

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



FACOLTÁ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dottorato di Ricerca in Biologia Avanzata

(Indirizzo: Sistematica Molecolare)

XXI ciclo

**Studi molecolari e funzionali su PLAUF,
una *RNA-binding protein* del riccio di mare
*Paracentrotus lividus***

Coordinatore:

Prof.ssa Laura Fucci

Candidato:

Danilo Swann Matassa

Docente guida:

Prof.ssa Laura Fucci

Anno Accademico 2007/2008

Indice

1	Introduzione	1
1.1	La regolazione post-trascrizionale	2
1.2	Le sequenze ARE	5
1.3	Le <i>ARE-Binding Proteins</i>	9
1.4	La famiglia di proteine AUF1	14
1.5	Il ruolo degli istoni	18
1.6	La variante istonica H3.3	19
1.7	La proteina PLAUF	22
2	Scopo del lavoro	27
3	Materiali & Metodi	31
3.1	Analisi della <i>library</i> genomica	32
<u>3.1.1</u>	<u>Preparazione della sonda omologa</u>	<u>32</u>
<u>3.1.2</u>	<u>Marcatura della sonda mediante la reazione di "Random priming"</u>	<u>33</u>
<u>3.1.3</u>	<u>Preparazione di cellule</u>	<u>33</u>
<u>3.1.4</u>	<u>Infezione con i fagi</u>	<u>34</u>
<u>3.1.5</u>	<u>Trasferimento delle placche fagiche sui filtri e preibridazione</u>	<u>34</u>
<u>3.1.6</u>	<u>Ibridazione</u>	<u>35</u>
<u>3.1.7</u>	<u>Identificazione su piastra di singole placche fagiche</u>	<u>35</u>
<u>3.1.8</u>	<u>Titolazione di fagi</u>	<u>35</u>
<u>3.1.9</u>	<u>Preparazione dei lisati fagici</u>	<u>36</u>
<u>3.1.10</u>	<u>Digestione del DNA fagico</u>	<u>37</u>
3.2	Southern Blotting	37
<u>3.2.1</u>	<u>Trasferimento su filtro</u>	<u>37</u>
<u>3.2.2</u>	<u>Preibridazione e ibridazione del Southern blotting</u>	<u>38</u>
3.3	Clonaggio in vettore plasmidico <i>pBluescript KS (-)</i>	39
<u>3.3.1</u>	<u>Preparazione del vettore di clonaggio</u>	<u>39</u>
<u>3.3.2</u>	<u>Reazione di ligasi</u>	<u>39</u>
<u>3.3.3</u>	<u>Trasformazione</u>	<u>40</u>
<u>3.3.4</u>	<u>Trasformazione per elettroporazione</u>	<u>40</u>
3.4	Colony hybridization	41
3.5	Analisi computazionale	42
3.6	Saggi di ritardo della mobilità elettroforetica	42

<u>3.6.1</u>	<u>Preparazione di estratti proteici totali da embrioni di <i>P. lividus</i></u>	<u>42</u>
<u>3.6.2</u>	<u>Preparazione delle sonde per il saggio EMSA</u>	<u>43</u>
<u>3.6.3</u>	<u>Reazione di marcatura terminale</u>	<u>44</u>
<u>3.6.4</u>	<u>Saggio di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA)</u>	<u>44</u>
3.7	Analisi dello stato cromatinico del gene <i>plauf</i>	45
<u>3.7.1</u>	<u>Estrazione di nuclei da embrioni di riccio di mare</u>	<u>45</u>
<u>3.7.2</u>	<u>Precipitazione immunocromatinica (ChIP)</u>	<u>46</u>
<u>3.7.3</u>	<u>Amplificazione mediante Real Time PCR</u>	<u>48</u>
3.8	Studi funzionali <i>in vivo</i>	49
<u>3.8.1</u>	<u>Preparazione di anticorpi policlonali contro PLAUF e parziale purificazione</u>	<u>49</u>
<u>3.8.2</u>	<u>Esperimento <i>in vivo</i> su embrioni di riccio di mare</u>	<u>50</u>
<u>3.8.3</u>	<u>Microiniezioni in uova di <i>P. lividus</i></u>	<u>50</u>
3.9	Studi funzionali <i>in vitro</i>	51
<u>3.9.1</u>	<u>Preparazione del costrutto ricombinante</u>	<u>51</u>
<u>3.9.2</u>	<u>Espressione di proteine di fusione ed estrazione proteica</u>	<u>52</u>
<u>3.9.3</u>	<u>Purificazione della proteina di fusione mediante colonna glutatione-sefariosio</u>	<u>53</u>
<u>3.9.4</u>	<u>Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)</u>	<u>54</u>
<u>3.9.5</u>	<u>Saggi di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio</u>	<u>54</u>
<u>3.9.6</u>	<u>Preparazione del trascritto marcato</u>	<u>55</u>
<u>3.9.7</u>	<u>Trascrizione <i>in vitro</i></u>	<u>56</u>
4	Risultati	58
4.1	Isolamento del promotore di <i>plauf</i>	59
4.2	Struttura del promotore	63
4.3	Caratterizzazione del promotore	66
4.4	Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)	79
4.5	Studi funzionali <i>in vitro</i>	83
4.6	Studi funzionali <i>in vivo</i>	88
5	Conclusioni e Discussione	95
6	Bibliografia	107

1. Introduzione

Il controllo dell'espressione genica è un processo fondamentale, che consente al genoma di tradursi in vita e che pertanto pervade tutta la biologia, dalla proliferazione cellulare al differenziamento. I sistemi viventi dipendono dalla dinamica dell'espressione genica per regolare la sopravvivenza cellulare, l'adattamento allo stress, l'omeostasi, il destino cellulare e il differenziamento, in risposta a segnali ambientali (Orphanides & Reinberg, 2002).

È un fatto ben riconosciuto che l'espressione genica è regolata a molti livelli (fig. 1.1)

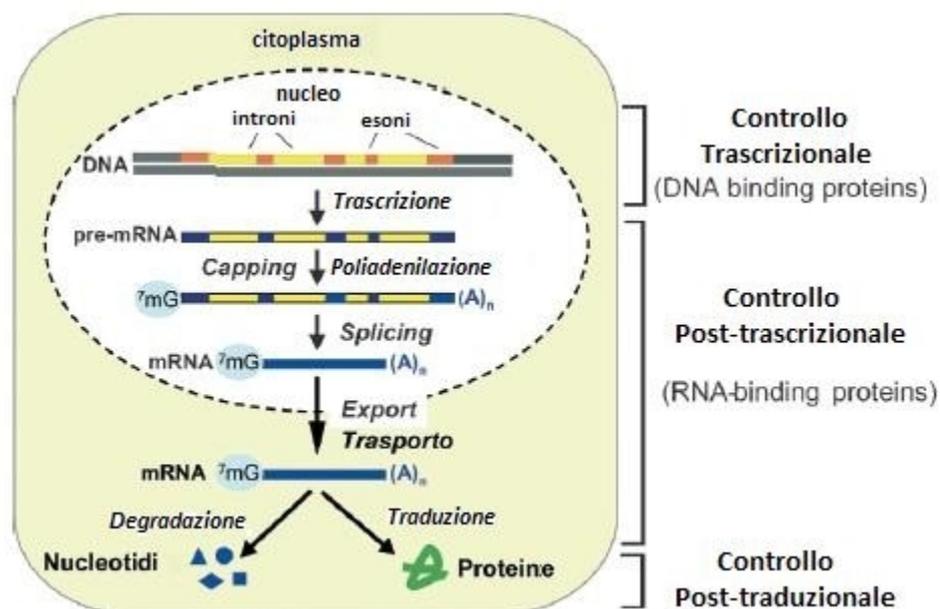


Figura 1.1: Rappresentazione schematica dei vari livelli di regolazione dell'espressione genica (da Halbeisen et al., 2008).

1.1 La regolazione post-trascrizionale

Fino ad oggi, gran parte della letteratura scientifica si è focalizzata sul complesso di eventi trascrizionali per spiegare la regolazione dell'espressione genica (Breedon, 2003).

Escludendo il livello post-traduzionale, la cosiddetta regolazione post-trascrizionale comprende diversi meccanismi che riguardano il trascritto, quali processamento, export, localizzazione, degradazione e traduzione. La scoperta recente dei micro-RNA ha rivitalizzato

in particolare lo studio della via di degradazione degli mRNA e della sua regolazione (Garneau et al., 2007). Studi recenti avanzano l'ipotesi che la regolazione post-trascrizionale possa superare in ricchezza e complessità la regolazione trascrizionale in molti, se non tutti, i processi fisiologici e negli stadi di sviluppo embrionale (Mata et al., 2005).

Studi su scala genomica hanno determinato il turnover degli mRNA in batteri (Selinger et al., 2003), lievito (Grigull et al., 2004), piante (Gutierrez et al., 2002) e uomo (Yang et al., 2003) tramite la misurazione dei livelli di mRNA a tempi diversi dopo inattivazione della RNA polimerasi II. Come per la trascrizione, i tempi della degradazione dei trascritti sembrano essere finemente regolati: l'emivita dei messaggeri è spesso correlata, fra elementi di un complesso macromolecolare comune o fra membri della stessa classe funzionale (Wang et al., 2002), che infatti sono definiti reguloni di degradazione. Per esempio, i trascritti codificanti per proteine metaboliche *core* hanno emivita lunga, mentre i trascritti codificanti fattori di trascrizione o membri del macchinario di biogenesi del ribosoma sono molto instabili (Wang et al., 2002).

Nelle cellule eucariotiche i trascritti poliadenilati possono essere degradati attraverso una via esonucleolitica o una via endonucleolitica (fig. 1.2). Due sono i meccanismi di degradazione esonucleolitica, ma entrambi iniziano con la deadenilazione, che è il punto chiave di controllo della stabilità degli mRNA. La coda di poli(A) viene rimossa da una deadenilasi (CCR4-NOT o PARN); in seguito, l'mRNA può essere sottoposto a rimozione del cap (*decapping*) seguito da degradazione 5'-3' oppure andare incontro a degradazione 3'-5' (fig. 1.2a). Nel primo caso, il complesso Lsm1-7 si associa all'estremità 3' del trascritto e induce la rimozione del cap da parte del complesso DCP1-DCP2. Questo rende l'mRNA suscettibile a degradazione 5'-3' ad opera della esonucleasi Xrn1. In alternativa, l'mRNA

deadenilato può essere degradato in direzione 3'-5' dal complesso dell'esosoma, e in tal caso il cap viene idrolizzato dall'enzima DcpS (Fasken & Corbett, 2005).

In *Saccharomyces cerevisiae* è stata descritta una via di degradazione deadenilazione-indipendente, che richiede il reclutamento del macchinario di rimozione del cap Rps28B, che interagisce con Edc3 (*Enhancer of decapping-3*) per legare l'enzima che rimuove il cap. In seguito, l'mRNA viene degradato da Xrn1 (fig. 1.2b).

La degradazione dell'mRNA mediata dall'endonucleasi, coinvolta ad esempio nel meccanismo della *RNA interference* (Tomari & Zamore, 2005), inizia con un taglio all'interno del trascritto, che genera due frammenti con estremità esposte alla degradazione. Tali frammenti vengono degradati da Xrn1 e dall'esosoma (fig. 1.2c).

Oltre a regolare il turnover degli mRNA, le cellule fanno uso anche di un meccanismo di "controllo della qualità", per far sì che i trascritti difettosi siano sicuramente distrutti (Fasken & Corbett, 2005). Al fine di evitare l'accumulo di proteine tronche, i trascritti

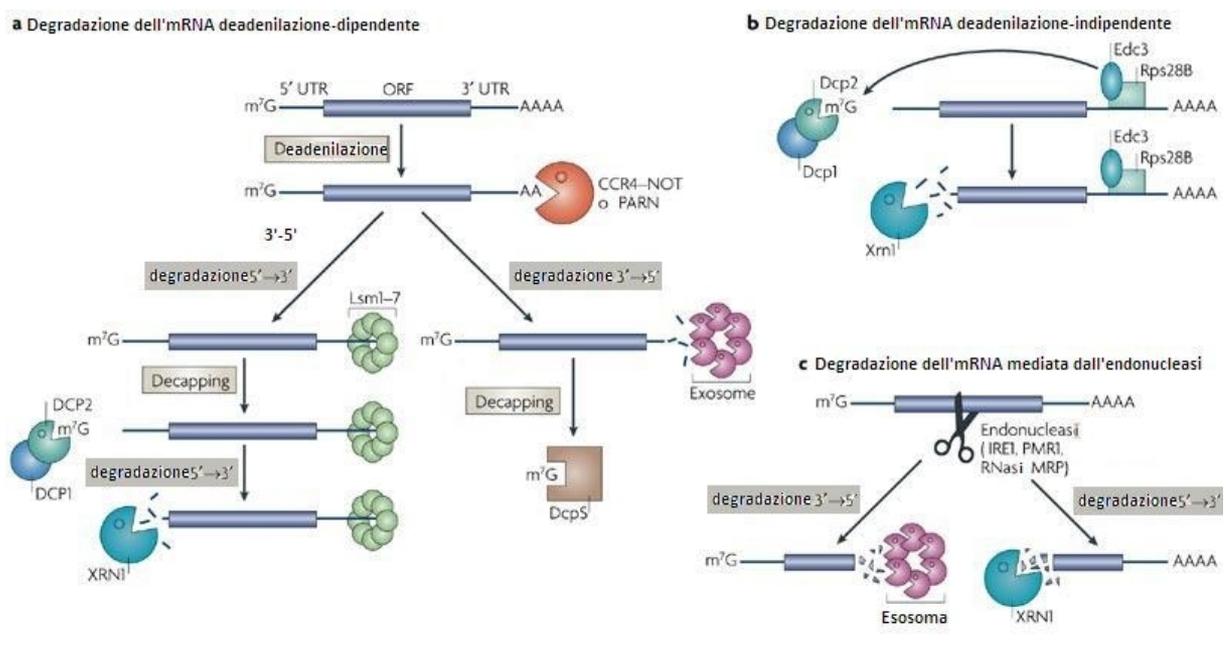


Figura 1.2: Meccanismi di degradazione degli mRNA poliadenilati (da Garneau et al., 2007).

contenenti codoni di stop prematuro sono degradati attraverso un processo denominato *nonsense-mediated decay* (NMD), che assicura la degradazione dei trascritti contenenti mutazioni nonsense per proteggere le cellule dalla presenza di proteine tronche potenzialmente pericolose per la cellula. Questi trascritti vengono privati del cap ma non deadenilati, e in seguito degradati a partire dall'estremità 5'. Un altro meccanismo assicura la degradazione di trascritti mancanti del codone di stop (*non-stop decay*). In questo caso, gli mRNA difettosi vengono reclutati dall'esosoma e degradati senza *decapping*. Questi meccanismi, che vanno sotto il nome di *mRNA surveillance*, sono tradizionalmente distinti dalle vie di controllo del turnover degli mRNA, sebbene vi siano molte sovrapposizioni e recenti evidenze suggeriscano che il NMD svolga anche ruoli regolativi.

È peraltro possibile che esista un vero e proprio network, formato da complessi di piccoli RNA e proteine, che determinano il destino dei messaggeri. Infatti, i meccanismi di controllo post-trascrizionale sopra citati sono mediati da *small interfering RNA* e *micro RNA*, che, insieme a complessi di proteine effettori, possono regolare la degradazione e la traduzione di trascritti target (Tomari & Zamore, 2005); oppure da varie *RNA-binding proteins* (RBP), che determinano il fato di trascritti contenenti segnali specifici e che sembrano regolare in maniera coordinata uno specifico sottoinsieme di mRNA (Keene & Lager, 2005).

1.2 Le sequenze ARE

Elevati livelli di degradazione dei trascritti sono stati messi in relazione con la presenza di elementi ricchi in adenosina e uridina (*AU-rich elements* o AREs) nelle 3'UTR dei trascritti (Raghavan et al., 2002). Sono stati descritti anche altri tipi di sequenze, ma nessuna di queste è affidabile nella predizione dei livelli di degradazione degli mRNA, suggerendo che il

controllo della degradazione possa coinvolgere il legame cooperativo di più RBP a siti differenti (Yang et al., 2003).

Tuttavia, le sequenze ARE non sono né sempre né esclusivamente associate a trascritti instabili (Puig et al., 2005). Nelle cellule di mammifero, comunque, tali sequenze sono state identificate per la loro capacità di destinare gli mRNA che le contengono ad una rapida degradazione. In generale, questi mRNA codificano proteine coinvolte nella regolazione della crescita cellulare o della risposta dell'organismo a stimoli esterni come micro-organismi, stimoli infiammatori e fattori ambientali. In cellule a riposo o non stimolate, il meccanismo di degradazione degli mRNA ARE-dipendente assicura un livello molto basso di espressione di tali importanti proteine. L'importanza di questa repressione nello stato di riposo è testimoniata dall'osservazione che stati patologici (cancro, infiammazioni croniche e patologie autoimmuni) sono associate a deregolazioni nella stabilità di trascritti contenenti elementi *AU-Rich* (Conne et al., 2000). Difatti, come ci si attende per proteine coinvolte nel controllo della stabilità di proto-oncogeni o citochine, i cambiamenti nei livelli di espressione di certe *ARE-binding proteins* sono stati implicati nello sviluppo del cancro (Audic & Hartley, 2004).

Inizialmente, le sequenze ARE furono identificate proprio nelle 3'UTR di mRNA codificanti alcune citochine e linfochine (Caput et al., 1986) ma, successivamente, si è allungata la lista degli mRNA che contengono tali motivi. È stato stimato che il 5-8% dei geni umani codifica per mRNA contenenti sequenze ARE, le cui proteine corrispondenti svolgono una grande varietà di funzioni (Bakheet et al., 2006).

