

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 La repressione trascrizionale.

1.2 Le Zinc-Finger Proteins di tipo Kruppel-like: “ZNF224”.

1.3 Le modifiche post-traduzionali e la regolazione trascrizionale.

1.4 La metilazione.

1.5 L’arginina metil-transferasi “PRMT5”.

1.6 Scopo del progetto di dottorato di ricerca.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari.

2.2 Costruzione di plasmidi ricombinanti.

2.3 Trasfezione transiente.

2.4 Lisi cellulare e preparazione di estratti proteici.

2.5 Saggio di immunoprecipitazione anti-FLAG e analisi di spettrometria di massa per MALDI/MS.

2.6 Tamponi e altre procedure di immunoprecipitazione.

2.7 Esperimenti di Western Blot.

2.8 Saggi di Chromatin Immunoprecipitation (X-ChIP).

2.8.1 Preparazione della cromatina.

2.8.2 Immunoprecipitazione.

2.8.3 Reazioni di polimerizzazione a catena (PCR).

2.9 Saggi di “RNA interference”.

2.9.1 Trasfezione transiente per l’esperimento di “RNA interference”.

2.9.2 Estrazione di RNA totale e sintesi di cDNA.

2.9.3 “Real Time” PCR.

3. RISULTATI

3.1 L’arginina metil-transferasi PRMT5 è stata identificata come potenziale interattore molecolare del repressore trascrizionale ZNF224.

3.2 L’interazione fra ZNF224 e PRMT5 è stata confermata da esperimenti di immunoprecipitazione.

3.2.1 Le proteine ricombinanti 3XFLAG-ZNF224 e MYC-PRMT5 interagiscono tra loro.

3.2.2 La conferma dell’interazione tra ZNF224 e PRMT5 è stata ottenuta dall’esperimento di immunoprecipitazione con le proteine endogene.

3.3 PRMT5 partecipa alla modulazione trascrizionale del gene dell’*aldolasi A* mediata da ZNF224.

3.3.1 PRMT5 appartiene al complesso proteico che lega l’elemento “silencer” AldA-NRE del gene dell’*aldolasi A* umana.

3.3.2 Una proteina del complesso multiproteico, che lega l’elemento “silencer” AldA-NRE, viene metilata simmetricamente da PRMT5.

3.3.3 PRMT5 è coinvolto direttamente nella repressione trascrizionale mediata da ZNF224 sul gene dell’*aldolasi A*.

4. DISCUSSIONE

5. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 La repressione trascrizionale.

La regolazione trascrizionale dell'espressione genica rappresenta un filone della ricerca biologica intensamente studiata e in continua evoluzione ed è di importanza cruciale negli eucarioti, sia per la regolazione del metabolismo cellulare, sia per la creazione e il mantenimento delle differenze morfologiche e funzionali durante lo sviluppo e la proliferazione cellulare.

Sebbene i primi studi sulla modulazione dell'espressione genica negli eucarioti si siano focalizzati soprattutto sull'attivazione trascrizionale (Hampsey M. *et al.*, 1999; Kumar R. *et al.*, 2004; Ma H. *et al.*, 1999), nell'ultimo decennio l'interesse scientifico si è spostato sulla repressione trascrizionale che, non solo, è un meccanismo di regolazione molto diffuso negli organismi superiori, ma può rivestire un ruolo essenziale in processi biologici, quali sviluppo, differenziamento e proliferazione cellulare (Imagawa M., 1996; Thiel G. *et al.*, 2004; Latchman D. S., 1996). Inoltre, la scoperta che numerose patologie umane sono collegate ad alterazioni nei complessi proteici di repressione trascrizionale mette in rilievo l'importanza dell'isolamento e della caratterizzazione funzionale delle proteine repressori: la principale causa dell'insorgenza della leucemia mieloide acuta (AML), ad esempio, è rappresentata da alterazioni nei fattori trascrizionali mieloidi che ne aboliscono la capacità di governare il differenziamento ematopoietico (Love J. D. *et al.*, 2000); mutazioni nei geni codificanti la famiglia delle "zinc-finger protein" IKAROS, che regolano l'espressione di specifici geni del differenziamento dei linfociti B e T, causano sviluppo di leucemie e linfomi (Shimada Y. *et al.*, 2000).

I repressori trascrizionali possono essere divisi in 3 differenti Classi, anche se alcuni di essi utilizzino meccanismi di repressione comuni a più di una classe: i repressori della Classe 1 sono le “DNA-binding proteins” che regolano negativamente la trascrizione di geni specifici riconoscendo una sequenza specifica all’interno del promotore oppure legando il DNA metilato; i repressori della Classe 2 sono proteine che non legano il DNA direttamente, ma vengono reclutati sui promotori da altre proteine regolatrici; i repressori di Classe 3 hanno come bersagli le proteine attivatrici, coattivatori o proteine del complesso di trascrizione basale.

In **Tabella 1** sono schematizzate le principali classi di repressori trascrizionali (Gaston K. *et al.*, 2003).

Tabella 1: Classi di repressori trascrizionali

Class 1 A: DNA-binding proteins	Sequence-specific DNA binding	PRH, Eve, Kruppel , Mad, IRF-2, RP58
Class1B: DNA-binding proteins	Methyl-CpG-binding proteins	MeCP2, MBD2
Class 2A: bind to DNA-binding proteins	Proteins (corepressors) that bind to dedicated repressors	Dnmt3, MBD3, Tup1, Groucho
Class 2B: bind to DNA-binding proteins	Proteins that bind to context-dependent transcription factors	Groucho, CtBP, TG1F, NcoR, Rb, MDM2
Class 3A: other repressors	Bind to activators, co-activators, or PIC	IkB, Mot1, FIR, GAL80, E1A243R, Rb, PHO80
Class 3A: other repressors	Post-translationally modify activators, coactivators or PIC	OGT, PHO80, CARM1, Srb10, CCK-II

L’interesse di questo lavoro di dottorato si è focalizzato su un repressore trascrizionale, la proteina ZNF224, che potrebbe essere inserita nella Classe I in quanto è un “DNA-binding repressor” che regola negativamente la trascrizione del proprio gene “target” legandosi direttamente ad una sequenza specifica all’interno del promotore.

1.2 Le Zinc-Finger Proteins di tipo Kruppel-like: la proteina “ZNF224”.

Negli organismi superiori la famiglia delle “Zinc-Finger Proteins” (ZFPs) di tipo “Kruppel-like” è una delle più importanti e numerose famiglie di fattori trascrizionali (**Tabella 1**, in rosso) (Huntley S. *et al.*, 2006). Questo nome deriva dall’omologia strutturale del motivo a dito di zinco con quello presente nella proteina “Kruppel”, essenziale per lo sviluppo di *D. melanogaster* (Mahowald P. A. *et al.*, 1985): tali dita di zinco sono formate da sequenze consenso di 25-30 aminoacidi di tipo “C2H2” ripetuti in tandem e di numero estremamente variabile; le dita di zinco formano una struttura composta da un’ α -elica all’estremità carbossi-terminale e un foglietto- β a quella ammino-terminale, che contatta il DNA inserendosi nel solco maggiore.

Le ZFPs possono modulare l’espressione genica agendo da attivatori o da repressori trascrizionali, tuttavia in alcuni casi la stessa proteina può svolgere entrambe le funzioni a seconda del contesto genico in cui agisce e dell’interazione con altre proteine regolatrici.

Circa un terzo delle ZFPs della famiglia “Kruppel-like” possiede nel tratto ammino-terminale un dominio di repressione “KRAB” (“Kruppel Associated Box”) (Margolin J. F. *et al.*, 1994; Abrink M. *et al.*, 2001). Le ZFPs che contengono il dominio KRAB svolgono una repressione di tipo “attiva”: esse presentano, cioè, un’intrinseca attività di regolazione negativa che influenza l’organizzazione strutturale della cromatina e il loro funzionamento è indipendente sia dalla presenza dell’attivatore che dalla distanza dell’elemento di regolazione negativa rispetto al sito di inizio della trascrizione. Sebbene la struttura, il pattern d’espressione ed il ruolo della maggior parte delle KRAB-ZFPs non siano ancora chiari, evidenze sperimentali hanno dimostrato che le funzioni biochimiche di alcune di queste proteine includono: la repressione

trascrizionale di promotori “target” delle RNA polimerasi I, II e III; lo splicing dell’RNA; il controllo della funzione del nucleolo (Urrutia R., 2003). Il meccanismo di repressione trascrizionale mediato dalle KRAB-ZFPs richiede l’interazione del dominio KRAB con il dominio RBCC (“RING-B-box coiled-coil”) del corepressore universale delle KRAB-ZFPs, KAP1 (“KRAB Associated Protein”) (Friedman J. R. *et al.*, 1996) e l’interazione con altre proteine regolatrici come la proteina dell’eterocromatina (HP1), le deacetilasi (HDACs) e le metilasi degli istoni (SETDB1) ([Figura 1](#)) (Kim S. *et al.*, 1996; Peng H. *et al.*, 2000; Schultz D.C. *et al.* 2002; Sripathy S. P. *et al.*, 2006).

Nel laboratorio dove è stato svolto questo progetto di dottorato è stato isolato e purificato un nuovo membro della famiglia delle ZFPs di tipo “Kruppel-like”: la proteina ZNF224 (Medugno L. *et al.*, 2003). ZNF224 è una proteina di 82KDa che presenta all’estremità carbossi-terminale 18 domini a dita di zinco di tipo “C2H2” e all’estremità ammino-terminale il dominio di repressione KRAB ([Figura 2](#)) (Medugno L. *et al.*, 2003). E’ stato dimostrato che ZNF224 lega specificamente, attraverso i domini a dita di zinco, l’elemento di regolazione negativa “AldA-NRE” localizzato a monte del sito di inizio della trascrizione del promotore distale “pL” del gene dell’aldolasi A umana; e che essa interagisce con il corepressore KAP1, attraverso il proprio dominio KRAB, reprime la trascrizione del gene dell’aldolasi A e di geni eterologhi nei cui promotori sia stata clonata la sequenza AldA-NRE (Medugno L. *et al.*, 2005).

Il gene che codifica ZNF224 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19 (19q13.2), in un “cluster” di geni codificanti altre KRAB-ZFPs. L’espressione di questa proteina è pressoché ubiquitaria e i suoi livelli d’espressione sono maggiori in molti tessuti adulti rispetto alla controparte fetale.

1.3 Le modifiche post-traduzionali e la regolazione trascrizionale.

Uno dei meccanismi che contribuiscono alla modulazione dell'espressione genica in eucarioti è l'introduzione di modifiche post-traduzionali a livello dell'estremità ammino-terminale degli istoni (Strahl B. D. *et al.*, (2000); tali modifiche hanno l'effetto di alterare la struttura della cromatina e di creare siti di "binding" per proteine regolatrici su specifici promotori (Hager G. L. *et al.*, 2006). Le crescenti informazioni, relative alle modifiche covalenti subite da questa classe di proteine, hanno permesso di definire un "codice istonico" utile per comprendere i meccanismi alla base della regolazione dell'espressione genica e per individuare le regioni del DNA accessibili all'apparato trascrizionale (Dutnall R. N., 2003; Peterson C. L. *et al.*, 2004).

Le modifiche degli istoni hanno implicazioni importanti nella regolazione trascrizionale: l'acetilazione, ad esempio (Berger S. L., 1999), riducendo la carica netta positiva del nucleo istonico, provoca una sensibile diminuzione dell'affinità di legame al DNA e porta al rilassamento della struttura della cromatina che facilita l'accesso dei fattori trascrizionali su specifici promotori; nella cromatina trascrizionalmente attiva gli istoni sono iperacetilati, in quella inattiva sono ipoacetilati per l'effetto del reclutamento degli enzimi "Histone Deacetylases" (HDACs) da parte di molti repressori trascrizionali (Hong L. *et al.*, 1993; Steger D. J. *et al.*, 1996; Ng H. *et al.*, 2000). L'anormale acetilazione o deacetilazione è stata, inoltre, associata allo sviluppo del cancro: l'inattivazione della cromatina per effetto della deacetilazione degli istoni H3, H4, o di entrambi, comporta il silenziamento di una serie di geni "cancer-related", come nel caso del blocco dell'espressione di MYO18B, che è tra le principali cause dell'insorgenza del tumore al polmone (Tani M. *et al.*, 2004).

