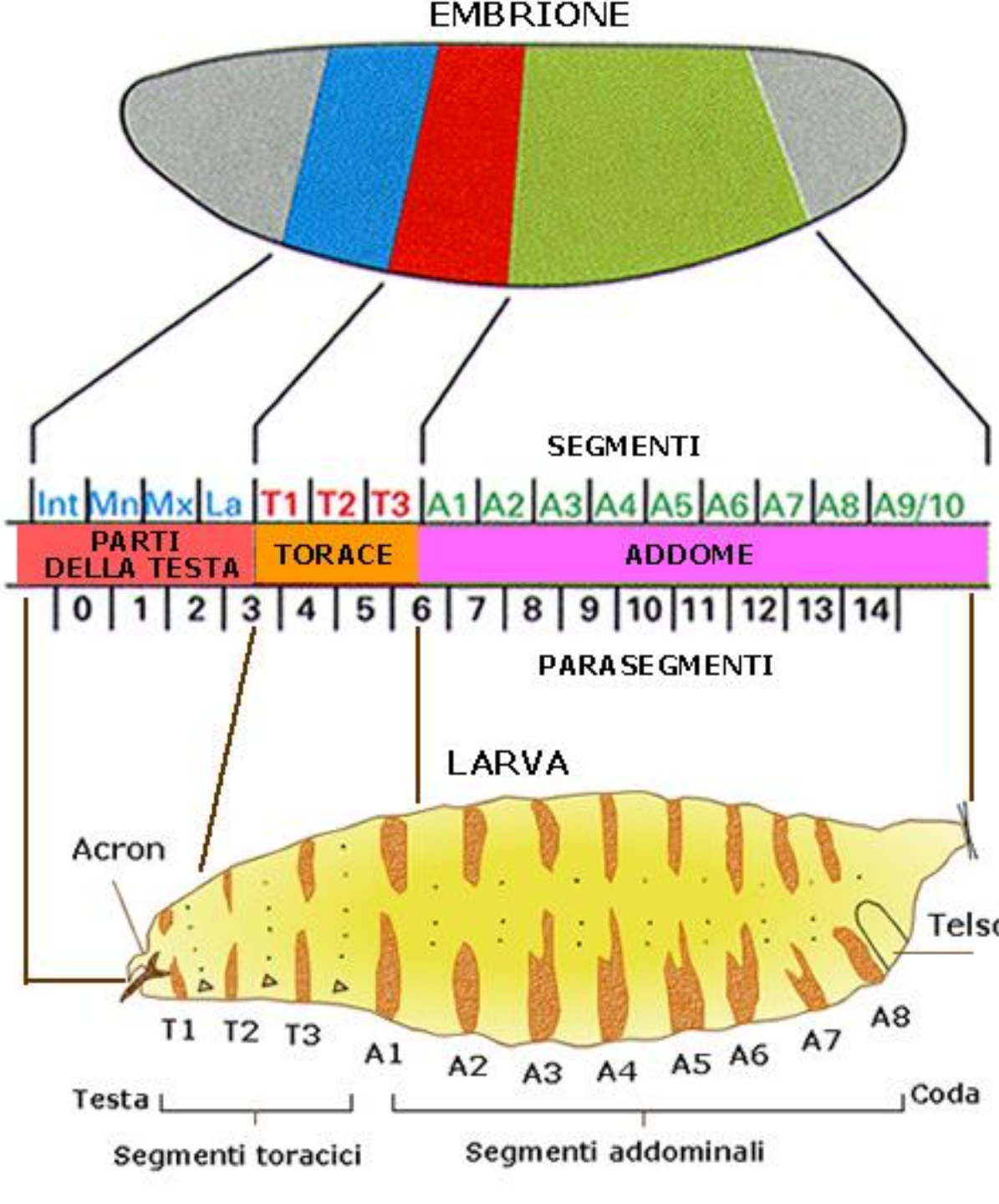






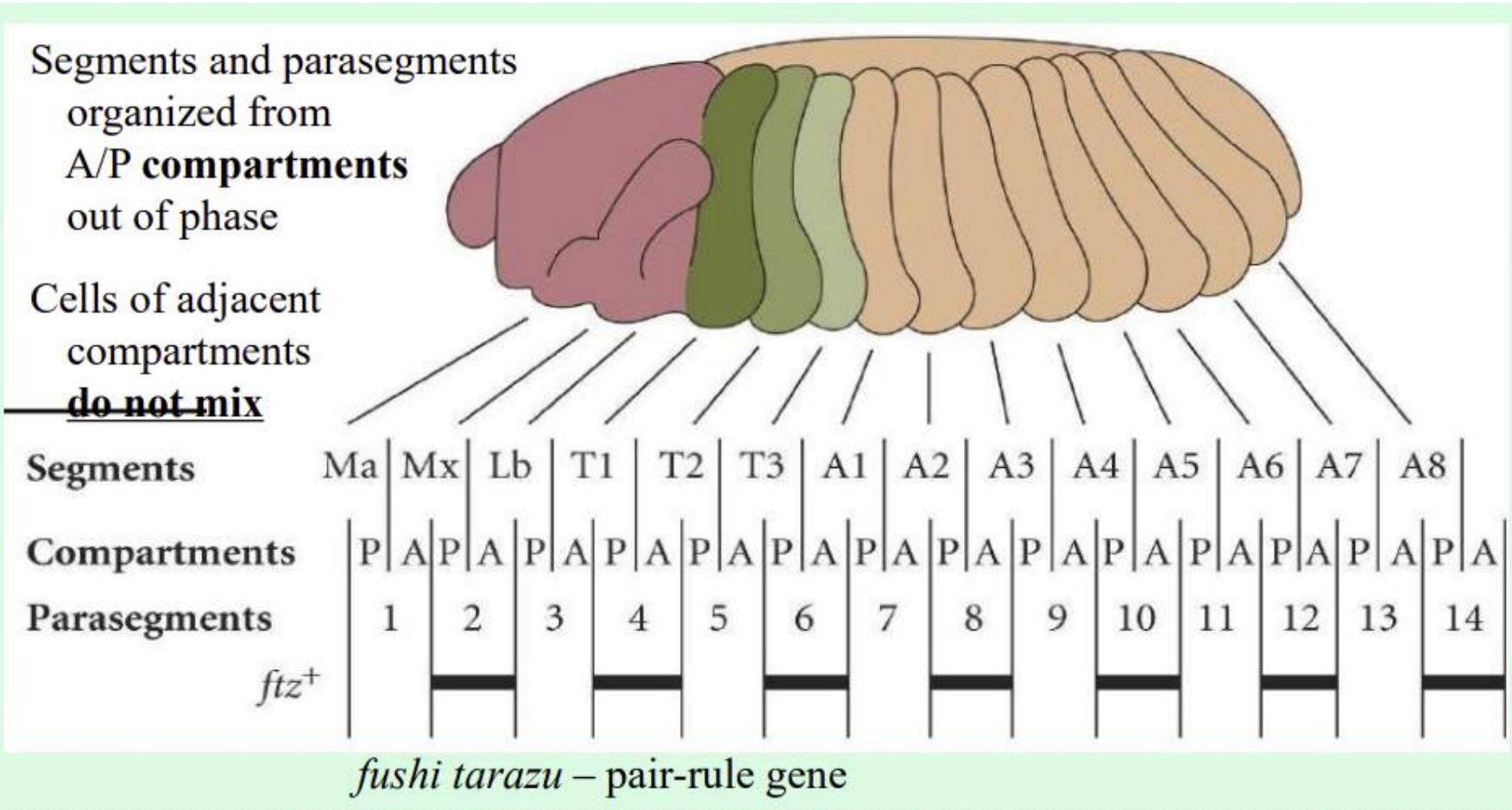


Corrispondenza tra segmenti dell'embrione e segmenti della larva, in *Drosophila melanogaster*



Segmenti e Parasegmenti

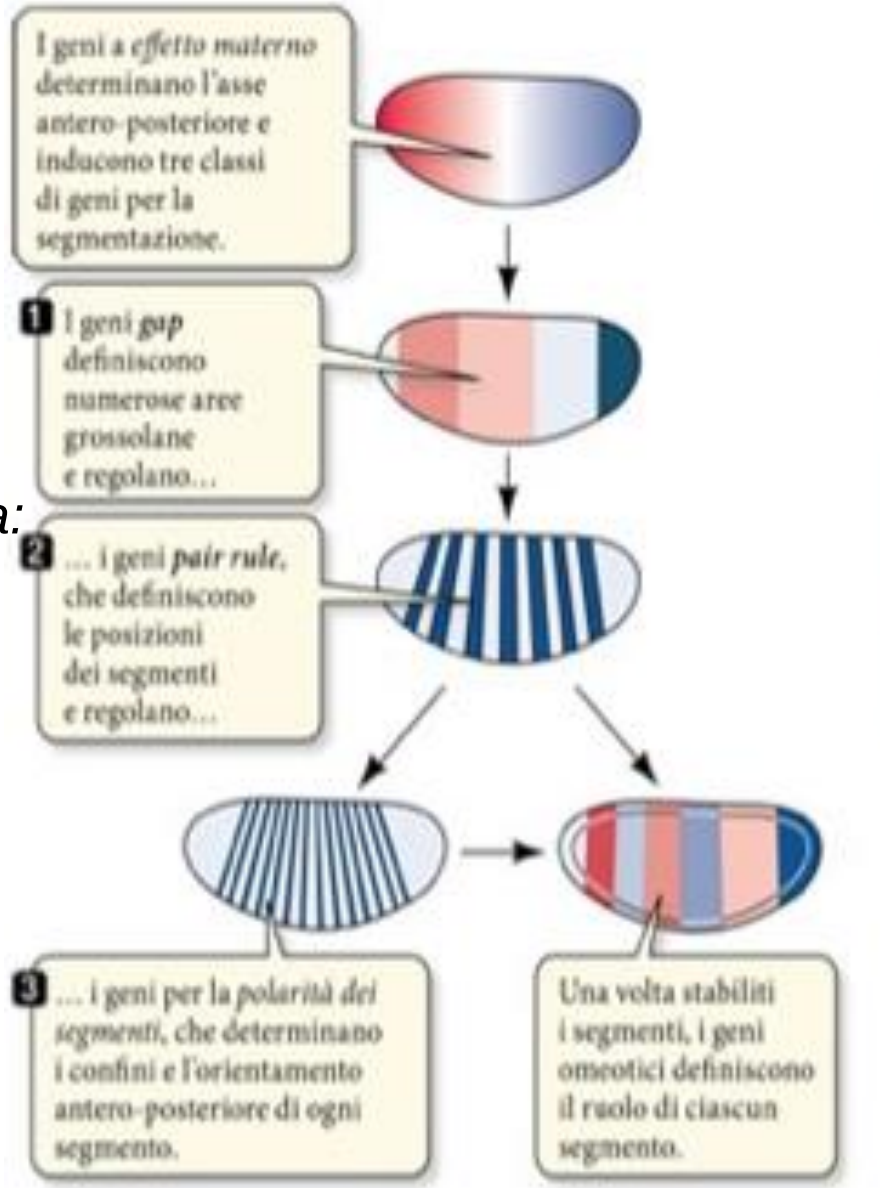
- Patterns di espresione in fasi precoci dell'embrione non sono delineate da segmenti di confine, ma da **parasegmenti**: unità fondamentali di espressione genica dell'embrione

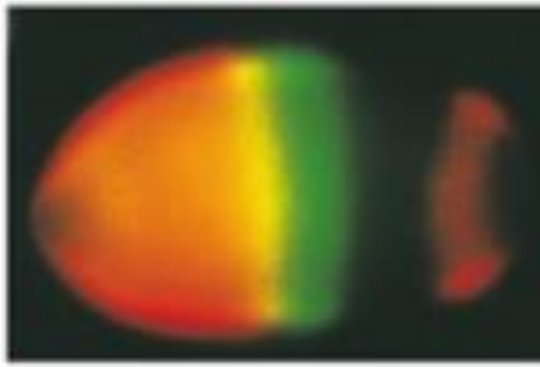


fushi tarazu – pair-rule gene

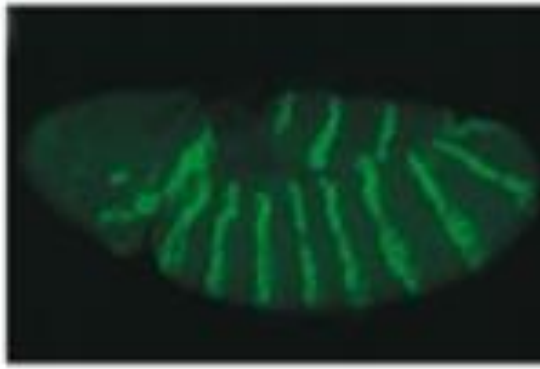
Geni zigotici della segmentazione

- L'espressione in sequenza di diversi fattori di trascrizione determina l'organizzazione dei segmenti del corpo di *Drosophila:*
  - **i geni per la segmentazione determinano**
    - il numero
    - e la posizione dei segmenti



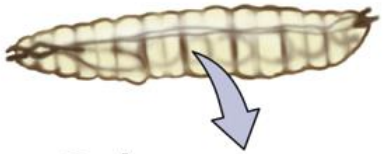






I geni zigotici *gap, pair-rule* e *segment polarity*

- Determinano il numero, posizione e polarità dei segmenti



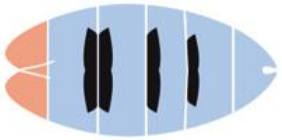
Geni gap

Larva normale

1 2 3 1 2 3 4 5 6 7 8

Testa | Segmenti toracici | Segmenti addominali

Larva mutante



Krüppel

La mutazione di *Krüppel* causa l'eliminazione dei segmenti anteriori.

Geni pair-rule

Segmenti deleti

1 2 3 1 2 3 4 5 6 7 8



even-skipped

La mutazione *even-skipped* causa la delezione dei segmenti pari.

Geni di polarità di segmentazione

1 2 3 1 2 3 4 5 6 7 8



gooseberry

La mutazione *gooseberry* causa la sostituzione della metà posteriore di ciascun segmento con un'immagine specchio della metà anteriore di un segmento adiacente.

Geni zigotici della segmentazione

NATURE OF THE GENE PRODUCTS OF THE PATTERNING GENES:

GAP GENES:

Krupple	(Kr)	TF Zn++ finger (like TFIIIA)
knirps	(kni)	TF Zn++ finger (steriod hormone R)
hunchback	(hb)	TF Zn++ finger (like TFIIIA)
giant	(gt)	cloned protein (? function opa repeats)
tailless	(tll)	TF Zn++ finger (steriod hormone R)
huckebein	(hkb)	TF

PAIR RULE GENES:

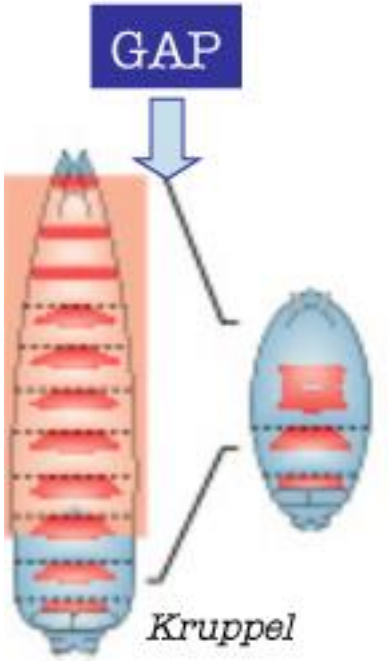
hairy	(h)	TF HLH helix-loop-helix
even-skipped	(eve)	TF homeodomain
runt	(run)	cloned protein (? function)
fushi tarazu	(ftz)	TF homeodomain
odd-paired	(opa)	
odd-skipped		
sloppy-paired	(slp)	cloned, probable TF DNABD (hepatocyte TF)
paired	(prd)	TF homeodomain

SEGMENT POLARITY GENES:

engrailed	(en)	TF homeodomain
wingless	(wg)	secreted glycoprotein (int-1 growth factor)
cubitus inter.	(ci-D)	
hedgehog	(hh)	secreted protein
fused	(fu)	ser/thr kinase
armadillo	(arm)	cytoplasmic protein (in adhesive junctions)
patched	(ptc)	transmembrane protein
gooseberry	(gsb)	cloned protein (? function)

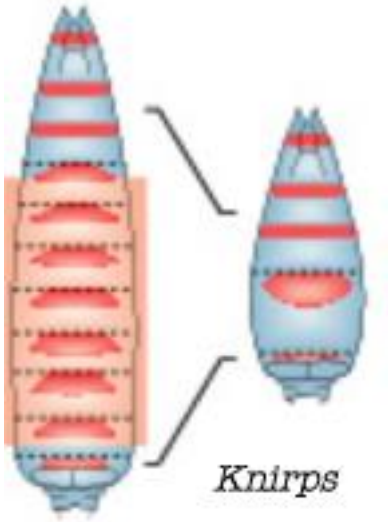
B1.Mutanti della segmentazione

- **3 classi di geni zigotici della segmentazione :**
  1. **GAP**
  2. **PAIR RULE**
  3. **SEGMENT POLARITY**



1.Mutanti GAP:

- Tutti i mutanti di questa classe presentano **delezioni di regioni corrispondenti a piu' segmenti contigui.**
- Questi loci devono essere necessari per
  - una suddivisione segmentale normale di una regione contigua del corpo;
  - identificano 3-4 ampie regioni nell'embrione.