Le sequenze ARE sono elementi costituiti da 50-150 nucleotidi ricchi in adenosina e uridina, localizzati nelle 3'UTR di trascritti degradati attraverso un meccanismo deadenilazione-dipendente (Chen & Shyu, 1995). Tuttavia, a seconda del contesto cellulare e

di stimoli precisi, la presenza di ARE può anche portare alla stabilizzazione dei trascritti. Ad ogni modo, per motivi storici, il termine ARE è legato a elementi che conferiscono instabilità e/o contengono motivi AUUUA. Di conseguenza, esistono elementi regolativi ricchi in adenosina e uridina che non vengono denominati ARE.

I primi elementi *AU-rich* identificati presentavano per l'appunto il pentamero AUUUA, spesso sovrapposto e frequentemente disperso in regioni ricche in uridina delle 3'UTR (Chen & Shyu, 1995). Da allora, innumerevoli studi hanno mostrato che il motivo AUUUA associato ad un tratto ricco in uridine sono due caratteristiche importanti di un ARE, ma anche che non possono spiegare a pieno la sua attività. La sequenza minima in seguito identificata per promuovere la degradazione di mRNA chimerici è il nonamero UUAUUUA(U/A)(U/A) (Zubiaga et al., 1995), ma l'inserzione di un singolo nonamero in un mRNA reporter produce solo un modesto effetto sulla sua stabilità. Mutagenesi sistematiche del motivo UUAUUUAUU in elementi ARE di GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor*) hanno confermato che due o quattro copie del nonamero sono più efficienti nella promozione della deadenilazione e dell'instabilità, rispetto ad una singola copia dello stesso motivo (Lai et al., 2005). Tuttavia, la mutagenesi del singolo UUAUUUAUU presente in *c-fos* non influenza significativamente la sua capacità di destabilizzare l'mRNA (Chen et al., 1994), suggerendo che il motivo UUAUUUA(U/A)(U/A) possa essere essenziale solo per un gruppo definito di ARE.

Attualmente, le ARE sono state raggruppate in tre classi, in base al numero e alla distribuzione dei pentameri AUUUA presenti (Chen & Shyu, 1995). La classe I contiene copie ripetute del motivo AUUUA disperse in regioni ricche in uridina. La classe II contiene almeno due nonameri UUAUUUA(U/A)(U/A) sovrapposti. Bakheet e collaboratori (2001) hanno costruito un database di mRNA contenenti ARE di classe II, e questi elementi regolativi sono

stati divisi in cinque gruppi. La classificazione in questo database (<http://rc.kfshrc.edu.sa/ared/>) è basata sulle modalità di ripetizione del pentamero AUUUA. La classe III è molto meno ben definita, e contiene regioni ricche in U ma nessun motivo pentamerico. L'esempio meglio documentato di ARE di tipo III è localizzato nella 3'UTR dell'mRNA per c-jun (Peng et al., 1996). La suddetta classificazione è schematizzata in tabella 1.1.

Tabella 1.1: Schema dell'attuale classificazione delle sequenze ARE (da Wilusz et al., 2001)

Gruppo	Motivo	Esempi
I	WAUUUAW and a U-rich region	c-fos, c-myc
IIA	AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA	GM-CSF, TNF- α
IIB	AUUUAUUUAUUUAUUUA	Interferon- α
IIC	WAUUUAUUUAUUUAW	cox-2, IL-2, VEGF
IID	WWAUUUUUUUAWW	FGF2
IIE	WWWWAUUUUAWWWW	u-PA receptor
III	U-rich, non-AUUUA	c-jun

È interessante notare che molti degli mRNA contenenti ARE di classe II codificano per citochine, mentre i fattori trascrizionali e le proteine regolative del ciclo cellulare sono codificati da messaggeri contenenti per lo più ARE di classe I e occasionalmente di classe III. Inoltre, l'inibizione con Actinomicina D o DRB stabilizza gli mRNA contenenti ARE di classe I o II (Chen et al., 1995) ma ha solo un modesto effetto sulla cinetica di degradazione degli mRNA con ARE di classe III (Peng et al., 1996). Pertanto, sebbene la classificazione non fosse inizialmente basata sulla funzione biologica, è possibile che le diverse classi raggruppino insieme di mRNA controllati da vie di degradazione simili o codificanti proteine con funzioni associate fra loro.

1.3 Le *ARE-Binding Proteins*

Come detto, la presenza di motivi ARE è spesso correlata con l'emivita dei trascritti stessi; tuttavia la loro sola presenza non è sufficiente a stabilire univocamente il loro comportamento. I fattori *in trans* che legano tali sequenze devono perciò essere responsabili del destino differenziale di questi trascritti in base al contesto cellulare ed ambientale (Raghavan et al., 2004).

Le *RNA-binding proteins* costituiscono il 3-11% del proteoma in batteri, archea ed eucarioti (Anantharaman et al., 2002). Il gran numero di RBP in tutti i regni della vita deve pertanto riflettere un'origine evolutiva antica della regolazione degli RNA.

Le RBP spesso contengono domini di legame all'RNA che interagiscono specificamente con sequenze o motivi strutturali presenti nell'RNA. Ad oggi è stato descritto un centinaio di domini proteici associati al metabolismo degli RNA, alcuni dei quali si presume abbiano avuto origine in fasi antiche dell'evoluzione, mentre altri, come il motivo RRM (*RNA Recognition Motif*) sono presenti esclusivamente in eucarioti e pertanto devono esser stati acquisiti in tempi più recenti (Anantharaman et al., 2002).

Un motivo molto conservato presente nelle proteine che legano l'RNA è il *K Homology Motif* (KH), identificato dapprima nella hnRNP K umana. Il motivo è costituito da 60 residui circa, in maggioranza idrofobici. Una proteina può arrivare a possedere fino a quindici motivi KH, tutti in grado di legare RNA a singolo filamento, e ciò fa ipotizzare un andamento cooperativo dell'interazione.

Altro motivo di legame ad acidi nucleici è lo *Zinc finger domain*, che può presentarsi in più modalità. Il motivo classico CCHH è stato ritrovato principalmente in *DNA-binding proteins*, mentre il motivo CCCH è presente in *RNA-binding proteins*. Un esempio di queste proteine è rappresentato da Tis11d (Carrick et al., 2004). Il motivo è formato da circa 70

residui la cui sequenza è caratterizzata da tre cisteine ed una istidina che coordinano uno ione zinco e formano, in generale, una sequenza CXCXCXH. Diversi motivi CCCH riconoscono e si legano specificamente a sequenze UAUU che si trovano nelle AREs di vari trascritti, come quelli per codificanti per TNF- α e per GM-CSF.

Il motivo RRM (fig. 1.3) è costituito da 90-100 aminoacidi ed è composto da due corte sequenze RNP1 (KGFGFVXF) e RNP2 (LFVGNL) separate da aminoacidi idrofobici. La struttura tridimensionale del motivo è costituita da quattro foglietti β e due α -eliche orientate perpendicolarmente, in cui i residui degli amminoacidi delle sequenze consenso sporgono alternativamente all'esterno del motivo o nella cavità interna. I residui carichi si trovano così orientati verso l'ambiente circostante in una posizione ideale per interagire con l'RNA tramite legami a idrogeno, mentre i residui idrofobici sono posizionati nella parte interna del dominio e interagiscono con i residui idrofobici delle α -eliche mantenendo la struttura tridimensionale del dominio (Burd & Dreyfuss, 1994).

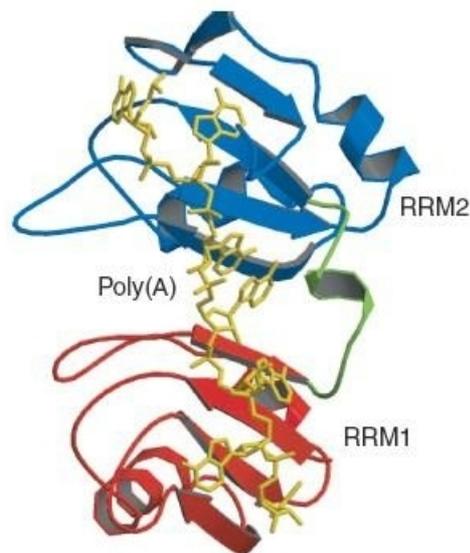


Figura 1.3: Struttura dei motivi RRM1 e 2 della PABP umana, in associazione con una coda di poli(A) (da Mangus et al., 2003).

Tale motivo di legame all'RNA è quello meglio conosciuto e caratterizzato, ed è ritrovato nella maggior parte delle proteine leganti elementi ARE. Almeno 17 differenti proteine leganti elementi *AU-rich* sono state identificate in estratti cellulari tramite *UV-crosslinking* e saggi di ritardo della mobilità elettroforetica (tab. 1.2 e fig. 1.4).

Molte di queste *AU-Binding Proteins* (AUBPs) sono omologhi in mammifero delle proteine ELAV (*Embryonic Lethal Abnormal Vision*), che appartengono ad un gruppo di *RNA-Binding Proteins* dapprima descritte in *Drosophila* e che si è scoperto essere importanti per il differenziamento neurale (Ma et al., 1996). Nell'uomo sono conosciuti quattro membri della famiglia *ELAV-like*: HuA (chiamata anche HuR), HuB (Hel-N1), HuC, and HuD (Good et al., 2000). A parte HuR, che è espressa ubiquitariamente, le altre sono proteine espresse in neuroni terminalmente differenziati (Ma et al., 1996).

Tabella 1.2: Elenco di *AU-binding proteins* e loro modalità di azione (da Bevilacqua et al., 2003)

Proteina	Nucleo/Citoplasma	Ruolo nella regolazione degli mRNA	Interazione/Regolazione
AUF1/HnRNP D (4 isoforme)	p42, p45 nucleare, p37, p40 citoplasmatica	Destabilizzante, stabilizzante	Hsp70
HuR/HuA	Nucleare	Stabilizzante	p38, SETa, SETb, pp32, and APRIL, AMP
HuD, Hel-N1 /HuB, HuC	Nucleare	Stabilizzante	?
TTP	Nucleare, citoplasmatica	Destabilizzante	P38, p42, MAPK- 2
KSRP	Nucleare, citoplasmatica	Destabilizzante	?
Hsp70	Citoplasmatica	Destabilizzante	Stress
TIA-1, TIAR	Nucleare, citoplasmatica	Destabilizzante, traduzione	?
AUH	Citoplasmatica	Attività enzimatica ?	?
hnRNPA1	Nucleare	Destabilizzante	?
hnRNPC	Nucleare	Destabilizzante	?
GAPDH	Nucleare, citoplasmatica	Attività enzimatica ?	?
AUBF	Citoplasmatica	?	?
AU-A, AU-B, AU-C	AU-A nucleare, AU-B, AU-C citoplasmatiche	Destabilizzante	?

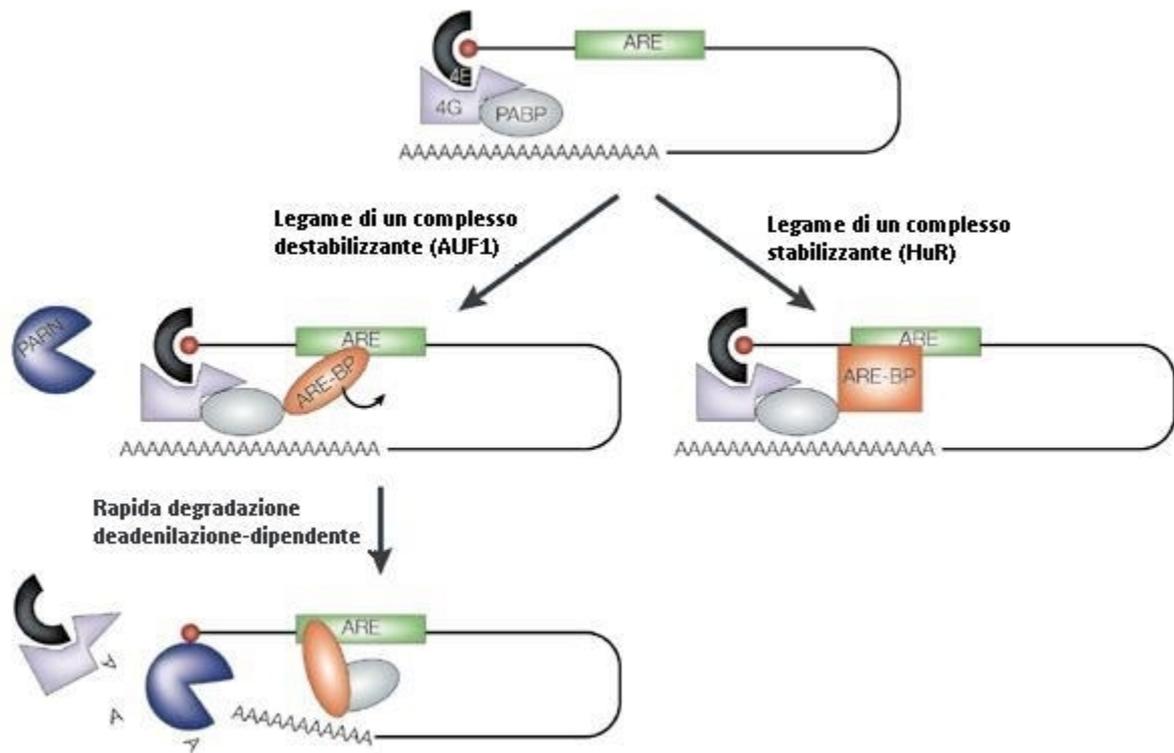


Figura 1.4: Influenza delle proteine AUF1 e HuR sulla deadenilazione (da Wilusz et al., 2001).

HuR, una delle RBP più studiate, è nota per la sua capacità di legare e stabilizzare differenti mRNA contenenti elementi *AU-Rich* in diversi sistemi cellulari (Peng et al., 1998). HuR è prevalentemente nucleare ma è in grado di agire da *shuttle* fra nucleo e citoplasma (Keene, 1999).

Un'altra ben caratterizzata AUBP, AUF1 (*AU-rich binding Factor 1*)/hnRNPD (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein D*) (Zhang et al., 1993), contiene due domini RRM ed è costituita da quattro proteine isomeriche di 37, 40, 42 e 45 kDa, che differiscono fra loro sia nel dominio terminale che nella specifica attività di legame agli mRNA (Wagner et al., 1998). AUF1 lega e destabilizza trascritti contenenti ARE, come quelli per c-myc, GM-CSF, and altri (Chen & Shyu, 1995) ma può di contro stabilizzare mRNA specifici durante lo shock da calore (Laroia et al., 1999).

Anche AUF1, come HuR, è essenzialmente nucleare (Lal et al., 2004), ma può transitare nel comparto citoplasmatico (Lu & Schneider, 2003). Questa proteina si lega alle ARE di classe I e II, mentre non è riportato alcun caso di legame di una AUF1 ad ARE di classe III.

La correlazione fra il legame di una proteina AUF1 e il decremento della stabilità degli mRNA è stata dimostrata sia tramite overespressione (Sarkar et al., 2003) o *RNA interference* di AUF1 in cellule (Lal et al., 2004), sia tramite modulazione del contenuto in AUF1 in estratti citoplasmatici (Brewer, 1991). In uno studio più recente (Raineri et al., 2004) l'incremento della stabilità del trascritto per IL-3 ottenuto per *RNA interference* di AUF1 ha portato ad un aumento nell'espressione della proteina codificata. Questo risultato è coerente con l'ipotesi che la proteina AUF1 destini il trascritto alla degradazione e conseguentemente diminuisca l'espressione della proteina corrispondente.

C'è da dire che le AUBP non necessariamente degradano o stabilizzano gli mRNA direttamente, ma spesso svolgono la loro funzione attraverso complesse interazioni proteina-proteina. Per esempio, le stesse AUF1 sono note per interagire con diverse altre proteine, inclusi l'enzima di coniugazione dell'ubiquitina E2I e tre RBP: NSEP-1 (*Nuclease Sensitive Element binding Protein 1*), NSAP-1 (*NS-1 Associated Protein*), e IMP-2 (*IGF-II mRNA binding protein 2*). Fra queste, la proteina NSEP-1 esibisce attività degradativa degli mRNA *in vitro* (Moraes et al., 2003). Infine, le AUBP possono regolare la degradazione attraverso interazioni con l'esosoma, un complesso multiproteico che possiede attività esonucleasica 3'-5' (Chen et al., 2001). L'esosoma è una struttura molto conservata lungo la scala evolutiva e gioca un ruolo chiave nel turnover degli RNA (Mukherjee et al., 2002). Studi condotti usando sistemi *in vitro* hanno mostrato che la degradazione degli mRNA contenenti ARE richiede l'intervento di tale complesso proteico (Butler, 2002). Mukherjee e collaboratori

(2002) suggeriscono che alcune subunità dell'esosoma umano leghino specificamente le ARE, causando una degradazione ARE-dipendente degli mRNA. Altri studi hanno mostrato che altre AUBP, ad esempio TTP e KSRP, sono fisicamente associate *in vitro* all'esosoma e sono richieste affinché l'esosoma possa degradare preferenzialmente mRNA contenenti ARE (Chen et al., 2001; Gherzi et al., 2004).

L'abbondanza relativa di questi altri fattori proteici, quali KSRP, BRF1, TTP e le già citate HuR, può determinare tanto l'identità degli mRNA target quanto il loro destino citoplasmatico (Barreau et al., 2005).

1.4 La famiglia di proteine AUF1

Un interessante studio (Lal et al., 2004) ha mostrato che le HuR e le AUF1 possono peraltro agire in concerto legando simultaneamente diversi mRNA, quantomeno nel nucleo; successivamente, studi recenti, condotti integrando tecniche di immunocitochimica e immunofluorescenza, hanno portato evidenze a favore di un'interazione funzionale di questi due fattori sia nel nucleo che nel citoplasma (David et al., 2007).

Uno studio sull'espressione tessuto-specifica di molte AUBP nei topi ha mostrato che sono riscontrabili alti livelli di espressione di AUF1 e HuR nello stesso tessuto (Lu & Schneider, 2004). Alcuni mRNA contenenti ARE, come quelli per c-fos, GM-CSF, l'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p21, IL-3 e la ciclina D1, vengono destabilizzati in presenza di AUF1 e stabilizzati in presenza di HuR. Di conseguenza, è possibile che le concentrazioni citoplasmatiche relative di *ARE-Binding Proteins* funzionalmente antagoniste definiscano la stabilità di un dato messaggero.