Le modificazioni post-traduzionali note sono: l'acetilazione (su residui di lisina), la metilazione (su residui di arginina e lisina), la fosforilazione (su residui di serina e treonina), l'ubiquitinazione (su residui di serina), la sumoilazione (su residui di serina) e l'ADP-ribosilazione (Peterson C. L. *et al.*, 2004). Queste modifiche covalenti non interessano solo le proteine istoniche. Un frequente substrato dell'ubiquitinazione (Ub) è rappresentato dai fattori trascrizionali: studi recenti hanno, infatti, dimostrato che Ub modula la localizzazione dei fattori trascrizionali promuovendo sia la degradazione delle "sequestering proteins", sia l' "import/export" nucleare dei propri substrati modificati (Shcherbik N. *et al.*, 2004). E' stato di recente dimostrato, inoltre, il coinvolgimento della poli-ADP-ribosio polimerizzazione nella regolazione dell'espressione genica attraverso una modificazione dei fattori trascrizionali, mediata dall'enzima PARP-1, in risposta al danno al DNA (Soldatenkov V. A. *et al.*, 2004).

Queste considerazioni hanno dimostrato che la regolazione genica e le modifiche post-traduzionali (epigenetica) sono strettamente interconnesse ed essenziali per assicurare l'integrità e lo sviluppo cellulare. La perturbazione del perfetto equilibrio tra i due meccanismi porta, infatti, al cambiamento del destino differenziativo delle cellule e all'insorgenza di malattie: l'aberrante stato della cromatina conduce a gravi alterazioni dei "pattern" d'espressione genica, note come "epi-mutazioni", che sono state riscontrate in molte sindromi tra cui il cancro (Horsthemke B., 2006).

1.4 La metilazione.

Negli organismi eucarioti la metilazione a livello dell'estremità ammino-terminale degli istoni rappresenta un importante marcatore epigenetico, è

implicata in diversi processi biologici e gioca un ruolo essenziale soprattutto nella regolazione trascrizionale (Pernetto J. *et al.*, 2006).

La metilazione su specifici residui di lisina, che è catalizzata dagli enzimi KMTs, è stata ben caratterizzata e può essere considerata come marcatore dello stato attivo o inattivo della cromatina (Kubicek S. *et al.*, 2004): la metilazione sui residui K4 e K36 nell'istone H3 è utilizzata come marcatore di trascrizione attiva; quella sui residui K9 e K27 come marcatore di repressione per l'eucromatina; anche la metilazione del residuo K79 nell'istone H3 rappresenta un marcatore di regioni attive della cromatina estremamente conservato nell'evoluzione, tanto che "silencing proteins" bloccano specificamente l'attività metil-transferasica dell'enzima Dot1 che agisce su questo residuo (Bode A. M. *et al.*, 2005). Questa modifica post-traduzionale crea siti di "binding" per specifiche proteine regolando la struttura della cromatina e quindi l'espressione di specifici promotori: un esempio è rappresentato dalla metilazione sulla K9 dell'istone H3 che costituisce un richiamo per il legame della proteina HP1, che stabilizza l'eterocromatina in quel sito e determina il blocco trascrizionale.

Diversamente da quello delle lisine, il meccanismo molecolare attraverso cui la metilazione degli istoni sui residui di arginina contribuisce al rimodellamento della cromatina e all'attivazione trascrizionale è ancora poco chiaro. Ampiamente documentata è, invece, la correlazione tra malattie umane e alterazioni nei "pattern" di metilazione degli istoni tanto che queste ultime sono spesso predittive di patologie: la deregolazione di geni essenziali per effetto della metilazione può provocare il cancro alla prostata e alla mammella; disordini cardiovascolari sono stati riscontrati in pazienti in cui sia stato rivelato un aumento dei livelli di monometil-arginina e dimetil-arginina

asimmetriche (Esteller M., 2006; McBride A. *et al.*, 2001; Lee D. Y. *et al.*, 2005). A differenza della metilazione delle lisine che è stata osservata esclusivamente nelle proteine istoniche, quella delle arginine è presente anche in altre proteine implicate nella regolazione dell'espressione genica, tra cui molte "RNA-binding proteins" coinvolte nel processamento, trasporto e stabilità dell'RNA, attivatori e coattivatori trascrizionali (Boisvert F. M. *et al.*, 2003; Shilatifard A., 2006)

La metilazione delle arginine è catalizzata dagli enzimi arginina metil-transferasi (PRMTs), di cui nei mammiferi sono noti 8 membri: sei di questi (PRMT1, PRMT3, PRMT4, PRMT5, PRMT6, PRMT7) promuovono, grazie alla presenza del dominio catalitico RMT ("arginine methyl-transferase domain") estremamente conservato, il trasferimento di un gruppo metilico dall'S-adenosil-metionina (AdoMet) all'azoto guanidinico dell'arginina, portando alla formazione di S-adenosil-omo-cisteina (AdoHcy) e metil-arginina. Questa modifica avviene in regioni "consensus" costituite dai residui amminoacidici "RGG, RG e GRG", e modula la formazione di legami inter- e intra-molecolari con diversi "target" proteici: l'aggiunta di gruppi metilici ha l'effetto di eliminare atomi d'idrogeno dei gruppi amminici delle arginine incrementando l'ingombro sterico. Queste 6 PRMTs sono state suddivise in due gruppi: le proteine di "tipo I" (PRMT1, PRMT3, PRMT4 e PRMT6) catalizzano la formazione di dimetil-arginine asimmetriche (aDMA); mentre quelle di "tipo II" (PRMT5 e PRMT7) catalizzano la formazione di dimetil-arginine simmetriche (sDMA) ([Figura 3A](#)) (Bedford M. T. *et al.*, 2005). Per PRMT2 e PRMT8 non è stata invece dimostrata alcuna attività enzimatica.

1.5 L'arginina metil-transferasi "PRMT5".

Durante lo svolgimento di questo lavoro di dottorato di ricerca abbiamo approfondito lo studio di uno dei membri della famiglia delle PRMTs; la proteina PRMT5 considerata, per diversi anni, l'unico componente del gruppo delle arginina metil-transferasi di tipo II (Branscombe T. L. *et al.*, 2001), fino alla scoperta di PRMT7, enzima in grado di catalizzare la dimetilazione di tipo simmetrica (Lee J. H. *et al.*, 2005).

PRMT5 è una proteina di 72KDa ed è nota in letteratura anche come l'omologo umano della proteina di lievito "ShK1 kinase-binding protein 1" e come JBP1 ("Jak-binding protein 1"), (Pollack B. P. *et al.*, 1999). PRMT5 è stata isolata nel complesso citoplasmatico del "Metilosoma" ("20S methyltransferase complex") di cui fanno parte le proteine MEP50, pIC1n ("Sm protein binding factor") e WD45 ("WD-repeat protein") (Friesen W. J. *et al.*, 2001). Tale complesso contribuisce all'assemblaggio dello "Spliceosoma" attraverso la metilazione, da esso mediata, nei tratti di sequenza ricchi in "RG", delle snRNPs ("small nuclear ribonucleoproteins"), quali SmD1 e SmD3, suggerendo che l'assemblaggio dello spliceosoma sia finemente regolato a livello post-traduzionale ([Figura 3B](#)), (Meister G. *et al.*, 2002). Altri substrati di metilazione, da parte di PRMT5, sono gli istoni H2A, H3 ed H4, la "myelin basic protein" (Pollack B. P. *et al.*, 1999) e la fosfatasi della RNA polimerasi II, FCP1 (Amente S. *et al.*, 2005). E' stato, inoltre, dimostrato che PRMT5 è direttamente coinvolta nella fase di allungamento dei nuovi trascritti attraverso la regolazione dell'interazione dell'RNA polimerasi II con l' "elongation factor SPT5", a cui essa stessa è in grado di legarsi (Kwak. Y. T. *et al.*, 2003).

Di recente all'arginina metil-transferasi PRMT5 è stato assegnato un ruolo nella modulazione dell'espressione genica. E' stato dimostrato che PRMT5 fa

parte del complesso di repressione trascrizionale del promotore del gene della *cyclina E1* e della sua attività metil-transferasica sull'istone H4 che è condizione necessaria per il blocco della trascrizione e della conseguente inibizione della proliferazione cellulare ([Figura 3C](#)), (Fabrizio E. *et al.*, 2002). PRMT5 interagisce, inoltre, con il complesso mSin3A/HDAC e con le proteine BRG1 e hBRM, che sono parte del complesso di rimodellamento dei nucleosomi hSWI/SNF: PRMT5 viene reclutata, insieme a queste proteine, sul promotore del gene "target" di Myc, *cad*, a livello del quale svolge la sua attività metil-transferasica sugli istoni H3 e H4 ipoacetilati, provocando così il silenziamento di questo gene (Pal S. *et al.*, 2003). E' stato anche dimostrato che molti geni vengono de-repressi se i livelli di PRMT5 nella cellula vengono ridotti; viceversa è stato rilevato che l'espressione di geni codificanti gli onco-soppressori ST7 ("suppressor of tumorigenicity") e NM23 ("nonmetastatic 23") è ridotta in linee cellulari in cui PRMT5 è sovra-espressa; questo decremento è correlato alla metilazione del residuo R8 sull'istone H3, mediato da PRMT5. L'insieme di questi dati suggerisce che la proteina PRMT5 sia direttamente coinvolta nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare attraverso il controllo dell'espressione di geni coinvolti nella soppressione tumorale (Pal S. *et al.*, 2004). E' stato anche dimostrato che, nei linfociti T, PRMT5 è implicata nell'attivazione dell'espressione del gene codificante l'interleuchina 2 (*IL2*), sebbene il meccanismo attraverso cui PRMT5 agisca non sia ancora noto (Richard S. *et al.*, 2005).

1.6 Scopo del progetto di dottorato di ricerca.

Questo lavoro di dottorato di ricerca, che si inquadra in un più ampio progetto che ha come finalità la caratterizzazione strutturale e funzionale del fattore

trascrizionale ZNF224, ha avuto come obiettivo l'isolamento di nuovi "partner" molecolari di questa proteina.

La repressione trascrizionale da parte di ZNF224 sul gene dell'*aldolasi A* umana è stata studiata per diversi anni nel laboratorio dove è stato svolto questo lavoro di dottorato; è stata identificata la sequenza minima di legame di ZNF224 ed è stato dimostrato che l'interazione tra questa proteina e il promotore "pL" dell'*aldolasi A* modula l'espressione del trascritto di tipo "L" durante specifiche fasi del ciclo cellulare (Lupo A. *et al.*, 1997). Tale complesso di repressione trascrizionale rappresenta, quindi, un utile sistema sperimentale per indagare i meccanismi molecolari che sono alla base della modulazione dell'espressione genica mediata dalle KRAB-ZFPs negli eucarioti. Negli ultimi anni, infatti, sebbene siano state isolate numerose ZFPs, solo di pochissime è noto il meccanismo molecolare di repressione trascrizionale nonché il gene bersaglio e la loro funzione all'interno della cellula.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari.

Le cellule embrionali renali umane (Human Embryonal Kidney, HEK-293) sono state cresciute in piastre Petri (100 mm, Falcon) in mezzo di coltura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's, Bio Whittaker) completo di 10% siero fetale bovino (FBS, EuroClone) e di 1% di miscela penicillina/streptomicina (Bio Whittaker). Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni e le cellule sono state mantenute sub-confluenti ed in attiva proliferazione.