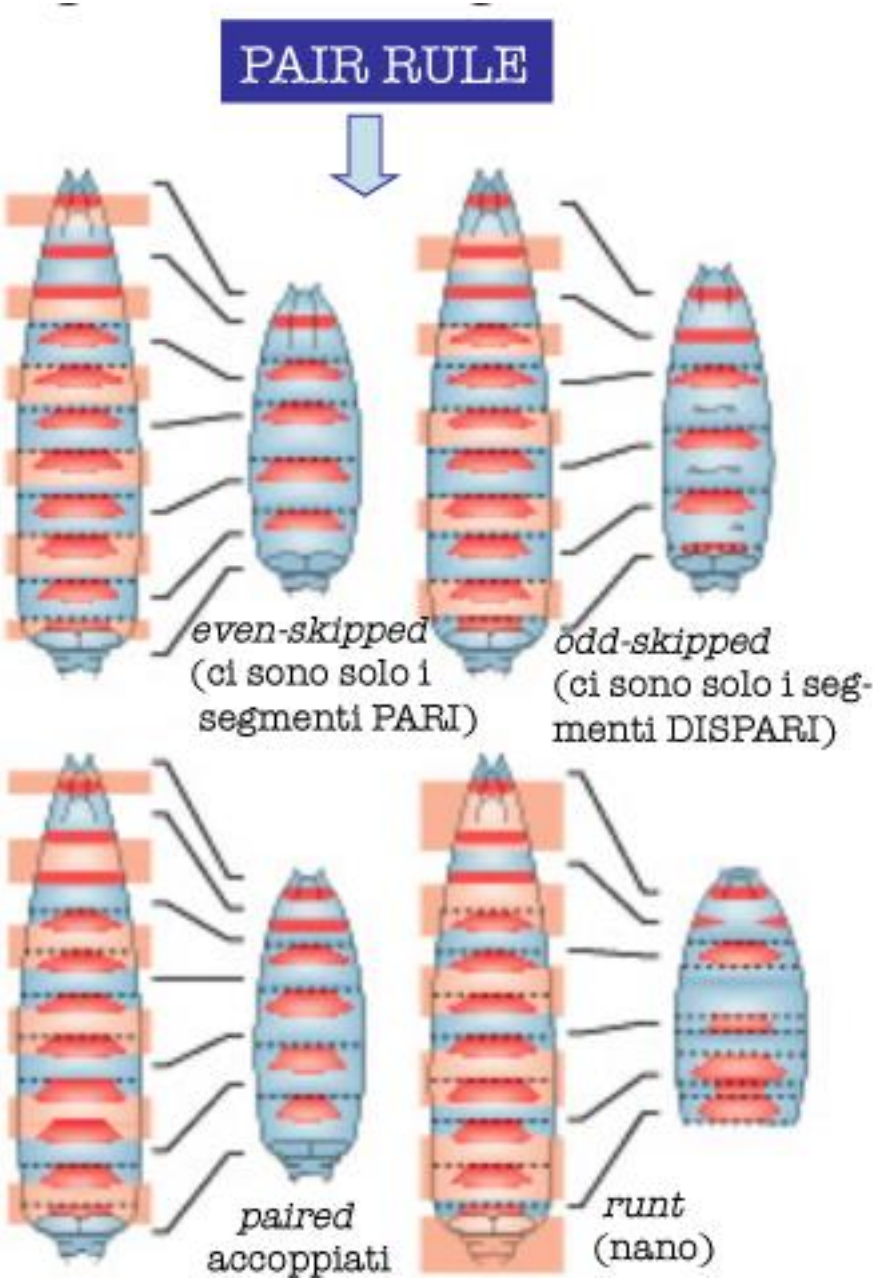


Le zone evidenziate, mancano nei mutanti indicati

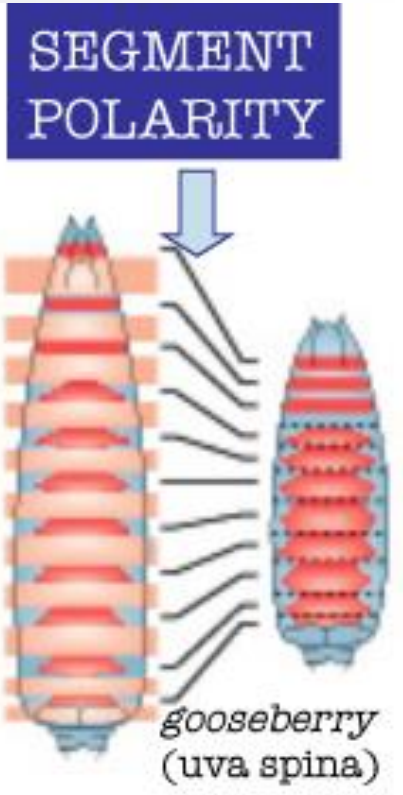
2. Mutanti della segmentazione: geni “pair rule”

- **Mutazioni PAIR-RULE o della regola pari:**
  - tutti i mutanti di questa classe presentano la delezione di segmenti
  - Specificano 7 regioni all’interno del-l’embrione

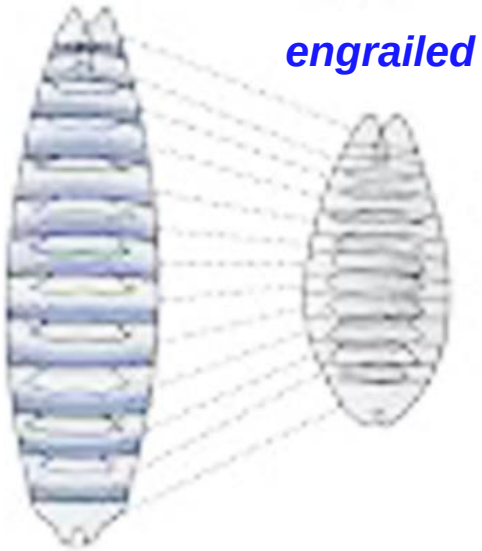
Le zone evidenziate, mancano nei mutanti indicati



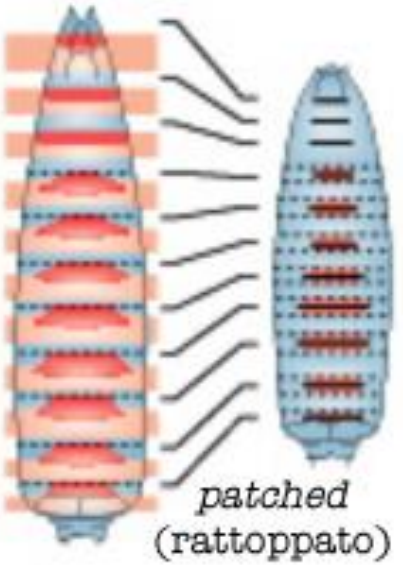
3. Mutanti della segmentazione: geni “segment polarity”



- **Mutazioni SEGMENT-POLARITY o della polarita’ dei segmenti:**
  - tutti i mutanti di questa classe mostrano una delezione di una parte specifica di ogni segmento con duplicazione speculare della parte che rimane.
  - Specificano 14 regioni all’interno dell’embrione (dei 14 segmenti)



- Nel mutante *engrailed* ci sono **solo parti anteriori dei segmenti**



Le zone evidenziate, mancano nei mutanti indicati

B2) I geni omeotici controllano lo sviluppo dei segmenti lungo l'asse antero-posteriore

- Dopo che l'azione dei geni di segmentazione ha stabilito i confini dei segmenti, **i geni omeotici** (dalla parola greca che sta per "uguale") **vengono attivati** in quanto bersaglio stesso dei geni zigotici.
- **L'espressione dei geni omeotici determina quali strutture adulte si formeranno** da ciascun segmento del corpo.
- Nella *Drosophila* questo include:
  antenne, parti della bocca, zampe, ali, torace e addome.

- I mutanti per questi geni vengono chiamati **mutanti omeotici: la struttura sviluppata da un segmento viene trasformata nella struttura presente nel segmento vicino.**

Geni selettori omeotici

- **Agiscono dopo che i segmenti sono stati definiti, specificando identità distinte per i vari segmenti.**

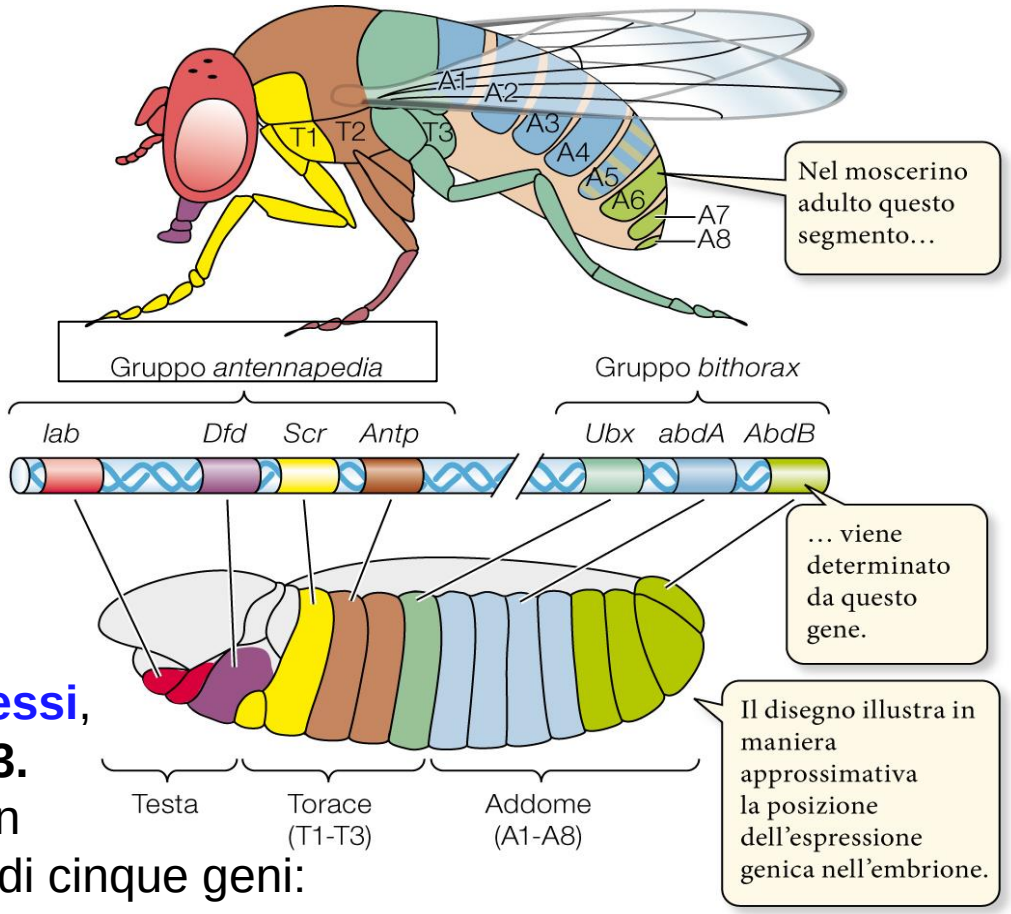
- Due gruppi principali di geni omeotici:

  - **complesso di geni *Antennapedia*:**
    agiscono nella specificazione dei segmenti della **testa e del torace.**

  - **complesso di geni *Bithorax*:**
    agiscono nella specificazione dei segmenti del **torace e dell'addome**

I geni omeotici

- L'espressione in sequenza di diversi FT determina l'organizzazione dei segmenti del corpo di *Drosophila*:
- **i geni omeotici controllano l'identità di ogni segmento.**



- La Drosophila, come tutti gli insetti, **ha 8 geni Hox.**
- Questi sono raggruppati in **2 complessi**, entrambi **localizzati sul cromosoma 3.**
- Il **complesso Antennapedia** (da non confondere con il gene *Antp)* consiste di cinque geni: *labiale (lab), proboscipedia (pb), deforme (Dfd), pettini del sesso ridotti (Scr)* e *Antennapedia (Antp) :*stabiliscono l'identità dei primi due segmenti toracici.
- **Il complesso Bithorax**, che prende il nome dal gene ***Ultrabithorax***, è costituito dai restanti 3 geni: *Ultrabithorax (Ubx), addominale-A (abd-A) e addominale-B (abd-B),* in particolare

  - *Ubx)*: controlla lo sviluppo delle strutture del compartimento posteriore di T2 e delle strutture di T3.
  - *abdA* e *AbdB):* stabiliscono l'identità degli otto segmenti addominali (A1-A8).

I geni *Hox* in *Drosophila*

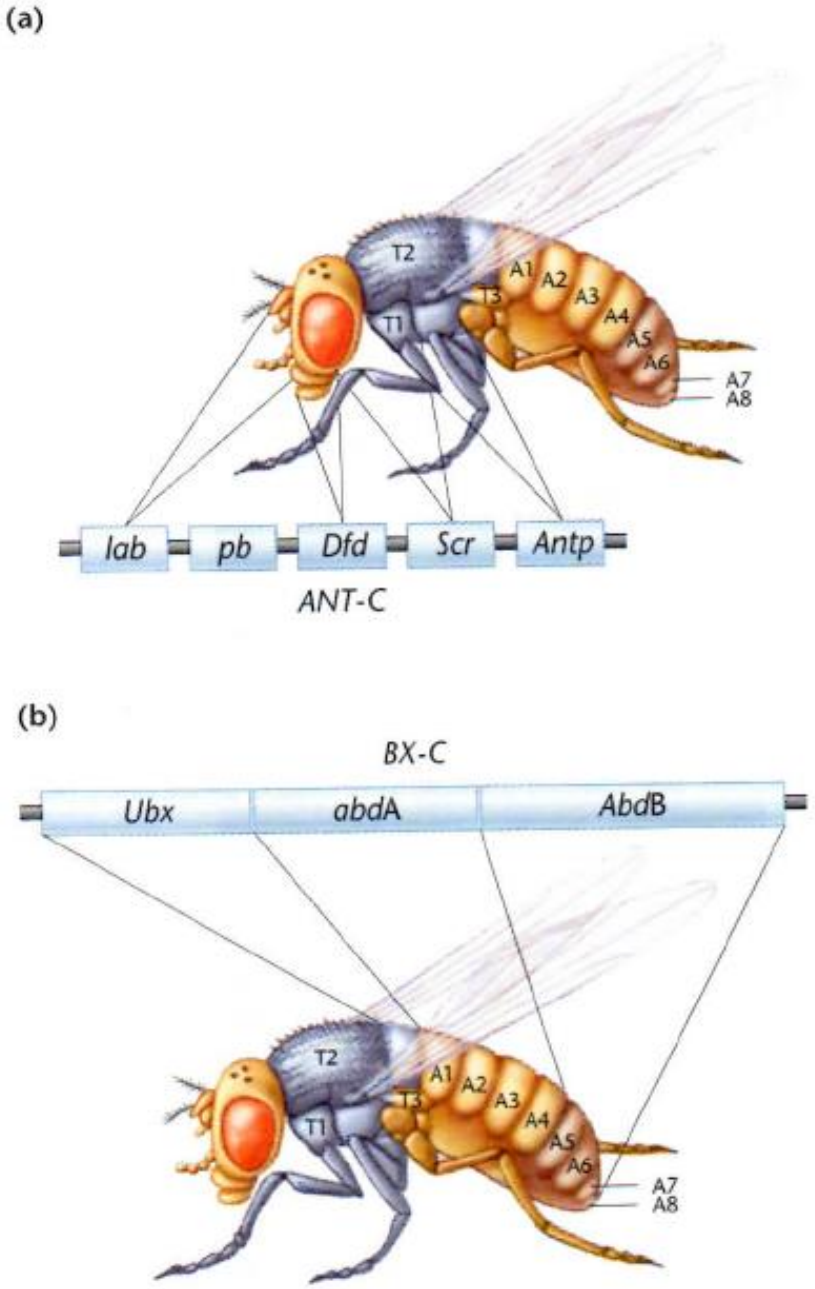
- **I geni del complesso *Antennapedia* e le strutture adulte che questi determinano,**

(a) Nel complesso *ANT-C*, i geni

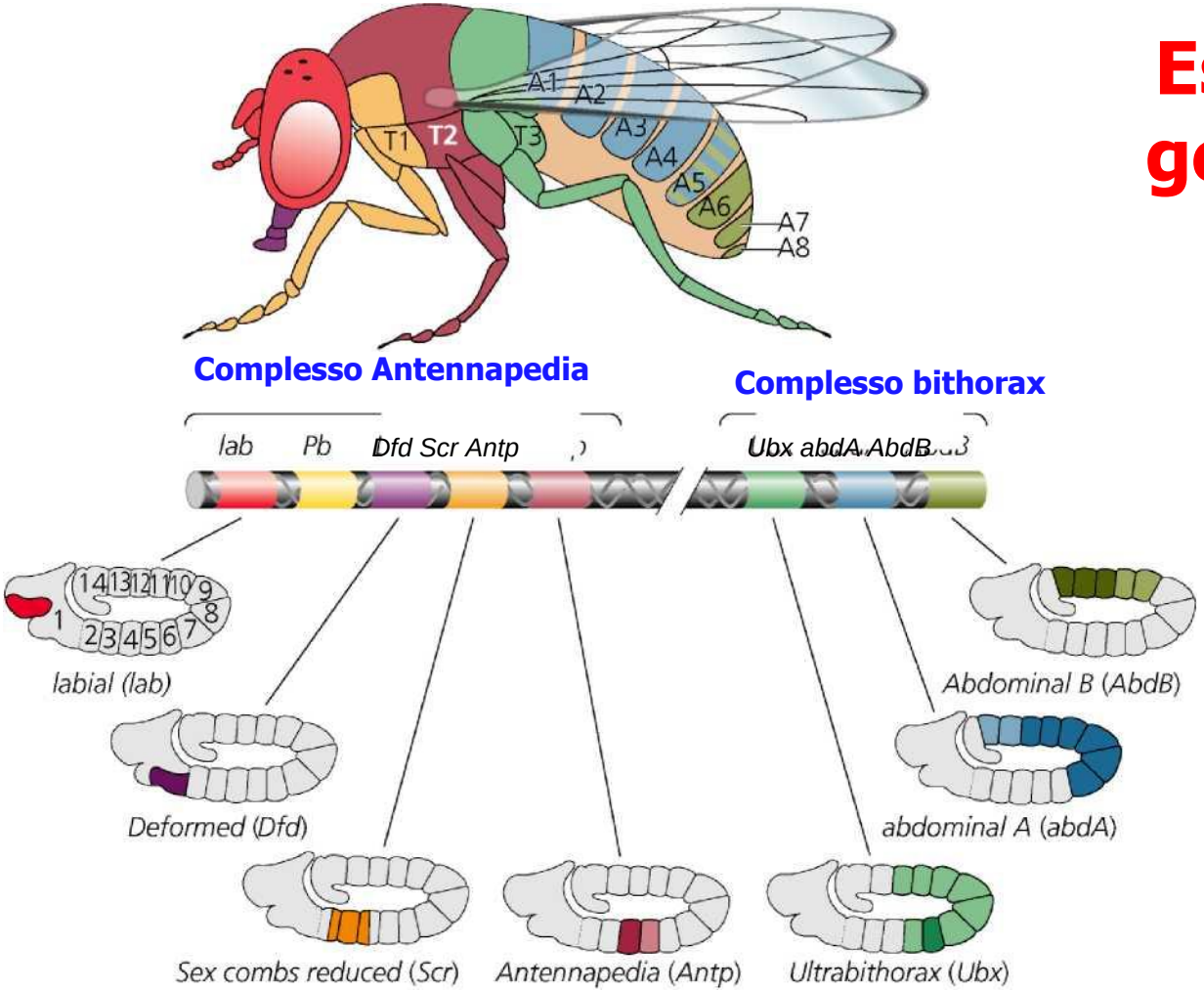
- ***labial (lab)* e *Deformed (Dfd*)** controllano lo sviluppo dei segmenti della testa.
- **Sex *comb reduced (Scr)* e *Antennapedia (Ant)*** stabiliscono l'identità dei primi due segmenti toracici.
- ***proboscipedia (pb),*** può non agire durante l'embriogenesi, ma può essere necessario per mantenere lo stato differenziato negli adulti. Nei mutanti, i palpi labiali sono trasformati in zampe,

b) Nel complesso BX-C,

- ***Ultrabithorax:*** controlla lo sviluppo delle strutture del compartimento posteriore di T2 e delle strutture di T3.
- ***abdominal A (abdA)* e *AbdominalB (AbdB),*** stabiliscono l'identità degli otto segmenti addominali (A1-A8).