Lal e collaboratori (2004) hanno direttamente investigato se può esistere un'interazione funzionale fra AUF1 e HuR. Tramite un'analisi per micro-array, hanno

dimostrato che queste due proteine possono coesistere sullo stesso trascritto quando questo è localizzato nel nucleo. Tuttavia, questa associazione non è riscontrabile quando l'mRNA viene esportato nel citoplasma. HuR è trovato in associazione con mRNA in polisomi, invece AUF1 solo nelle frazioni prive di polisomi. Studi sui trascritti per la ciclina D1 e p21 hanno dimostrato che il sito di legame di ciascuna proteina all'mRNA è distinto e non sovrapposto, il che rende possibile l'interazione simultanea delle due proteine con lo stesso trascritto. Ad ogni modo, il silenziamento di una delle due RBP provoca un incremento dell'associazione dell'altra proteina all'mRNA target. Del resto questo non sorprende, perché è noto che, oltre a legare le specifiche sequenze ARE, le AUBP riconoscono anche sequenze contigue (Winzen et al., 2004). Pertanto, la cinetica di degradazione di un mRNA può essere determinata, almeno in parte o per certi mRNA, da un equilibrio o bilanciamento tra fattori stabilizzanti e destabilizzanti nella cellula. Tale bilanciamento sarà modulato da stimoli fisiologici che potrebbero, ad esempio, influenzare la distribuzione nucleare/citoplasmatica dei fattori (Lal et al., 2004).

In accordo con questi risultati, è stato dimostrato che due AUBP, AUF1 e ElrA, legano la 3'UTR della ciclina B2 in embrioni di *Xenopus laevis* (Guo et al., 2008). ElrA è l'omologo di HuR di *Xenopus* e lega il trascritto per la ciclina B2, sia prima che dopo la transizione di *midblastula*, quando l'mRNA per la ciclina B2 viene deadenilato e destabilizzato. Come già dimostrato per HuR e AUF1 in modelli cellulari tramite FRET *in vivo* (David et al., 2007), anche ElrA e AUF1 possiedono siti di legame sovrapposti e competono l'un l'altra. Nonostante ciò, rimangono da chiarire i meccanismi d'azione, in quanto l'overespressione di AUF1 non influisce sulla degradazione del trascritto per la ciclina B2. Inoltre, anche il livello proteico della ciclina B2 non viene alterato, escludendo un ruolo di AUF1 nella traduzione.

È infatti noto che, in molti casi, la *ARE-Binding Proteins* possono non solo influenzare l'emivita dei trascritti, ma anche la traduzione degli stessi. Tale effetto inibitorio sulla traduzione potrebbe essere mediato da due meccanismi. Negli oociti e negli embrioni a stadi iniziali di sviluppo è stata stabilita una correlazione diretta tra lo stato di adenilazione di un mRNA e la sua presenza in polisomi; mRNA poliadenilati sono tradotti più efficientemente (Paillard & Osborne, 2003). Il reclutamento cap-dipendente dei ribosomi è mediato dal complesso di inizio traduzionale eIF4F, composto da diverse proteine, fra cui eIF4E and eIF4G. La struttura del cap (m⁷GpppX), presente all'estremità 5' degli mRNA eucariotici, è riconosciuta da eIF4E. eIF4G agisce da impalcatura, legando sia eIF4E all'estremità 5' dell'mRNA che la *poly(A)-binding protein1* (PABP1) associata alla coda di poli(A) al 3' (Gingras et al., 1999). L'associazione fra eIF4E/eIF4G e il cap al 5' è stabilizzata quando eIF4G è legato anche a PABP1 (Kahvejian et al., 2005). Pertanto, l'inibizione ARE-dipendente della traduzione potrebbe essere dovuta alla deadenilazione dell'mRNA target, che provoca una perdita di PABP1 e, di conseguenza, alla destabilizzazione dell'interazione eIF4E-cap. Una variante di questo modello vedrebbe la AUBP legarsi a eIF4E, inibendo in maniera competitiva il legame fra eIF4E e eIF4G (Barreau et al., 2005). Sebbene ad oggi non siano state riportate interazioni dirette fra ARE-BP e eIF4E, è interessante il fatto che AUF1 entri a far parte di complessi multimerici contenenti eIF4G (Laroia et al., 1999).

Un meccanismo alternativo chiama in gioco gli *stress granules*. Questi contengono mRNA non tradotti e sono associati con molte AUBP. Ciò suggerisce una via di arresto traduzionale in cui le AUBP possano condurre gli mRNA agli stessi *stress granules* (Barreau et al., 2005).

La proteina AUF1 è stata implicata anche in altri meccanismi regolativi. Per esempio, è stato dimostrato che p40 interagisce con la *TATA-binding protein* e può attivare l'espressione di un gene reporter in modelli cellulari (Tolnay et al., 2000).

L'isoforma p42, invece, lega le sequenze telomeriche a singolo filamento, interagisce con la telomerasi ed è coinvolta nella regolazione della lunghezza dei telomeri (Enokizono et al., 2005).

Dobi e collaboratori (2006) hanno dimostrato che AUF1 è anche in grado di legare regioni ricche in AT di DNA a doppio filamento con alta specificità, agendo da regolatore trascrizionale. Nello stesso studio è stata riscontrata una elevata espressione di AUF1 nella corteccia embrionale, suggerendo che la proteina AUF1 possa essere coinvolta nella regolazione della corticogenesi. Più recentemente (Lee et al., 2008), è stato dimostrato che AUF1, HDAC1 (*Histone DeAcetylase 1*) e MTA2 (*MeTastasis Associated protein 2*) sono coespressi e interagiscono in cervelli di ratto. Inoltre, utilizzando cellule embrionali in coltura, è stato chiarito l'effetto di AUF1 sull'acetilazione degli istoni neuronali, mediato dal reclutamento di fattori di rimodellamento della cromatina su regioni di DNA ricche in AT (Lee et al., 2008).

In che modo la proteina AUF1 legghi l'elemento *AT-rich* di DNA a doppio filamento non è ancora noto. A parte AUF1, di tutte le hnRNP solo E2BP (Tay et al., 1992), la ERE-BP (*Estrogen Response Element-Binding Protein*) (Chen et al., 1998) e CBF-A (*CArG Binding Factor A*) (Shinji & Takeshi, 1992) sono noti legare DNA a doppio filamento; è interessante notare che tutte queste proteine mostrano alta identità con AUF1 e si ritiene che svolgano ruoli regolativi nell'espressione genica.

Le modalità con cui le AUF1 influenzano l'espressione di geni in sistemi cellulari sono pertanto varie e diverse, e talvolta non del tutto chiarite. Sarkar e collaboratori (2008), ad

esempio, hanno dimostrato, tramite *knock-out* di p40_{AUF1}, che questa gioca un ruolo critico nell'espressione della citochina IL10. Tuttavia, sorprendentemente, l'overespressione di p40_{AUF1} non ha alcun effetto sulla stabilità del messaggero per IL10, lasciando aperta la questione sul suo meccanismo di azione.

Uno studio recente (Palanisamy et al., 2008) ha fornito le prime evidenze della presenza di proteine AUF1 e HuR nella saliva umana e della loro influenza sull'emivita degli mRNA contenenti ARE, che nella saliva umana sono stimati ammontare a circa il 30% del totale.

1.5 Il ruolo degli istoni

I geni istonici possono essere divisi in due grosse famiglie sulla base del loro profilo di espressione in relazione al ciclo cellulare. Il gruppo principale è quello dei geni espressi in corrispondenza della fase S del ciclo cellulare, ossia quando avviene la sintesi del DNA, che sono definiti *cell-cycle dependent*. Esiste poi una seconda classe minoritaria di varianti geniche espressa durante tutto il ciclo cellulare ad un livello definito "basale", la cui espressione è quindi indipendente dalla duplicazione; in questo caso si parla di geni *cell-cycle independent*. Le varianti *cell-cycle independent* recentemente stanno acquistando grande importanza nell'ambito della regolazione genica.

Le differenze fra gli istoni canonici o replicativi e le rispettive varianti *cell-cycle independent* sono tanto funzionali quanto strutturali. I geni che codificano per le varianti replicative sono privi di introni, hanno corte 5' e 3'UTR e danno vita agli unici mRNA non poliadenilati conosciuti in eucarioti (Marzluff, 2005). Al posto della coda di poli(A), essi presentano una struttura *stem-loop* al 3' che è cruciale per la loro regolazione ed è formata da un taglio endonucleolitico del pre-mRNA. Le varianti *cell-cycle independent*, invece, sono

codificate da geni contenenti introni e presentano il relativo mRNA con una lunga 3'UTR poliadenilata (tab. 1.3).

Tra queste varianti, H3.3 è stata estesamente studiata e identificata come sequenza genomica e/o di cDNA in diversi organismi quali Insetti (Akhmanova et al., 1995), Echinodermi (Fucci et al., 1994), Piante (Chaubet et al., 1992), Uccelli (Engel et al., 1982) e Mammiferi (Hraba-Renevey & Kress, 1989; Albig et al., 1995).

Tabella 1.3: Schema delle varianti istoniche “replicazione-dipendenti” e “replicazione-indipendenti”.

GENE ISTONICO	REPLICAZIONE -DIPENDENTE	REPLICAZIONE- INDIPENDENTE
Dipendenza dalla duplicazione del DNA	+	-
Presenza di introni nel gene	-	+
Presenza del tratto di poli(A) nella regione 3'UTR dei trascritti	-	+
Presenza della struttura stem-loop al 3' degli mRNA	+	-
Lunga regione 3'UTR	-	+
Numero di copie genomiche	>50	1-2
Presenza del motivo S../.A.IG nella proteina *	-	+

* valido solo per l'istone H3

1.6 La variante istonica H3.3

La variante H3.3 è difficilmente rilevabile per via sperimentale tramite l'utilizzo di anticorpi, in quanto differisce dall'istone H3 canonico per pochi amminoacidi. In particolare, è presente un residuo di serina in posizione 31 al posto della alanina e i residui alanina, isoleucina e glicina nelle posizioni 87, 89 e 90 (motivo S../.A.IG) sostituiscono le classiche serina, valina e metionina della sequenza consenso della variante replicativa. Altre varianti di H3 presentano ulteriori differenze nelle posizioni 24, 71, 96, 98 e 111 (fig. 1.5).



Figura 1.5: Allineamento di sequenze delle principali varianti istoniche H3 di Mammifero. La percentuale di omologia è mostrata sulla destra (da Loyola & Almouzni, 2007).

Tramite l'utilizzo di una tecnica che prevede l'incorporazione di biotina *in vivo* (de Boer et al., 2003) l'istone H3.3 è stato distinto da H3 dopo induzione dell'espressione in cellule S2 di *Drosophila* (Mito et al., 2005). Ne è risultato che la deposizione dell'istone H3.3 varia da gene a gene, mentre H3 rimane costante, e che H3.3 è maggiormente presente in geni in attiva trascrizione ed è correlato con un aumento dell'attività della RNA pol II. Il livello della deposizione della variante H3.3 rappresenta un indicatore sensibile del livello di attivazione trascrizionale (Hawkins & Ren, 2006).

L'istone H3 può anche essere sostituito dalla sua variante H3.3. Infatti, tramite l'utilizzo di proteine di fusione con GFP, è stato dimostrato che tale variante può essere incorporata in qualunque fase del ciclo cellulare secondo una modalità replicazione-indipendente (Ahmad & Henikoff, 2002).

In cellule umane, i complessi nucleari isolati contenenti gli istoni H3.1 (la variante replicativa canonica) e H3.3 mostrano una distinta composizione proteica e una differente attività di assemblaggio della cromatina. Lo chaperone istonico CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor-1*) è stato trovato esclusivamente in complessi contenenti H3.1, mentre HIRA (*Histone Regulation A*) è associato solo con H3.3 (Tagami et al., 2004). Questi due chaperoni supportano rispettivamente modalità di assemblaggio della cromatina replicazione-dipendente e replicazione-indipendente. Anche quando è espresso costitutivamente, H3.1

rimane legato specificamente a CAF-1 e viene incorporato solo tramite il meccanismo replicazione-dipendente (Tagami et al., 2004).

Studi recenti hanno mostrato che esistono differenze nelle modificazioni post-traduzionali degli istoni H3, in particolar modo in relazione alla metilazione (Garcia et al., 2007). L'ipotesi del "codice istonico" propone che modificazioni post-traduzionali specifiche e/o combinazioni di tali modificazioni possano regolare l'espressione genica attraverso due possibili meccanismi: cambiando la struttura cromatinica in uno stato trascrizionale "attivato" o "represso", oppure agendo come un sito di riconoscimento per regolatori trascrizionali che si associano alla cromatina (Jenuwein & Allis, 2001).

Una caratterizzazione estensiva delle modificazioni post-traduzionali delle varianti istoniche H3 ha mostrato che H3.1, H3.2 e H3.3 hanno pattern di modifica differenti. È stato dimostrato un arricchimento di acetilazione nella variante istonica H3.3 rispetto alla variante replicativa H3.1 (Waterborg, 1990). Analisi successive in altre specie, fra cui *Drosophila* (McKittrick et al., 2004), *Arabidopsis* (Johnson et al., 2004) e mammiferi (Hake et al., 2006) hanno confermato questi risultati. Negli stessi studi è stato dimostrato che la variante H3.3 è più ricca di modifiche generalmente considerate rappresentative di uno stato di attivazione trascrizionale, come metilazione in K4 e K36 e acetilazione in K9, K18 e K23. Queste osservazioni hanno portato Hake e Allis (2006) a proporre l'ipotesi del cosiddetto "*H3 barcode*", secondo cui l'istone H3 potrebbe agire come una vera e propria "firma" per creare regioni cromosomali differenti.

Diversamente dalla variante replicativa H3.1, la variante H3.3 non possiede la caratteristica struttura *stem-loop*, ma una lunga 3'UTR poliadenilata, che potrebbe essere implicata nella stabilità del trascritto.

1.7 La proteina PLAUF

Fucci e collaboratori (1994) hanno isolato da una *library* di espressione il cDNA per la variante istonica H3.3 di riccio di mare *Paracentrotus lividus*. Tale variante è sintetizzata in modo indipendente dal ciclo cellulare, è richiesta proprio a partire dalle prime fasi di sviluppo embrionale e si accumula nelle fasi tardive (Fucci et al., 1994). Il trascritto per questa variante istonica è caratterizzato da una lunga 3'UTR con motivi AUUUA e AUUUG separati da tratti ricchi in U, che possono essere considerati motivi ARE non canonici.

È stato studiato quindi il *turnover* di questo trascritto in un sistema *in vitro* ed è stato dimostrato che la 3'UTR svolge un ruolo importante nella determinazione dell'emivita dell'mRNA. Infatti, la delezione della 3'UTR nell'mRNA per l'istone H3.3 aumenta la stabilità della molecola e la fusione della stessa 3'UTR con il trascritto per la β globina di coniglio ne provoca destabilizzazione (Pulcrano et al., 2007).

In estratti da embrioni di *P. lividus* a vari stadi di sviluppo sono presenti proteine capaci di legare tale 3'UTR. La figura 1.6 mostra due proteine, di 21 kDa e 45 kDa rispettivamente, presenti già in embrioni allo stadio di 4 blastomeri; è inoltre presente una proteina di circa 32 kDa, sintetizzata in piccole quantità già allo stadio di blastula e in maggiori quantità allo stadio di gastrula. Si potrebbe quindi ipotizzare un coinvolgimento di tali proteine nella regolazione dell'emivita del trascritto che presenta motivi ARE nella sua 3'UTR.

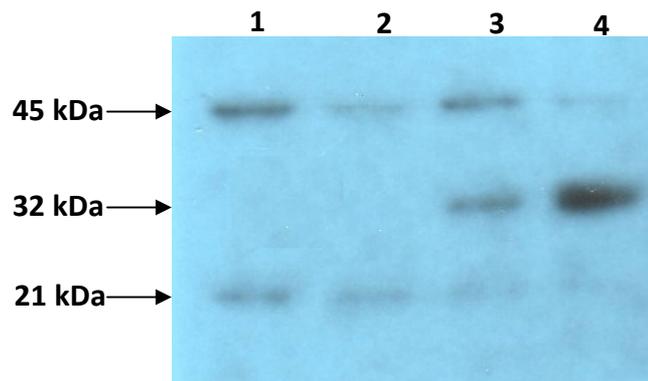


Figura 1.6: Autoradiografia di un esperimento di *Northwestern* su proteine presenti in estratti totali di embrioni di riccio di mare *P. lividus* a vari stadi di sviluppo. L'RNA marcato, utilizzato negli esperimenti di legame, è rappresentato dal trascritto corrispondente alla 3'UTR dell'mRNA per l'istone H3.3. Estratti proteici totali da embrioni allo stadio di: 4 blastomeri (corsia 1), morula (corsia 2), blastula (corsia 3), gastrula (corsia 4).

Per identificare le proteine capaci di legare la 3'UTR dell'istone H3.3, che potessero essere coinvolte nella regolazione dell'emivita del trascritto, è stata eseguita un'analisi di una *library* fagica di espressione contenenti cDNA di embrioni di *P. lividus*, attraverso la metodica di Sagesser (Sagesser et al., 1997). La sonda utilizzata è rappresentata dalla 3'UTR dell'mRNA per l'istone H3.3. Questa metodica ha portato all'isolamento di un clone, il cui inserto è risultato lungo 1253 bp e contenente una breve 5'UTR, una regione codificante per una proteina di 361 amminoacidi e una corta 3'UTR che termina con una coda di poli(A).

Dall'allineamento effettuato con le sequenze presenti in banca dati attraverso il programma Blast, la proteina di interesse di *P. lividus* ha mostrato il 66% di similarità con le proteine della famiglia AUF1 di uomo e di ratto nelle regioni RRM. Quindi la proteina è stata chiamata PLAUF (*P. lividus* AUF). Sulla base di tale similarità si poteva ritenere che PLAUF fosse implicata nel turnover del trascritto per l'istone H3.3.