2.2 Costruzione di plasmidi ricombinanti.

Il cDNA di ZNF224 é stato clonato nel vettore di espressione eucariotico p3XFLAG-CMV-7.1 (Sigma) che codifica proteine di fusione recanti tre copie dell'epitopo FLAG, di 8 aminoacidi ciascuno, sotto il controllo del promotore del cytomegalovirus (CMV).

Il cDNA di ZNF224 è stato amplificato utilizzando i seguenti olinucleotidi:

ZNF224-HindIII: 5'-CCCAAGCTTATGACCACGTTCAAGGAGGCA-3'

ZNF224-XbaI: 5'-TGCTCTAGATCACTAAGGTTTTTCTCCAAC-3'

Il cDNA di ZNF224 è stato successivamente clonato nel "multiple cloning site" (MCS) tra i siti di restrizione HindIII e XbaI. Le reazioni di polimerizzazione a catena (PCR) sono state effettuate in un apparecchio Biometra Personal Cycler, usando l'enzima Platinum Pfx DNA polimerasi (Invitrogen), secondo il seguente ciclo di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30sec; appaiamento a 55°C per 20sec; estensione a 72°C per 1min. I cicli sono stati ripetuti per 30 volte, seguiti da un'estensione finale a 72°C per 10min e da raffreddamento dei campioni a 4°C.

2.3 Trasfezione transiente.

Le cellule HEK-293, piastrate il giorno prima della trasfezione alla densità di 1×10^6 cellule/piastra, sono state trasfettate con un singolo plasmide o cotrasfettate (con 3 μg totali DNA plasmidico) in presenza di solo DMEM, utilizzando il LipofectamineTM Reagent (Invitrogen): il rapporto utilizzato è stato di 3 μl di reagente per μg di DNA.

I plasmidi trasfettati sono stati: p3XFLAG-CMV-7.1 (Sigma); p3XFLAG-ZNF224 utilizzato negli esperimenti d'immunoprecipitazione per dimostrare l'interazione tra PRMT5 e ZNF224; p3XFLAG-AF4 utilizzato come controllo della specificità della suddetta interazione negli esperimenti di immunoprecipitazione (gentilmente concesso dalla Prof.ssa G. Esposito); pMyc-PRMT5 utilizzato negli esperimenti d'immunoprecipitazione per dimostrare l'interazione tra PRMT5 e ZNF224 (gentilmente concesso dal Prof. Sardet; Fabrizio E. *et al.*, 2002); pMyc-ECE utilizzato come controllo della specificità della suddetta interazione negli esperimenti di immunoprecipitazione (gentilmente concesso dal Prof. S. Bonatti). Dopo circa 6h dalla trasfezione al DMEM sono stati aggiunti 10% di FBS e 1% di miscela penicillina/streptomicina.

2.4 Lisi cellulare e preparazione di estratti proteici.

Le cellule sono state raccolte e sottoposte a lisi 48h dopo la trasfezione. Dopo due lavaggi in tampone fosfato PBS (ICN), le cellule sono state incubate a 4°C per 30min, in agitazione, in presenza di 500 μl del tampone Lysis-IP (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 1% Triton-X100) completo di inibitori delle proteasi "Protease Inhibitor cocktail" (1:1000, Invitrogen), e PMSF 1mM. Le cellule sono state centrifugate a 4°C per 20min

alla velocità di 9000rpm (centrifuga Eppendorf). L'estratto proteico totale è stato separato dal pellet cellulare e misurato mediante saggio Bradford (Bradford M. M., 1976).

2.5 Saggio di immunoprecipitazione anti-FLAG e analisi di spettrometria di massa per MALDI/MS.

Gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati condotti su 35mg di estratto proteico totale da cellule trasfettate con il vettore p3XFLAG-ZNF224 e su estratto proteico ottenuto da cellule di controllo trasfettate con il plasmide p3XFLAG-CMV-7.1. In questo esperimento di immunoprecipitazione è stato utilizzato l'anticorpo anti-FLAG legato covalentemente ad una resina di agarosio (ANTI-FLAG M2, Sigma). Gli estratti sono stati incubati con la resina in un rapporto di 40µl di resina/piastra contenente circa 2×10^6 cellule, in presenza del tampone Lysis-IP cui è stato aggiunto 0,1% Np-40 (Sigma), a 4°C per una notte, in agitazione. I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 5min alla velocità di 1100rpm e lavati 6 volte con 10 volumi di tampone BC100 (20mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaCl, 5% Triton-X100, 10% glicerolo, 0,1% Np-40) completo di inibitori delle proteasi e PMSF 1mM. L'eluizione dei complessi immunoprecipitati è avvenuta a 4°C per 1h in presenza dell' "Elution solution" (Sigma), contenente 3µl di 3XFLAG peptide (Sigma)/100µl di tampone. I campioni sono stati frazionati su SDS-PAGE all'8% e le proteine visualizzate per colorazione con Coomassie-Blue colloidale (Invitrogen). Le bande proteiche sono state escisse dal gel e digerite *in situ* con tripsina. E' seguita poi l'analisi degli spettri di massa per MALDI/MS della miscela di peptidi ottenuta.

2.6 Tamponi e altre procedure di immunoprecipitazione.

Gli esperimenti di coimmunoprecipitazione, per confermare l'interazione di PRMT5 con ZNF224, sono stati condotti utilizzando l'anticorpo anti-Myc legato covalentemente ad una resina di agarosio (ANTI-c-Myc Agarose Conjugate, Sigma) e l'anticorpo anti-FLAG (Sigma). 2mg di estratto proteico totale da cellule non trasfettate, trasfettate con un solo plasmide e cotrasfettate sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione in presenza del tampone di lisi completo di inibitori delle proteasi diluiti 1:1000. Per l'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Myc, gli estratti proteici non trasfettati e trasfettati con p3XFLAG-ZNF224 insieme al vettore pMyc-PRMT5 o a pMyc-ECE sono stati incubati con la resina in un rapporto di 20 μ l di resina/mg di estratto; mentre per l'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-FLAG gli estratti proteici non trasfettati e trasfettati con il vettore p3XFLAG-ZNF224 insieme a pMyc-PRMT5 o a pMyc-ECE, e trasfettati con p3XFLAG-AF4 insieme a pMyc-PRMT5 sono stati incubati con 5 μ g di anticorpo/mg di estratto. Per l'immunoprecipitazione delle proteine endogene, il protocollo seguito è descritto nel lavoro di Pal (Pal S. *et al.*, 2003), ed ha previsto l'incubazione degli estratti proteici non trasfettati con l'anticorpo anti-PRMT5 (Upstate) e con un siero pre-immune di coniglio utilizzato come controllo negativo.

Nel caso delle immunoprecipitazioni con gli anticorpi anti-FLAG e anti-PRMT5 gli estratti sono stati incubati con i suddetti anticorpi primari a 4°C per una notte e il giorno successivo con 25 μ l di resina Protein A/G PLUS Agarose (Santa Cruz) a 4°C per 1h. I campioni sono stati poi centrifugati a 4°C per 5min alla velocità di 3000rpm, ciascun sovrantante ottenuto è stato eliminato mentre il precipitato, composto da resina, anticorpo e proteine ad esso legate è stato lavato per 3 volte con 1ml di tampone Lysis-IP. Dopo l'ultimo lavaggio la

resina é stata risospesa in 24µl di Laemmli-sample buffer (BIO-RAD), mescolata e centrifugata a temperatura ambiente per 30sec a 10000rpm. Le proteine immunoprecipitate sono state, infine, frazionate su SDS-PAGE al 10% e visualizzate per Western-Blot.

2.7 Esperimenti di Western Blot.

Per gli esperimenti di Western Blot, le proteine immunoprecipitate e/o gli estratti proteici totali (“input”) sono stati denaturati a 95°C per 5min, frazionati su SDS-PAGE all’8% o al 10% a 80mV costanti ed infine trasferiti per “elettro-blotting” su filtri di nitrocellulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia). I filtri sono stati preibridati, per 2h, in tampone t-TBS1X (5mM Tris pH7.5; 15mM NaCl; 0,1% Tween-20) e 5% latte (Mead Johnson). L’incubazione con anticorpi specifici é stata condotta in 3% o 5% latte/t-TBS; l’incubazione è stata condotta a temperatura ambiente per 2h oppure a 4°C, per tutta la notte. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: anti-ZNF224 (prodotto dalla ditta Neosystem in coniglio contro un peptide sintetico disegnato sulla sequenza proteica di ZNF224 in posizione 169-182) alla diluizione di 1:500; anti-FLAG M2 (Sigma) alla diluizione di 1:5000; anti-Myc alla diluizione di 1:1000; anti-PRMT5 (Upstate) alla diluizione di 1:3000; questi ultimi tre anticorpi sono gli stessi utilizzati nei saggi di immunoprecipitazione. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati: la proteina A e l’anticorpo anti-mouse coniugati all’enzima Perossidasi (Amersham Pharmacia) diluiti 1:5000 in 5% latte/t-TBS.

2.8 Saggi di Chromatin Immunoprecipitation (X-ChIP).

2.8.1 Preparazione della cromatina.

Le cellule HEK-293 sono state piastrate alla densità di 1×10^6 cellule/piastra. Dopo tre giorni di crescita le cellule sono state incubate 10' in presenza di 1% Fixing Solution (11% HCHO, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0, 0,5mM EGTA, 50mM Hepes pH8.0; 0,125M glicina). Questa reazione di “cross-linking” ha consentito la formazione di legami crociati tra proteine e DNA per effetto dell'aggiunta di formaldeide direttamente al mezzo di coltura.

Le cellule, dopo due lavaggi in PBS, sono state centrifugate a 4°C per 15min alla velocità di 3000rpm. I pellet ottenuti sono stati risospesi in 1,5ml di Cell Lysis Buffer (5mM PIPES pH8.0, 85mM KCl, 0,5% NP-40, 1mM PMSF e 3µl di inibitori delle proteasi), lasciati in ghiaccio per 10min e poi centrifugati a 4°C per 5min alla velocità di 3000rpm. I nuclei sono stati risospesi in 250µl di Nuclei Lysis Buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 0,8% SDS, 1mM PMSF e 3µl di inibitori delle proteasi), e sottoposti a sonicazione 8 volte per 30sec con intervalli di 30sec in ghiaccio. I campioni sono stati ricentrifugati a 4°C per 10min alla velocità di 14000rpm, i sovranatanti diluiti ad un volume finale di 1ml con Dilution Buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 0,5mM EGTA, 1% TritonX-100, 140mM NaCl, 1mM PMSF e 3µl di inibitori delle proteasi), 30µl dell'intera preparazione sono stati sottoposti a reversione del “cross-link”, mentre la restante preparazione è stata conservata a -80°C.

2.8.2 Immunoprecipitazione.

Per ogni campione immunoprecipitato con gli anticorpi anti-PRMT5 e anti-Sym11 e in assenza di anticorpo (No-Ab), che rappresenta il controllo negativo, un'aliquota di circa 450µl è stata diluita con 1 volume di RIPA

Buffer (Haimovich B. *et al.*, 1991). Ciascun campione è stato incubato in presenza di 30µl di Protein A agarose (Amersham) per il “pre-clearing”, a 4°C per 4h, e poi centrifugato a 4°C per 10min alla velocità di 14000rpm. I sovranatanti sono stati incubati in presenza di 5µg di anticorpo, a 4°C per tutta la notte e successivamente centrifugati a 4°C per 10min alla velocità di 14000rpm, incubati con 30µl di Protein A agarose, a 4°C per 4h in agitazione, e poi nuovamente centrifugati. La resina di ciascun campione è stata lavata 5 volte con RIPA Buffer, 1 volta con 0,8M LiCl e 1 volta con TE pH8.0 (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0). Il sovranatante della prima centrifugata del No-Ab rappresenta l’ “input” nell’analisi di PCR; lo 0.1% dello stesso è stato sottoposto, come i campioni di IP e No-Ab, alla reazione di “decross-linking” che ha consentito la rottura dei legami crociati tra proteine e DNA. Alla fine ogni resina è stata risospesa in 100µl di TE pH8.0.