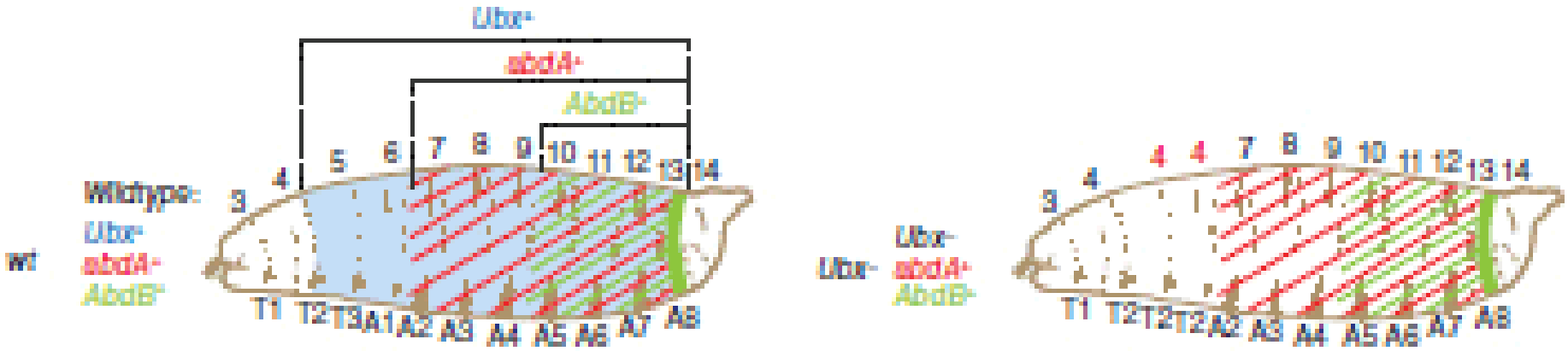


Espressione dei geni omeotici in *Drosophia*



- Al centro sono rappresentati i complessi **Antennapedia** e **bitorax.**
- Sotto e sopra la mappa dei geni sono raffigurate rispettivamente la regione di espressione (mRNA e proteine) nel blastoderma dell'embrione e le regioni del moscerino adulto che da queste si formano.
- Le regioni più intensamente colorate rappresentano i segmenti o para-segmenti che contengono la maggior quantità di prodotto.

Effetto delle mutazioni in geni omeotici



Cambiamento di Identità di segmenti nel mutante *Ubx*.

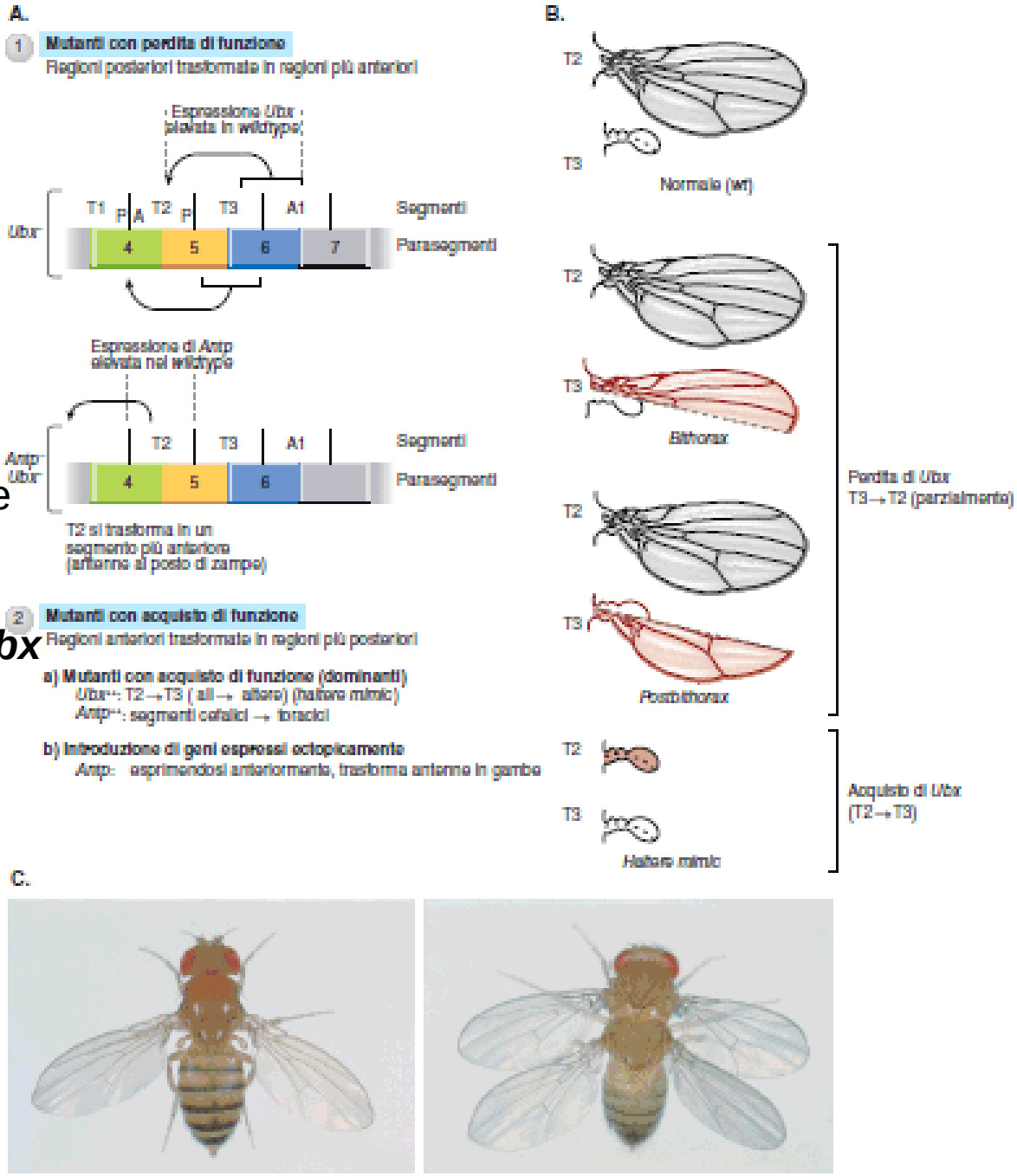
- Nel wildtype (a sinistra), diversi gruppi di segmenti esprimono diverse combinazioni di Ubx, AbdA e AbdB.
- Nel mutante *Ubx* (a destra), i parasegmenti 5 e 6 acquisiscono identità di segmento 4 e i corrispondenti segmenti T3 e A1 acquisiscono identità di segmento 12.
- Più posteriormente, nelle regioni che esprimono *AbdA e AbdB,* la mutazione di *Ubx* ha scarso effetto.

Mutazioni con perdita o acquisto di funzione nei mutanti *Antp* e/o *Ubx* alterano il piano di sviluppo dei segmenti toracici.

A) Mutanti con perdita di funzione (1) e con acquisto di funzione **(2). *Ubx**, Antp** *:* espressione spazialmente sregolata di *Ubx* e *Antp, ri*spettivamente**.

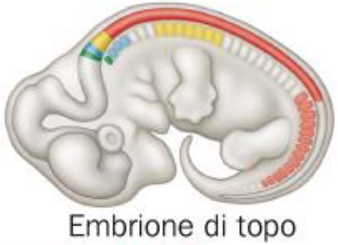
(B) Mutanti con perdita o con acquisto di funzione di *Ubx.*

I mutanti *bithorax* e *postbithorax* sono mutanti in regioni regolative. (C) *Drosophila* con quattro ali, anziché due, a causa di una combinazione delle mutazioni *bithorax e postbithorax*



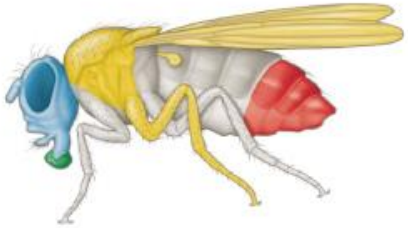
I geni omeotici e l'apoptosi si ritrovano in un'ampia varietà di animali

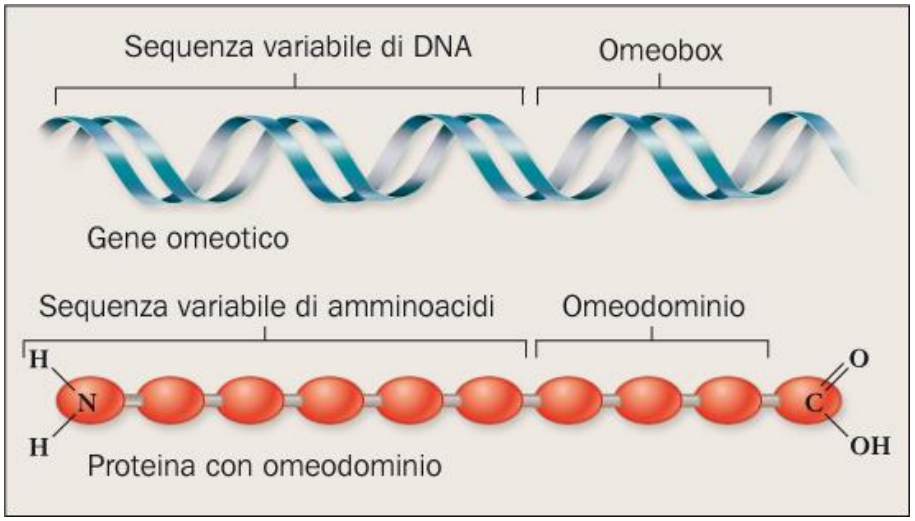
- I **geni omeotici** vengono attivati dopo quelli che regolano la segmentazione,
- **stabiliscono quali parti del corpo si svilupperanno da ogni segmento**.
- Tutti i geni omeotici **contengono la stessa particolare sequenza nucleotidica**, che è stata chiamata **omeobox**.









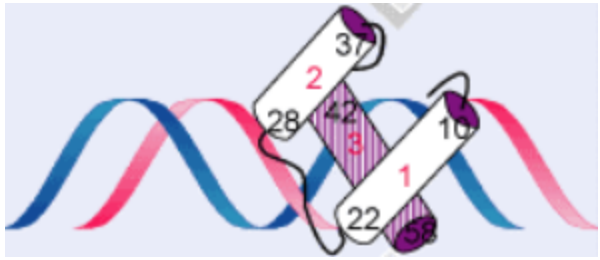


Geni omeotici e omeodominio

- I **geni *omeotici (HOX)*** codificano i fattori di trascrizione **HOX**
- sono accomunati dalla presenza **dell'omeobox**, una **sequenza di DNA di 180 bp,**
  - molto conservata evolutivamente,
  - individuata per la prima volta nel 1984 all'interno dei geni *Antp* e *Ubx* di *D. melanogaster*.
- La sequenza dell'***omeobox*** corrisponde ***all'omeodominio dei fattori di trascrizione HOX***, una regione di **60 aminoacidi** che lega il DNA, regolando l'espressione genica.

```
lab       NNSGRTNFTNKQLTELEKEFHFNRYLTRARRIEIANTLQLNETQVKIWFQNRRMKQKKRV
pb        PRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAASLDLTERQVKVWFQNRRMKHKRQT
Dfd       PKRQRTAYTRHQILELEKEFHYNRYLTRRRRIEIAHTLVLSERQIKIWFQNRRMKWKKDN
Scr       TKRQRTSYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMKWKKEH
Antp      RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMKWKKEN
Ubx       RRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIEMAHALCLTERQIKIWFQNRRMKLKKEI
abd-A     RRRGRQTYTRFQTLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMKLKKEL
abd-B     VRKKRKPYSKFQTLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARNLQLTERQVKIWFQNRRMKNKKNS

consensus -RRGRT-YTR-QTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMK-KKE-
                    Helix 1          Helix 2          Helix 3
```



- In molti organismi questi **fattori di trascrizione** sono essenziali per specificare, il destino differenziativo delle cellule durante il differenziamento e lo sviluppo embrionale,
- A livello molecolare, l'omeodominio possiede una struttura secondaria definita da tre alfa-eliche **(elica-giro-elica-giro-elica)**.
- Una proteina che **possiede un omeodominio è** quasi certamente **un fattore trascrizionale.**

L'omeobox

```
lab          NNSGRTNFTNKQLTELEKEFHFNRYLTRARRIEIANTLQLNETQVKIWFQNRRMKQKKRV
pb           PRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAASLDLTERQVKVWFQNRRMKHKRQT
Dfd          PKRQRTAYTRHQILELEKEFHYNRYLTRRRRIEIAHTLVLSERQIKIWFQNRRMKWKKDN
Scr          TKRQRTSYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMKWKKEH
Antp         RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMKWKKEN
Ubx          RRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIEMAHALCLTERQIKIWFQNRRMKLKKEI
abd-A        RRRGRQTYTRFQTLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMKLKKEL
abd-B        VRKKRKPYSKFQTLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARNLQLTERQVKIWFQNRRMKNKKNS

Sequenza     -RRGRT-YTR-QTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRRMK-KKE-
consenso                Elica 1          Elica 2          Elica 3
```

eliche 2 e 3: ***helix-turn-helix***

➢ **Le proteine Hox hanno sequenze in comune**

- Sequenze degli omeodomini di *Drosophila*.
- Tutti gli otto geni *Hox* codificano proteine contenenti un **dominio altamente conservato** di **60 aa, l'omeodominio, composto da tre α eliche**.
- Le eliche 2 e 3 formano un motivo ***helix-turn-helix*** simile a quello presente nel repressore Lac, Cro ed altre proteine di legame al DNA.
- I residui comuni dei geni *Hox* sono colorati in giallo, i residui diversi in rosso; quelli comuni a un gruppo di proteine sono colorati in blu o in verde.

Siti di legame di proteine Hox

➢ **Proteine Hox legano sequenze di DNA**

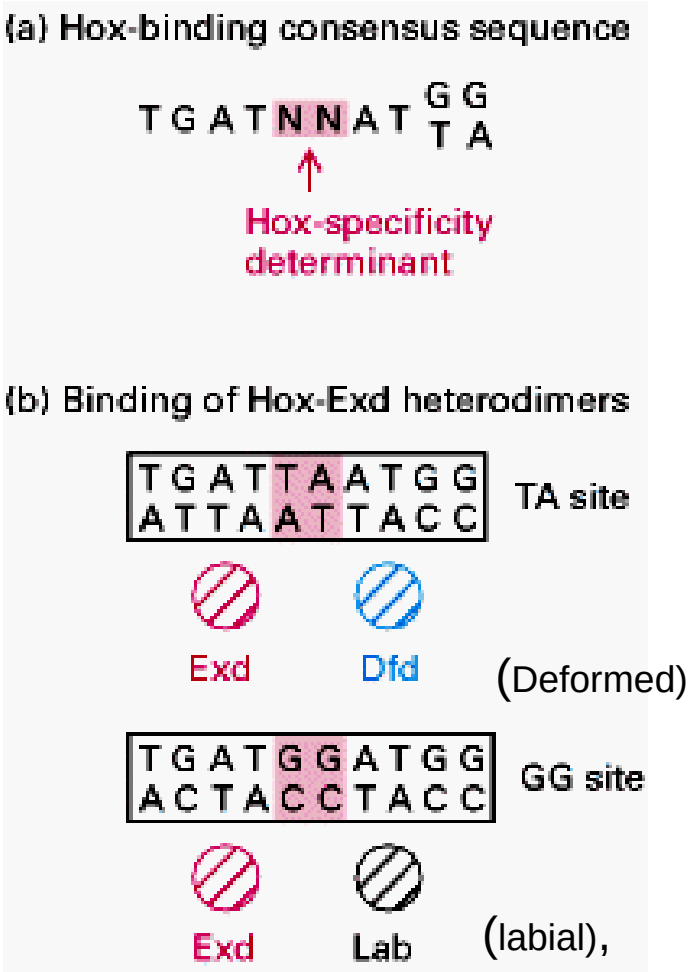
- ma differenti proteine Hox si legano con alta affinità alla stessa corta sequenza di DNA presente una volta ogni kb.

• La **capacità di proteine Hox** di controllare l'espresione di geni differenti **d**ipende dal prodotto del gene ***extradenticle (exd).***

• **Exd lega** differenti proteine Hox formando differenti eterodimeri che si legano selettivamente a specifiche sequenze target

• Exd può anche contribuire a specificità di funzione di Hox convertendo proteine Hox legate da repressori ad attivatori.

• Exd può anche operare indipendentemente per reprimere altri geni..

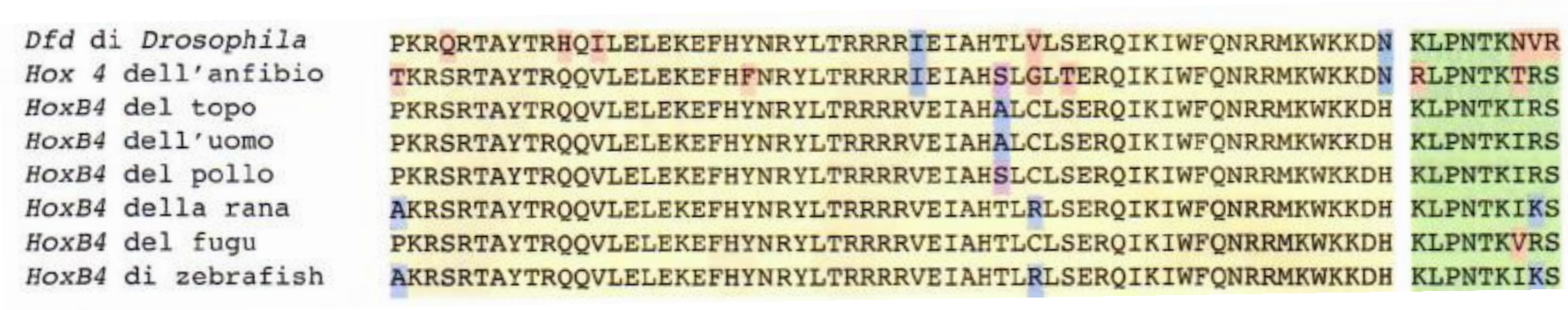


➢ **Ruolo di proteine Exd nel conferire specificità di legame di proteine Hox al DNA in *Drosophila*.**

(a) Varie proteine Hox, incluse *Dfd e Lab*, legano una sequenza consenso di 10-bp che differisce nei nucleotidi (N) localizzati nelle 2 posizioni centrali.

(b) Gli eterodimneri Exd-Dfd (Deformed) e Exd-Lab riconoscono specificatamnete i siti di legame Hox in cui i dinucleotidi centrali sono, rispettivamente, TA o GG,.