PLAUF è caratterizzata da due motivi RRM, da un dominio ricco in glutammine, da una RGG-box e un tratto ricco in glicine, che potrebbe sostituire funzionalmente la regione ricca in alanina della AUF1 (Pulcrano et al., 2005) (fig. 1.7).

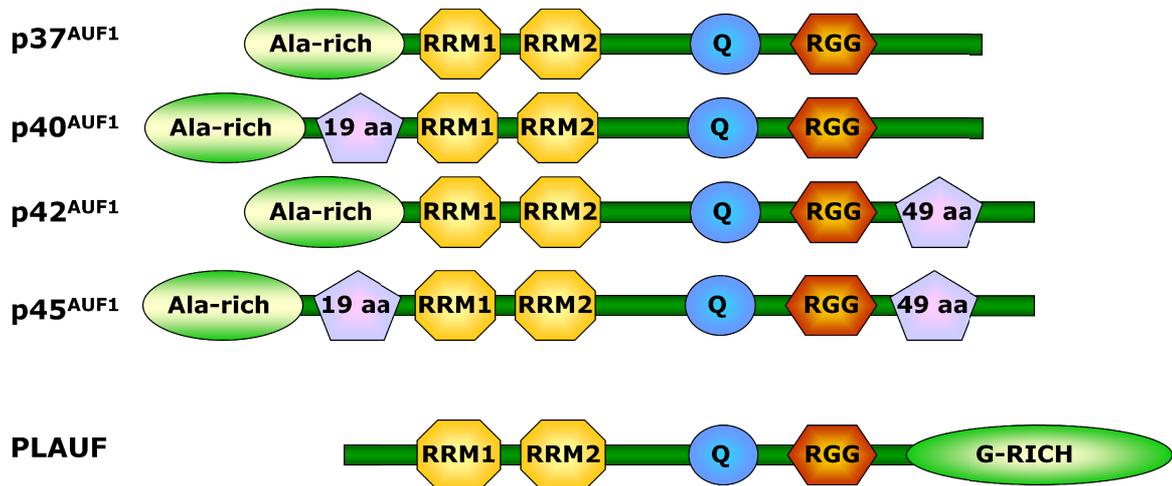


Figura 1.7: Confronto fra le strutture schematiche della quattro isoforme di AUF1 umane e PLAUF

L'espressione del gene *plauf* aumenta gradualmente durante i primi stadi di sviluppo del riccio di mare, raggiungendo il plateau a blastula, con andamento simile al trascritto per l'istone H3.3.

Per verificare la capacità di PLAUF di legare la 3'UTR di H3.3, si è saggiato in esperimenti di REMSA (*RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay*) il lisato totale proteico del fago che contiene l'inserito *PLAUF1* dopo induzione dell'espressione genica; come sonda è stata utilizzato un frammento di circa 200 nucleotidi (PCR1) della 3'UTR del trascritto per H3.3.

Come è evidente dalla figura 1.8, quando il lisato totale proteico interagisce con la sonda risulta evidente una banda a mobilità ritardata (corsia 2). L'aggiunta del competitore specifico in eccesso molare 100x impedisce il legame della proteina alla sonda (corsia 5), a differenza dell'aggiunta di un competitore aspecifico (corsia 8); tali risultati suggeriscono che

il legame è specifico. Un esperimento analogo condotto incubando la sonda con PLAUF espressa come proteina di fusione con GST ha in seguito confermato tali risultati.

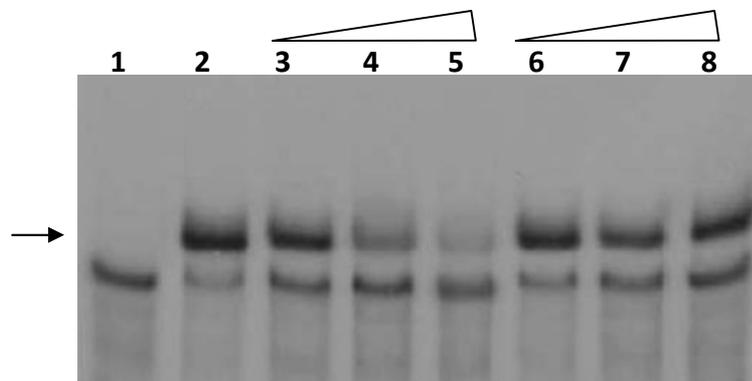


Figura 1.8: Autoradiografia di un saggio REMSA utilizzando il lisato proteico di fagi indotti e come sonda la 3'UTR del trascritto istonico H3.3. Corsia 1: trascritto incubato in assenza di proteine; corsia 2: trascritto in presenza di 20 μg di lisato proteico; corsie 3-5: competizione con il trascritto H3.3 non marcato in eccesso molare 10x, 50x e 100x; corsie 6-8: competizione con trascritto aspecifico in eccesso molare 10x, 50x e 100x.

La proteina PLAUF è codificata da almeno tre diversi trascritti (da 1,4 kb, 1,8 kb e 2,6 kb), che si differenziano per la lunghezza della 3'UTR e sono soggetti a *splicing* alternativo (Pulcrano et al., 2005).

È stato quindi analizzato il gene per PLAUF, attraverso lo *screening* di una *library* genomica. Il gene è risultato diviso in 10 esoni e 9 introni (fig. 1.9).

Il clone genomico isolato, tuttavia, è risultato mancante del primo esone all'estremità 5', che è stato ottenuto per PCR su DNA genomico, nonché di tutta la regione regolatrice a monte.

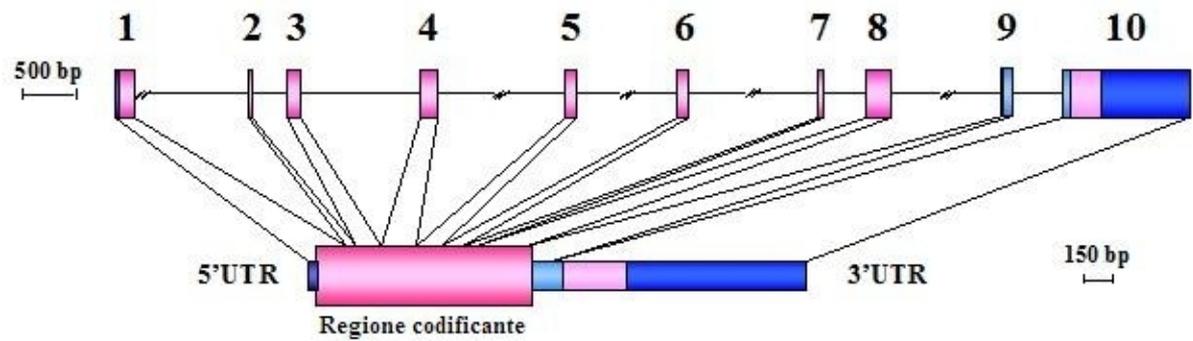


Figura 1.9: Rappresentazione schematica del gene e dell'mRNA per PLAUF.

Anche il gene per le AUF1 umane è organizzato in 10 esoni e 9 introni (Wagner et al., 1998). Per gli esoni 1, 4, 5 e 6 la lunghezza e la posizione in *plauf* è esattamente conservata rispetto alle AUF1, se ci si riferisce alla sequenza amminoacidica codificata. Invece gli esoni 2 e 3 di *plauf* costituiscono un unico esone nel caso delle AUF1, mentre la fine della regione codificante delle AUF1 umane deriva da 3 esoni invece che da due. Nel gene umano gli esoni 2, 7 e 9 possono essere eliminati mediante lo *splicing* alternativo, mentre invece in *P. lividus* solo l'esone 9 che contiene il codone di stop può essere soggetto a *splicing* alternativo.

2. Scopo del lavoro

Una volta identificata la proteina PLAUF, è stato necessario correlare tale proteina ai dati ottenuti con gli estratti proteici da embrioni di *P. lividus* e quindi alla proteina da circa 32 kDa identificata negli esperimenti di *Northwestern* (fig. 1.8). Dopo preparazione di anticorpi anti-PLAUF, sono stati effettuati esperimenti di *Western blotting*, che hanno permesso l'identificazione di una proteina di circa 32 kDa presente nell'estratto proteico da embrioni di riccio di mare allo stadio di gastrula.

Inoltre, in esperimenti di *Supershift*, gli anticorpi anti-PLAUF hanno identificato la proteina nel complesso di legame *in vitro* al trascritto per l'istone H3.3 (fig. 2.1). Infatti, gli anticorpi anti-PLAUF sono capaci di ritardare ulteriormente uno dei complessi a mobilità ritardata (corsie 3 e 4), a differenza del siero non immune (corsia 5). Questi risultati suggeriscono che PLAUF è presente in uno dei complessi ritardati specifici, generati dall'interazione di proteine di riccio di mare con la sonda PCR1, che rappresenta un breve tratto della 3'UTR del trascritto per l'istone H3.3.

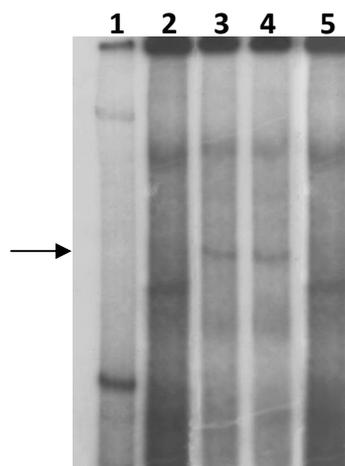


Figura 2.1: Autoradiografia di un esperimento di *Supershift* utilizzando come sonda marcata PCR1 e 30 μ g di lisato proteico totale da embrioni allo stadio di gastrula e anticorpi anti-PLAUF. Corsie: 1) in assenza di proteine; 2) in presenza di proteine; 3 e 4) dopo aggiunta di 300 e 500 ng di anticorpi anti-PLAUF; 5) dopo aggiunta di 600 ng di siero preimmune.

Inoltre esperimenti di ibridazioni *in situ* hanno dimostrato che gli mRNA per PLAUF e per l'istone H3.3 colocalizzano in embrioni a diversi stadi di sviluppo (fig. 2.2).



Figura 2.2: Esperimenti di ibridazioni *in situ* condotti su embrioni di riccio di mare allo stadio di blastula, gastrula e prisma utilizzando come sonda il trascritto antisenso per H3.3 e per PLAUF marcato con digossigenina. L'esperimento controllo è stato condotto utilizzando come sonda il trascritto senso per PLAUF.

Pertanto, sembra proprio che PLAUF corrisponda alla proteina da 32 kDa in grado di legare la 3'UTR dell'mRNA per l'istone H3.3 in estratti proteici di embrioni di riccio di mare.

Lo scopo del mio lavoro durante i tre anni del dottorato è stato dunque quello di integrare e proseguire gli studi sulla proteina PLAUF con attenzione all'aspetto funzionale soprattutto *in vivo*, data la carenza di dati sulla reale funzione biologica della proteina.

Lo studio è continuato sul gene che la codifica, con particolare riguardo alla zona regolatrice, la cui sequenza e le cui caratteristiche non erano note.

Per quanto riguarda l'aspetto funzionale, si è voluto seguire prima un approccio *in vitro*, attraverso lo studio del ruolo svolto dalla proteina *wild-type* e da quella deleva della regione *glycine-rich* nella determinazione del turnover del trascritto per l'istone H3.3. Si è passati poi allo studio *in vivo*, allo scopo di studiare il possibile ruolo biologico della proteina in embrioni di riccio di mare ai vari stadi di sviluppo.

In riferimento al secondo punto, sono stati proseguiti gli studi molecolari sul gene *plauf*, attraverso l'isolamento, il sequenziamento e la caratterizzazione della zona promotrice del gene stesso. Inoltre, è stato caratterizzato lo stato cromatinico del gene in embrioni allo stadio di blastula, anche attraverso l'utilizzo della sequenza della regione promotrice appena isolata.

3. Materiali & Metodi

Per le tecniche più comuni di biologia molecolare si fa riferimento al manuale di Maniatis (Sambrook et al., 1989).

3.1 Analisi della *library* genomica

La *library* fagica in λ Dash II è stata gentilmente fornita dalla Dott.ssa Branno della Stazione zoologica “Anton Dohrn” di Napoli.

3.1.1 Preparazione della sonda omologa

La sonda utilizzata per lo *screening* della *library* genomica di riccio di mare corrisponde al primo esone del gene *plauf* per una lunghezza totale di 186 bp.

La sonda è stata preparata mediante PCR effettuata su DNA genomico di riccio di mare (1 μ g). La miscela di reazione (50 μ l) della PCR è costituita da: *Taq polimerasi* 1U (Sigma) in presenza del buffer specifico 1x (Sigma), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP ciascuno ad una concentrazione finale di 100 μ M e da 25 pmol di ciascun *primer* utilizzato (PL5 e PL42: tab. 3.1). La reazione di PCR prevede un primo ciclo di denaturazione del DNA a 94°C per 3'; seguono 40 cicli costituiti da una denaturazione a 94°C per 1', *annealing* dei *primers* a 58°C per 30" e allungamento a 72°C per 1'; infine un ciclo finale di polimerizzazione a 72°C per 10'. Allo scopo di valutare la presenza di eventuali contaminazioni è stato allestito anche un controllo negativo in cui è stata aggiunta H₂O al posto del DNA. Il prodotto di PCR è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% con il marker di peso molecolare 100 bp (Sigma). La banda corrispondente al prodotto di amplificazione è stata estratta dal gel utilizzando il kit “QIAquick Gel Extraction Kit” della Qiagen, seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il DNA estratto è stato diluito in un volume di H₂O opportuno.

3.1.2 Marcatura della sonda mediante la reazione di "Random priming"

100 ng della sonda sono denaturati in presenza di ottameri a sequenza random tramite riscaldamento a 100°C per 5' e poi raffreddati immediatamente in ghiaccio.

Si aggiungono: 3 µl di [α^{32} P]dCTP (10 µCi/µl, Amersham), 3 µl di [α^{32} P]dATP (10 µCi/µl, Amersham), 1 µl del frammento di Klenow della DNA polimerasi USB (5 U/µl), 5 µl di tampone OLB contenente i nucleotidi dGTP e dTTP freddi, 2 µl di BSA (20 mg/ml) e H₂O fino a 50 µl. La miscela così composta è incubata per 2 h a 37°C.

Successivamente si separa il DNA marcato dai nucleotidi liberi per cromatografia su una colonnina Nick Sephadex G-50 medium (GE Helthcare) pre-impaccata in una siringa da 1 ml. L'eluizione viene eseguita lasciando filtrare per gravità attraverso la resina una soluzione TE; vengono raccolte cinque frazioni da 100 µl ciascuna e viene scelta quella più attiva dopo aver misurato la radioattività allo scintillatore Beckman-Coulter LS 6500, utilizzando 1 µl di ciascuna frazione in 5 ml di liquido di scintillazione.

La radioattività delle sonde così preparate è stata in media di 300.000 cpm/µl.

3.1.3 Preparazione di cellule

1 ml di cellule batteriche MRA-P2 vengono fatte crescere a 37°C per 4 ore sotto agitazione costante (200 rpm) in una soluzione contenente: 50 ml di LB (10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g estratto di lievito in 1 litro), 500 µl di Maltosio 20%, 500 µl di MgSO₄ 1M. Al termine della crescita le cellule vengono centrifugate per 5' a 1500 rpm a 4°C in centrifuga Beckman Allegra con rotore TA 14-50. Il pellet cellulare viene risospeso in un volume di MgSO₄ 10 mM tale che la soluzione abbia una lettura allo spettrofotometro di 1 OD a λ_{600} .

3.1.4 Infezione con i fagi

L'infezione viene eseguita incubando 500 µl di cellule batteriche diluite in MgSO₄ 10 mM e la soluzione della *library* fagica diluita per 10' a 37°C. Alla miscela vengono poi aggiunti 8 ml di terreno di coltura NZY top-agarosio (10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g estratto di lievito, 2 g MgSO₄, 7 g di agarosio in 1 litro) e si versa la sospensione in piastre contenenti il mezzo di coltura NZY agar (10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g estratto di lievito, 2 g MgSO₄, 14 g di agar in 1 litro). Le piastre sono incubate a 37°C per la notte.

3.1.5 Trasferimento delle placche fagiche sui filtri e preibridazione

Le piastre sono tenute a 4°C per 2 ore per far sì che l'agarosio diventi compatto, evitando così il rischio che il filtro possa restare adeso alla piastra. Il trasferimento del DNA nelle aree di lisi è stato eseguito deponendo filtri di nitrocellulosa. Per ogni piastra sono usati due filtri: il primo resta a contatto con la piastra per 2', mentre la sua replica resta per 4'. I filtri sono stati posti per 5' su carta Whatman 3MM imbevuta nella soluzione denaturante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), poi altri 5' su un foglio di carta Whatman 3MM imbevuto nella soluzione neutralizzante (Tris-HCl 0,5 M pH 8, NaCl 1,5 M) ed infine 5' in una soluzione SSC 2x. I filtri sono stati asciugati su carta Whatman 3MM e posti in stufa sotto vuoto ad 80°C per 2 ore in modo da fissare il DNA denaturato. I filtri sono stati posti in una box di ibridazione e sono stati aggiunti 5 ml per filtro della soluzione di preibridazione (soluzione Denhardt's 5x, SSC 5x, fosfato di sodio 50 mM pH 6,8, EDTA 5 mM pH 8, SDS 0,5%, DNA spermatico di salmone frammentato e denaturato 100 µg/ml). La preibridazione è stata condotta per 2 ore a 65°C.

3.1.6 Ibridazione

Al termine della preibridazione, alla miscela è stata aggiunta la sonda marcata radioattivamente (circa $150 \cdot 10^6$ cpm totali) che è stata prima denaturata a 100°C per 5'. Dopo una notte di ibridazione a 65°C si effettua un lavaggio di 15' a 65°C sotto agitazione in una soluzione SSC 2X ed SDS 0,1%. Questo lavaggio è stato seguito da uno o più lavaggi in soluzione SSC 0,2x ed SDS 0,1%. I filtri sono stati lasciati asciugare ed esposti ad una lastra autoradiografica Fuji RX a -80°C per una notte.