Eventuali contaminazioni da RNA sono state eliminate incubando i campioni con 1µg di RNase (Roche), a 65°C per tutta la notte. Il giorno seguente, allo scopo di degradare eventuali proteine rimaste, ogni campione è stato incubato con 5µl di SDS al 10% e 2,5µl di 20mg/ml Proteinasi K (Roche), a 50°C per 4h. I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 2min alla velocità di 14000rpm, sottoposti alla prima estrazione con fenolo/cloroformio/IAA (25:24:1), alla seconda, della sola fase organica, con 1 volume di TE pH8.0 ed a precipitazione in presenza di glicogeno fino a 100 µg/ml, a -20°C per tutta la notte. I pellet di DNA sono stati, infine, risospesi in 30µl di H₂O e 2µl di ciascuno sono stati analizzati per PCR.

2.8.3 Reazioni di polimerizzazione a catena (PCR).

Sui campioni di X-ChIP con gli anticorpi anti-PRMT5 e anti-Sym11 sono state allestite le reazioni di PCR, in un apparecchio Biometra Personal Cycler, utilizzando oligonucleotidi disegnati specificamente sulla sequenza del cDNA della Gliceraleide-3-fosfato deidrogenasi (G3PDH) e su quella dell'elemento di regolazione negativa AldA-NRE. In più, solo per l'esperimento di X-ChIP con l'anticorpo anti-PRMT5 è stata condotta l'amplificazione di una regione all'interno del promotore del gene *cad* ("carbamoyl-phosphate synthase-aspartate carbamoyltransferase-dihydroorotase"; Pal S. *et al.*, 2003), e solo per l'esperimento di X-ChIP con l'anticorpo anti-Sym11 l'amplificazione di una regione all'interno del promotore del gene *IL2* (Richard S. *et al.*, 2005).

Le sequenze oligonucleotidiche utilizzate per l'amplificazione del frammento di 440bp di G3PDH sono state:

G3PDH forward: 5'-AGGTCATCCATGACAACCTTTGG-3'

G3PDH reverse: 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGCT-3'

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate usando la Ampli Taq DNA Polymerase (Roche). Il profilo di reazione di PCR seguito è stato: denaturazione a 94°C per 2min seguita da 28 cicli di denaturazione a 94°C per 1min, appaiamento a 58°C per 1min, estensione a 72°C per 1min; estensione finale a 72°C per 5min e raffreddamento dei campioni a 4°C.

Le sequenze oligonucleotidiche specifiche utilizzate per l'amplificazione del frammento AldA-NRE di 450bp sono state:

AldA-NRE forward: 5'-CCCTCTGTTCCACTGGGCAAGTGAG-3'

AldA-NRE reverse: 5'-CCATTCCAGTTCCCAGGCCTGGGTG-3'

In questo caso la reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando il Buffer "Cagliari" (166mM Ammonio Solfato, 670mM Tris-HCl pH8.8, 670µM

EDTA, 19mM MgCl₂, 100mM βMercapto-etanolo, 1,7mg/ml BSA). Il profilo di reazione di questa PCR ha previsto l'attivazione dell'enzima a 94°C per 10min, seguita da 28 cicli di denaturazione a 94°C per 1min, appaiamento a 64°C per 1min, estensione a 72°C per 1min; estensione finale di 5min a 72°C e raffreddamento dei campioni a 4°C.

Per l'amplificazione del frammento di 400bp all'interno del promotore del gene *cad* è stato seguito il protocollo utilizzato per il frammento AldA-NRE, le sequenze oligonucleotidiche utilizzate sono state quelle descritte nel lavoro di Pal S. *et al.*, 2003.

Per l'amplificazione del frammento di 450bp all'interno del promotore del gene *IL-2* le sequenze oligonucleotidiche utilizzate sono state quelle descritte nel lavoro di Richard S. *et al.*, 2005. Il profilo di questa reazione di PCR è stato: denaturazione a 94°C per 5min seguita da 28 cicli di denaturazione a 94°C per 1min, appaiamento a 50°C per 1min, estensione a 72°C per 1min; estensione finale a 72°C per 5min e raffreddamento dei campioni a 4°C.

2.9 Saggi di “RNA interference”.

2.9.1 Trasfezione transiente per l'esperimento di “RNA interference”.

Le cellule HEK-293, piastrate in piastre “multi-well” da 24 pozzetti (Falcon) alla densità di 4×10^4 cellule/pozzetto, nel mezzo di coltura OptiMEM (Gibco), sono state trasfettate il giorno dopo con 40pmoli di “small interfering RNA” (*SKB1-48*; *SKB1-49*; *SKB1-50*) della lunghezza di 25 nucleotidi disegnati specificamente sulla sequenza del cDNA di PRMT5, utilizzando il reagente LipofectamineTM2000 (Invitrogen). Come controllo negativo, le cellule sono state trasfettate con “Stealth RNAi negative control Duplexes” (Invitrogen) con

sequenza aspecifica ma lo stesso contenuto in citosina e guanina dei siRNA specifici per PRMT5. Dopo 5h dalla trasfezione è stato aggiunto 10% FBS.

Le sequenze dei “primer” utilizzati sono stati:

SKBI-48: 5'-AUAUGUCUGAGAUUCCAGAUUGUCC-3'

5'-GGACAAUCUGGAAUCUCAGACAUAU-3'

SKBI-49: 5'-AAUGAUGUCUGCUUUCUCUGGAGCC-3'

5'-GGCUCCAGAGAAAGCAGACAUCAUU-3'

SKBI-50: 5'-AAUUCAGCUCCUGUAACAUGGCCGC-3'

5'-GCGGCCAUGUUACAGGAGCUGAAUU-3'

2.9.2 Estrazione di RNA totale e sintesi di cDNA.

Le cellule sono state raccolte e sottoposte a protocollo di estrazione degli RNA con 1ml di Trizol, cui è stato aggiunto 1/5 del volume di Cloroformio. I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 5min alla velocità di 12000rpm, il sovrinatante è stato precipitato con 1volume di isopropanolo e poi lavato con etanolo al 75%. L'RNA è stato risospeso in acqua DEPC “RNase free”, e la sua concentrazione è stata valutata mediante quantizzazione spettrofotometrica (Beckman DU 530), alla lunghezza d'onda di 260nm. La reazione di trascrizione inversa è stata condotta con l' “MMLW reaction” (Invitrogen) su 1µg di RNA estratto da cellule trasfettate, utilizzando la strumentazione MyCycler (Bio-Rad), in presenza 1µl di 25mM dNTP mix (Invitrogen), 2µl di 0,1M DTT, 2µl di 10X Buffer, 4µl di MgCl₂, 2µl di 50µM Random Primer cui sono stati aggiunti 1µl di Trascrittasi inversa (20U/µl), 1U/µl di RNAsin e inibitore dell'RNAsi. Dopo denaturazione a 70°C per 10min, i campioni sono stati trattati a 25°C per 10min; 42°C per 45min; 99°C per 3min; 8°C per 1min.

La sintesi del cDNA è stata bloccata mediante inattivazione dell'enzima a 70°C per 15min.

2.9.3 “Real Time” PCR.

I livelli del messaggero di PRMT5 è stata valutata mediante PCR quantitativa con la procedura in “Real Time”, utilizzando lo strumento iCycler (Bio-Rad). La curva di taratura per valutare l'efficienza della reazione di PCR è stata effettuata su tre diluizioni scalari del cDNA.

Le condizioni di reazione utilizzate sono state: 95°C per 3min (attivazione della Taq DNA Polimerasi), seguita da 40 cicli a 95°C per 15sec, 58°C per 1min, 55°C per 10sec, e altri 80 cicli in cui la temperatura partendo 55°C si è innalzata di 0,5°C ogni 10sec.

Le sequenze oligonucleotidiche utilizzate per la PCR relativa al frammento AldA-NRE e a un tratto di sequenza del cDNA di PRMT5 sono stati:

L1 forward: 5'-TCAACCACACTCCGTCCACG-3'

L1 reverse: 5'-GTAGCAAGTTCCGGTGCTTC-3'

PRMT5 forward: 5'-CTGGATGGAGCCCAGCACT-3'

PRMT5 reverse: 5'-GGCTCGGACCTCATTGTACA-3'

La reazione di PCR è stata condotta in presenza di 10µl di SYBER Green I mix 2X, 0,38µl di miscela 20µM dei due “primer”, 7,62µl di acqua e 2µl di cDNA.

La fluorescenza emessa dal SYBER Green I, quando questo si intercala nel DNA a doppio filamento, è proporzionale alla quantità di DNA amplificata che può essere rilevata dallo strumento durante ogni ciclo di amplificazione e, quindi, in tempo reale.

3. RISULTATI

3.1 L'arginina metil-transferasi PRMT5 è stata identificata come potenziale interattore molecolare del repressore trascrizionale ZNF224.

Il complesso di repressione trascrizionale della “zinc-finger protein” ZNF224 è composto da diverse proteine che, interagendo direttamente o indirettamente con ZNF224, cooperano al meccanismo di regolazione negativa del gene dell'*aldolasi A* umana durante specifiche fasi del ciclo cellulare. I “partner” molecolari fino ad oggi identificati che partecipano alla repressione trascrizionale mediata da ZNF224 sono il corepressore universale delle KRAB-ZFPs, KAP1 e le deacetilasi degli istoni, le quali determinano il compattamento della cromatina e quindi il passaggio della stessa ad uno stato trascrizionalmente inattivo (Medugno L. *et al.*, 2005). L'identificazione di altre proteine che interagiscono con ZNF224 è stata condotta ricorrendo alla metodica dell'immunoprecipitazione coniugata all'analisi di spettrometria di massa per MALDI/MS. A tale scopo il cDNA della proteina ZNF224 è stato clonato nel vettore di espressione eucariotico p3XFLAG-CMV-7.1, a valle dell'epitopo 3XFLAG, ottenendo un plasmide ([Figura 4A](#)) codificante la proteina ricombinante 3XFLAG-ZNF224 che viene riconosciuta specificamente dall'anticorpo anti-FLAG. Gli estratti proteici da cellule HEK-293 trasfettate con questo plasmide, contenenti cioè i complessi formati per interazione delle proteine endogene con la proteina ricombinante 3XFLAG-ZNF224 e quelli da cellule trasfettate con il plasmide di controllo p3XFLAG-CMV-7.1, sono stati immunoprecipitati utilizzando una resina di agarosio cui era legato covalentemente l'anticorpo diretto contro l'epitopo 3XFLAG. Le proteine immunoprecipitate specificamente con 3XFLAG-ZNF224 ([Figura 4B](#), linea

3), non presenti quindi nell'immunoprecipitato di controllo ([Figura 4B](#), linea 2), sono state frazionate su SDS-PAGE, visualizzate con colorazione con Coomassie-Blue colloidale, digerite *in situ* con tripsina e la miscela di peptidi ottenuta è stata, infine, sottoposta all'analisi di spettrometria di massa: il confronto degli spettri di massa ottenuti con una banca dati specifica per proteine ha portato all'identificazione di alcune proteine, tra cui l'arginina metil-transferasi PRMT5, come possibili "partner" molecolari di ZNF224.

3.2 L'interazione fra ZNF224 e PRMT5 è stata confermata da esperimenti di immunoprecipitazione.

Tra le proteine identificate, l'interesse scientifico è stato rivolto all'interazione di ZNF224 con l'arginina metil-transferasi PRMT5, una proteina di 72 KDa, membro della famiglia delle PRMTs di tipo II, che catalizza la formazione di arginine monometilate e dimetilate simmetricamente (Branscombe T. L. *et al.*, 2001). L'interazione tra le proteine ZNF224 e PRMT5 è stata confermata da saggi di coimmunoprecipitazione utilizzando le proteine ricombinanti 3XFLAG-ZNF224 e Myc-PRMT5 sovra-espresse nel sistema cellulare delle HEK-293, e da esperimenti d'immunoprecipitazione sulle proteine endogene.