Cluster dei geni *Hox* controllano lo sviluppo di molti animali



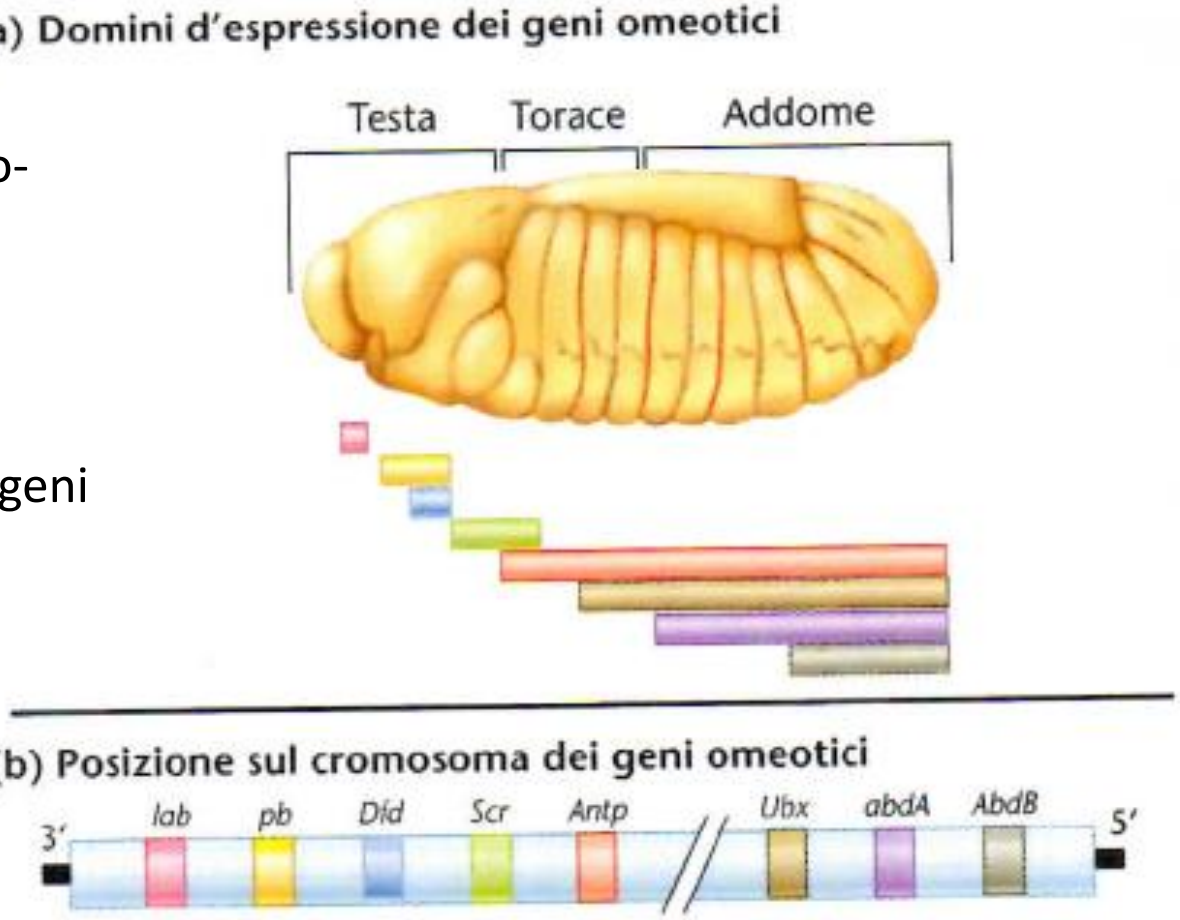
- Le **proteine Hox di *Drosophila*** e dei vertebrati mostrano **notevoli similarità .**
- Le sequenze degli omeodomini *Deformed* di *Drosophila* e di 4 geni del gruppo *Hox* nei vertebrati sono molto simili.
- I residui in comune sono mostrati in giallo; i residui diversi in rosso;
  i residui comuni a un sottogruppo di proteine in blu.
- Le regioni altamente similari fiancheggianti la regione C- terminale fuori dall'omeodomio sono mostrate in verde .

La relazione di colinearità tra il profilo spaziale d'espressione dei geni omeotici e la loro posizione sul cromosoma in *Drosophila*

(a) L'embrione di *Drosophila* e i domini d'espressione dei geni omeotici nell'epidermide embrionale e nel sistema nervoso centrale,

(b) Posizione sul cromosoma dei geni omeotici. NB:

L'ordine dei geni sul cromosoma corrisponde all'ordine in cui i geni sono espressi nei vari segmenti



labial (lab), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed (Dfd), Sex comb reduced (Scr), Antennapedia (Ant), Ultrabithorax (Ubx), abdominal A (abdA*) e *AbdominalB (AbdB)*

Controllo dell'espressione dei geni *Hox*

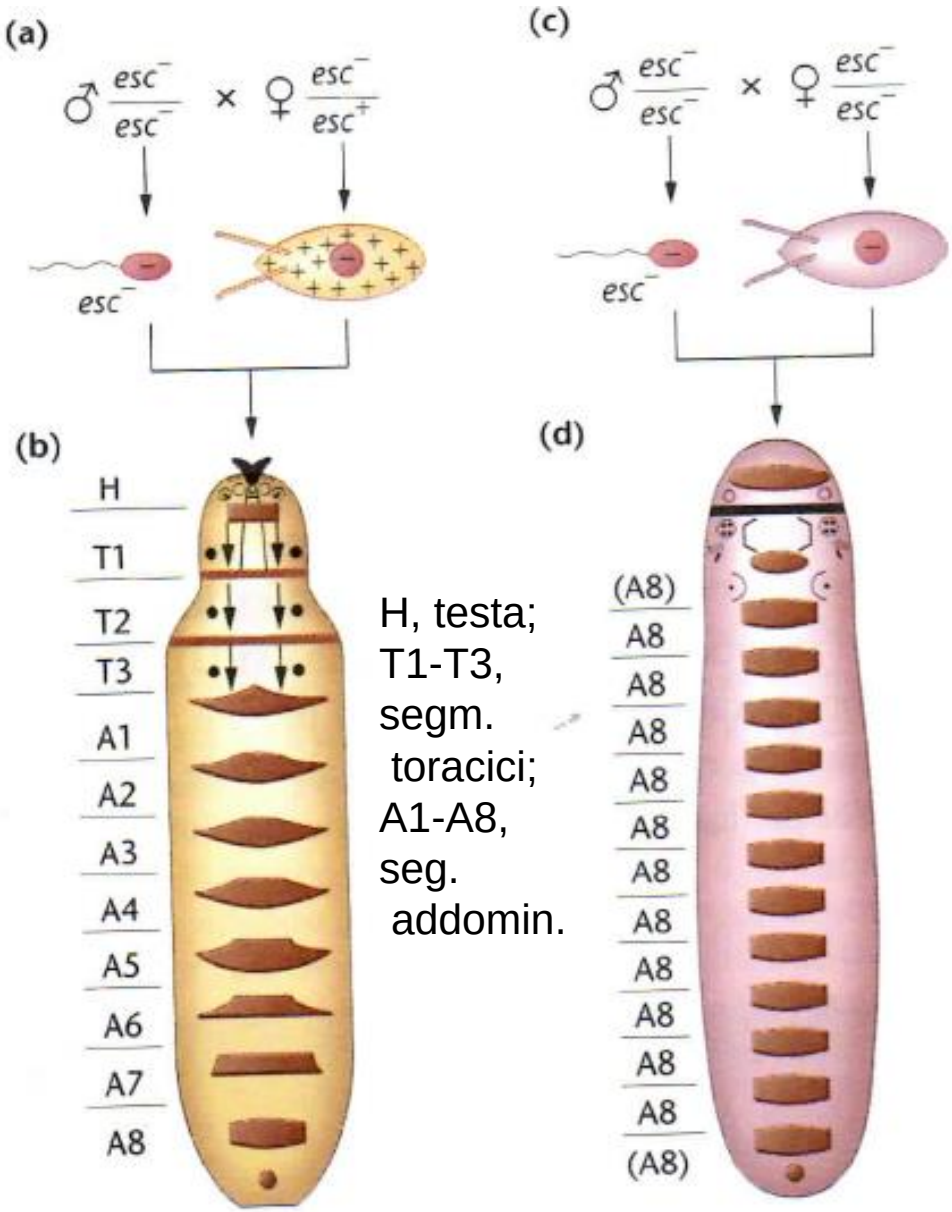
- In *D. m* è stato identificato un gruppo di **geni che controlla l'espressione dei geni *Hox:*** *extra sex combs (esc), Polycomb (pc), supersex combs (sxc) e trithorax (trx)*

a) Le femmine eterozigoti formano un prodotto selvatico del gene esce lo immagazzinano nell'oocita. (b) Quando l'uovo *esc-* ottenuto dalla meiosi di femmine eterozigoti viene fecondato da uno Spermatozoo *esc-*, si ottiene una larva selvatica con un normale profilo di segmentazione (*maternal rescue,* salvataggio materno).

- I confini tra la testa e il torace e tra il torace e l'addome sono indicati dalle frecce,

(c) Femmine omozigoti *esc-* producono uova mancanti di prodotto esc, che, quando fecondate con spermatozoi esc-,
(d) Danno vita a una larva nella quale la maggior parte dei segmenti della testa, del torace e dell'addome sono trasformati nell'ottavo segmento addominale.

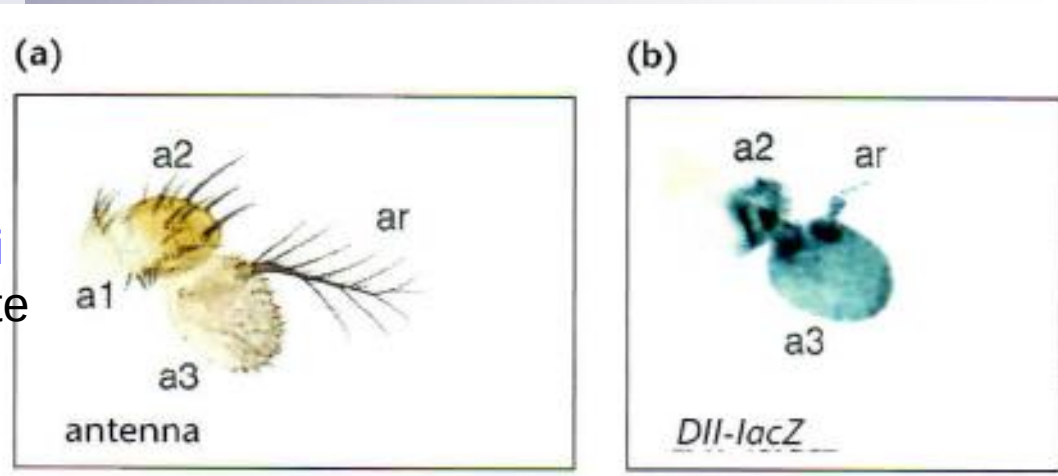
- Il *maternal rescue* dimostra che il prodotto del gene *esc* viene prodotto dal genoma materno e immagazzinato nell'oocita per essere poi usato nell'embrione.

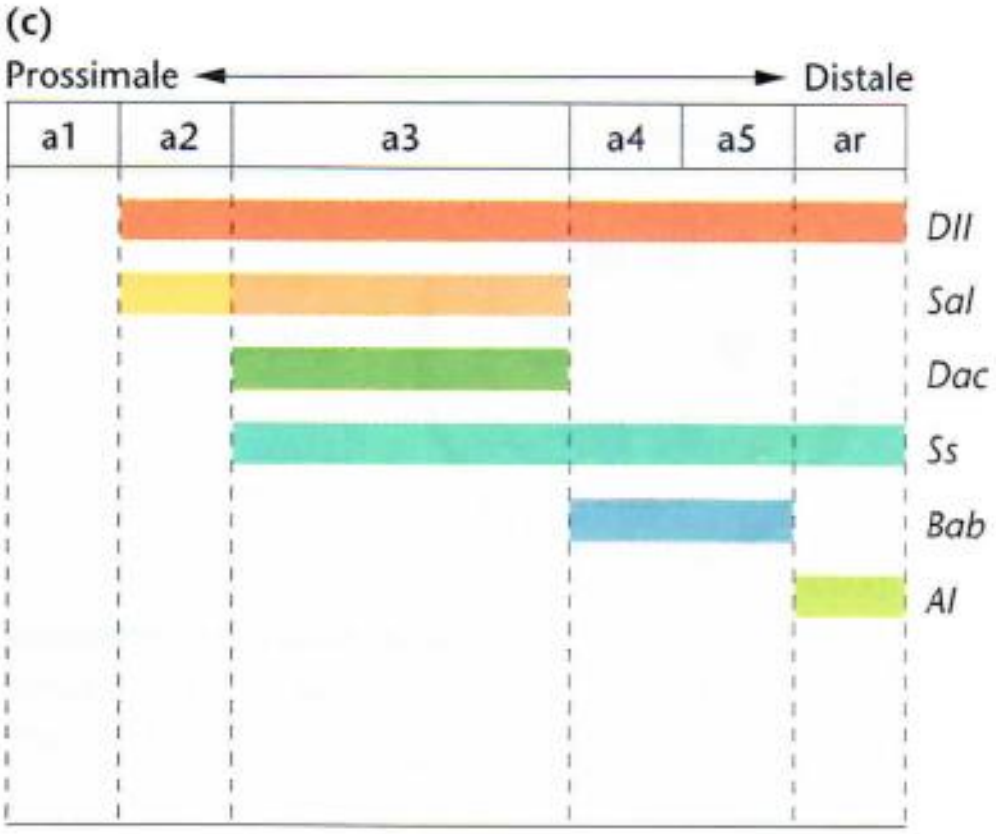


H, testa; T1-T3, segm. toracici; A1-A8, seg. addomin.

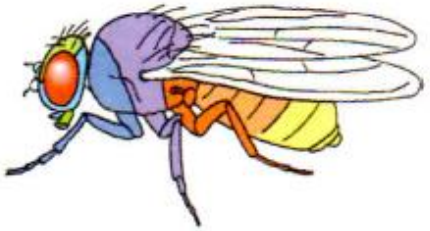
Le cascate d'azione dei geni che controllano il differenziamento

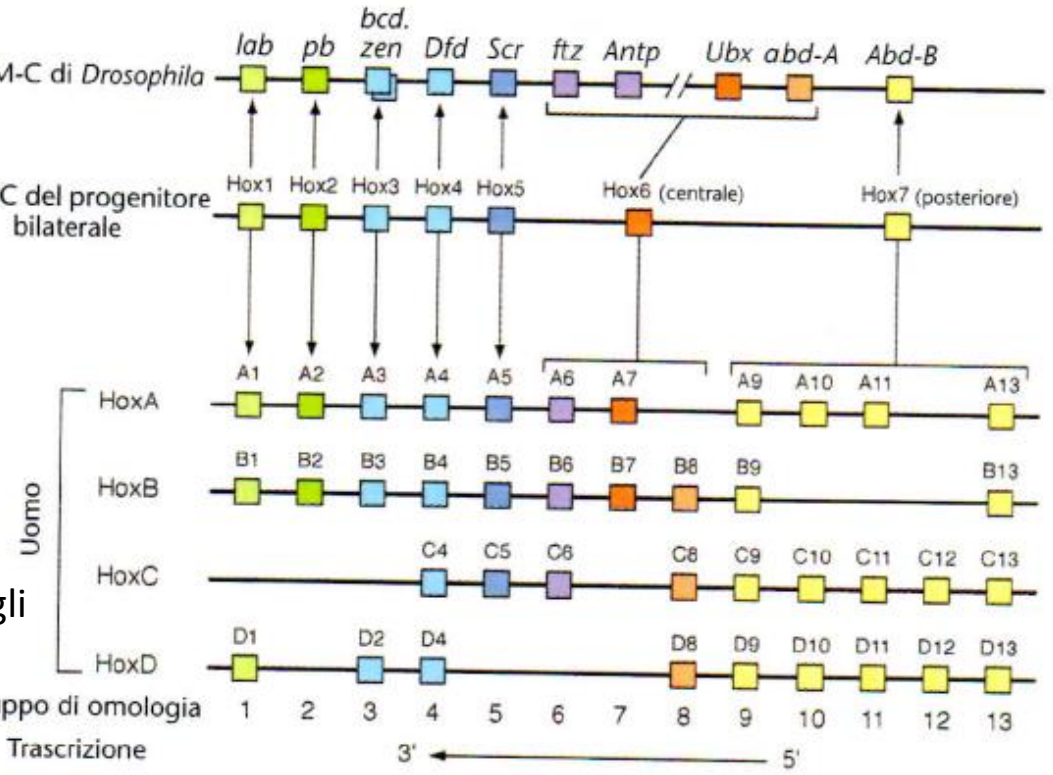
- Oltre ai geni homeobox del gruppo di geni *Hox* nei genomi eucarioti è presente una **grande ed eterogenea famiglia di geni homeobox**
  - L'azione del **gene *Distal-less (Dil)*** in D*rosophila* porta alla formazione di (a) **antenne selvatiche, suddivise** - nelle ariste (ar) e nei tre segmenti antennali (a1, a2, a3).
  (b) Espressione di *Dil* (evidenziata in blu) nell'antenna di una pupa allo stadio tardivo. L'espressione in questa fase è limitata all'arista e ad a3.
  (c) L'attivazione dei geni bersaglio di *Dil* nei segmenti antennali durante il terzo stadio larvale appena prima dello stadio di pupa.
  - In questa fase, *Dil* è espresso in tutti i segmenti eccetto a1 .
  - Tutti i geni bersaglio **sono fattori di trascrizione**, che, a loro volta, attivano una cascata di altri geni.





Conservazione dell'organizzazione e dei profili d'espressione dei geni *Hox.*





- **Strutture sviluppate nell'adulto di *Drosophila,*** i colori corrispondono ai membri del Gruppo *Hox* che controllano la loro formazione (nel mezzo).

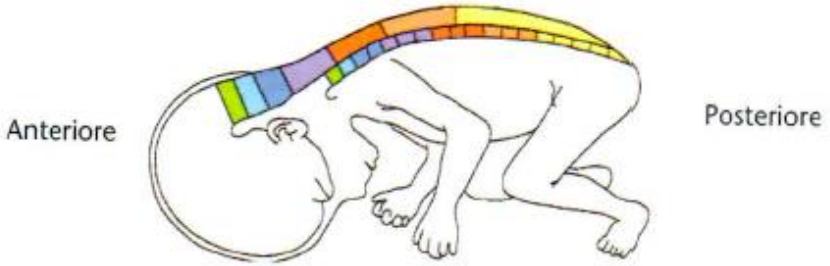
Ricostruzione del gruppo *Hox* del progenitore comune a tutti gli organismi con simmetria bilaterale, composto da sette geni (In basso).

- **Organizzazione e profili d'espressione dei quattro gruppi di geni *Hox (39 geni)* nell'embrione umano.**

NB. Alcuni dei geni posteriori sono espressi negli arti.

Il profilo d'espressione è dedotto da quello osservato nei topi.