Sulla base dei dati autoradiografici, le placche di lisi risultate positive (*plugs*) sono state prelevate e messe ad eluire per almeno 2 ore a temperatura ambiente in 500 μl di SM "phage buffer" (NaCl 100 mM, MgSO_4 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e gelatina 0,01%) contenenti 50 μl di cloroformio.

3.1.7 Identificazione su piastra di singole placche fagiche

Dato che il *plug* prelevato contiene una popolazione eterogenea di cloni fagici ricombinanti, si è proceduto ad una diluizione della soluzione di fagi per ottenere singole placche da cui individuare la progenie di singoli fagi positivi. È stato quindi calcolato il titolo dei *plugs* ottenuti dopo il primo *screening* e sono state preparate piastre in cui si formavano placche di lisi singole. Il DNA fagico è stato trasferito su filtri di nitrocellulosa come per le analisi precedenti ed è stata ripetuta l'ibridazione con la stessa sonda. Dopo l'autoradiografia, le singole placche positive sono state prelevate e conservate come già descritto.

3.1.8 Titolazione di fagi

200 μl di cellule MRA-P2 in MgSO_4 (1 O.D. a λ_{600}) vengono infettate con 1 μl di diverse diluizioni (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) della soluzione della *library* fagica in SM "phage buffer". La

miscela di cellule e fagi è stata incubata per 10' a 37°C sotto agitazione costante (200 rpm). Sono stati poi aggiunti 3,5 ml di NZY top-agarosio e versati in piastre contenenti il mezzo di coltura NZY agar e lasciate a 37°C per la notte. Il giorno seguente sono state contate le colonie per determinare il titolo della *library* fagica.

3.1.9 Preparazione dei lisati fagici

Per amplificare i singoli fagi provenienti dal secondo *screening* sono stati preparati dei lisati a confluenza infettando cellule (1 O.D. a λ_{600}) con diversi volumi di soluzione fagica proveniente dai *plugs* positivi. La miscela di cellule e fagi è stata incubata per 10' a 37°C sotto agitazione costante (200 rpm); sono stati aggiunti 8 ml del terreno di coltura NZY top-Agar e la sospensione è stata versata in piastre contenenti il mezzo di coltura NZY Agar. Le piastre sono state poi incubate a 37°C per la notte.

Le piastre dove si era verificata la lisi a confluenza sono state ricoperte con 12 ml di SM e lasciate agitare a 4°C per tutta la notte in modo da eluire i fagi ricombinanti dall'agarosio. Da ogni piastra è stata poi raccolta la sospensione fagica, a cui è stato aggiunto cloroformio 0,3% finale per distruggere le cellule batteriche presenti. I residui batterici sono stati eliminati centrifugando per 15' a 3500 rpm in centrifuga Beckman Allegra con rotore TA 14-50. Il lisato fagico è stato incubato per 30' a 37°C con DNAsi I e RNAsi A alla concentrazione finale di 1 µg/ml, per degradare il DNA e l'RNA batterico. Alla fine dell'incubazione sono stati aggiunti 0,3 v di una soluzione composta da PEG 6000 30% ed NaCl 3 M e la miscela è stata incubata in ghiaccio per un'ora. Le particelle fagiche sono state recuperate per centrifugazione a 10000 rpm per 20' in centrifuga Beckman Allegra 25R con rotore TA14-50. Dopo aver allontanato tutto il supernatante il precipitato è stato risospeso in 0,1 v di SM *phage buffer* e per eliminare le proteine del capsido, si è proceduto all'estrazione con 1 v di

fenolo: cloroformio: alcool isoamilico (25: 24: 1). Il DNA è stato recuperato per centrifugazione a 3500 rpm per 10' in centrifuga Beckman Allegra 25R con rotore TA14-50. È stata recuperata la fase acquosa, contenente il DNA, ed è stata ripetuta l'estrazione con l'aggiunta di 1 v di cloroformio: alcool isoamilico (24: 1) per allontanare residui di fenolo. Il DNA fagico è stato precipitato aggiungendo 1 v di alcool isopropilico e lasciando il campione per 5' a temperatura ambiente. Dopo 20' di centrifugazione a 10000 rpm il precipitato è stato lavato con etanolo al 70% freddo, asciugato all'aria e solubilizzato in acqua bidistillata sterile.

3.1.10 Digestione del DNA fagico

3,7 µg di DNA fagico (75 µl) sono stati digeriti a 37°C per 3 ore con 4 µl dell'enzima EcoRI *Boheringer* (10 U/µl) dopo l'aggiunta di 10 µl dello specifico *buffer* di reazione (*buffer H Boheringer* 10x) in un volume totale di 100 µl. Parte dei prodotti di digestione (circa 200 ng) viene analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%, applicando una differenza di potenziale di 100 V. La restante parte è stata utilizzata per il subclonaggio.

3.2 Southern Blotting

3.2.1 Trasferimento su filtro

Dopo essere stato fotografato, il gel viene sottoposto ai seguenti trattamenti:

depurazione (2 passaggi di 10' in HCl 0,2 N), lavaggi (3 passaggi di 5' in ddH₂O sterile), denaturazione (2 passaggi di 30' in NaOH 0,5 N + NaCl 1 M), lavaggi (6 passaggi di 5' in ddH₂O sterile), neutralizzazione (2 passaggi di 30' in Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 + NaCl 1,5 M). Il Dna viene poi trasferito dal gel su un filtro di nylon (Hybond-N, Amersham) secondo le modalità descritte da Sambrook et al. (1989).

Dopo 16 ore si controlla che il DNA si sia trasferito sul filtro in maniera uniforme, trattando il gel con una soluzione 1 µg/ml di bromuro di etidio per 15-30' ed osservandolo poi su un transilluminatore a lampade UV. Il filtro viene prelevato, lavato con SSC 2x per 5', avvolto in Saran Wrap e quindi posto su un transilluminatore a lampade UV per 5' in modo da fissare il DNA.

3.2.2 Preibridazione e ibridazione del Southern blotting

Il filtro di nylon su cui si è trasferito il DNA viene preibridato per circa 12 ore a 60°C con la seguente soluzione (0,2 ml/cm² di filtro): SSC 6x, SDS 0,5%, soluzione di Denhardt's 5x e 100 µg/ml di DNA spermatico di aringa sonicato e denaturato per trattamento a 100°C per 10' e bloccato in ghiaccio. Successivamente, viene allontanata la soluzione di preibridazione ed il filtro ibridato per circa 18 ore a 60°C con la seguente soluzione (0,05 ml/cm² di filtro): SSC 6x, SDS 0,5%, soluzione di Denhardt 5x, EDTA 0,01 M e 100 µg/ml di DNA spermatico di aringa sonicato e denaturato per riscaldamento a 100°C e poi bloccato in ghiaccio. Infine, viene aggiunta la sonda marcata, denaturata per riscaldamento a 100°C e poi bloccata in ghiaccio. La sonda (186 bp) è la stessa utilizzata per l'analisi della *library*.

Al termine viene rimossa la soluzione di ibridazione e viene allontanata dal filtro la sonda marcata ibridata non specificamente con più lavaggi, come indicato da Sambrook et al. (1989). Successivamente, il filtro umido viene avvolto in Saran Wrap e viene eseguita l'autoradiografia tramite esposizione con lastre Fuji RX a -80°C. Le lastre vengono sviluppate dopo diversi tempi di esposizione.

3.3 Clonaggio in vettore plasmidico *pBluescript KS(-)*

3.3.1 Preparazione del vettore di clonaggio

5 µg di plasmide pBluescript sono stati precipitati tutta la notte a -20°C per aggiunta di NaCl 0,3 M finale e di 2,5 v di etanolo 99% freddo.

Il campione è successivamente centrifugato per 30' a 14000 rpm a 4°C in centrifuga Microfuge (Eppendorf). Il pellet ottenuto viene lavato con etanolo al 70% e poi asciugato in sistema Savant.

Per evitare che il plasmide potesse richiudersi su se stesso, quest'ultimo è stato defosforilato aggiungendo 0,6 U di C.I.A.P. (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Roche) in presenza dello specifico tampone di reazione in un volume complessivo di 20 µl. La reazione viene fatta procedere a 37°C per 4' , dopo i quali vengono aggiunte altre 0,6 U di enzima e si prosegue l'incubazione per altri 45' a 37°C.

A questo punto il plasmide viene purificato dalla fosfatasi tramite elettroforesi su gel di agarosio ed estrazione da gel. Dal gel si è proceduto all'estrazione della banda corrispondente al plasmide lineare (poiché nella preparazione potrebbero esservi ancora tracce delle forma circolare e di quella superavvolta). Il frammento estratto è stato poi pesato e successivamente trattato con il kit "QIAquick Gel Extraction Kit" della Quiagen, seguendo le istruzioni della casa produttrice.

3.3.2 Reazione di ligasi

Il plasmide defosforilato ed i frammenti fagici digeriti sono stati utilizzati in una reazione di ligasi. Prima di procedere alla reazione di ligasi il DNA fagico è stato microdializzato allo scopo di eliminare i residui di sali presenti nel *buffer* di reazione dell'enzima utilizzato per la digestione. La microdialisi è stata effettuata, per 1 ora circa, utilizzando filtrini *Millipore*

(diametro 13 mm, pori 0,025 μm), poggiati su una soluzione ipotonica (H_2O), sui quali è stata poggiata la preparazione di DNA fagico.

Per la reazione di ligasi, 100 ng di DNA del plasmide più 200 ng di DNA fagico (digerito e microdializzato) vengono incubati con 1 μl della ligasi T4 (Boheringer, 3U/ μl) in presenza dello specifico tampone di reazione in un volume complessivo di 20 μl . La reazione viene fatta procedere a 4°C per tutta la notte. La miscela è stata utilizzata per la trasformazione di cellule batteriche sia mediante elettroporazione che mediante trasformazione chimica.

3.3.3 Trasformazione

Un'aliquota di batteri competenti scongelata in ghiaccio è incubata con 20-100 ng di DNA per 30' in ghiaccio, viene poi provocato lo *shock* termico per 5' a 37°C, viene effettuato un secondo passaggio in ghiaccio per 20' ed è poi aggiunto 1 ml di LB e si incuba per 1 ora a 37°C; questa incubazione consente ai batteri trasformati di esprimere la resistenza all'Ampicillina. Aliquote di 100 μl e 200 μl di questa sospensione sono piastrate su Agar contenente Ampicillina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e le piastre incubate a 37°C per circa 14 ore.

3.3.4 Trasformazione per elettroporazione

I prodotti di ligasi sono stati precedentemente microdializzati come già descritto.

La procedura seguita è la seguente: 80 μl di cellule elettrocompetenti DH5 α (efficienza di trasformazione 10^7 cfu/ μg di DNA) sono state incubate con l'intero prodotto di ligasi in ghiaccio per 1'. La miscela è stata trasferita in una elettrocuvetta (0,2 cm) preraffreddata che è stata posta nell'elettroporatore (*Gene pulsar*, Biorad) e sottoposta ad un impulso elettrico (conduttanza 25 μF , differenza di potenziale 2,5 kV, resistenza 200 Ohm) per un intervallo di tempo 4,5-5". Immediatamente dopo l'elettroporazione, alla sospensione viene aggiunto 1

ml di terreno SOC (Tryptone 20 mg, Estratto di lievito 5 mg, NaCl 10 μ M, KCl 2,5 μ M, MgCl₂ 10 μ M, MgSO₄ 10 μ M, Glucosio 0,4%), e la miscela è stata trasferita in una provetta Falcon per essere incubata a 37°C, sotto vigorosa agitazione, per un'ora. In seguito le cellule vengono piastrate su terreno LB con Ampicillina (50 μ g/ml). Le piastre sono poi incubate a 37°C per tutta la notte.

3.4 Colony hybridization

Sulle piastre ottenute dalla trasformazione, sono stati appoggiati filtri di nylon (83 mm, Perkin Elmer Life Sciences NEF978) che sono stati posti in autoclave a 100°C per 3' per denaturare e fissare il DNA. La preibridazione è stata effettuata in 50 ml di una soluzione composta da SSC 6x, SDS 0,1%, soluzione Denhardt's 5x, tRNA 100 μ g/ml, DNA spermatico di aringa sonicato, denaturato per trattamento a 100°C per 10' e bloccato in ghiaccio (100 μ g/ml). La preibridazione è stata fatta procedere a 60°C per tutta la notte. Successivamente, alla soluzione di preibridazione è stata aggiunta la sonda marcata (186 bp, la stessa usata per lo *screening* e il *Southern*), denaturata per riscaldamento a 100°C e poi bloccata in ghiaccio, il tutto incubato a 60°C tutta la notte in agitazione.

Il filtro è stato poi sottoposto a una serie di lavaggi e, successivamente, all'autoradiografia, come descritto precedentemente per il *Southern Blotting*.

Le singole colonie batteriche contenenti il plasmide con l'inserito di interesse sono state prelevate dalle piastre ed incubate in terreno LB in presenza di ampicillina 50 μ g/ml a 37°C per una notte sotto agitazione. Il DNA plasmidico è stato ottenuto per mini- e midi-prep utilizzando gli appositi kit della Qiagen e seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

3.5 Analisi computazionale

Per mappare la disposizione dei frammenti ottenuti nella digestione del clone fagico 2A è stato utile inizialmente il confronto eseguito in Banca Dati tra le sequenze ottenute e una sequenza posta a monte di un gene omologo in *Strongylocentrotus purpuratus*, tramite l'utilizzo del tool bioinformatico BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*), presente all'interno del sito www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/seaurchin/.

Al fine di predire quali fattori trascrizionali putativi potessero legare il promotore isolato è stato utilizzato il programma MachtTM del pacchetto Transfac 6.0, che si basa sull'utilizzo di una serie di matrici mononucleotidiche e contiene vaste informazioni sulla struttura, funzione e pattern di espressione di diversi fattori trascrizionali (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>).

3.6 Saggi di ritardo della mobilità elettroforetica

3.6.1 Preparazione di estratti proteici totali da embrioni di *P. lividus*

Gli embrioni di riccio di mare agli stadi di blastula e gastrula sono stati gentilmente forniti dalla Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli.

La soluzione di acqua di mare contenente $1,2 \cdot 10^7$ embrioni viene centrifugata in centrifuga Beckman Allegra 6R con rotore GH-3.8A a 2500 rpm per 10' a 4°C. Il pellet viene lavato due volte con NaCl 3,7% (soluzione isotonica per *P. lividus*) dopodichè viene effettuata una centrifugazione a 2500 rpm per 15' a 4°C, in centrifuga Beckman Allegra 6R con rotore GH-3.8 A. Il pellet è risospeso in 10 volumi della seguente soluzione: KCl 100 mM, Hepes 15 mM pH 7,9, MgCl₂ 3 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,2 mM, EDTA 0,1 mM, e lasciato in agitazione 10' in ghiaccio. La soluzione viene sottoposta a 8 cicli di sonicazione (sonicatore Bandelin) di 20" ciascuno al 50% della potenza dell'apparecchio. Alla soluzione viene aggiunto ammonio

solfato fino ad ottenere una concentrazione finale di 0,36 M (9% di saturazione); si lascia precipitare per 30' e poi si sottopone ad una centrifugazione di 30' a 35000 rpm a 4°C in ultracentrifuga Beckman L8-M con rotore 60 Ti angolo fisso. Il supernatante è prelevato e si aggiungono lentamente 0,3 g/ml di ammonio solfato in 30' (55% di saturazione) e si lascia in agitazione tutta la notte a 4°C. La soluzione viene poi centrifugata a 18000 rpm per 30' a 4°C in centrifuga Beckman Avant J25 con rotore JA 25.50. Il pellet è risospeso in 5 ml della seguente soluzione di dialisi: KCl 100 mM, Hepes 20 mM pH 7,9, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerolo 20% e dializzato contro 500 ml della stessa soluzione per eliminare l'ammonio solfato, effettuando 4 cambi da 1/2 litro.

La soluzione viene centrifugata per 30' a 18000 rpm e si preleva il supernatante. Se ne determina la concentrazione utilizzando il kit "Protein Assay" della Biorad e si conserva a -80°C in aliquote da 250 µl.

3.6.2 Preparazione delle sonde per il saggio EMSA

La sonda da utilizzare per il saggio EMSA è stata preparata per amplificazione tramite PCR della regione promotrice di *plauf* utilizzando i primer ProPL1 e ProPL2 (tab. 3.1) e come stampo il clone CPP1a (clone contenente il frammento da 1273 bp).

Per il saggio è stata preparata anche una sonda aspecifica attraverso una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers PL4-PL11 (tab. 3.1) e come stampo il clone cDNA PLAUF1 (AY590189). Questa sonda rappresenta una zona della regione codificante del gene *plauf*.

Il prodotto di PCR è stato estratto da gel d'agarosio con il kit "QIAquick Gel Extraction Kit" della Quiagen e sottoposto a reazione di marcatura con ³²P mediante marcatura terminale.

Le sonde oligonucleotidiche sono state preparate eseguendo l'*annealing* di oligo complementari (tab. 3.1) in quantità equimolari per tutta la notte a temperatura ambiente.

3.6.3 Reazione di marcatura terminale

I frammenti di DNA impiegati come sonde sono stati resi radioattivi mediante marcatura delle estremità 5' usando [γ -³²P]dATP.

100 ng di DNA vengono portati ad un volume finale di 10 μ l aggiungendo: 1 μ l di T4-polinucleotide chinasi (1 U/ μ l), 1 μ l di tampone di reazione 10x, 3 μ l di [γ -³²P]dATP GE Healthcare (3000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l). La miscela di reazione viene mantenuta a 37°C per 40', dopodichè la T4-polinucleotide chinasi viene inattivata per riscaldamento a 95°C per 2' e il DNA denaturato viene lasciato rinaturare a RT per 30'.