3.2.1 Le proteine ricombinanti 3XFLAG-ZNF224 e MYC-PRMT5 interagiscono tra loro.

Saggi di coimmunoprecipitazione sono stati eseguiti utilizzando estratti proteici da cellule trasfettate con i vettori di espressione che codificano le proteine ricombinanti 3XFLAG-ZNF224 e Myc-PRMT5 e con il vettore pMyc-ECE che codifica per una proteina transmembrana di 53 KDa, Myc-ECE, utilizzata come proteina di controllo, che possiede all'estremità ammino-terminale

l'epitopo Myc presente a monte del cDNA di PRMT5. Come ulteriore controllo, la reazione di immunoprecipitazione è stata condotta su estratti proteici da cellule non trasfettate: i due controlli sono stati necessari per dimostrare la specificità dell'interazione tra 3XFLAG-ZNF224 e Myc-PRMT5 e per escludere, quindi, che questa fosse dovuta alla presenza dell'epitopo Myc. I complessi proteici immunoprecipitati con l'anticorpo anti-Myc sono stati purificati utilizzando una resina d'agarosio cui erano coniugate covalentemente le immunoglobuline di topo (IgG) e di coniglio (IgA). L'analisi per Western Blot sui complessi immunoprecipitati ha fornito una prima evidenza dell'esistenza di una specifica interazione tra le proteine ZNF224 e PRMT5: la proteina 3XFLAG-ZNF224 era, infatti, presente nel complesso immunoprecipitato con la proteina Myc-PRMT5 ([Figura 5A](#), linea 2) e non in quelli di controllo ([Figura 5A](#), linea 3 e linea 4).

L'esperimento reciproco di immunoprecipitazione utilizzando l'anticorpo diretto contro l'epitopo 3XFLAG ha confermato l'interazione tra ZNF224 e PRMT5. In questo esperimento è stato aggiunto un ulteriore controllo per confermare la specificità dell'interazione, rappresentato da estratti proteici di cellule trasfettate con il vettore pMyc-PRMT5 insieme al vettore p3XFLAG-AF4 che codifica una proteina ricombinante di circa 100 KDa, formata dalla regione ammino-terminale del fattore trascrizionale AF4 e dall'epitopo 3XFLAG all'estremità ammino-terminale. Il risultato di questa coimmunoprecipitazione ha dimostrato che Myc-PRMT5 immunoprecipita con 3XFLAG-ZNF224 ([Figura 6A](#), linea 4) e non con il suo controllo negativo 3XFLAG-AF4 ([Figura 6A](#), linea 2). La specificità dell'interazione è stata ulteriormente confermata dall'assenza dell'altra proteina di controllo, Myc-ECE, nel complesso immunoprecipitato con 3XFLAG-ZNF224 ([Figura 6A](#),

linea 3). E' quindi possibile affermare che le proteine di fusione 3XFLAG-ZNF224 e Myc-PRMT5, sovra-espresse nelle cellule HEK-293, interagiscono fra di loro.

3.2.2 La conferma dell'interazione tra ZNF224 e PRMT5 è stata ottenuta dall'esperimento di immunoprecipitazione con le proteine endogene.

Per accertarsi che l'interazione tra il repressore trascrizionale ZNF224 e l'arginina metil-transferasi PRMT5 non fosse dovuta alla loro sovra-espressione, è stato allestito un esperimento di immunoprecipitazione su cellule trasfettate con il solo vettore p3XFLAG-ZNF224. Gli estratti proteici da cellule trasfettate e non, utilizzati come controllo, sono stati incubati con l'anticorpo anti-FLAG; l'analisi per Western Blot con l'anticorpo anti-PRMT5, che riconosce specificamente la proteina PRMT5 endogena, ha rivelato la presenza di quest'ultima proteina nel complesso immunoprecipitato con 3XFLAG-ZNF224 ([Figura 7A](#), linea 1) e non nel controllo ([Figura 7A](#), linea 2).

Un'ulteriore evidenza a favore dell'esistenza dell'interazione tra ZNF224 e PRMT5 è stata fornita dall'immunoprecipitazione delle proteine endogene utilizzando l'anticorpo anti-PRMT5. L'analisi per Western Blot con l'anticorpo che riconosce specificamente ZNF224, (anti-ZNF224), ha dimostrato che tale proteina immunoprecipita specificamente con PRMT5 ([Figura 7B](#), linea 3) e non con un siero pre-immune di coniglio utilizzato come controllo ([Figura 7B](#), linea 2).

3.3 PRMT5 partecipa alla modulazione trascrizionale del gene dell'*aldolasi A* mediata da ZNF224.

Ottenuta la conferma dell'interazione tra ZNF224 e PRMT5, gli studi successivi sono stati finalizzati a dare un significato funzionale a tale interazione.

Dati recenti di letteratura hanno indicato il coinvolgimento di PRMT5 nella modulazione dell'espressione genica, per cui era possibile ipotizzarne un ruolo anche nella repressione trascrizionale mediata da ZNF224 sul suo gene "target", l'*aldolasi A*. Il legame diretto della proteina ZNF224 all'elemento di regolazione negativa AldA-NRE, confermato mediante saggi di "Chromatin Immunoprecipitation", è alla base della modulazione dell'espressione del trascritto del gene dell'*aldolasi A* (Medugno L. *et al.*, 2005).

Allo scopo di chiarire se PRMT5 fosse un componente del complesso di repressione trascrizionale di ZNF224 sono stati allestiti saggi di X-ChIP con l'anticorpo diretto contro la proteina PRMT5 e condotte amplificazioni specifiche per l'elemento AldA-NRE. Inoltre, utilizzando la metodica dell'"RNA interference", che ha determinato una significativa riduzione dell'espressione del trascritto del gene *prmt5*, ne è stato valutato l'effetto sull'espressione del gene dell'*aldolasi A*.

3.3.1 PRMT5 appartiene al complesso proteico che lega l'elemento "silencer" AldA-NRE del gene dell'*aldolasi A* umana.

Il possibile ruolo biologico dell'interazione di PRMT5 con ZNF224 è stato indagato allestendo saggi di X-ChIP. In [Figura 8](#) è riportata l'immunoprecipitazione condotta utilizzando l'anticorpo anti-PRMT5 e parallelamente in assenza di anticorpo, come controllo della specificità della

reazione. L'efficienza dell'immunoprecipitazione della cromatina è stata dimostrata attraverso l'amplificazione di una regione del promotore del gene *cad* ([Figura 8A](#), linea 2 e linea 3 a confronto), di cui è descritta l'interazione con PRMT5 (Pal S. *et al.*, 2003). Per verificare la presenza di PRMT5 nel complesso proteico che lega l'elemento di regolazione negativa AldA-NRE la cromatina immunoprecipitata, con e senza anticorpo, è stata analizzata mediante PCR utilizzando oligonucleotidi specifici per la sequenza AldA-NRE: la presenza del prodotto di amplificazione evidenziato nel complesso immunoprecipitato con la proteina PRMT5 ([Figura 8B](#), linea 2) e l'assenza della banda amplificata nel controllo ([Figura 8B](#), linea 3), ha fornito una prima indicazione dell'appartenenza di PRMT5 al complesso multiproteico che lega il promotore del gene dell'*aldolasi A*. La specificità della reazione di immunoprecipitazione è stata verificata attraverso l'amplificazione di una regione del gene *g3pdh*: l'assenza del prodotto di amplificazione nella linea 2 ([Figura 8C](#)), relativa alla immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-PRMT5, ha dimostrato che non vi è DNA legato in maniera aspecifica a questo anticorpo.

3.3.2 Una proteina del complesso multiproteico, che lega l'elemento “silencer” AldA-NRE, viene metilata simmetricamente da PRMT5.

L'anticorpo anti-SYM11, che è in grado di riconoscere i residui di arginina dimetilati simmetricamente da PRMT5, è stato utilizzato per un esperimento di X-ChIP al fine di rivelare l'eventuale presenza, nel complesso multiproteico che lega la sequenza AldA-NRE, di una proteina substrato di metilazione da parte di PRMT5 ([Figura 9](#)). Come controllo dell'efficienza della reazione, sulla cromatina immunoprecipitata, con e senza anticorpo ([Figura 9A](#), linea 3

e 2 rispettivamente), è stata condotta l'amplificazione di una regione all'interno del promotore del gene *IL-2*, nel cui complesso di regolazione trascrizionale è presente una proteina che viene riconosciuta dall'anticorpo anti-Sym11, perché dimetilata simmetricamente da PRMT5 (Richard S. *et al.*, 2005). I risultati ottenuti hanno rivelato la presenza del prodotto di amplificazione, corrispondente all'elemento AldA-NRE, nel campione immunoprecipitato con l'anticorpo anti-Sym11 ([Figura 9B](#), linea 2), e l'assenza di banda amplificata nel controllo negativo ([Figura 9B](#), linea 3) e nell'amplificazione della regione del gene *g3pdh* ([Figura 9C](#)), dimostrando la presenza di substrati dell'attività enzimatica di PRMT5 nel complesso di repressione trascrizionale di ZNF224.

3.3.3 PRMT5 è coinvolto direttamente nella repressione trascrizionale mediata da ZNF224 sul gene dell'*aldolasi A*.

Al fine di valutare il ruolo di PRMT5 nella regolazione trascrizionale del gene dell'*aldolasi A* è stato allestito un esperimento di "RNA interference" trasfettando cellule HEK-293 con "small interfering RNA" (siRNA), disegnati specificamente sulla sequenza del cDNA di PRMT5, e con "stealth RNAi negative control Duplexes", utilizzati come controllo. Nella cellula i siRNA si associano al complesso ribonucleoproteico RISC ("RNA induced silencing complex") che, riconoscendo l'mRNA bersaglio, lo degrada in modo altamente specifico abolendone l'espressione.

Sono stati effettuati 3 diversi esperimenti di "RNA interference" su cellule HEK-293. La diminuita espressione dell'mRNA di PRMT5 è stata valutata mediante PCR quantitativa con la procedura in "Real Time". L'efficienza dell'"interferenza" è stata dimostrata dall'effettiva riduzione dei livelli di mRNA di PRMT5 ([Figura 10A](#)). Gli estratti proteici sottoposti ad interferenza e quelli

di controllo sono stati analizzati mediante Western Blot con l'anticorpo anti-PRMT5: la diminuzione dell'espressione della proteina PRMT5, per effetto dell' "RNA interference", è stata visualizzata rispetto al controllo ([Figura 10B](#), linea 1 e linea 2, rispettivamente). Ottenuta la riduzione dei livelli del trascritto e della proteina PRMT5 è stato indagato un eventuale effetto sull'espressione del trascritto del gene dell'*aldolasi A*. L'analisi dei livelli di messaggero di tipo "L" dell'*aldolasi A* è stata condotta, anche in questo caso, mediante PCR quantitativa con la procedura in "Real Time". Tale analisi ha dimostrato che al silenziamento del trascritto di PRMT5 è associato un aumento dei livelli di messaggero di tipo "L" di circa 4 volte, chiarendo la partecipazione diretta di PRMT5 al meccanismo di formazione di un complesso di repressione trascrizionale attivo sul gene dell'*aldolasi A* ([Figura 10A](#)).

In questo lavoro di dottorato di ricerca sono stati, dunque, presentati dati che hanno confermato l'importanza delle modifiche post-traduzionali e il coinvolgimento degli enzimi modificatori nella regolazione dell'espressione genica. Sebbene non sia stato ancora chiarito quali proteine del complesso di ZNF224 siano il substrato della metilazione simmetrica da parte di PRMT5, si può ipotizzare che tale substrato sia rappresentato dagli istoni in quanto le modifiche post-traduzionali che riguardano questa classe di proteine sono uno degli elementi chiave alla base sia della attivazione che della repressione dell'espressione genica in eucarioti.