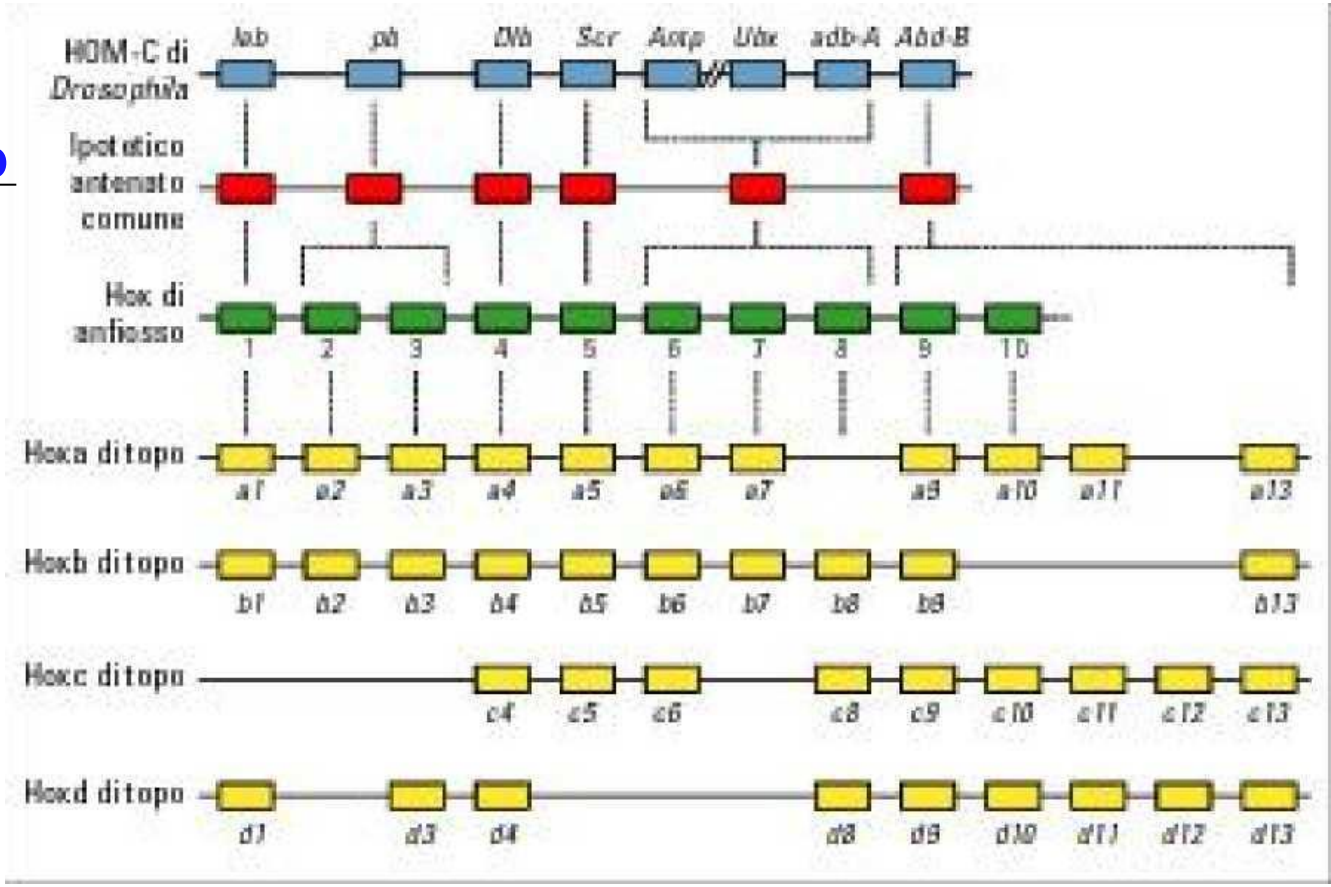
- Come in *Drosophila,* i **geni all'estremità sinistra del gruppo sono responsabili dello sviluppo delle strutture anteriori e i geni all'estremità destra sono responsabili dello sviluppo delle strutture posteriori**.
- Essendo avvenute delle duplicazioni, i geni hanno alta omologia per la sequenza originale



Duplicazione genica ed evoluzione dei geni Hox

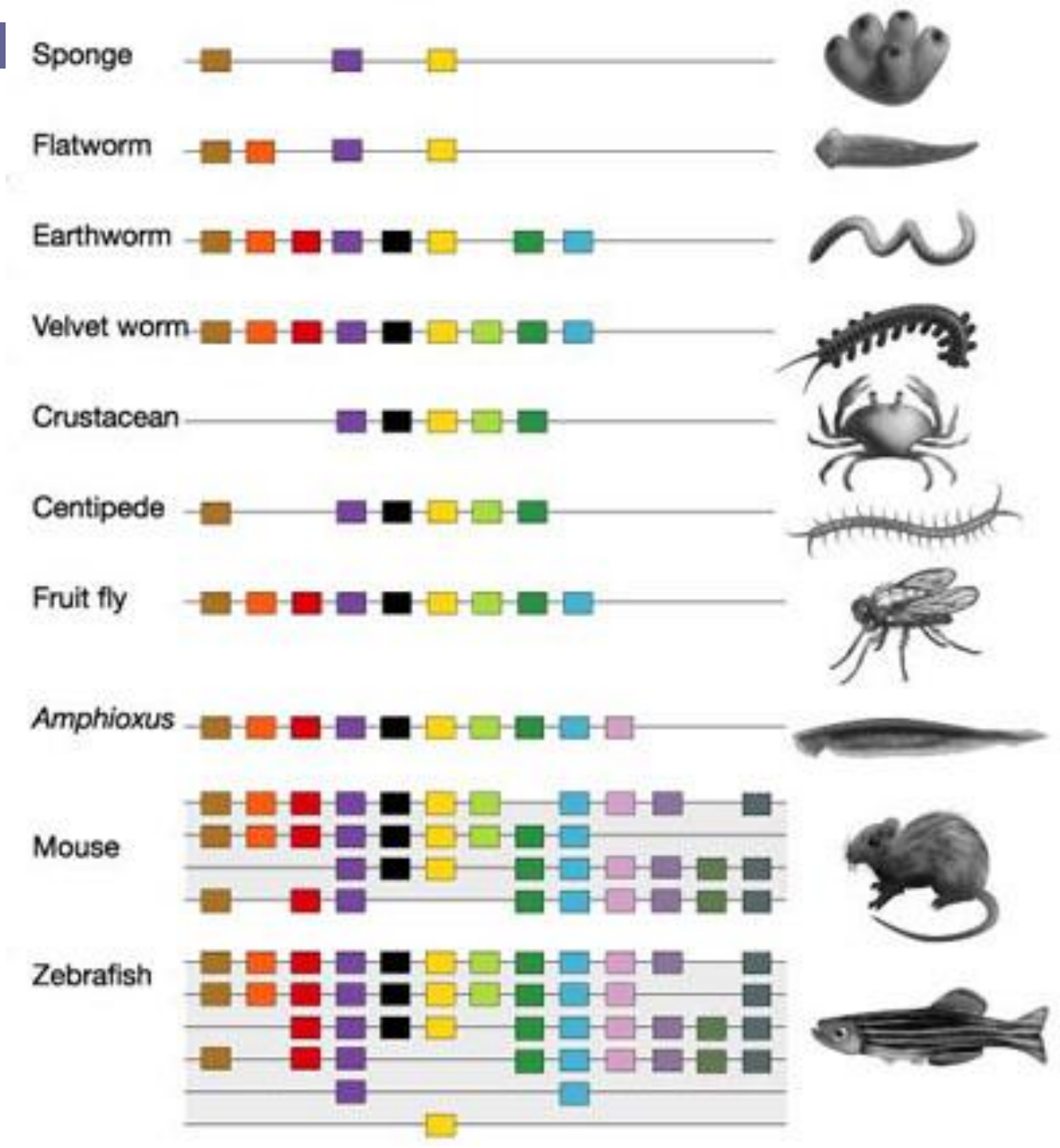
- **Ipotetico antenato comune**

- **Nei vertebrati**: una **doppia duplicazione dell'intero locus**



Essendo avvenute delle duplicazioni, **i geni hanno alta omologia per la sequenza originale**

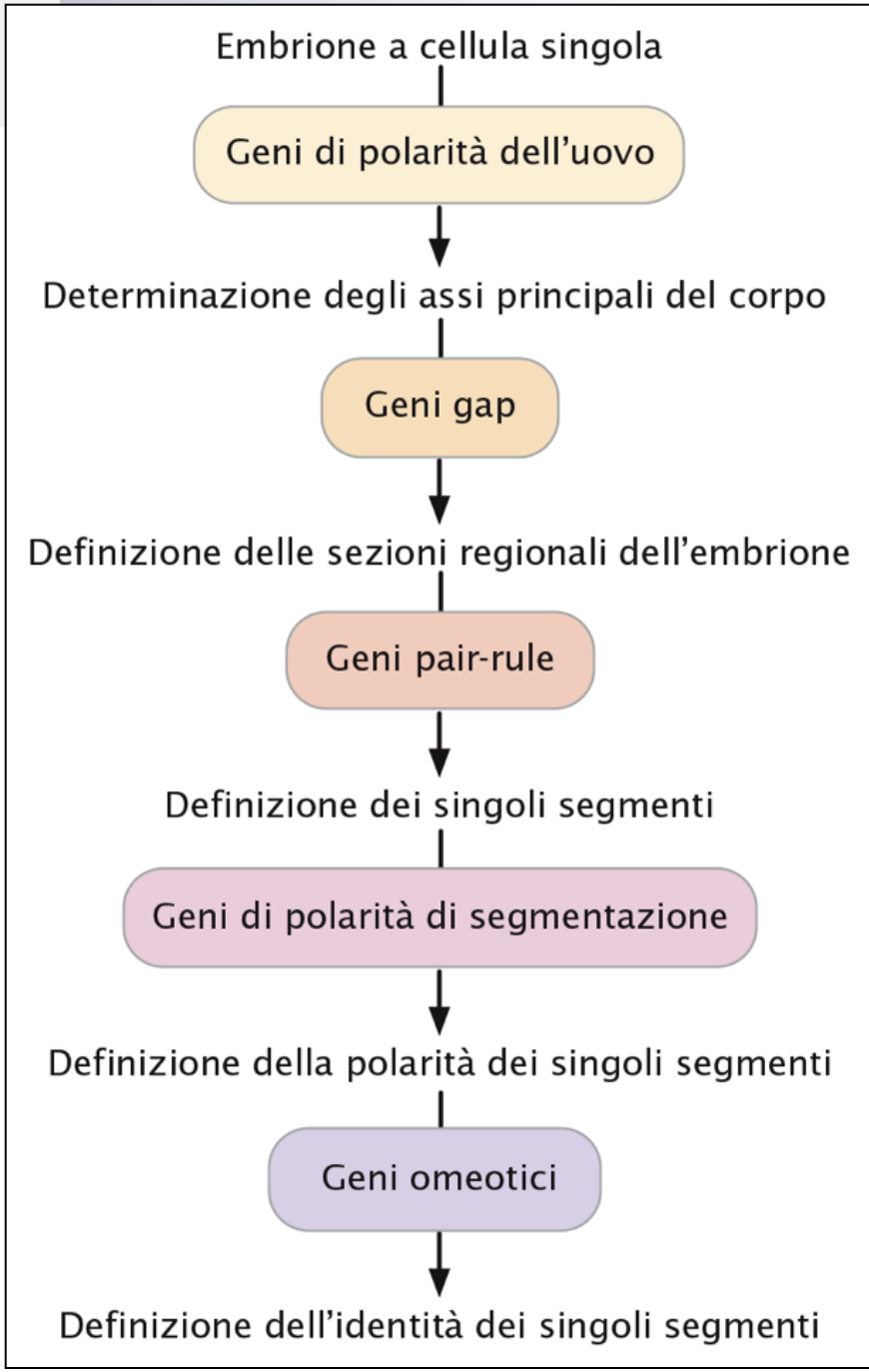
E non solo!


Sponge
Flatworm
Earthworm
Velvet worm
Crustacean
Centipede
Fruit fly
Amphioxus
Mouse
Zebrafish

In sintesi

- I geni che controllano lo sviluppo nella *Drosophila* **agiscono in una cascata ordinata in senso temporale e spaziale,** partendo con i geni che nelle prime fasi stabiliscono l'asse antero-posteriore (e dorso-ventrale) dell'uovo e dell'embrione.
- I gradienti lungo l'asse antero-posteriore degli mRNA e delle proteine materni attivano i geni *gap,* che **suddividono l'embrione in ampie regioni.**
- **I geni *gap,*** a loro volta, attivano i geni *pair-rule,* che **dividono l'embrione in segmenti**.
- L'ultimo gruppo di geni di segmentazione, i g**eni per la polarità segmentale, divide ogni segmento nelle regioni anteriore e posteriore** linearmente lungo l'asse antero-posteriore.
- Ai segmenti viene poi **assegnata un'identità dai geni *Hox*.**
- Pertanto, questa progressiva restrizione delle potenzialità di sviluppo delle cellule dell'embrione di *Drosophila* (che si compie interamente durante il primo terzo dell'embriogenesi)

coinvolge una cascata di azioni geniche, con proteine regolatrici che agiscono a livello sia trascrizionale sia traduzionale.



L’evoluzione della metameria

- Costituzione segmentale (o metamerica) del corpo di molti animali, Anellidi, Artropodi e Vertebrati,
- in **cui uno o più organi si ripetono nei metameri o segmenti successivi.**

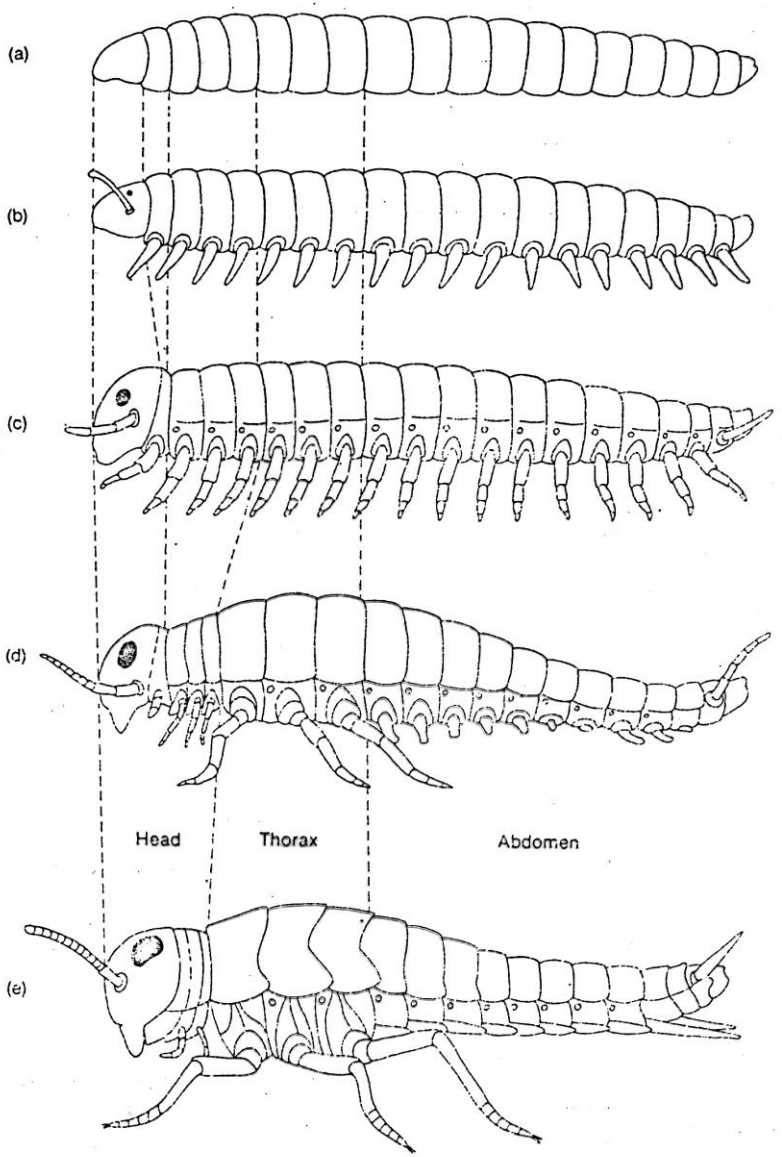


FIGURE 8–14. Diagrammatic representation of the hypothesized evolution of segmental pattern in the phylogeny of the Insecta. (a) annelid, (b) onychophoran, (c) myriapod, (d) apterygote insect, (e) pterygote insect. A comparison of this figure with Figure 8–9 demonstrates that the progressive deletion of the homeotic loci results in a progressive simplification of the segmental pattern of Drosophila, which to a certain extent mimics the phylogeny of the insects. [Redrawn from Snodgrass, 1935.]

MESSAGGIO

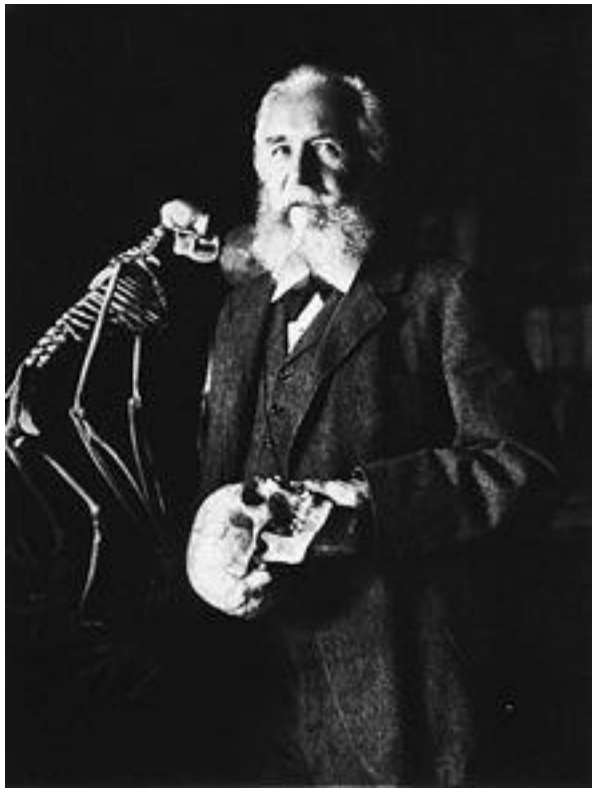
- Le strategie di sviluppo nelle diverse classi di animali sono piuttosto antiche e altamente conservate.

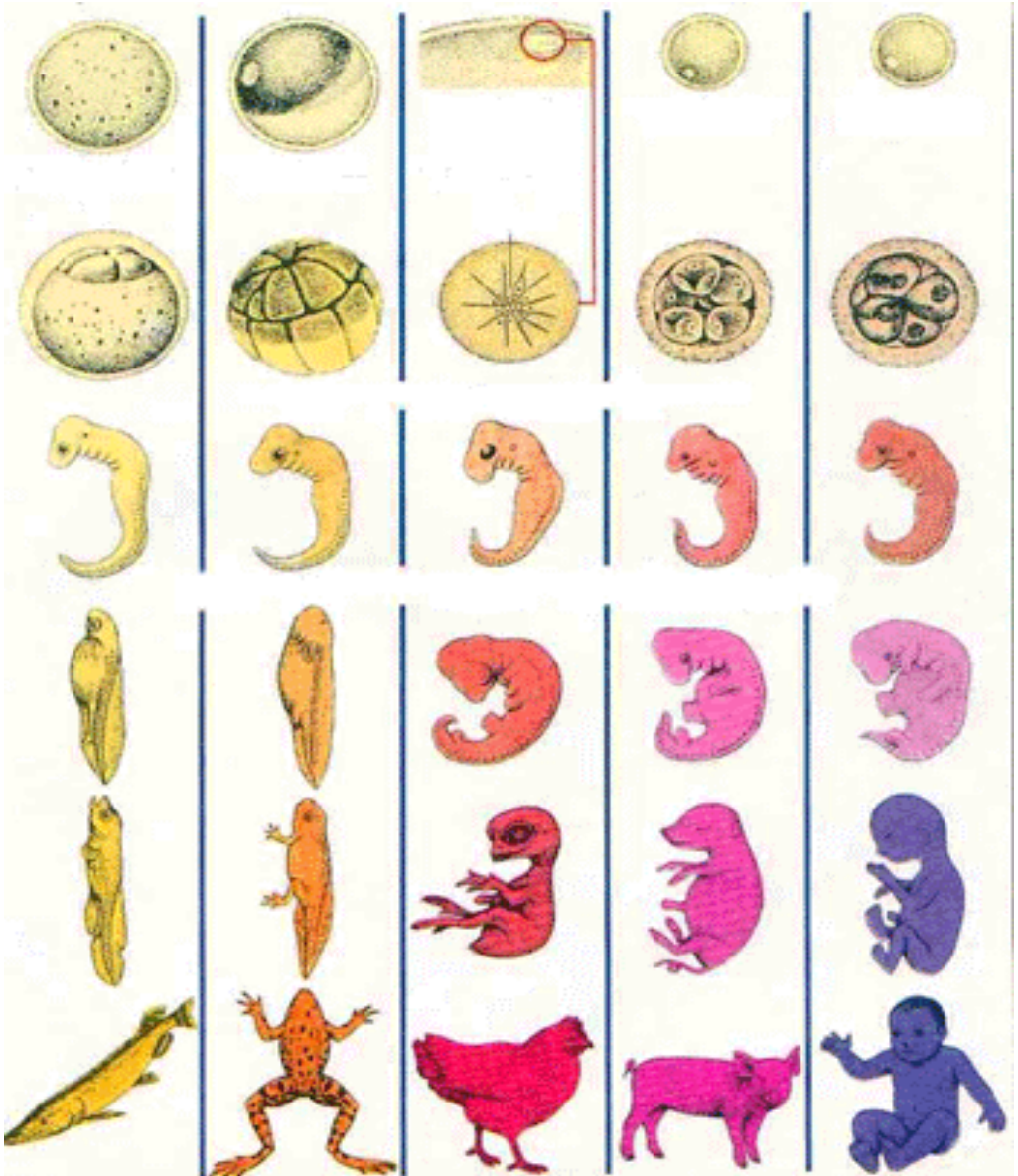
- Un mammifero, un nematode e un moscerino sono costruiti a partire dalle stesse unità costitutive e con strumenti di regolazione conservati