Il DNA marcato viene purificato dai precursori radioattivi per cromatografia su colonna NAP5 contenente Sephadex G-25 (GE Healthcare) secondo le modalità riportate in precedenza (v. § 3.1.2).

3.6.4 Saggio di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA)

Il saggio viene effettuato utilizzando gli estratti proteici da embrioni di *P. lividus* agli stadi di blastula e gastrula e le sonde marcate scelte all'interno della regione promotrice del gene *plauf*. 10 g di estratti proteici sono aggiunti ad una miscela contenente la seguente composizione finale: Tris-HCl 10 mM pH 7,9, DTT 1 mM, KCl 20 mM, 10 μ g di tRNA (competitore aspecifico). Alla miscela è aggiunta 1 μ l di sonda marcata (circa 120.000 cpm/ μ l) e poi si aggiunge H₂O fino a raggiungere un volume finale pari a 20 μ l. Si lascia interagire per 30' a temperatura ambiente.

Nel saggio è stata verificata la specificità di interazione utilizzando quantità crescenti in eccesso molare (50x, 100x, 200x e 400x) del competitore specifico non marcato e di un competitore aspecifico. In questo caso i competitori vengono incubati con le proteine a temperatura ambiente per 30' prima dell'aggiunta della sonda marcata.

Si continua poi l'incubazione per altri 30'; successivamente sono aggiunti 10 µl di un tampone di caricamento 3x, con la seguente composizione: Glicerolo 7%, TBE 0,5x, Blu di Bromofenolo 0,002%.

30 µl finali di ogni campione sono caricati su un gel non denaturante di poliacrilammide al 5% (0,1 x 25 x 17 cm³) e si effettua la corsa elettroforetica a 9 mA costanti per 4 h in tampone TBE 0,5x; quindi il gel è trasferito su carta Whatman 3MM ed asciugato sottovuoto in gel dryer Hoefer SE 1160.

Si procede, infine ad un'autoradiografia con lastre Fuji RX a -80°C per tempi di esposizione diversi.

3.7 Analisi dello stato cromatinico del gene *plauf*

3.7.1 Estrazione di nuclei da embrioni di riccio di mare

Gli embrioni di riccio di mare sono stati gentilmente forniti dalla Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli. I nuclei sono stati estratti da embrioni allo stadio di blastula (24 ore dopo la fecondazione). La soluzione di tre litri di acqua di mare contenente 5000 embrioni/ml è stata centrifugata in centrifuga Beckman Allegra 6R con rotore GH-3.8A a 4000 rpm per 5' a 4°C. Il pellet è stato lavato due volte con 5 vol di NaCl 37‰ ed una volta con 5 vol di glucosio 1,5 M. È stata effettuata l'omogeneizzazione in un omogenizzatore Potter, sospendo il pellet lavato in 10 vol di MgCl₂ 2 mM, con 14-15 colpi, in ghiaccio. L'avvenuta lisi delle membrane plasmatiche è stata controllata prelevando una goccia di lisato ed osservandola al

microscopio. Il lisato è stato diluito in egual volume di una soluzione di glucosio 2 M ed MgCl_2 2 mM. Dopo centrifugazione (4000 rpm, 5' a 4°C), il pellet è stato lavato due volte con 10 ml di una soluzione glucosio 1 M ed MgCl_2 1 mM. Il pellet è stato sospeso nella stessa soluzione ed applicato su di un gradiente discontinuo di saccarosio (2,5 M; 2,2 M e 1,9 M), che è stato sottoposto a centrifugazione a 22000 rpm per 1 ora a 4°C in ultracentrifuga Beckman L8-M con rotore SW 28. Sono state prelevate le tre interfasi. L'interfase inferiore, contenente i nuclei, è stata diluita in 1 vol di MgCl_2 2 mM. Questa soluzione è stata centrifugata a 5000 rpm per 5' a 4°C. Il pellet è stato poi sospeso in 5 ml della soluzione di cross-linking composta da Hepes 20 mM pH 7,9, KCl 40 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Glicerolo 20% e inibitori di proteasi "complete" (Roche) 1x. La reazione di *cross-linking*, necessaria per legare fortemente le proteine istoniche al DNA, è stata effettuata con formaldeide 1% per 10' a temperatura ambiente. Il cross-linking è stato bloccato con un eccesso di glicina 125 mM. I nuclei sono stati centrifugati a 5000 rpm per 5'; il pellet è stato raccolto e risospeso in 1,4 ml di una soluzione di MgCl_2 2 mM ed inibitori di proteasi Roche 1x e conservati a -20°C.

3.7.2 Precipitazione immunocromatinica (ChIP)

Due aliquote nucleari (contenenti circa $1,4 \cdot 10^7$ nuclei) sono state centrifugate e risospese in 2 ml di buffer di lisi (SDS 1%, Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM). La lisi è stata effettuata per 10' in ghiaccio. La soluzione è stata sottoposta a 6 cicli di sonicazione (sonicatore Bandelin) di 2' 30'' al 50% della potenza dell'apparecchio e ad una centrifugazione per 10' a 13200 rpm a 4°C in centrifuga Beckman Allegra 25R con rotore TA14-50 in modo da allontanare le membrane nucleari. Il supernatante è stato diluito in 9 ml di ChIP buffer (SDS 0,01%, Triton 1,1%, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8, NaCl 167 mM, inibitori di proteasi Roche 1x). La

resina *Protein A-Sepharose* (PAS) della Amersham è stata risospesa in 1 ml di buffer di eluizione (EDTA 1,2 mM; Tris-HCl 16,7 mM pH 8) ed è stata aggiunta ai 9 ml per un'ora a 4°C sotto agitazione per eseguire il *preclearing*. Il campione di *preclearing* è stato centrifugato in centrifuga eppendorf 5415 D con rotore F45-24-11 per 5' a 2000 rpm a 4°C. È stato prelevato il supernatante che è stato suddiviso in 10 aliquote da 1 ml ciascuno, di cui cinque sono state trattate con 5 µl di anticorpo antidimetil-istone H3K4 (Upstate) ed altre 5 sono state trattate con 5 µl di siero non immune. L'interazione con l'anticorpo è stata eseguita a 4°C sotto agitazione per la notte. Ad ogni campione sono stati poi aggiunti 200 µl di PAS. L'interazione con la resina avviene per 2 ore a 4°C sotto agitazione. I campioni sono stati centrifugati per 5' a 5000 rpm a 4°C in centrifuga eppendorf 5415 D con rotore F45-24-11 e sono stati raccolti i supernatanti definiti *Unbound* antidimetil (UAd) e *Unbound* non immune (UNI). I pellet sono stati sospesi in 1 ml ciascuno di soluzione di lavaggio (SDS 0,1%, Triton 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM). Ogni campione è stato lavato con 9 ml di questa soluzione ed è stato centrifugato a 3000 rpm per 5' a 4°C in centrifuga Beckman Allegra 25 R con rotore AT-14. È stato eseguito un altro lavaggio con 9 ml della soluzione: 0,1%, Triton 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM. Dopo centrifugazione, ogni campione è stato lavato per due volte con 9 ml di TE 1x. È stato eliminato il supernatante ed il DNA legato (*Bound*) è stato eluito dalla resina con 500 µl di buffer di eluizione (SDS 1%, NaCO₃ 0,1 M), miscelando i campioni e centrifugando per 10' a 13200 rpm in centrifuga eppendorf 5415 D con rotore F45-24-11. Il *reverse-crosslinking*, necessario per indebolire l'interazione del DNA con le proteine legate, è stato effettuato aggiungendo NaCl ad una concentrazione finale di 0,2 M ad ogni campione di *bound* ed *unbound* ed incubandoli a 65°C per tutta la notte. I campioni sono stati trattati con una proteinasi (EDTA 10 mM, Tris-HCl 40 mM pH 7,5, proteinasi K 0,04 µg/µl) ed incubati con l'enzima per un'ora a 45°C. I campioni sono stati poi

sottoposti ad una estrazione con un uguale volume di fenolo: cloroformio: alcol isoamilico (25: 24: 1) per due volte, allo scopo di eliminare le proteine residue e una singola estrazione con un uguale volume cloroformio: alcol isoamilico (1: 1) per eliminare i residui di fenolo. È stata effettuata una precipitazione con NaCl 250 mM, 1 vol di isopropanolo e 50 µg di glicogeno. La precipitazione è stata eseguita a -20°C per tutta la notte. I campioni sono poi stati centrifugati per 20' a 13200 rpm a 4°C e lavati con 70 µl di etanolo al 70%. I pellet sono stati asciugati in Savant e sospesi nel volume appropriato di acqua. La quantità di DNA ricavato da ogni campione è stata determinata al Nanodrop (Thermo) e 5 µl di campione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

3.7.3 Amplificazione mediante Real Time PCR

L'amplificazione mediante *Real Time PCR* è stata effettuata con l'apparecchiatura 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizzando il software in dotazione della macchina. Oltre ai campioni di DNA genomico ottenuti dagli esperimenti di ChIP, la miscela di reazione è composta dalla SYBR GREEN PCR Master mix (Applied Biosystems) 1x e dalla coppia di *primers* (PL71-PL72 per il promotore di *plauf*, PL32-PL35 per la cds di *plauf*, Spe1-Spe2 per *H3L*: tab. 3.1) ciascuno alla concentrazione finale di 0,5 pmol/µl in un volume finale di 25µl. Le reazioni di *Real Time PCR* sono state eseguite effettuando un primo ciclo di attivazione dell'enzima a 95°C per 10' e 40 cicli suddivisi in una fase di denaturazione a 95°C per 15'' seguita dalla fase di *annealing* e di allungamento a 60°C per 1'. Come controllo interno è stato utilizzato il clone H3L.

Per determinare la concentrazione del prodotto di amplificazione sono stati utilizzati $5 \cdot 10^1$ pg, $5 \cdot 10^3$ pg e $5 \cdot 10^5$ pg dei seguenti standard: clone CPP1 per la coppia di primer PL71-72 localizzati nella regione promotrice del gene *plauf*; clone di cDNA PLAUF1 per la coppia di

primer PL32-PL35 localizzati nella *coding sequence* del gene *plauf*; clone H3L per la coppia di primer Spe1-Spe2 localizzati nella regione promotrice del gene *H3L*. I campioni della CHIP sono stati preparati in duplicato mentre gli standard sono stati preparati in triplicato. È stato allestito anche un controllo negativo aggiungendo H₂O al posto del DNA.

3.8 Studi funzionali *in vivo*

3.8.1 Preparazione di anticorpi policlonali contro PLAUF e parziale purificazione

È stato preparato un antisiero contro PLAUF tramite immunizzazione di un coniglio, allo scopo di effettuare esperimenti sul ruolo *in vivo* della proteina in embrioni di riccio di mare.

La regione di cDNA codificante PLAUF è stata ottenuta mediante PCR utilizzando come oligonucleotidi specifici PL5 e PL2 (tab. 3.1) e come stampo il cDNA di PLAUF; successivamente è stata clonata in un vettore pRSV sotto il promotore forte eucariotico RSV, sottoponendo il vettore ad idrolisi con gli enzimi di restrizione HindII e BglIII (Boheringer) ed effettuando la reazione di ligasi con la T4 DNA Ligasi (Promega), come descritto in precedenza.

Il plasmide preparato mediante maxipreparazioni è stato iniettato nella sottocute di un coniglio, con un richiamo settimanale, per un totale di 4 iniezioni da 800 µg ciascuna, seguendo lo schema di La Cava e Albani (2000). Dopo 7 giorni dall'ultima iniezione è stato effettuato un prelievo di sangue, da cui dopo coagulazione è stato prelevato il siero. Il siero è stato sottoposto a precipitazione differenziale con ammonio solfato al 40% di saturazione per favorire la purificazione delle immunoglobuline. Il precipitato è stato risospeso in PBS e dializzato. Le varie frazioni sono state analizzate per SDS-PAGE al 10%.

L'antisiero contro PLAUF è stato saggiato per la sua capacità di legare PLAUF tramite esperimenti di immunodiffusione doppia e *Western blotting* (non mostrati), ed utilizzato nei saggi di funzionalità *in vivo* sugli embrioni.

3.8.2 Esperimento in vivo su embrioni di riccio di mare

Le immunoglobuline anti-PLAUF purificate per precipitazione in ammonio solfato al 40% di saturazione sono state risospese in PBS 1x e la soluzione è stata dializzata. Il siero non immune, utilizzato come controllo, è stato preparato allo stesso modo. L'esperimento *in vivo* è stato condotto aggiungendo quantità crescenti (50, 100 e 200 µg) del siero anti-PLAUF in 1 ml di acqua di mare contenente 100 embrioni del riccio di mare *P. lividus*. È stato preparato un controllo aggiungendo medesime quantità di siero non immune a campioni analoghi di embrioni. Come riferimento sono stati utilizzati embrioni non trattati. L'aggiunta di siero è stata effettuata a 15 ore di sviluppo, allo stadio di blastula non natante, mentre le osservazioni al microscopio sono state eseguite a 45 ore di sviluppo. Tutti i campioni sono stati preparati in duplicato. Le osservazioni sono state effettuate utilizzando un microscopio Axio Imager M1. Gli embrioni sono stati forniti dal servizio di pesca della Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli.

3.8.3 Microiniezioni in uova di *P. lividus*

Per effettuare gli esperimenti di microiniezione, sono state utilizzate uova e spermatozoi di riccio di mare forniti dalla stazione zoologica di Napoli A. Dohrn.

Le uova sono state filtrate su un filtro con pori da 550 µm (Millipore), al fine di eliminare le impurità, e degelificate immergendole per 30'' in acqua di mare precedentemente portata a pH 5 con Acido Citrico.

Le uova così trattate sono state disposte in un'unica fila su una piastra precedentemente trattata con una soluzione di Protamina Solfato 1%, che favorisce l'adesione delle uova alla piastra.

Si è dunque proceduto alla microiniezione utilizzando un microscopio a contrasto di fase e un transjector (Eppendorf), applicando una pressione di 800 hPa all'ago, costituito da capillari di vetro borosilicato ($\phi=0,75$ mm, $l=10$ cm, $OD=1$ nm).

La soluzione di microiniezione contiene KCl 120 mM, Rodamina 0,4% e Morfolino a concentrazioni diverse: sono stati condotti esperimenti utilizzando soluzioni di morfolino 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M e 200 μ M.

Appena terminata la fase di microiniezione, le uova sono state fecondate con circa 100 μ l di sperma di riccio diluito 1: 200 in acqua di mare. Le piastre sono state poste in un incubatore a 16°C. Dopo 24 ore e dopo 48 ore dalla fecondazione, le piastre sono state osservate al microscopio Axio Imager M1 e le fotografie sono state effettuate utilizzando un ingrandimento 10x.

3.9 Studi funzionali *in vitro*

3.9.1 Preparazione del costrutto ricombinante

Al fine di rimuovere la parte codificante per la regione *glycine rich*, 10 μ g di plasmide pGEX-2T contenente la regione codificante del cDNA per PLAUF (dalla posizione 109 corrispondente alla seconda metionina fino alla posizione 1131) sono stati sottoposti ad una doppia digestione con gli enzimi di restrizione SmaI ed EcoRI (Boheringer) a 37°C per 2 ore (5 U/ μ g di DNA), in presenza del tampone suggerito dalla casa produttrice. SmaI ha il sito di taglio interno all'inserito in posizione 760 ed EcoRI taglia nel vettore in posizione 940. La digestione rimuove una regione di 375 bp contenente anche il codone di stop della

traduzione e ne crea uno nuovo a valle dell'inserto che provoca l'inserzione di tre amminoacidi aggiuntivi. L'esito dell'idrolisi viene controllato su gel di agarosio all'1%.

Il plasmide così privato della regione codificante la *Gly-rich* è stato estratto da gel utilizzando il kit "QIAquick Gel Extraction Kit" della Qiagen, seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Il plasmide idrolizzato ed estratto da gel è stato infine sottoposto a *fill-in* e poi a ligasi. 250 ng di plasmide sono stati incubati con dNTP (100 mM), 1 µl del frammento di Klenow (Biolabs, 5U/µl), in presenza dell'apposito tampone di reazione, per 30' a temperatura ambiente. L'enzima è stato inattivato per riscaldamento a 65°C per 15'.

In seguito 100 ng di DNA sono stati incubati con 1 U dell'enzima *T4 DNA Ligase* (Boehringer) in presenza dello specifico tampone di reazione. La reazione viene fatta procedere a 4°C per tutta la notte.

Un'aliquota della miscela è stata utilizzata per la trasformazione di cellule batteriche Ca-competenti come indicato precedentemente.

Il DNA plasmidico, purificato tramite le miniprep, è stato digerito con l'enzima PstI, allo scopo di individuare le colonie nel quale era presente il plasmide contenente l'inserto di interesse. L'enzima presenta due siti di restrizione nel costrutto, uno nell'inserto in posizione 233 e l'altro nel vettore in posizione 1897. Il clone contenente il plasmide da cui si sono ottenuti i frammenti delle dimensioni attese (4168bp e 1379 bp) è stato utilizzato per l'espressione della proteina GST-PLAUFΔ, priva della regione *glycine-rich*.

3.9.2 Espressione di proteine di fusione ed estrazione proteica

A crescita avvenuta è stata prelevata con un'ansa sterile una colonia dalla piastra ed è stata inoculata in 100 ml di terreno liquido LB a cui è stata aggiunta ampicillina ad una

concentrazione finale di 50 µg/ml. Il tutto è stato messo a crescere a 37°C tutta la notte sotto agitazione costante (280 rpm).

Il giorno dopo l'inoculo è stato diluito 1:10 ed è stato posto a 37°C sotto agitazione costante (280 rpm) fino al raggiungimento di 0,6-0,8 O.D. a $\lambda=600$ nm; quindi sono stati prelevati circa 50 ml da utilizzare come controllo non indotto.