4. DISCUSSIONE

L'identificazione dell'arginina metil-transferasi PRMT5, come nuovo "partner" proteico della "zinc-finger protein" ZNF224, ha fornito dati utili alla caratterizzazione funzionale di questa proteina, ed ha consentito di aumentare le conoscenze relative al meccanismo molecolare che regola l'espressione del gene dell'*aldolasi A* umana.

La modulazione trascrizionale di tale gene è stata oggetto di studio per diversi anni nel laboratorio dove è stato svolto questo lavoro di dottorato e rappresenta un utile strumento per comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della repressione trascrizionale negli organismi eucarioti. È stato dimostrato che ZNF224 è in grado di reprimere la trascrizione di un qualsiasi promotore eterologo in cui sia stata inserita la sua sequenza bersaglio "AldA-NRE" (Medugno L. *et al.*, 2003); inoltre, la modulazione del legame del repressore all'elemento "silencer" durante le diverse fasi del ciclo cellulare" (Lupo A. *et al.*, 1997) lascia ipotizzare il coinvolgimento di questo complesso di repressione trascrizionale in meccanismi generali di regolazione dell'espressione genica durante il ciclo cellulare.

Di qui l'interesse ad approfondire la caratterizzazione funzionale di ZNF224 partendo dall'isolamento di nuove proteine che, *in vivo*, interagiscono con essa, al fine di ottenere informazioni utili sui meccanismi molecolari che sono alla base della repressione trascrizionale mediata dalle KRAB-ZFPs in eucarioti.

L'approccio sperimentale messo a punto è consistito nella trasfezione transiente di cellule embrionali renali umane della linea HEK-293 con un vettore di espressione eucariotico che codifica la proteina ricombinante 3XFLAG-ZNF224 e saggi di immunoprecipitazione, utilizzando l'anticorpo

diretto contro l'epitopo FLAG. La successiva analisi mediante spettrometria di massa per MALDI/MS sui complessi immunoprecipitati ha permesso di identificare diversi possibili "partner" molecolari di ZNF224. Abbiamo scelto di approfondire l'eventuale interazione con l'arginina metil-transferasi PRMT5 in quanto l'interesse scientifico degli ultimi anni nei confronti di questa proteina è cresciuto; infatti, è stato dimostrato il coinvolgimento di PRMT5 in differenti complessi regolativi dell'espressione genica.

Attualmente nei mammiferi sono noti 6 membri della famiglia delle arginina metil-transferasi (PRMTs), cui appartiene PRMT5, per i quali è stata documentata l'implicazione nell'attivazione o nella repressione trascrizionale o in entrambi i meccanismi regolativi (Bedford M. *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda PRMT5, è stato recentemente dimostrato il suo coinvolgimento nell'attivazione dell'espressione di geni come *IL2* e *NF-AT* (Richard S. *et al.*, 2005) e nella repressione dell'espressione di geni che codificano per onco-soppressori quali ST7 ("suppressor of tumorigenicity") e NM23 ("nonmetastatic 23") (Pal S. *et al.*, 2004).

In questo lavoro, allestendo esperimenti di immunoprecipitazione, sia su estratti cellulari trasfettati che iper-esprimevano le proteine ricombinanti, sia sulle due proteine endogene, abbiamo confermato l'interazione tra l'arginina metil-transferasi PRMT5 e la "zinc-finger protein" ZNF224.

Il passo successivo è stato il chiarimento del ruolo funzionale di questa interazione e la dimostrazione del coinvolgimento di PRMT5 nella regolazione trascrizionale del gene dell'*aldolasi A*.

La "Chromatin immunoprecipitation" è una procedura estremamente diffusa in questi ultimi anni in quanto consente di rilevare, *in vivo*, interazioni tra proteine e una specifica sequenza di DNA, permettendo di accrescere le conoscenze

relative a diversi “network” regolativi dell’espressione genica e ai differenti meccanismi epigenetici nelle cellule. Utilizzando questa metodica abbiamo dimostrato la partecipazione di PRMT5 al complesso multiproteico che lega l’elemento “AldA-NRE”.

La conferma del coinvolgimento diretto di PRMT5 nella repressione trascrizionale del gene dell’*aldolasi A* è stata fornita da saggi di “RNA interference” nei quali al silenziamento del trascritto di PRMT5 è corrisposto un incremento di circa 4 volte dell’espressione del messaggero di tipo “L” dell’*aldolasi A*, confermando il ruolo diretto dell’arginina metil-transferasi nella repressione trascrizionale del gene “target” di ZNF224.

L’isolamento dell’arginina metil-transferasi PRMT5 quale interattore di ZNF224, e la dimostrazione del suo diretto coinvolgimento nella regolazione dell’*aldolasi A*, hanno fornito un ulteriore esempio dell’importanza delle modifiche post-traduzionali nella modulazione dell’espressione genica e nella formazione di complessi proteici di regolazione trascrizionale. L’introduzione di modifiche post-traduzionali, soprattutto a livello dell’estremità ammino-terminale degli istoni, rappresenta un segnale cellulare importante per il reclutamento di proteine regolatrici su specifici promotori; in tal modo le proteine istoniche svolgono un ruolo centrale nella regolazione dell’espressione genica.

Sebbene il meccanismo molecolare attraverso cui la metilazione delle arginine degli istoni contribuisca al rimodellamento della cromatina e alla regolazione trascrizionale sia ancora poco chiaro, dati recenti di letteratura hanno indicato che tale modifica delle proteine sia richiesta per lo sviluppo dei mammiferi e che probabilmente sia importante anche per la proliferazione e il differenziamento cellulare (Shimada Y. *et al.*, 2000).

In questo lavoro abbiamo dimostrato che l'attività metil-transferasica di PRMT5 è necessaria per la formazione del complesso multiproteico di repressione di ZNF224. Attraverso saggi di "Chromatin immunoprecipitation" con l'anticorpo anti-Sym11, che riconosce specificamente le arginine simmetricamente dimetilate (Boisvert F. M. *et al.*, 2003), è stata, inoltre, rivelata la presenza, nel complesso multiproteico che lega la sequenza AldA-NRE di una o più proteine substrato di metilazione da parte di PRMT5. Questo risultato ha chiarito l'importanza dell'attività enzimatica di PRMT5 come parte fondamentale nella costituzione del complesso di repressione che si struttura sul promotore del gene dell'*aldolasi A*.

Sebbene non sia stato ancora chiarito quali proteine del complesso rappresentino il substrato di metilazione da parte di PRMT5, è possibile ipotizzare che si tratti delle proteine istoniche in quanto le modifiche post-traduzionali che riguardano questa classe di proteine sono uno degli elementi chiave alla base sia dell'attivazione che della repressione dell'espressione genica. Inoltre, è ampiamente documentata l'attività enzimatica di PRMT5 su specifici residui di arginina degli istoni, come ad esempio l'arginina 8 sull'istone H3 e l'arginina 3 sull'istone H4, che sono alla base dell'attività di proteine coinvolte nella regolazione trascrizionale (Pal S. *et al.*, 2004).

5. BIBLIOGRAFIA

- Abrink M. *et al.* (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 1422-1426.
- Amente S. *et al.* (2005), *FEBS Letters*, 579: 683-689.
- Bedford M. T. and Richard S. (2005), *Mol. Cell*, 18: 263-272. Review.
- Berger S. L. (1999), *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11 (3): 336-41. Review.
- Bode A. M. and Dong Z. (2005), *Science's STKE*, 281: 1-10.
- Boisvert F. M. *et al.* (2003), *Mol. & Cellular Proteomics* 2.12: 1319-1330.
- Bradford M. M. (1976), *Anal. Biochem.*, 72: 248-54.
- Branscombe T. L. *et al.* (2001), *J. of Biol. Chem.*, 276 (35): 32971-32976.
- Dutnall R. N. (2003) *Mol. Cell*, 12 (1): 3-4. Review.
- Esteller M. (2006), *Carcinogenesis*, 27 (6): 1121-1125.
- Fabrizio E. *et al.* (2002), *EMBO Reports*, 3 (7): 641-5.
- Friedman J. R. *et al.* (1996), *Genes Dev.*, 10: 2067-2078.
- Friesen W. J. *et al.* (2001), *Mol. and Cell. Biology*, 21 (24): 8289-8300.
- Gaston K. and Jayaraman P. S., (2003), *C.M.L.S.*, 60: 721-74.
- Hager G. L. *et al.* (2006), *Chromosome Research*, 14: 107-116.
- Haimovich B. *et al.* (1991), *Cell Regul.*, 2 (4): 271-83.
- Hampsey M. and Reinberg D. (1999), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9: 132-13.
- Hong L. *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.*, 268 (1): 305-14.
- Horsthemke B. (2006), *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 310: 45-59.
- Huntley S. *et al.* (2006), *Genome Res.*, 16 (5): 669-77.
- Imagawa M. (1996), *Neurochem. Int.*, 29 (6): 565-72. Review.
- Kim S. *et al.* (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 15299-15304.
- Kubicek S. and Jenuwein T. (2004), *Cell*, 119: 903-906.

Kumar R. *et al.* (2004), *Mol. Carcinog.*, 41 (4): 221-30. Review.

Kwak. Y. T. *et al.* (2003), *Mol. Cell*, 11: 1055-1066.

Latchman D. S. (1996), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28 (9): 965-74.

Lee D. Y. *et al.* (2005), *Endocrine reviews*, 26 (2): 147-170.

Lee J. H. *et al.* (2005), *J. of Biol. Chem.*, 280 (5): 3656-3664.

Love J. D. *et al.* (2000), *Biochem. Soc. Trans.*, 28 (4): 390-6. Review.

Lupo A. *et al.* (1997), *J. of Biological Chemistry*, 272 (50): 31641-31647.

Ma H. *et al.* (1999), *Mol. Cell. Biol.*, 19: 6164–6173.

Mahowald P. A. and Hardy P. A. (1985), *Ann. Rev. Genet.*, 19: 149-177.

Margolin J. F. *et al.* (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 4509-4513.

McBride A. E. and Silver P. A. (2001), *Cell*, 106: 5-8.

Medugno L. *et al.* (2003), *FEBS Letters* 534: 93-100.

Medugno L. *et al.* (2005), *Gene*, 359: 35-43.

Meister G. and Fischer U. (2002), *The EMBO J.*, 21 (21): 5853-5863.

Ng H. H. and Bird A. (2000), *Trands Biochem. Sci.*, 25: 121-126.

Pal S. *et al.* (2003), *Mol. Cell Biol.*, 23 (21): 7475-87.

Pal S. *et al.* (2004), *Mol. Cell Biol.*, 24 (21): 9630-45.

Peng H. *et al.* (2000), *J. Mol. Biol.*, 295: 1139-1162.

Pernette J. *et al.* (2006), *Advances in Genetics*, 56: 163-204.

Peterson C. L. and Laniel M. A. (2004), *Curr. Biol.*, 14 (14): 546-51.

Pollack B. P. *et al.* (1999), *J. of Biol. Chemistry*, 274 (44): 31531-31542.

Ptashane M. and Gonm A.A.F. (1999), *Nature*, 346: 329-331.

Richard S. *et al.* (2005), *Biochem. J.*, 388: 379-86.

Schultz D.C. *et al.* (2002), *Genes Dev.*, 16: 919-932

Shcherbik N. and Haines D. S. (2004), *J. Cell Biochem.*, 93 (1): 11-19.

Shilatifard A. (2006), *Annu. Rev. Biochem.*, 75: 243-69.