‘’Nulla in biologia ha senso se non alla luce dell'evoluzione".
“ (T. Dobzhansky)

Ernst Haeckel: l'ontogenesi ricapitola la filogenesi

Analogia nelle diverse fasi embrionali di varie classi di organismi





LO SVILUPPO DEL FIORE



- **Le piante hanno evoluto dei sistemi paralleli ai geni *Hox* degli animali**

Fiore

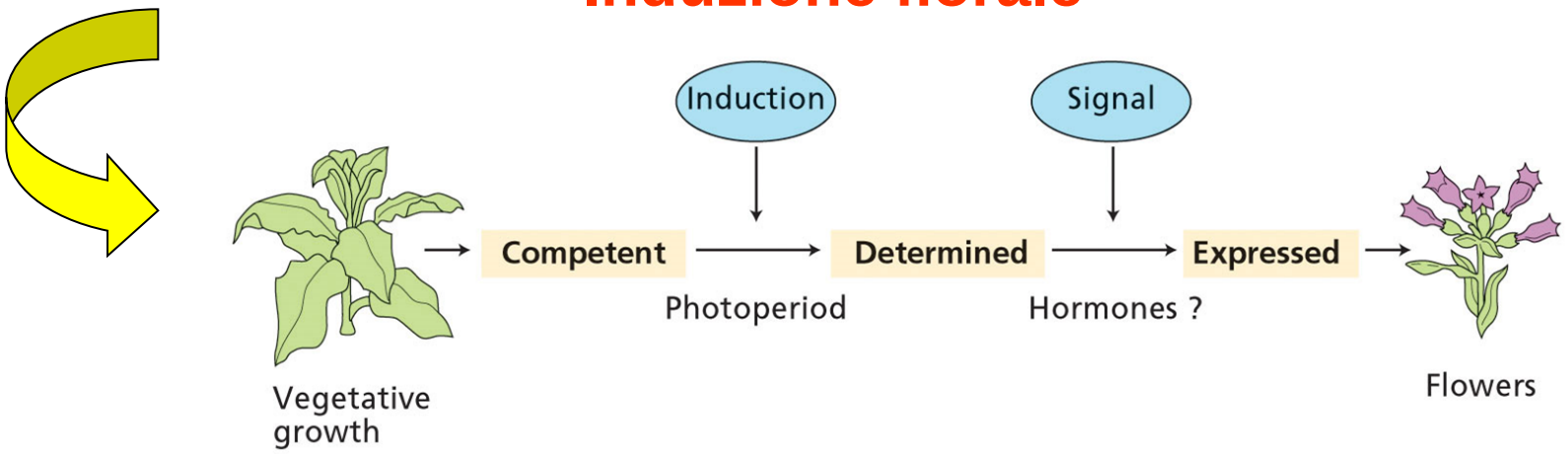
- complesso apparato di strutture funzionalmente specializzate e radicalmente diverse dall'organismo vegetativo sia nella forma che nei tipi cellulari

- La transizione verso la fioritura implica cambiamenti radicali nel destino delle cellule dei meristemi apicali

- Alterazione del destino delle cellule meristematiche: cambiamento di fase

- L'insieme degli eventi che portano l'apice del germoglio a produrre fiori si indica come

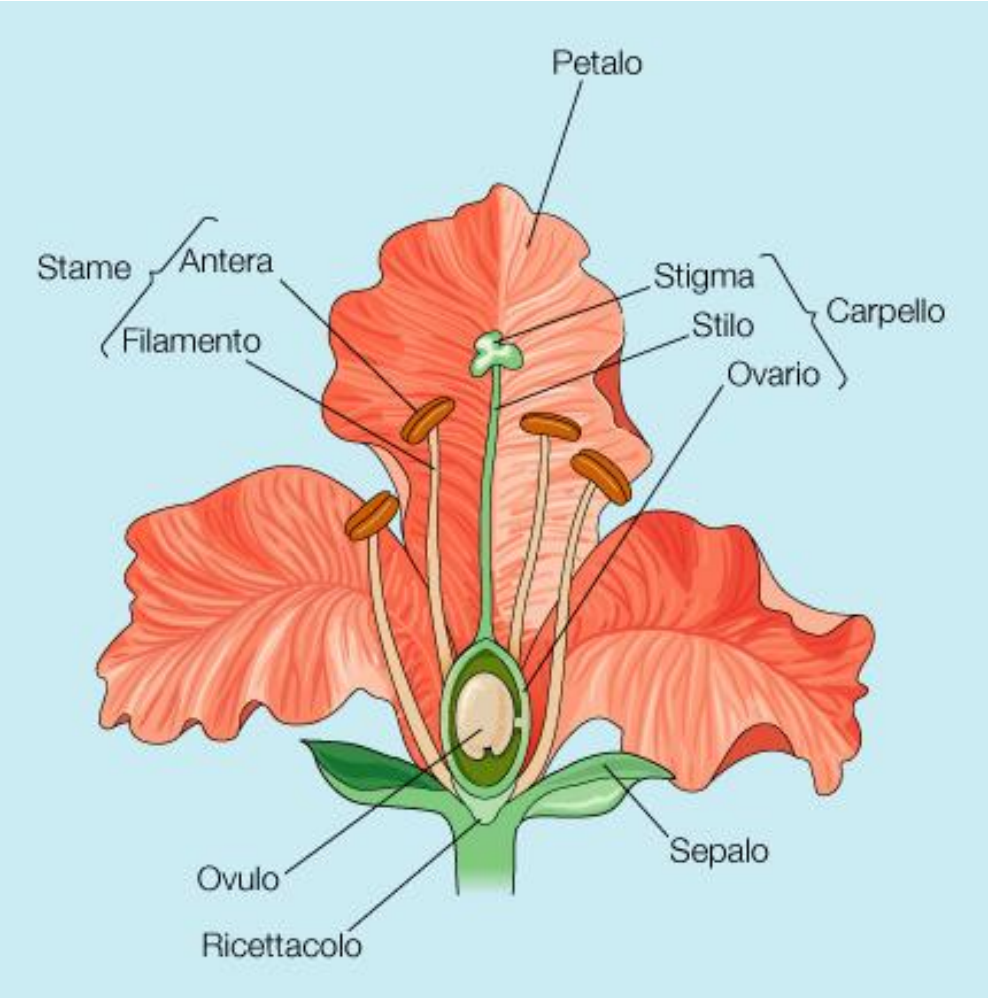
Induzione fiorale



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.12 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Struttura schematica di un fiore (ermafrodita)

- Le parti del fiore sono disposti in **maniera concentrica.**
- **I sepali** formano l'anello più esterno,
- seguiti da
  - **petali**
  - **stami,**
  - **carpelli** all'interno,



Il meristema fiorale determina la formazione di quattro organi organizzati in cerchi concentrici/verticilli

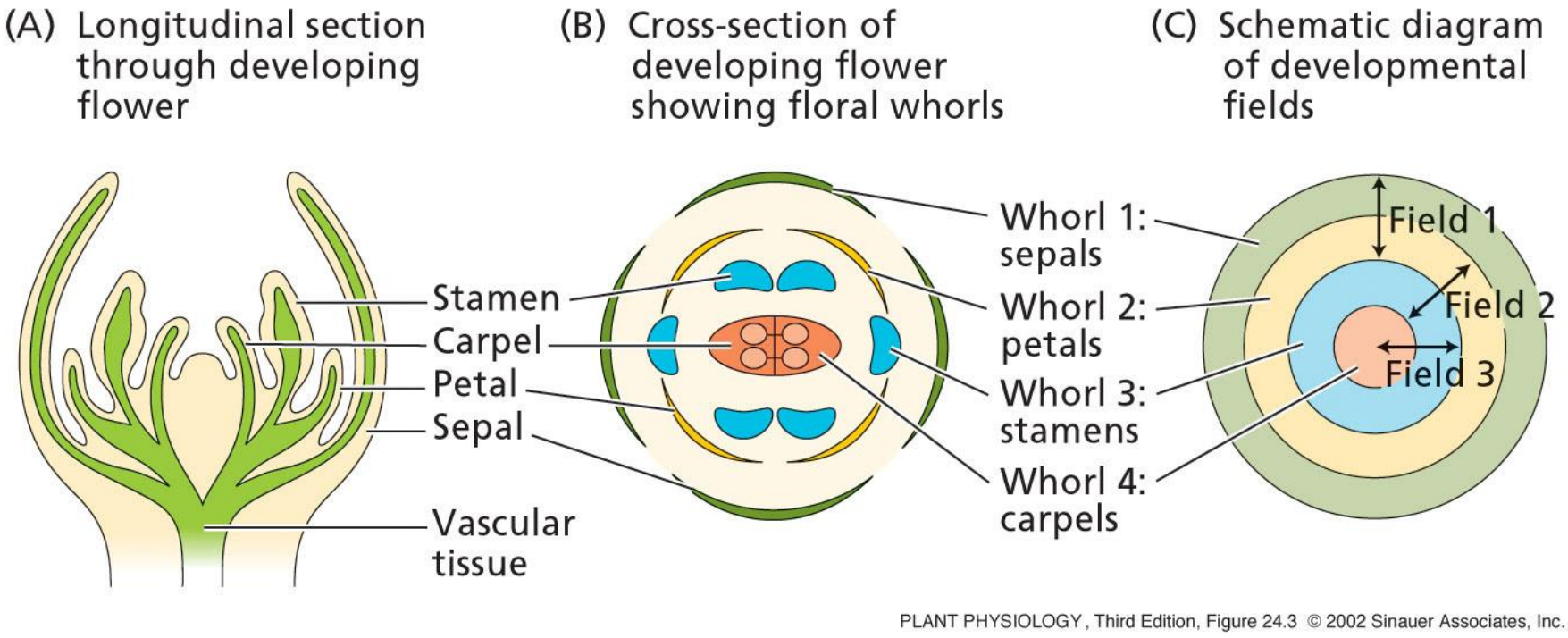
- La formazione degli organi più interni (carpelli) esaurisce le cellule meristematiche nella zona apicale e rimangono solo i primordi degli organi fiorali

In Arabidopsis dall'esterno:



- **Quattro sepali (verdi)**
- **Quattro petali (bianchi)**
- **Sei stami (quattro più lunghi)**
- **Un pistillo (composto da due carpelli fusi a formare l'ovario; lo stilo e lo stigma)**

Organi fiorali formati in sequenza dal meristema fiorale di Arabidopsis



PLANT PHYSIOLOGY , Third Edition, Figure 24.3 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Studi condotti principalmente su Arabidopsis e Anthirrinum (bocca di leone)



- Identificazione di una rete di geni che controlla la morfogenesi del fiore

Identificate tre classi di geni che controllano lo sviluppo del fiore

1. **Geni che determinano l'identità degli organi fiorali**
   (fattori di trascrizione che controllano l'espressione di geni di differenziamento)

2.Geni Catastali
(regolatori spaziali della espressione dei geni di identità degli organi)

3. Geni di identità meristematica
(fattori di trascrizione necessari per l'induzione dei geni di identità degli organi fiorali)

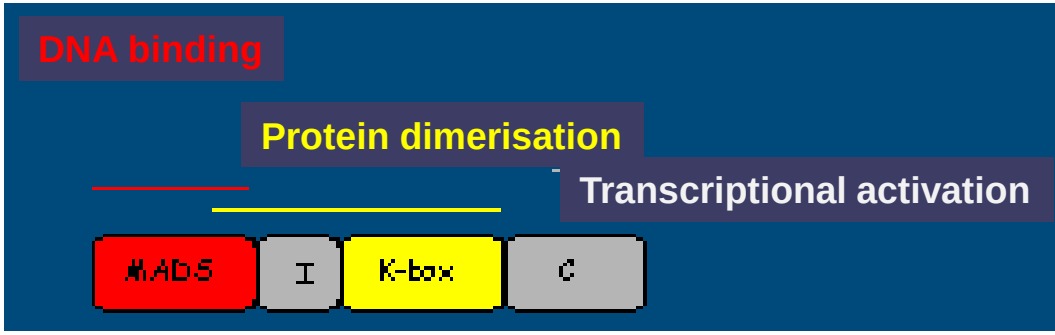
Studio di MUTANTI FIORALI OMEOTICI

ha portato alla scoperta dei geni che controllano

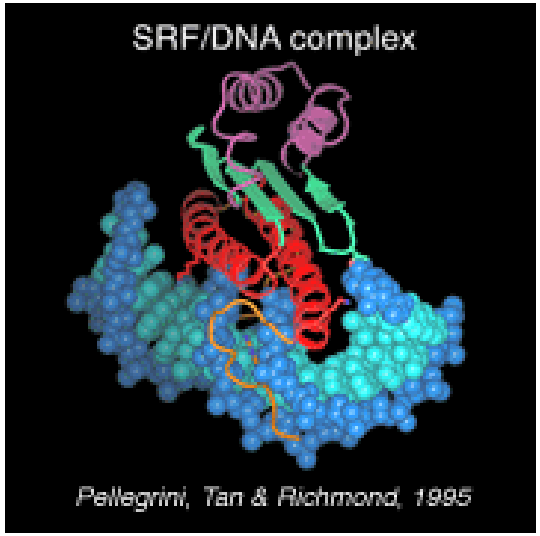
l'identità degli organi fiorali

1. I geni che determinano l'identità degli organi fiorali

- Sono definiti **OMEOTICI funzionalmente**: mutazioni di questi geni comportano la formazione di un organo al posto di un altro (es: carpelli al posto di sepali).
- Tuttavia sono **strutturalmente diversi dai geni omeotici** in quanto non contengono il motivo **HOMEO-BOX**
  - appartengono alla classe di fattori **MADS box**



- **MADS box è un motivo conservato di 56 aa che si lega al DNA**
- **Inoltre è presente un motivo K box di interazione Proteina-proteina**

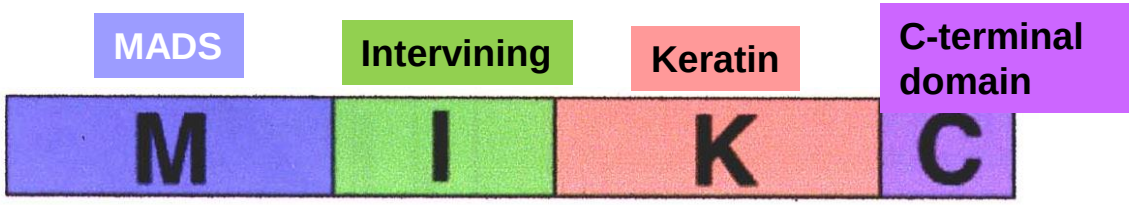


- **I geni MADS box prendono il nome dai 4 membri fondatori di questa famiglia di fattori di trascrizione:**

- **M**CM1(Minicromosome maintenance1; lievito),
- **A**GAMOUS, arabidopsis, - **D**EFICIENS, anthirrinum,
- **S**RF, Serum response factor;uomo.

Struttura della proteina del MADS box nelle piante

MADS: **M**CM1(lievito), **A**GAMOUS (arabidopsis), **D**EFICIENS (anthirrinum), **S**RF (uomo)



- Oltre al dominio MADS, la maggior parte dei geni MADS box delle piante **codificano prodotti contenenti una tipica struttura M-I-K-C**.
- Queste proteine contengono una **regione MADS (M)** che codifica un dominio di legame al DNA di 58 aa in corrispondenza o vicino al terminale N, **una regione intermedia (I)** di lunghezza variabile, un **dominio di cheratina (K),** così chiamato perché si prevede che si formi una spirale a doppio filamento con somiglianza strutturale alla cheratina e un **dominio C-terminale (C)** divergente.

  - **In Arabidopsis oltre 100 geni MADS BOX**
  - Animali o funghi ne possiedono un numero molto minore (*Drosophila* 2)
  - **Nelle piante molti coinvolti nello sviluppo del fiore.**

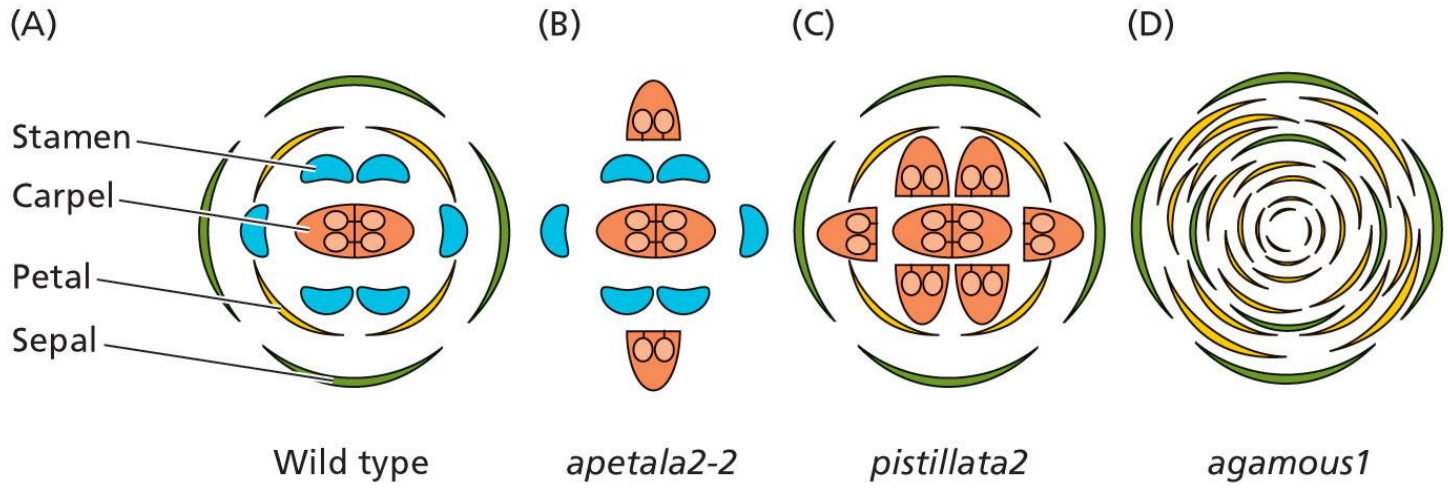
  APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, AGAMOUS, SEPALLATA1, SEPALLATA2, SEPALLATA3

  - 5 classi: Mα, Mβ, Mγ, Mδ e MIKC

MODELLO ABC

Negli anni 90
E. Meyerowitz, E. Coen et al.
proposero il modello ABC per l'identità degli organi fiorali

- Basato sullo studio dei **mutanti fiorali omeotici** di arabidopsis e anthirrinum
- modello semplice e applicabile a molte angiosperme
- ancora oggi valido con integrazioni



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.5 © 2002 Sinauer Associates, Inc.