L'espressione della proteina di fusione è stata indotta dall'aggiunta di IPTG ad una concentrazione finale di 0,1 mM. Dopo circa 15 ore di induzione, sia il campione non indotto che quello indotto sono stati centrifugati a 3000 rpm in centrifuga Beckman per 10' per rimuovere il terreno di coltura. Il precipitato è stato risospeso in PBS 1x (10 ml/g di cellule). I campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 20' e il precipitato è stato risospeso in tampone (10 ml/g di cellule) (PBS 1x, EDTA 0,5 mM, DTT 5 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 2 µg/ml, Leupeptina 0,5 µg/ml, Pepstatina 0,7 µg/ml).

Successivamente i campioni sono stati sonicati 6 volte per 20'' con un sonicatore Labsonic della Braun (40 Watt). È stato prelevato il supernatante dopo centrifugazione a 14000 rpm per 30' a 4°C in centrifuga Microfuge Eppendorf.

Lo stesso procedimento è seguito sia per l'espressione della proteina PLAUF completa che per quella delevata della regione *Gly-rich*.

3.9.3 Purificazione della proteina di fusione mediante colonna glutatione-sefariosio

La proteina PLAUF è stata ottenuta come proteina di fusione costituita da GST (glutatione-S-trasferasi) all'N-terminale. La purificazione consiste nell'applicare la miscela proteica su una colonna Glutatione-Sefariosio 4B caratterizzata dalla presenza di glutatione legato alla resina impaccata, e eluire la proteina mediante aggiunta di glutatione ridotto.

1 ml di soluzione contenente la resina viene equilibrata con 3 cambi consecutivi di 10 volumi di PBS 1x. A questo punto si lascia sedimentare la resina e, dopo aver rimosso il supernatante, si aggiungono alla resina 20 ml di lisato (36 mg di proteine totali) contenente la proteina di fusione. Si lascia interagire il tutto per 1 ora a 4°C, dopo di che si impacca la colonna e contemporaneamente si raccoglie la frazione di proteine non legate. Il diametro della colonna utilizzata è 0,5 cm e, una volta impaccata la colonna, la resina raggiunge un'altezza di 3 cm. Quindi si lava la colonna per due volte con 10 volumi di PBS 1x. A questo punto si procede all'eluizione della proteina di fusione con 5 ml di glutatione ridotto (15 mM) in Tris-HCl 50 mM pH 8, lo si lascia interagire per 10' e successivamente si recuperano le frazioni eluite da 2 ml ciascuna (10 ml).

3.9.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

È stato preparato un gel alla concentrazione del 10% di Acrilammide/Bisacrilammide, secondo la metodica di Laemmli (1970) delle dimensioni di 83 x 58 x 0,75 mm. Il rapporto Acrilammide/Bisacrilammide è nel "Separating gel" di 12%: 0,32% e nello "Stacking gel" di 5%: 0,13%. I campioni vengono bolliti per 5' prima di essere caricati su gel. L'elettroforesi è condotta a 100 V costanti per circa 1 ora. Il gel è poi fissato in una soluzione di Metanolo 45% e Acido acetico 10% per almeno 30', in tal modo le proteine precipitano e l'SDS viene allontanato. Il gel viene colorato con Blue Coomassie per circa 10' e successivamente decolorato con vari cambi nella soluzione decolorante (Metanolo 35%, Acido acetico 10%).

3.9.5 Saggi di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio

Per analizzare l'emivita della 3'UTR del trascritto per H3.3 in presenza della proteina di fusione GST-PLAUF o della proteina GST, sono stati condotti saggi di stabilità *in vitro* in lisati

di reticolociti di coniglio (Promega). 3 μl di trascritto PCR1 (costituito da parte della 3'UTR del cDNA per l'istone H3.3 e precisamente dai nucleotidi 779-1006) marcato con ^{32}P e 2 μg di proteine sono stati aggiunti a 17,5 μl di lisati di reticolociti di coniglio commerciali e H_2O per raggiungere un volume di 25 μl ; la miscela è stata incubata a 30°C. Sono state prelevate aliquote di 4 μl a tempi diversi e sono stati purificati gli RNA totali mediante estrazione con fenolo-cloroformio e precipitazione con etanolo. I campioni sono stati analizzati su gel d'agarosio denaturante all'1,2%, trasferiti su membrana di nylon Hybond-N (Amersham) e il filtro è stato sottoposto ad autoradiografia. La quantità del segnale autoradiografico è stato analizzato per densitometria e riportato in percento rispetto a quello del t=0.

3.9.6 Preparazione del trascritto marcato

I subcloni utilizzati per la preparazione dei trascritti di cui si è misurata l'emivita sono stati preparati a partire dal clone 11C11 già disponibile in laboratorio, costituito dal vettore pCR-ScriptTM Amp SK(+) e da un inserto contenente parte della 3'UTR del cDNA per l'istone H3.3 (nucleotidi 779-1006).

Il trascritto H3.3 PCR1 è stato preparato a partire da 10 μg del plasmide 11C11PCR1 dopo linearizzazione con 40 U dell'enzima XhoI che ha un unico sito di taglio nel polilinker al 3' dell'inserto. Il DNA plasmidico viene precipitato mediante aggiunta di 2,5 v di etanolo assoluto in presenza di NaCl 0,3 M. La precipitazione viene effettuata lasciando il campione a -80°C per 30'. Successivamente la soluzione viene centrifugata per 30' a 14000 rpm in centrifuga Microfuge della Eppendorf ed il pellet ottenuto viene lavato con etanolo 70%. Dopo centrifugazione per 15' a 14000 rpm, il supernatante viene allontanato e i residui di alcool vengono fatti evaporare in concentratore Savant sotto vuoto. Il DNA viene infine risospeso in H_2O e la sua concentrazione determinata per assorbanza a $\lambda = 260 \text{ nm}$.

3.9.7 Trascrizione in vitro

1 µg di DNA plasmidico linearizzato è riscaldato a 70°C per 10' e poi incubato per 2 ore a 37°C in presenza dello specifico tampone fornito dalla casa produttrice, DTT 10 mM, CTP 1 mM, GTP 1 mM, ATP 1 mM, UTP 0,06 mM, 60 µCi di [α -³²P]UTP (400 Ci/mmol, Amersham), 40 U di RNA Polimerasi T3 (Promega). La reazione è bloccata con l'aggiunta di 5 U di DNasi priva di RNasi (Boheringer) mediante incubazione per 15' a 37°C. Il prodotto della reazione di trascrizione viene purificato mediante estrazione con 1 v di fenolo acido (AppliChem), precipitato con etanolo assoluto, lavato con etanolo 70% e quindi risospeso in 15 µl di H₂O trattata con DEPC.

Tabella 3.1: Elenco di tutti i primers utilizzati per PCR e saggi EMSA e loro sequenza (fw=forward; rv=reverse).

PRIMER	SEQUENZA	CLONE
PL11 (fw)	5' GGATCACTCAGAAGAATCAAAGG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL42 (rv)	5' TTGTCATCTTCTTGCTC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL52 (fw)	5' AGGCATTAGCTGCTGTGGCCTA 3'	CLONE CPP1b (1223 bp)
PL53 (rv)	5' GGGTCGCACTTTTAAGAGAC 3'	CLONE CPP1b (1223 bp)
PL55 (fw)	5' CGCTTTAATCCCACCTCGATAAC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL51 (rv)	5' CTAATTAGAGCAGCTGCCGTATC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL54 (fw)	5' CCCGATTACTCAAACCTCTAC 3'	CLONE CPPA (4533 bp)
ProPL1 (fw)	5' GGCATCTACCGCCAATATG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
ProPL2 (rv)	5' AGTTACGGGGAAGAGAGAAC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL4 (rv)	5' GGATGAATCCAAACCCTCTG 3'	CLONE PLAUF1 (AY590189)
PL71 (fw)	5' GGCATCTACCGCCAATATGACG3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL72 (rv)	5' CGGGGAAGAGAGAACATGCC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL32 (rv)	5' CCTCCACTGCCTTGCCGTAGCC 3'	CLONE PLAUF1 (AY590189)
PL35 (fw)	5' GGAGGTGGAGGAGGCTACGG 3'	CLONE PLAUF1 (AY590189)
Spe1 (fw)	5' ACAGGCCTGGAACAGTGT 3'	CLONE H3L
Spe2 (rv)	5' TAAGGCCCGATTGCAGCAC 3'	CLONE H3L
PL2 (rv)	5' ACACGTCTTTAGCGAGTG 3'	CLONE PLAUF1 (AY590189)
PL5 (fw)	5' CCTTGACGAACATCCCGGAGGAA3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
PL58 (fw)	5' TGAAGTCTGTAACTGCCCT 3'	CLONE CPPD (649 BP)
antiPL58 (rv)	5' AGGGCAGTTACAGCAGTTCA 3'	CLONE CPPD (649 BP)
NFY	5' TTCTGACCAATCAGAGAACGGG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
antiNFY	5' CCCGTTCTCTGATTGGTCAGAA 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
CREB	5' CCGCCAATATGACGTCATAGGA 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
antiCREB	5' TCCTATGACGTCATATTGGCGG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
OCT-1	5' GTATGTCGAAAATGCAAATTTTGGTGTGGC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
antiOCT-1	5' GCCACACCAAATTTGCATTTTCGACATAC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
CAAT	5' CATCTACCGCCAATATGACGTC 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
antiCAAT	5' GACGTCATATTGGCGGTAGATG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
TATA-BP	5' CGGCAGCTGCTCTAATTAGTATG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)
antiTATA-BP	5' CATACTAATTAGAGCAGCTGCCG 3'	CLONE CPP1a (1273 bp)

4. Risultati

4.1 Isolamento del promotore di *plauf*

In precedenza, nell'ambito dello studio della struttura genica di *plauf*, era stato già effettuato uno *screening* della *library* genomica di riccio di mare che aveva portato all'isolamento di un clone fagico contenente gran parte del gene, ma mancante della corta 5'UTR e della parte iniziale della sequenza codificante, che costituiscono il primo esone. Le regioni mancanti erano state individuate attraverso esperimenti di PCR effettuati direttamente sul DNA genomico.

Per isolare l'esone mancante e la zona di regolazione, è stato dunque effettuato un ulteriore *screening* della *library* genomica di riccio di mare, utilizzando come sonda la 5'UTR e una parte iniziale della regione codificante del gene *plauf*. Questo secondo *screening* ha portato all'individuazione di sette cloni fagici positivi all'ibridazione. Per le analisi successive è stato scelto il clone fagico corrispondente al segnale denominato 2A. Il clone fagico isolato è stato in seguito amplificato mediante infezione di altre cellule MRA-P2 per ottenere quantità sufficienti per le analisi successive.

Il DNA fagico purificato è stato digerito con l'enzima di restrizione EcoRI ed il prodotto di digestione è stato analizzato mediante elettroforesi su di un gel di agarosio allo 1% (figura 4.1a). Nonostante una parziale digestione, è stata inizialmente rilevata la presenza di cinque frammenti di diversa lunghezza: 0,6 kb, 1,2 kb, 2,0 kb, 2,2 kb e 4,5 kb.

Per identificare il frammento di interesse è stata poi effettuata un'analisi per Southern Blotting utilizzando la stessa sonda usata per lo *screening*. Dall'analisi è risultato evidente un segnale di ibridazione con la sonda in corrispondenza della banda di circa 1,2 kb (figura 4.1 b, corsia 1). È presente anche un segnale di ibridazione meno intenso in corrispondenza di una banda ad alto peso molecolare, probabilmente dovuto a digestione parziale del DNA fagico. Nella linea 3 è evidente il segnale del controllo positivo.

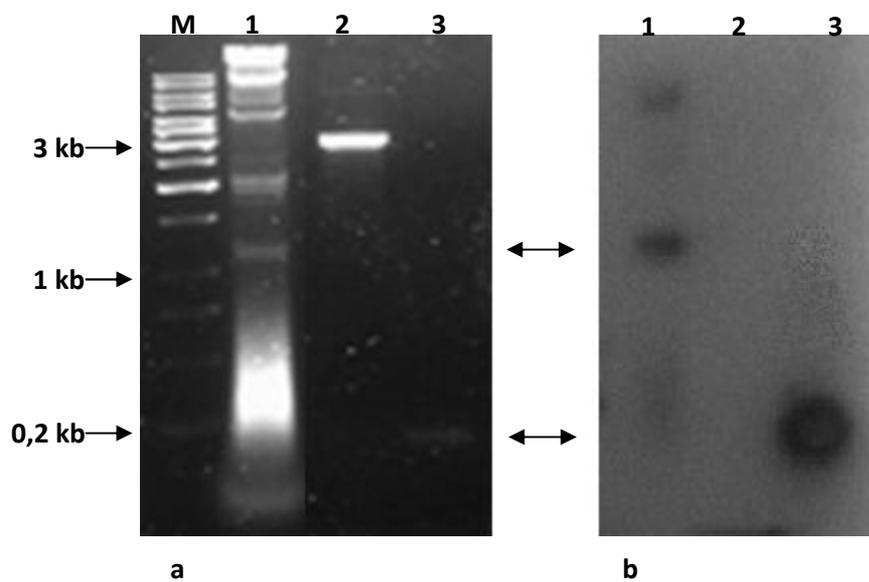


Figura 4.1: (a) Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dopo colorazione con bromuro di etidio.

Corsia 1: prodotto di digestione del DNA fagico con EcoRI; corsia 2: plasmide pBluescript KS(-) linearizzato (controllo negativo); corsia 3: sonda usata per lo *screening* (controllo positivo); M: marker di peso molecolare "1 Kb" (Fermentas).

(b) Autoradiografia dello stesso gel del pannello "a", dopo ibridazione.

Si è passati quindi a subclonare il frammento da 1,2 kb nel vettore plasmidico pBluescript KS(-). A questo scopo è stato utilizzato l'intero prodotto di digestione. Il vettore era stato precedentemente linearizzato con EcoRI e defosforilato all'estremità 5' con la fosfatasi alcalina di vitello per evitare che potesse richiudersi su se stesso senza includere l'inserto. I prodotti di ligasi sono stati utilizzati per trasformare cellule DH5α calcio-competenti. Queste cellule sono state piastrate su terreno LB contenente ampicillina, e sono state ottenute 10 colonie trasformanti. Il DNA plasmidico di queste colonie è stato estratto mediante miniprep ed i campioni sono stati sottoposti a digestione con EcoRI per estrarre i vari inserti.

I prodotti di digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi su un gel di agarosio all'1% (figura 4.2). Sono stati così ottenuti cloni contenenti soltanto i frammenti da 4,5 kb (corsie 1, 2 e 3), da 0,6 kb circa (corsie 4, 6 e 7), da 2,0 kb (corsia 5) e da 2,2 kb (corsie 8 e 9). Pertanto, proprio il frammento da 1,2 kb, che ibridava con la sonda, non era presente nei cloni isolati.

Si è quindi ripetuta la trasformazione utilizzando quantità maggiori sia di plasmide che di inserto e cellule DH5α elettrocompetenti. Sono state ottenute 199 colonie, sulle quali è stata effettuata una *colony hybridization* usando come sonda il primo esone di *plauf*.

Sono stati rilevati 22 segnali positivi e ne sono stati scelti tre che meglio coincidevano con le colonie corrispondenti sulla piastra. Da queste è stato estratto, mediante miniprep, il DNA plasmidico (cloni CPP1, CPP2 e CPP3), che è stato sottoposto a digestione con EcoRI ed i risultati sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'analisi elettroforetica ha mostrato che tutti i cloni ottenuti contenevano l'inserto da 1,2 kb.

Gli esperimenti sono proseguiti sul clone CPP1.

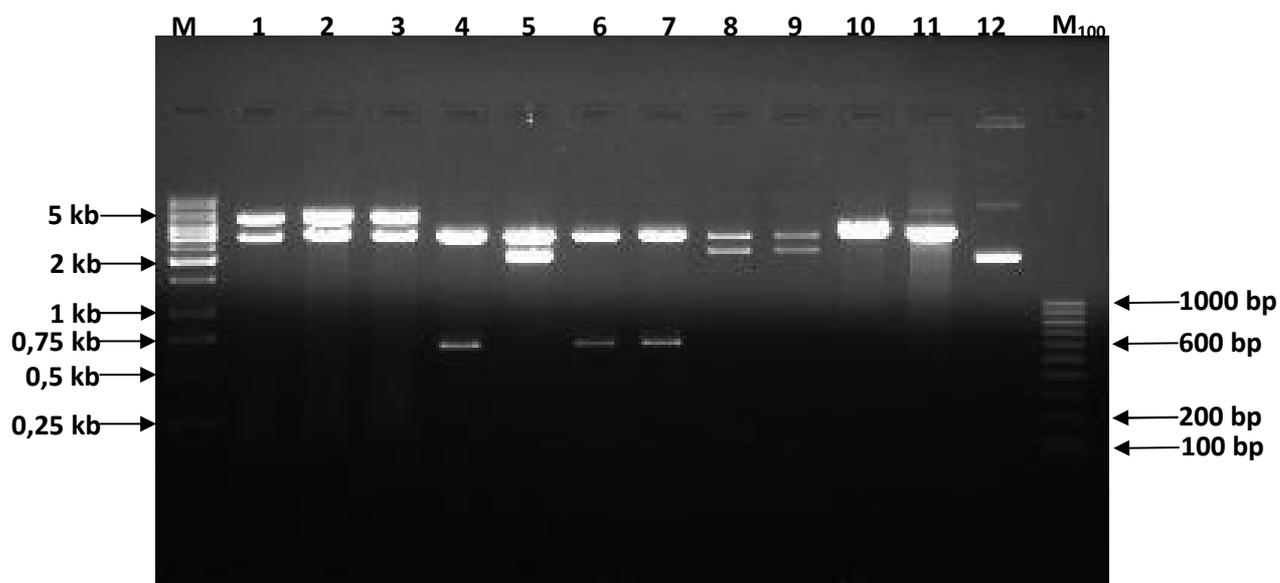


Figura 4.2: Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti di digestione delle minipreparazioni plasmidiche dopo colorazione con bromuro di etidio. Corsia 1: clone CPPA; corsia 2: clone CPPB; corsia 3: clone CPPC; corsia 4: clone CPPD; corsia 5: clone CPPE; corsia 6: clone CPPF; corsia 7: clone CPPG; corsia 8: clone CPPH; corsia 9: clone CPPI; corsia 10: clone CPPL; corsia 11: plasmide pBluescript linearizzato; corsia 12: plasmide pBluescript non digerito; M: marker *1kb* (Fermentas); M₁₀₀: marker 100 bp (Sigma).