- Shimada Y. *et al.* (2000), *Radiat. Res.*, 154 (3): 293-300.
- Soldatenkov V. A. and Potaman V. N. (2004), *Curr. Drug Targets*, 5 (4): 357-65.
- Sripathy S. P. *et al.* (2006), *Mol. Cell Biol.*, in press.
- Steger D. J. and Workman J. L. (1996), *Bioessays*, 18 (11): 875-84.
- Strahl B. D. and Allis C. D. (2000), *Nature*, 403: 41-45.
- Tani M. *et al.* (2004), *Genes Chromosomes Cancer*, 40: 146-151.
- Thiel G. *et al.* (2004), *Eur. J. Biochem.*, 271: 2855-2862.
- Urrutia R. (2003), *Menome Biol.*, 4 (10): 231.
- Wysocka J. *et al.* (2006), *Front. Biosci.*, 1 (11): 344-55.

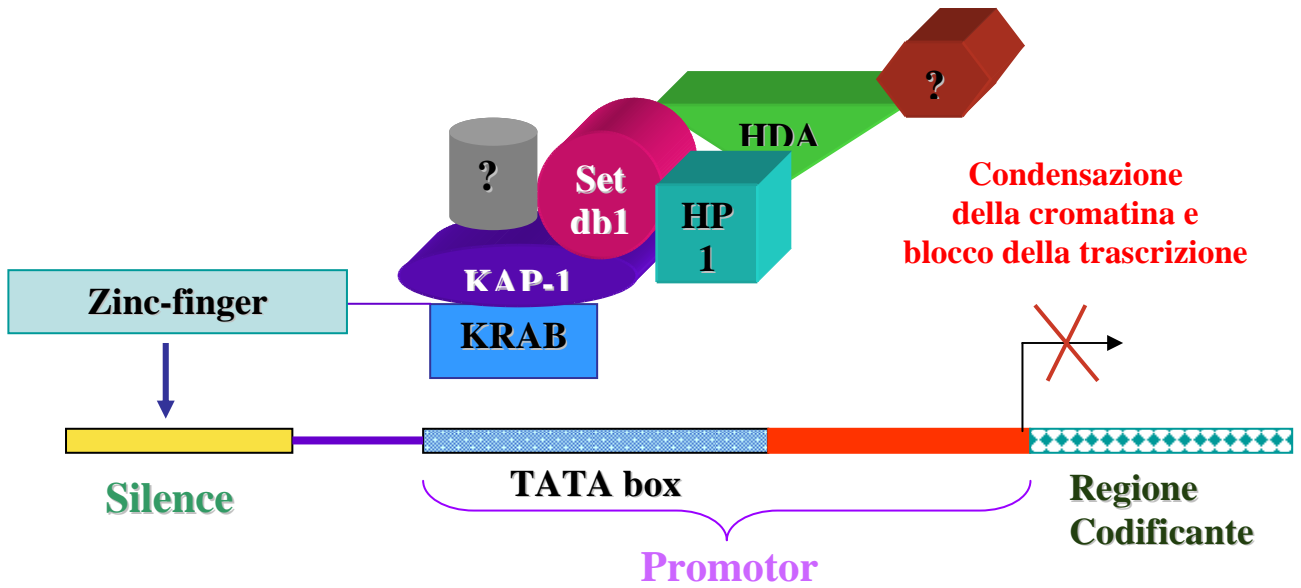


Figura 1: Il meccanismo di repressione mediato dalle KRAB-ZFPs.

Le proteine KRAB-ZFPs prendono contatto con il DNA attraverso i domini a dita di zinco, ed, attraverso il dominio di repressione KRAB, interagiscono con il corepressore KAP1 che recluta la proteina dell'eterocromatina (HP1), le deacetilasi (HDACs) e le metilasi degli istoni (SETDB1) per formare una complessa unità di repressione trascrizionale.

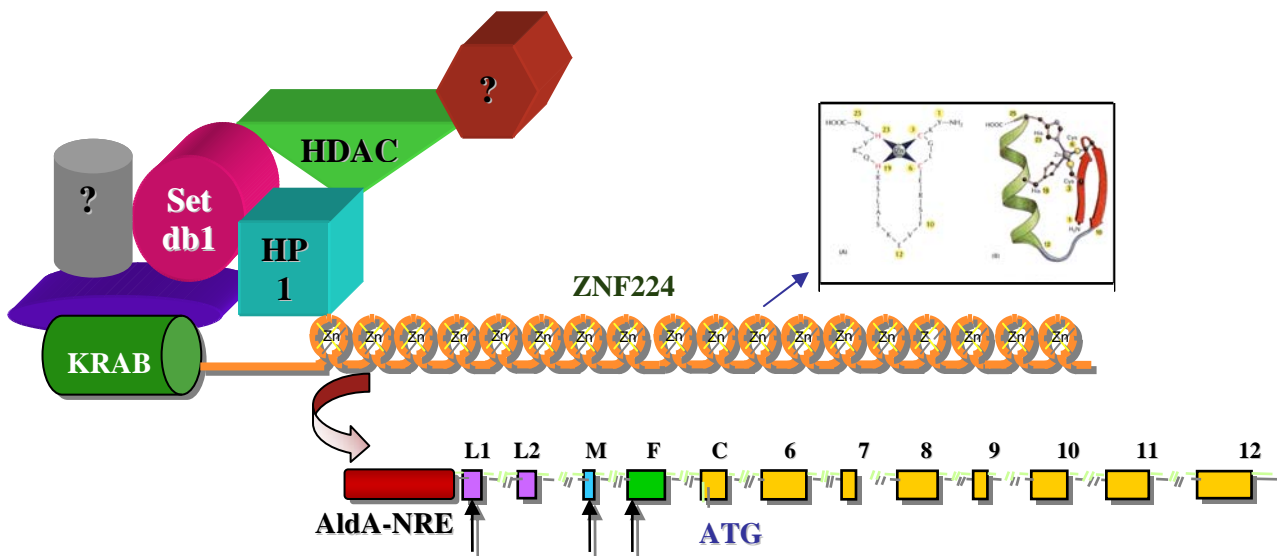


Figura 2: ZNF224 è la proteina nucleare che lega il promotore del gene dell'aldolasi A umana.

ZNF224 lega specificamente, attraverso i propri domini a dita di zinco, l'elemento di regolazione negativa "AldA-NRE", localizzato a monte del sito di inizio della trascrizione del promotore distale "pL" del gene dell'aldolasi A umana.

Nel riquadro è rappresentata l'organizzazione strutturale del motivo a dita di zinco di tipo C2H2

A

QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

B

QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

C

QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

Figura 3: (A) Tutte le PRMTs catalizzano la formazione di monometil-arginine (MMA), ma vengono suddivise in due tipi per il fatto che le proteine appartenenti al tipo I (PRMT1, PRMT3, PRMT4 e PRMT6) portano alla produzione di dimetil-arginine asimmetriche (aDMA), mentre quelle appartenenti al tipo II (PRMT5 e PRMT7) catalizzano la formazione di dimetil-arginine simmetriche (sDMA).
(B) Modello di assemblaggio dello “Spliceosoma” mediato dal complesso SMN-PRMT5.
(C) Coinvolgimento di PRMT5 nella repressione trascrizionale del gene della *ciclina E*.

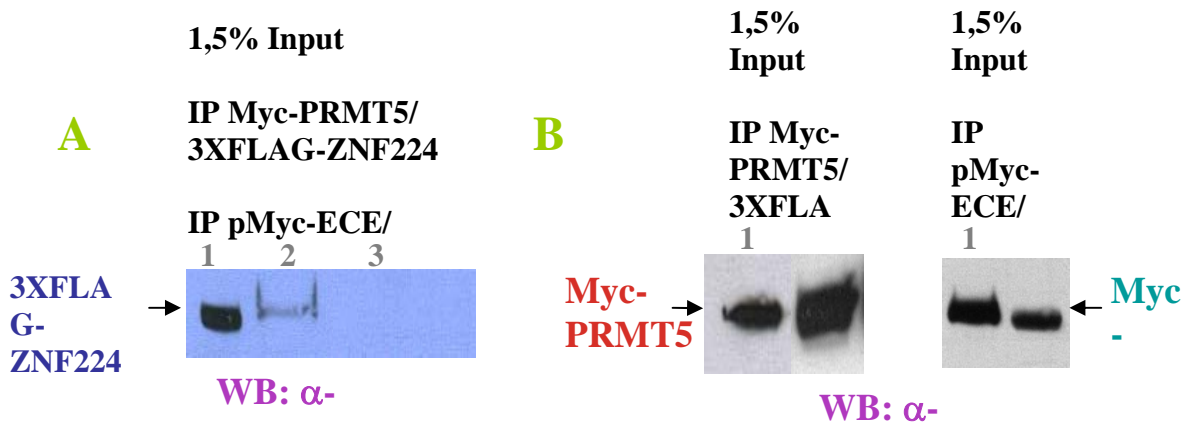


Figura 5: Analisi dell'interazione tra PRMT5 e ZNF224 con l'anticorpo anti-Myc, dopo trasfezione transiente delle cellule HEK-293 con i vettori di espressione p3XFLAG-ZNF224 e pMyc-PRMT5.

- (A) L'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Myc degli estratti proteici cotrasfettati e l'analisi Western Blot con l'anticorpo anti-FLAG, hanno rivelato la presenza della proteina 3XFLAG-ZNF224 nella immunoprecipitazione con la proteina Myc-PRMT5 (linea 2), e non nelle immunoprecipitazioni di controllo condotte su estratti da cellule non trasfettate (linea 4) e cotrasfettate con p3XFLAG-ZNF224 e pMyc-ECE (linea 3).
- (B) Visualizzazione degli "input" Myc-PRMT5 e Myc-ECE e delle rispettive proteine esca nelle immunoprecipitazioni.

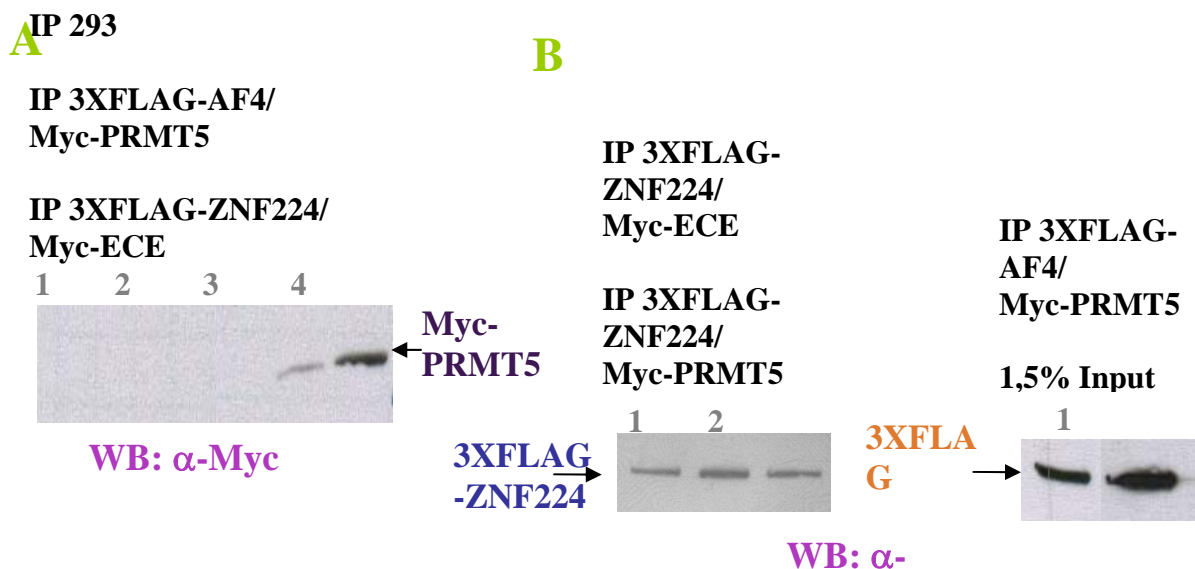


Figura 6: Analisi dell'interazione tra PRMT5 e ZNF224 con l'anticorpo anti-FLAG, dopo trasfezione transiente delle cellule HEK-293 con i vettori di espressione p3XFLAG-ZNF224 e pMyc-PRMT5.