wt



apetala2-2



pistillata2



agamous1

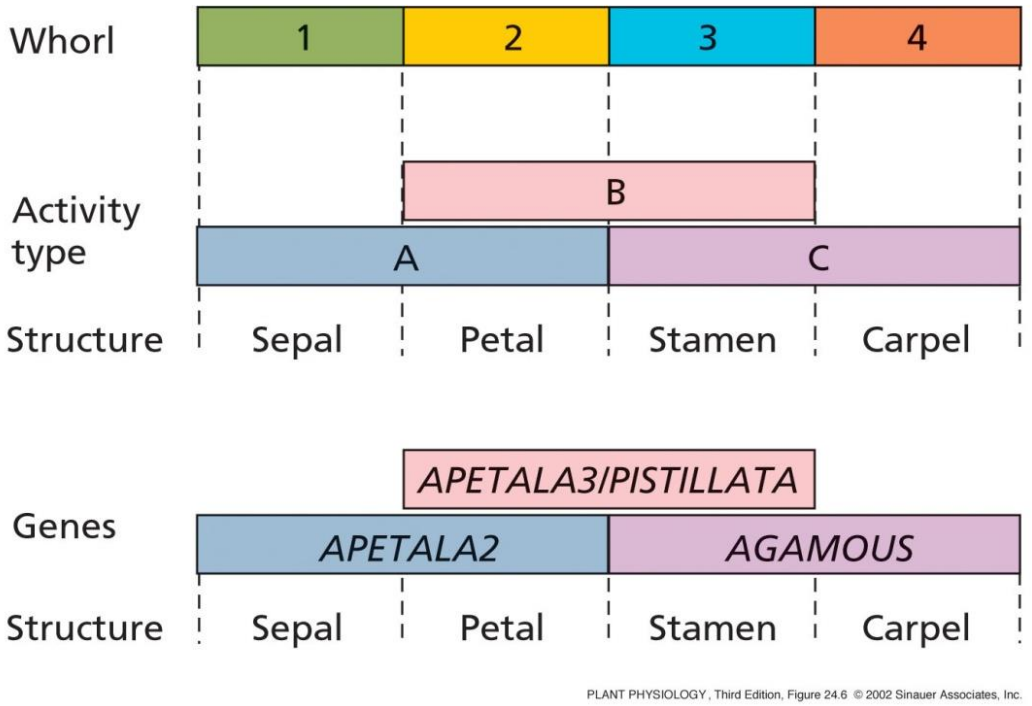
Il modello ABC postula che l'identità d'organo nel fiore è controllata dalla combinazione di tre funzioni geniche A B C nei verticilli fiorali

A = SEPALI

A+B = PETALI

B+C = STAMI

C = CARPELLI



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.6 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

A e C si reprimono reciprocamente

In Arabidopsis

Classe A: ***APETALA1 (AP1), APETALA 2 (AP2)***

Classe B: ***APETALA3 (AP3), PISTILLATA (PI)***

Classe C: ***AGAMOUS (AG)***

In Anthirrinum

Classe A: ***SQUAMOSA (SQUA)***

Classe B*:* ***DEFICIENS (DEF), GLOBOSA (GLO)***

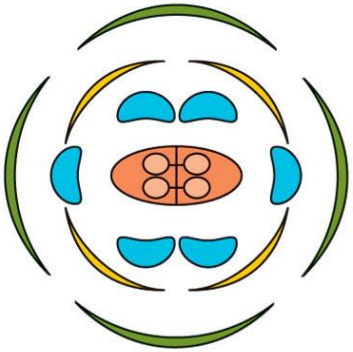
Classe C*:* ***PLENA***

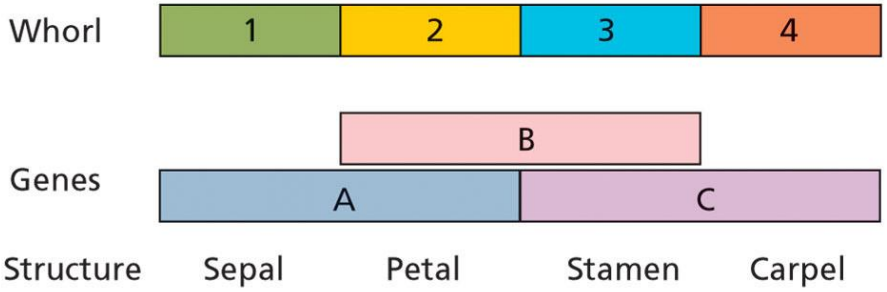
- A (AP1, AP2) specifica SEPALI
- A e B (AP3, PI) specificano PETALI
- A e C (AP1, AG) specificano STAMI
- C (AG) specifica CARPELLI
- A e C si reprimono reciprocamente

- **C (AGAMOUS**) controlla anche lo stato di **crescita determinata** del meristema.
- L'assenza di *C* fa si che il meristema continui a crescere e nel quarto verticillo si formi un nuovo fiore

Fenotipi dei mutanti omeotici fiorali secondo il modello ABC

(A) Wild type

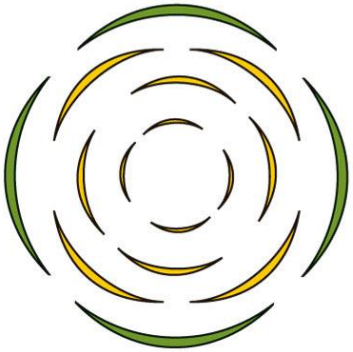


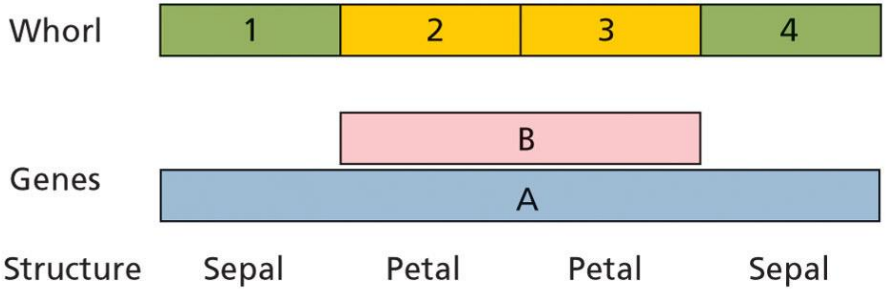




wt

(B) Loss of C function



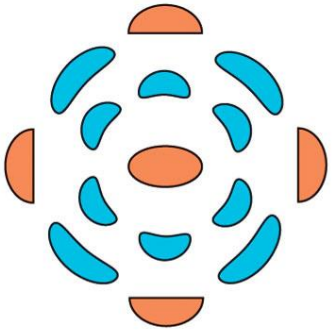


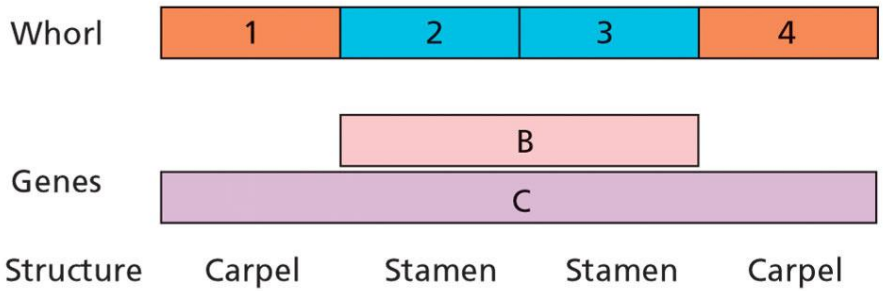


agamous1

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.8 (Part 1) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

(C) Loss of A function

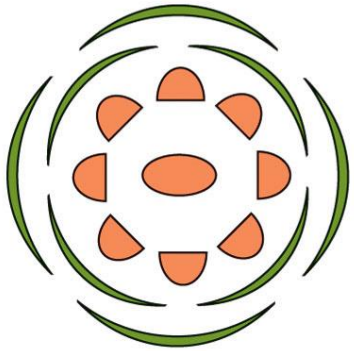


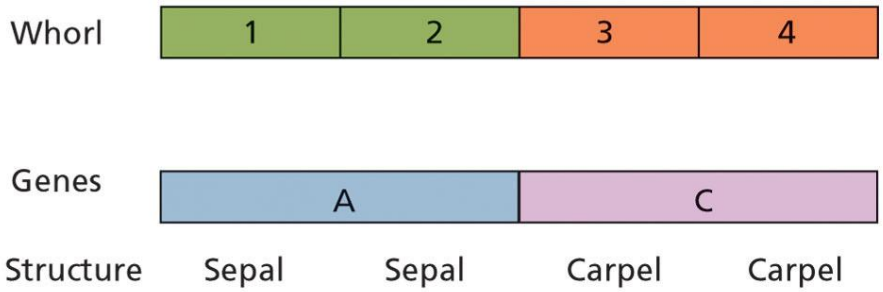




apetala2

(D) Loss of B function





PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.8 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.



pistillata2

INTEGRAZIONE DEL MODELLO ABC

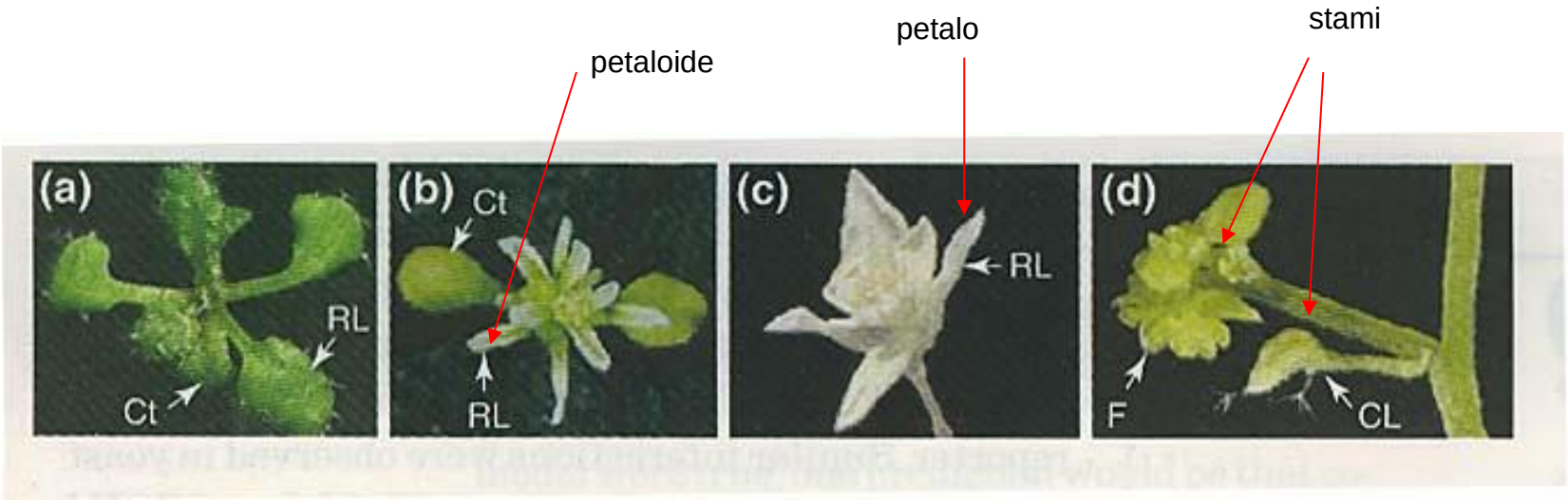
- Il **mancato sviluppo di organi** nelle posizioni corrette nei **mutanti ABC** dimostra che i **geni ABC sono NECESSARI** per specificare l'identità degli organi fiorali

- **Sono anche sufficienti?**

- **Come test di sufficienza**

- **STUDI DI ESPRESSIONE ECTOPICA DEI GENI ABC (promotore 35S)**

L'espressione ectopica dei geni *SEP* insieme ai geni *ABC* converte foglie caulinari o foglie a rosetta in petali o stami



wt

AP3,PI, SEP3

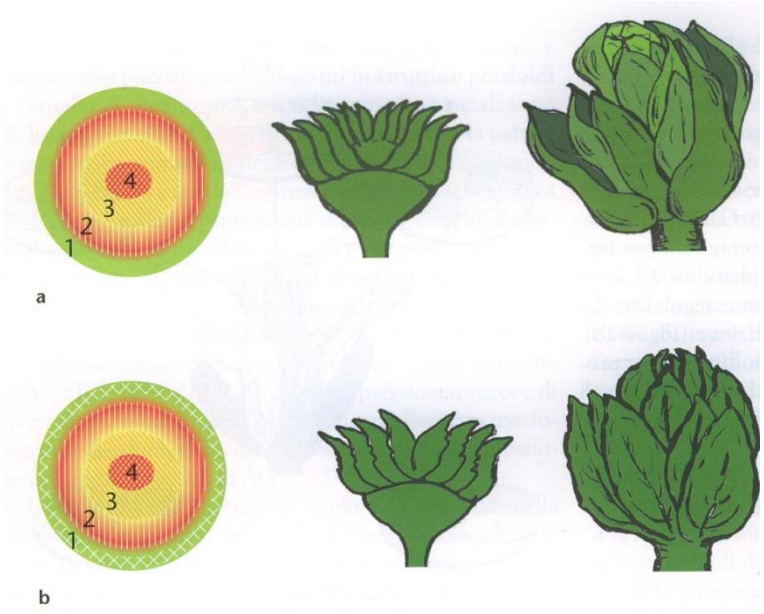
AP3,PI, SEP3, AP1

AP3,PI, SEP3, AG

Geni *SEPALLATA* (*SEP*)

- I **geni *sepallata* (*SEP*) sono necessari per la conversione delle foglie in organi fiorali**

- Sono simili nella sequenza ed esibiscono lo stesso pattern di espressione temporale durante le fasi iniziali e intermedia dello sviluppo del fiore

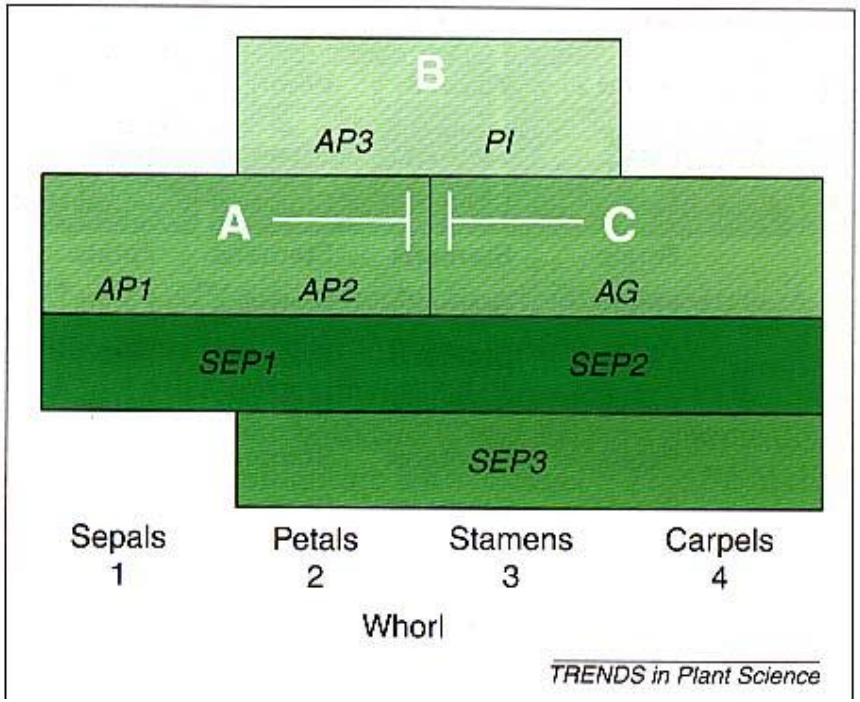


- *sep1 sep2 sep3* : 1 verticillo sepali altri verticilli sepali omeotici (indeterminato)

sep1 sep2 sep3 sep4:
tutti i verticilli foglie omeotiche

- Tutti e 4 i geni *SEP* sono necessari per lo sviluppo corretto degli organi fiorali (in assenza dei geni *SEP* i tre verticilli interni si sviluppano tutti come sepali)
- I geni *SEP* sono ridondanti (necessari i tripli mutanti per la manifestazione del fenotipo)

MODELLO ABC integrato con i geni SEP



Box 1. ABC and *SEP* genes

AG	*AGAMOUS* (*Arabidopsis* C class)
AP1	*APETALA1* (*Arabidopsis* A class)
AP3	*APETALA3* (*Arabidopsis* B class)
DEF	*DEFICIENS* (*Antirrhinum* AP3 orthologue)
GLO	*GLOBOSA* (*Antirrhinum* PI orthologue)
PI	*PISTILLATA* (*Arabidopsis* B class)
PLE	*PLENA* (*Antirrhinum* AG orthologue)
SEP1	*SEPALLATA1*
SEP2	*SEPALLATA2*
SEP3	*SEPALLATA3*
SQUA	*SQUAMOSA* (*Antirrhinum* AP1 orthologue)

Table 1. Floral organ identity genes in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*

	Arabidopsis thaliana	*Antirrhinum majus*
A class	*AP1, AP2*	*SQUAMOSA* (*SQUA*)
B class	*AP3, PI*	*DEFICIENS* (*DEF*), *GLOBOSA* (*GLO*)
C class	*AG*	*PLENA*
SEPALLATA	*SEP1, SEP2, SEP3*	*DEFH84, DEFH200, DEFH72*

Geni di classe D

- Da studi in petunia identificati i geni:

- ***FLORAL BINDING PROTEIN7 (FBP7)***

- ***FLORAL BINDING PROTEIN11 (FBP11)***

- **Tali geni e determinano l'identità dell'ovulo**

- Il **silenziamento di questi geni det**ermina la **conversione degli ovuli in strutture carpelloidi**
  - In Arabidopsis: *SHP1, SHP2, , SKT*