- L'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-FLAG degli estratti cotrasfettati con p3XFLAG-ZNF224 e pMyc-PRMT5 e l'analisi Western Blot con l'anticorpo anti-Myc, hanno rivelato la presenza di Myc-PRMT5 nella immunoprecipitazione con 3XFLAG-ZNF224 (linea 4) e non in quelle di controllo su estratti da cellule non trasfettate (linea 1), cotrasfettate con i vettori p3XFLAG-AF4 e pMyc-PRMT5 (linea 2) e cotrasfettate con i vettori p3XFLAG-ZNF224 e pMyc-ECE (linea 3).
- Visualizzazione degli "input" 3XFLAG-ZNF224 e 3XFLAG-AF4 e delle rispettive proteine esca nelle immunoprecipitazioni.

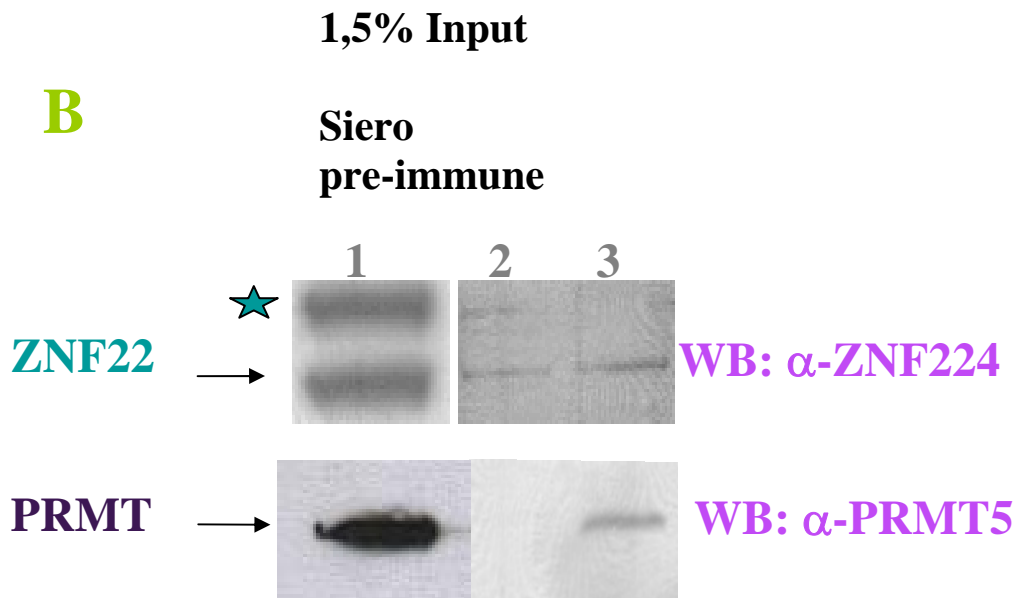
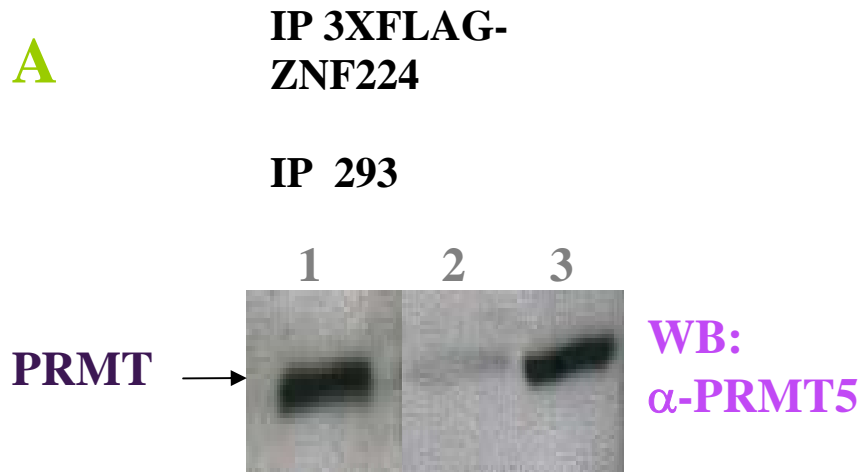


Figura 7: Analisi dell'interazione delle proteine endogene PRMT5 e ZNF224.

- La coimmunoprecipitazione con l'anticorpo anti-FLAG e l'analisi Western Blot con l'anticorpo anti-PRMT5, hanno rivelato la presenza della proteina PRMT5 endogena nell' immunoprecipitazione con la proteina ricombinante 3XFLAG-ZNF224 espressa in cellule HEK-293 trasfettate (lane 1) e non in quella di controllo su estratti cellulari, non trasfettati (linea 2).
- (B) Visualizzazione mediante Western Blot, con l'anticorpo anti-ZNF224, della proteina ZNF224 endogena nel complesso immunoprecipitato con l'anticorpo anti-PRMT5 (linea 3), e non in quello di controllo immunoprecipitato con il siero-preimmune (linea 2). L'asterisco indica una banda aspecifica riconosciuta dall'anticorpo anti-ZNF224. Nella linea 1 sono visualizzati gli "input" delle proteine ZNF224 e PRMT5 endogene.

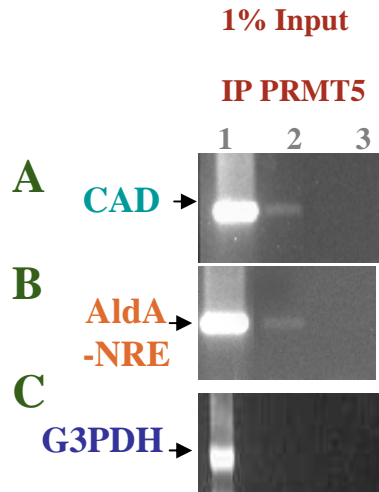


Figura 8: Saggio di “Chromatin Immunoprecipitation” con l’anticorpo diretto contro la proteina PRMT5.

- La presenza della banda amplificata con “primer” specifici per una regione del promotore del gene *cad* in corrispondenza della cromatina immunoprecipitata con l’anticorpo anti-PRMT5 (linea 2) e non in quella immunoprecipitata in assenza di anticorpo (linea 3), dimostra l’efficienza della reazione di XChIP.
- La presenza della banda amplificata con “primer” specifici per la sequenza AldA-NRE in corrispondenza della cromatina immunoprecipitata con l’anticorpo anti-PRMT5 (linea 2) e non in quella immunoprecipitata in assenza di anticorpo ha dimostrato l’appartenenza di PRMT5 al complesso proteico che lega tale elemento.
- Come controllo negativa è stata condotta una reazione di amplificazione utilizzando “primer” complementari ad una regione del gene *g3pdh*.

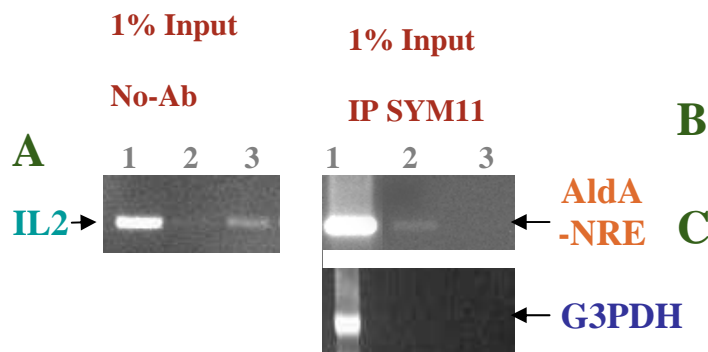


Figura 9: Saggio di “Chromatin Immunoprecipitation” con l’anticorpo anti-Sym11 che riconosce specificamente le arginine dimetilata simmetricamente da PRMT5.

- La presenza della banda amplificata, con “primer” specifici per una regione del promotore del gene *IL2*, in corrispondenza della cromatina immunoprecipitata con l’anticorpo anti-SYM11 (linea 3) e non in quella immunoprecipitata in assenza di anticorpo (linea 2) dimostra l’efficienza della reazione di XChIP.
- La presenza della banda amplificata, con “primer” specifici per la sequenza AldA-NRE, in corrispondenza della cromatina immunoprecipitata con l’anticorpo anti-SYM11 (linea 2) e non in quella immunoprecipitata in assenza di anticorpo (linea 3) ha dimostrato che PRMT5 svolge la sua attività enzimatica su una delle proteine del complesso che lega tale elemento.
- Come controllo negativa è stata condotta una reazione di amplificazione utilizzando “primer” complementari ad una regione del gene *g3pdh*.

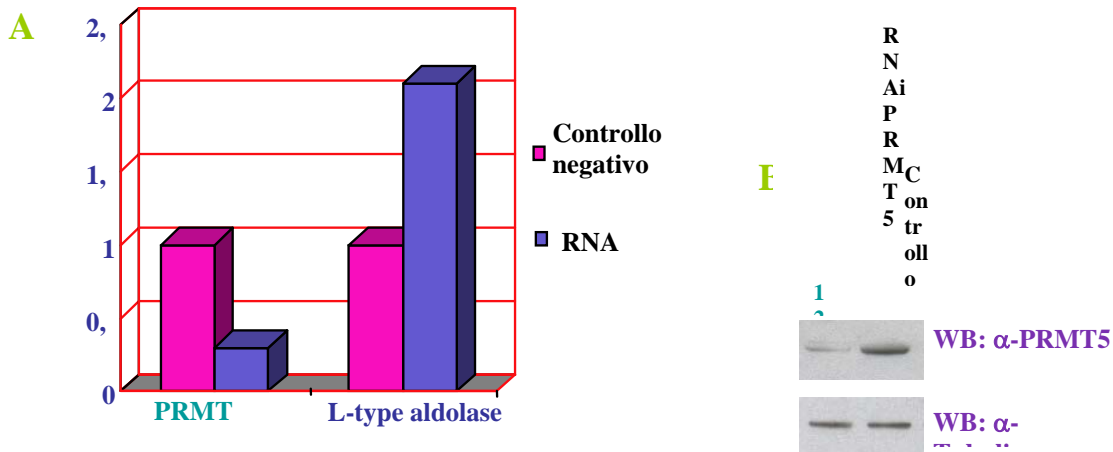


Figura 10: Analisi dell' "RNA interference" sul trascritto del gene *prmt5* e dei livelli di espressione del messaggero di tipo "L" del gene dell'*aldolasi A*.

- Il grado di interferenza del messaggero di PRMT5 è stato valutato mediante PCR quantitativa con la procedura in "Real Time": è possibile osservare la riduzione dei livelli dell'mRNA di PRMT5, in cellule HEK-293 trasfettate con "small interfering RNA" disegnati specificamente sulla sequenza del cDNA di PRMT5, paragonata ai livelli di espressione del trascritto in cellule di controllo, trasfettate con "Stealth RNAi negative control Duplexes". Dopo 72 ore dalla trasfezione transiente delle cellule con siRNA per PRMT5 e con siRNA di controllo, la variazione dei livelli di messaggero di tipo "L" del gene dell'*aldolasi A* è stata valutata mediante PCR quantitativa con la procedura in "Real Time": è possibile osservare un aumento di circa 4 volte dei livelli di messaggero di tipo "L" dell'*aldolasi A*, paragonato a quelli di controllo, per effetto dell' "RNA interference" sul trascritto di PRMT5.
- (Pannello in alto) L'analisi Western Blot con l'anticorpo anti-PRMT5 ha permesso di visualizzare la riduzione dei livelli proteici di PRMT5 (linea 1), per effetto dell' "RNA interference", rispetto al controllo (linea 2). (Pannello in basso) L'analisi per Western Blot con l'anticorpo anti- α -Tubulina ha rivelato la presenza della stessa quantità di proteine nei due estratti cellulari.