IL Modello ABC (DE) e il modello del QUARTETTO

E= SEP
D= STK, SHT

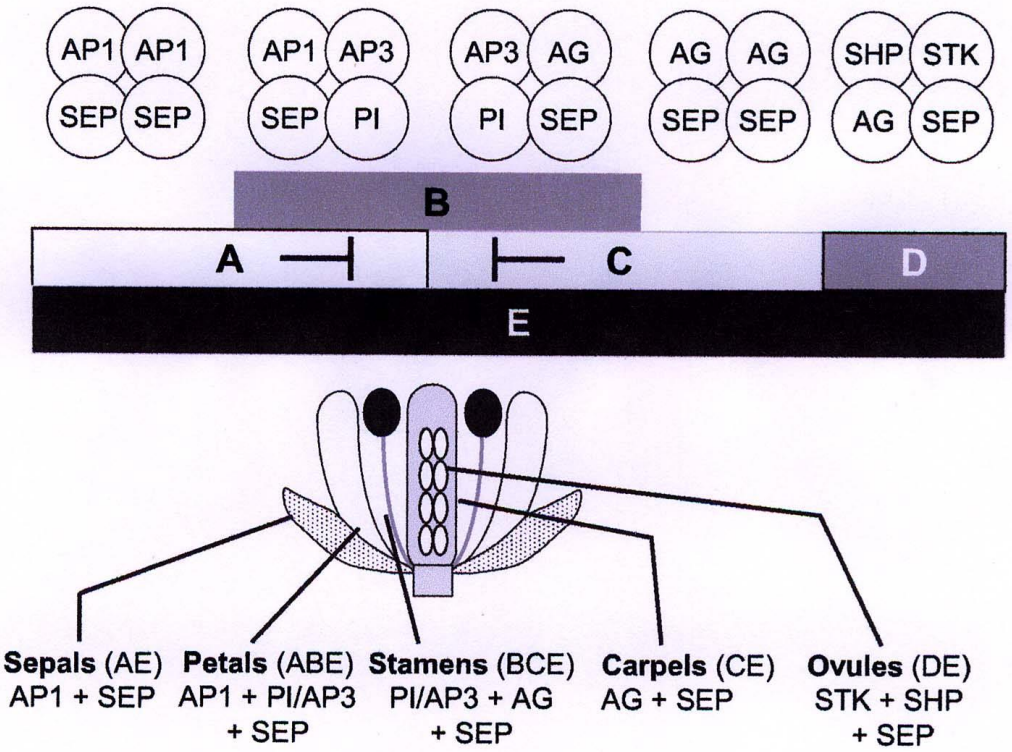
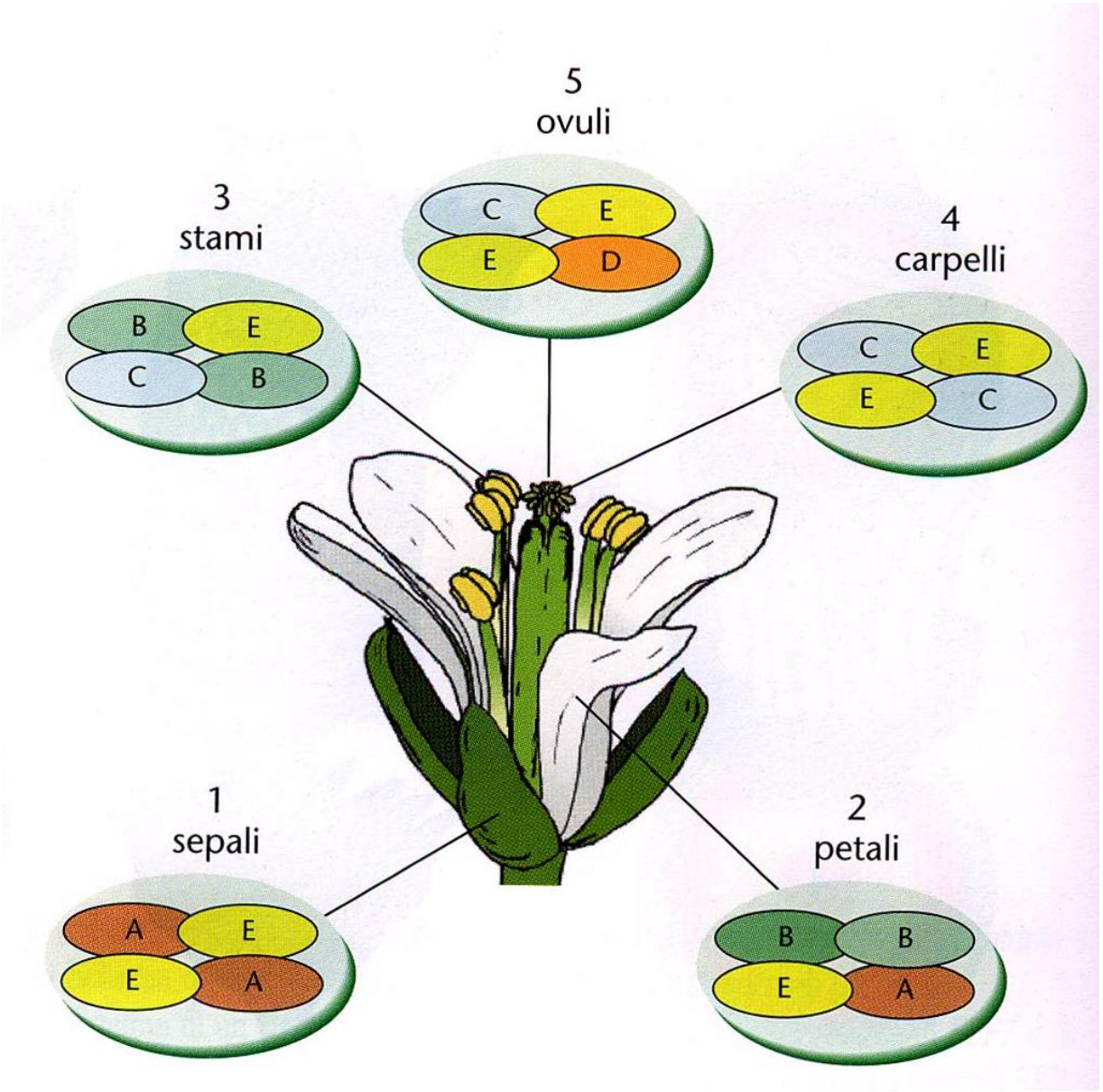


Figure 2. The genetic ABC + DE model and the quartet model. The ABC model states that A-function genes, such as *AP1* in *Arabidopsis*, are necessary for the formation of the sepals, B-function genes, which include *AP3* and *PI* in *Arabidopsis*, along with A-function genes, are necessary for the formation of the petals and B-function, along with C-function genes, which in *Arabidopsis* includes *AG*, are necessary for the formation of the stamens, and C-function genes alone are necessary for the formation of the carpels. This has been expanded to include class D- and E-function genes, which are necessary for the ovules and whorls of the flower, respectively. D-function genes in *Arabidopsis* include *SEEDSTICK* (*STK*) and *SHATTERPROOF1* and *SHATTERPROOF2* (*SHP1, SHP2*). E function *sensu lato* requires at least one of the four *SEPALLATA* (*SEP1, SEP2, SEP3,* and *SEP4*) genes. The floral quartet model expands on this idea using data from protein interaction studies (Theissen 2001; Theissen and Saedler 2001). In this figure the hypothesized quartets, based on experimentally determined dimeric or multimeric protein interactions, necessary for each floral organ are presented.


5
ovuli
C
E
E
D
3
stami
B
E
C
B
4
carpelli
C
E
E
C
1
sepali
A
E
E
A
2
petali
B
B
E
A

2 GENI CATASTALI

- agiscono come r**egolatori dell'espressione spaziale dei geni omeotici**
- **Ne** limitano l'espressione nelle regioni appropriate

- **Regolazione trascrizionale**

  - *LFY* *(LEAFY)*
  - *AP2* *(APETALA2)*
  - *SUP* *(SUPERMAN)*
  - *UFO* *(UNUSUAL FLOWER ORGANS)*

Regolazione dell'espressione di *AG*

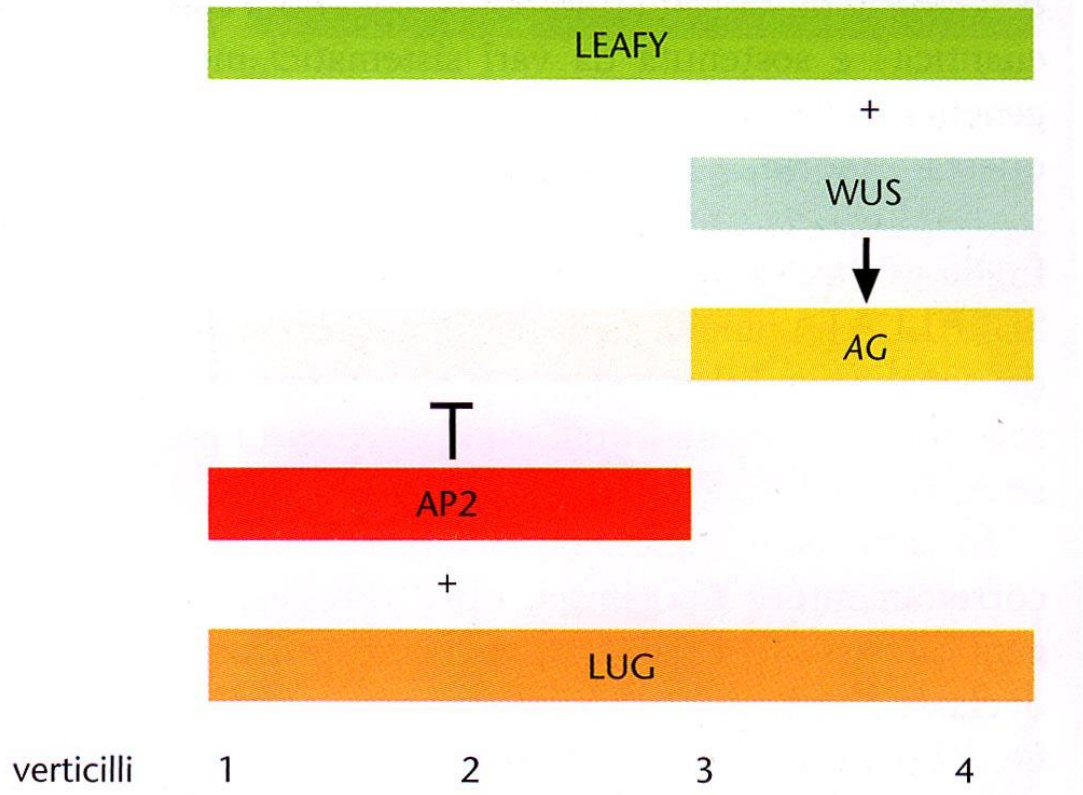


Fig. 7.19 → L' espressione di AG è finemente regolata.
L'espressione di *AG* nel meristema fiorale è controllata positivamente da LFY e WUS, e negativamente da AP2 e LUG che ne limitano l'espressione nel primo e nel secondo verticillo. (*Schema modificato da O. Layser*).

Complesso *LEUNIG/SEUSS (LUG/SEU*)

- Funziona da repressore dell'espressione di *AG* nel primo e secondo verticillo

- I singoli mutanti *lug* e *seu* mostrano sepali parzialmente convertiti in strutture petaloidi o carpelloidi nel primo verticillo e petali di dimensioni
- ridotte nel secondo; doppi mutanti hanno fenotipo più severo

Espressione ectopica di *AG* e dei geni di classe B

AP2

- Funziona come repressore di *AG* nel primo e secondo verticillo.

- L'mRNA di *AP2* è espresso in tutti e quattro i verticilli;
- viene degradato mediante micro-RNA nel terzo e nel quarto;
- la proteina AP2,in grado di reprimere l'espressione di AG;
- è dunque presente solo nel 1 e 2 verticillo

LFY

- Modulatore positivo dell'espressione di *AG* e dei geni di classe B (*AP3; PI*)

- Nei doppi mutanti *lfy/ap1* il trascritto di AP3 è assente

- LFY+AP1 necessari per l'espressione di AP3

UFO

- Modulatore positivo di AP3
- Mutanti *ufo* hanno un numero ridotto di petali e stami
- L'espressione ectopica di UFO provoca la conversione omeotica dei sepali in petali e dei carpelli in stami (come l'espressione ectopica di AP3 o PI)
- UFO è una proteina F box

Attiva l'espressione di AP3 determinando la degradazione di un repressore

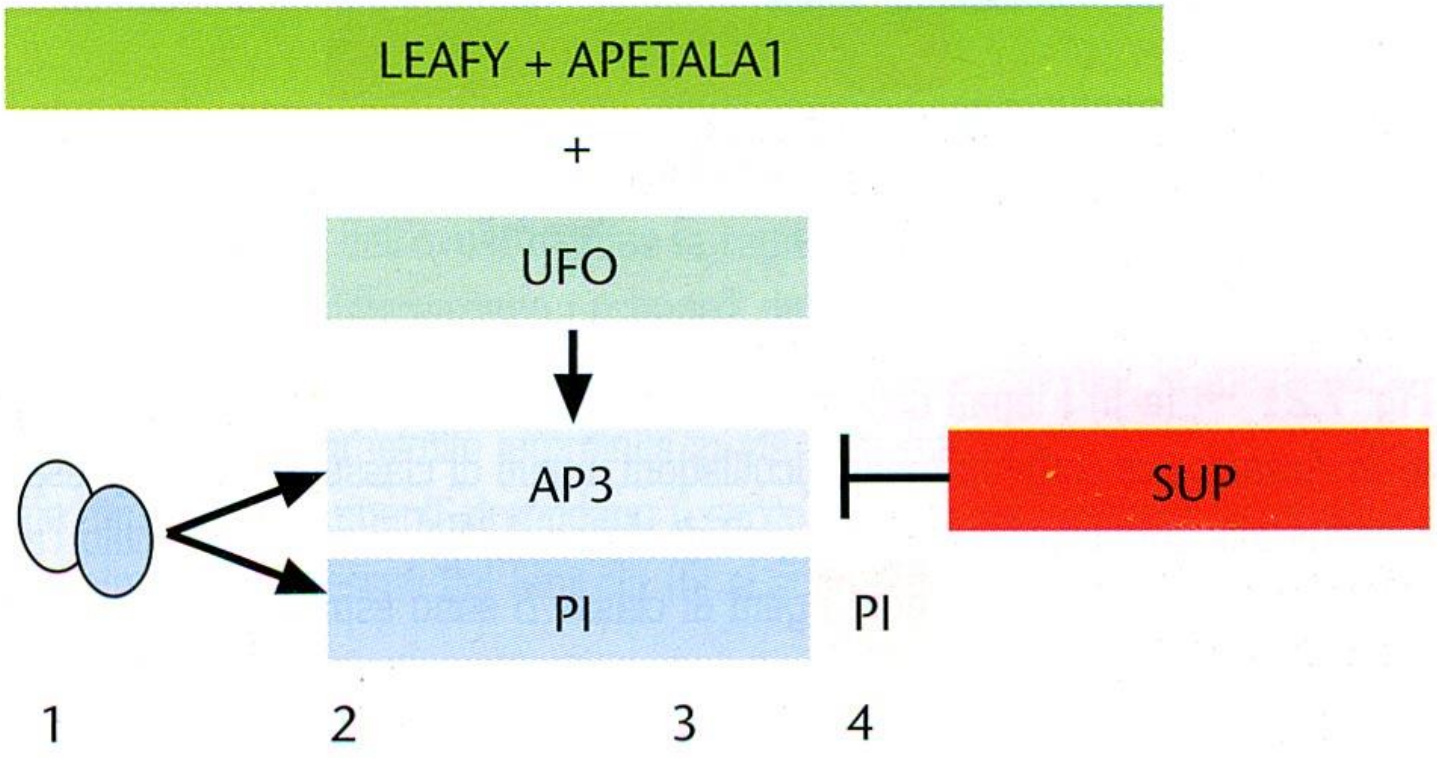
SUP

- Mutazioni *sup* determinano la formazione di stami extra al posto dei carpelli

- In questi mutanti l'espressione di *AP3* (B) normalmente ristretta al secondo e terzo verticillo si espande nel quarto (stami al posto di carpelli**)**

  - *SUP* regola negativamente l'espressione di *APETALA3* nel quarto verticillo

Regolazione dell'espressione di AP3



III) Morte cellulare programmata

- La morte cellulare programmata (PCD) si verifica nei percorsi di sviluppo

- PCD o apoptosi è una forma di suicidio della cellula che elimina cellule specifiche come parte del pattern di formazione

- Mutazioni nei geni che sottendono la morte cellulare possono causare malformazione dei tessuti o anomali pattern di crescita cellulare

Morte cellulare programmata (➔ apoptosi).

TRE VIE che portano all'apoptosi

1)Assenza di fattori di crescita;

2) attività di Fas;

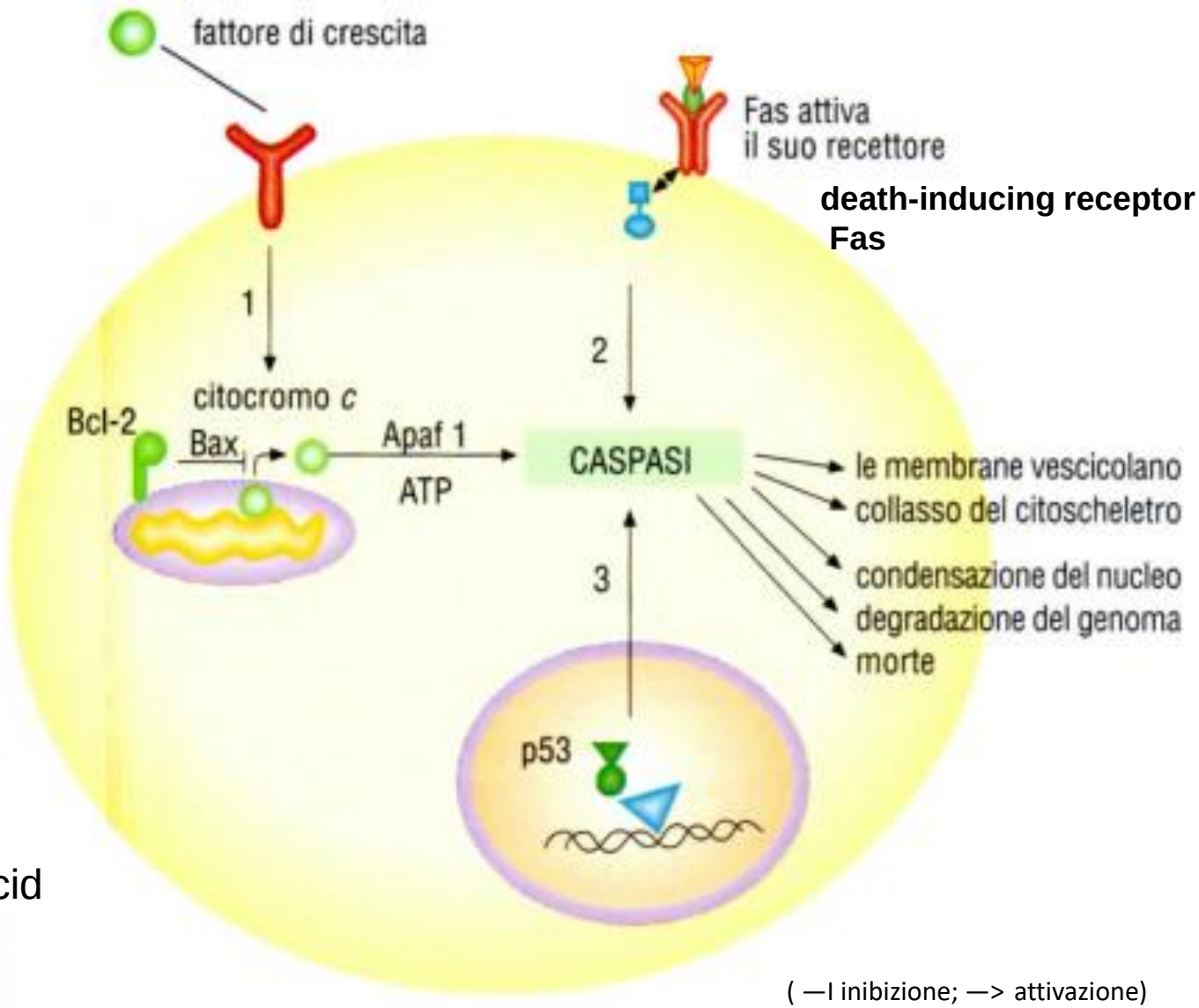
3) danneggiamento del DNA

Bcl-2: fattore prolif.➔ mantiene chiusi i canali membrana mitocondri

Bax. Fattore apoptico➔ annulla attività di Bcl2

Apaf 1:apoptotic protease-activating factor1

CASPASI: Cysteine-aspartic acid proteases



(—I inibizione; —> attivazione)

…Stay hungry, stay ……



GRAZIE
PER
L'ATTENZIONE