4.2 Struttura del promotore

Nel sequenziamento del clone CPP1 è risultato che l'inserto contenuto non era costituito solo dal frammento da 1273 bp ma anche da un secondo frammento di simile lunghezza (1223 bp) separati da un sito di restrizione per l'enzima EcoRI. Tale costrutto poteva essere stato prodotto sperimentalmente durante la reazione di ligasi in cui si era utilizzato il vettore pBluescript KS(-) e tutto il prodotto di digestione fagica, senza aver separato i frammenti.

Per evidenziare l'altro frammento nei prodotti di digestione del DNA fagico 2A è stata dunque ripetuta l'analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 0,7%. Nella figura 4.3 risulta ora più visibile la presenza dei due frammenti di simile lunghezza.

Allo scopo di avere a disposizione cloni contenenti inserti singoli è stato pertanto necessario ottenere la digestione completa del DNA del clone CPP1 ed estrarre da gel le bande corrispondenti ai frammenti da circa 1200 bp; questi sono poi stati subclonati nel vettore plasmidico pBluescript KS(-) linearizzato con EcoRI e defosforilato all'estremità 5'.

Dopo trasformazione e selezione su terreno contenente ampicillina sono state ottenute una decina di colonie trasformanti, di cui ne sono state scelte cinque.

Per identificare quale dei due inserti fosse presente nei cloni ottenuti, è stata effettuata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primer PL11-PL42, situata sulla sequenza del frammento da 1273 bp e che produce un frammento da 203 bp, e la coppia di primer PL52-PL53, situata sulla sequenza del frammento da 1223 bp e che genera un frammento da 441 bp.

Dalla figura 4.4 è possibile osservare che sul subclone 1 è stato ottenuta un'amplificazione utilizzando la coppia di primer PL52 e PL53 (corsia 3) ed il frammento amplificato è della lunghezza attesa (441 bp), mentre sul subclone 2 è stato ottenuta un'amplificazione utilizzando la coppia di primer PL11 e PL42 (corsia 4).

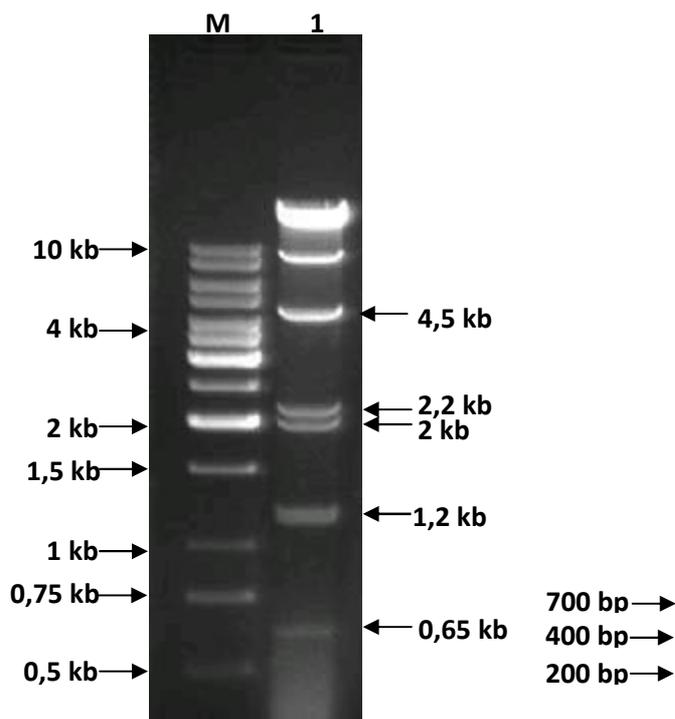


Figura 4.3: Elettroforesi su gel di agarosio allo 0.8% dei prodotti di digestione del DNA fagico 2A con l'enzima di restrizione EcoRI, dopo colorazione con bromuro di etidio.

Corsia 1: DNA del fago 2A, dopo digestione; M: marker di peso molecolare 1 Kb (Fermentas).

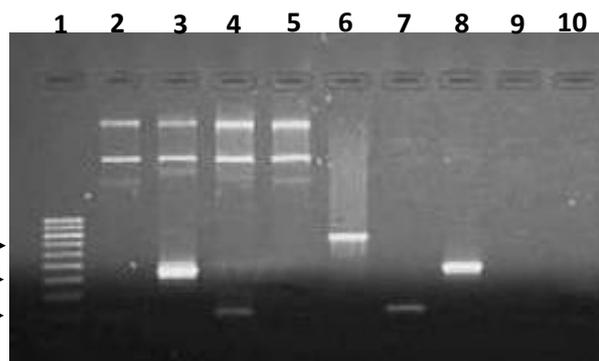


Figura 4.4: Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti di amplificazione mediante PCR sul DNA dei subcloni 1 e 2 e su DNA genomico di *P. lividus*. Corsia 1: Marker 100 bp; corsia 2: subclone 1 sottoposto ad amplificazione con la coppia di primer PL 11-PL 42; corsia 3: subclone 1 sottoposto ad amplificazione con la coppia di primer PL 52-PL 53; corsia 4: subclone 2 sottoposto ad amplificazione con la coppia di primer PL 11-PL 42; corsia 5: subclone 2 sottoposto ad amplificazione con la coppia di primer PL 52-PL 53; corsia 6: amplificazione su DNA genomico di *P. lividus* con la coppia di primer PL 55 e PL 53, rispettivamente presenti sul frammento da 1273 bp e da 1223 bp; corsie 7 e 8: controlli positivi effettuati su DNA genomico di *P. lividus*, rispettivamente con la coppia di primers PL 52-PL 53 e PL 11-PL 42; corsie 9 e 10: controlli negativi effettuati, rispettivamente, con la coppia di primers PL 52-PL 53 e PL 11-PL 42.

Nelle corsie 7 e 8 è possibile osservare i controlli positivi effettuati su DNA genomico utilizzando, rispettivamente, la coppia di primers PL11-PL42 e PL52-PL53 e nelle corsie 9 e 10 i relativi controlli negativi .

Per stabilire se i due frammenti da circa 1,2 kb fossero collocati in posizione adiacente sul genoma è stata effettuata una PCR su DNA genomico di *P. lividus* utilizzando la coppia di primer PL55 e PL53, rispettivamente presenti nel frammento da 1273 bp e da 1223 bp. Come mostrato in figura 4.4 (corsia 6) si è ottenuta una banda di amplificazione della lunghezza attesa; ciò ha suggerito che il frammento da 1223 bp segue quello da 1273 sul genoma.

Per mappare la disposizione degli altri cinque frammenti ottenuti nella digestione del clone fagico 2A è stato utile inizialmente il confronto eseguito in Banca Dati tra l'unica parte della regione promotrice presente nel frammento da 1273 bp (192 bp) con una sequenza posta a monte di un gene omologo in *Strongylocentrotus purpuratus*, utilizzando il programma di allineamento BLAST2seq (www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/seaurchin/). Tale allineamento ha evidenziato che la sequenza del promotore in questa zona è molto conservata (91% di identità) e si estende a monte per circa 30 bp nella parte 3' terminale del frammento da 4,5 Kb. Ciò ha suggerito che il frammento da 4,5 Kb è a monte rispetto a quello da 1273 bp.

Inoltre, allineando tutti gli esoni del gene *plauf* con la regione genomica di *S. purpuratus* in questione, è emersa un'alta similarità che si estende dalla zona promotrice fino all'esone 5. Ad oggi non è stato trovato nessun allineamento significativo dell'altra parte del gene *plauf* (esone 6-10), perché la *conting* genomica di *S. purpuratus* ritrovata è parziale.

Per confermare sperimentalmente che il frammento da 4,5 Kb preceda realmente quello da 1273 bp è stata effettuata una PCR su DNA genomico di *P. lividus* utilizzando la

coppia di primer PL51-PL54, rispettivamente presenti nel frammento da 4,5 kb e 1273 bp. Dalla reazione è stato ottenuto un frammento della lunghezza attesa (figura 4.5, corsia 2), confermando che il frammento da 4,5 Kb è al 5' rispetto al frammento da 1273 bp e contiene la maggior parte della zona promotrice del gene *plauf*.

Per identificare la posizione degli altri frammenti sul genoma (2,0 kb, 2,2 kb e 0,6 kb) è stato effettuato un sequenziamento direttamente sul clone fagico 2A, utilizzando degli oligo collocati in posizione terminale di ciascun frammento, la cui sequenza era stata ottenuta dal sequenziamento degli inserti dei singoli subcloni con primer presenti sui vettori. Si è quindi proceduti all'allineamento e alla sovrapposizione delle sequenze tra loro, fino a disegnare completamente la loro reale disposizione.

È emerso che il frammento da circa 0,6 Kb è posizionato a valle del frammento da 1223 bp ed a monte del frammento di circa 2,0 Kb, mentre il frammento da circa 2,2 Kb è a monte del frammento da circa 4,5 Kb.

Nella figura 4.6 è mostrata la reale disposizione di tutti i frammenti e l'esatta lunghezza dei frammenti sequenziati interamente. Si può notare che l'inserto del clone fagico isolato è lungo circa 12 kb e contiene circa 6,9 kb di regione *upstream*, 37 bp di 5'UTR, 149 bp di cds ed un lungo tratto corrispondente alla regione 5' del primo introne.

4.3 Caratterizzazione del promotore

Dopo aver identificato la collocazione completa dei sei frammenti nel genoma, si è proseguito il lavoro di caratterizzazione del promotore, sequenziando a doppio filamento l'intero frammento da circa 4,5 kb, utilizzando primers diversi disegnati di volta in volta sulla base della sequenza ottenuta. Il frammento è risultato lungo 4533 bp.

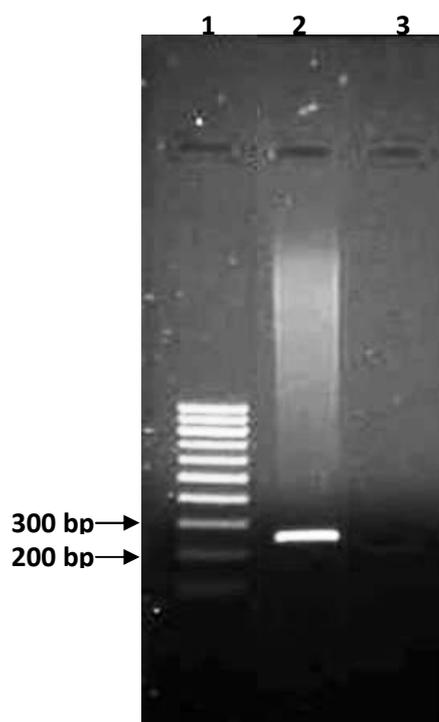


Figura 4.5: Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti di amplificazione mediante PCR su DNA genomico di *P. lividus*.

Corsia 1: Marker 100 bp; corsia 2: amplificazione su DNA genomico di *P. lividus* con la coppia di primer PL54-PL51, rispettivamente presenti sul frammento da 4,5 kb e 1273 bp; corsia 3: controllo negativo effettuato con la coppia di primer PL54-PL51.

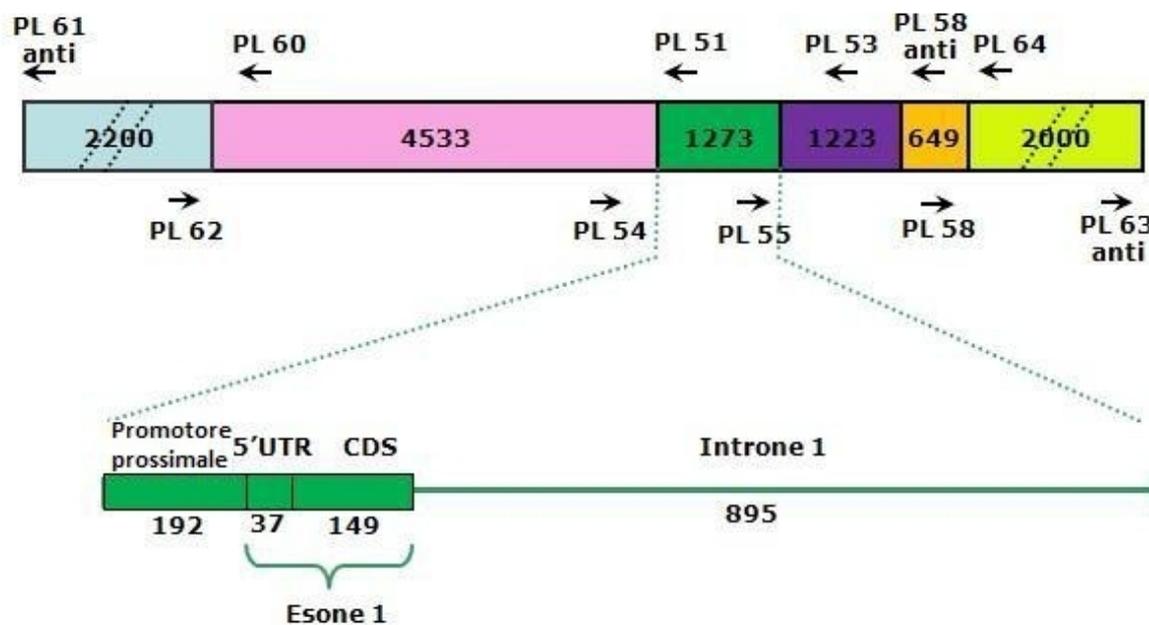


Figura 4.6: Rappresentazione schematica della disposizione di tutti i frammenti ottenuti dalla digestione con l'enzima EcoRI del DNA del clone fagico 2A.

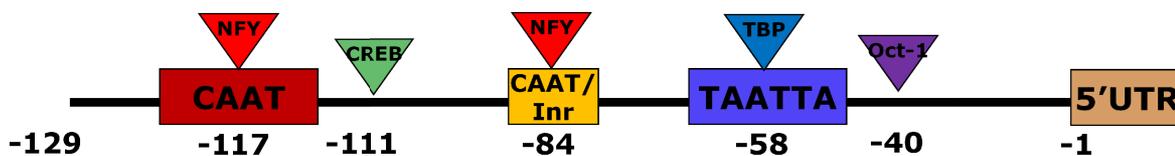


Figura 4.7: Rappresentazione schematica dei fattori di trascrizione putativi che possono riconoscere sequenze consenso nel promotore proximale di *plauf*.

L'analisi della sequenza regolativa a monte ha evidenziato che la regione del promotore prossimale contiene: una TATA box non canonica in posizione -58, una sequenza CAAT/Inr in posizione -84, una CAAT box in posizione -117. Numerose CAAT-box e CG-box ed un tratto ricco di polipirimidine sono presenti nella putativa regione regolativa a monte.

Per identificare i potenziali siti di legame di fattori trascrizionali sulla sequenza promotrice è stato utilizzato il programma MachtTM del pacchetto Transfac 6.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>), il quale contiene vaste informazioni sulla struttura, funzione e pattern di espressione di diversi fattori trascrizionali.

Nella figura 4.7 sono schematicamente rappresentati i fattori trascrizionali putativi leganti la regione -129/-1 di *plauf*, tra cui sono stati trovati quelli delle famiglie OCT, CREB, NFY ed TBP.

Sulla base di questi dati teorici, è stato effettuato un saggio di ritardo della mobilità elettroforetica o EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), utilizzando come sonda il frammento di 128 bp comprendente la zona -129/-1 della regione prossimale. Il frammento è stato ottenuto eseguendo un reazione di PCR con la coppia di oligo ProPL1-ProPL2 sul clone CPP1a contenente il frammento da 1273 bp.

Il saggio è stato effettuato con 1 ng circa di sonda marcata terminalmente e con 10 µg di estratti proteici da embrioni di *P. lividus* allo stadio di blastula, stadio di sviluppo in cui si accumula l'mRNA per PLAUF (fig. 4.8). Sono state così individuate almeno due bande di ritardo, suggerendo la presenza di uno o più fattori trascrizionali leganti la sequenza in questione a questo stadio di sviluppo. Tale legame risulta essere sequenza-specifico, in quanto le bande di ritardo scompaiono gradualmente in presenza di quantità crescenti (50x, 100x, 200x) di competitore specifico (corsie 3-5), ma non in presenza del competitore aspecifico (corsie 6-8). Questi risultati suggeriscono un legame

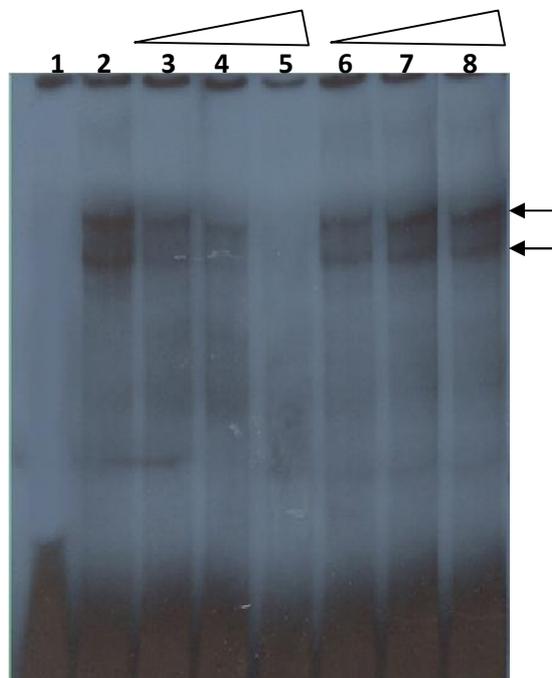


Figura 4.8: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni allo stadio di blastula e la sonda marcata corrispondente alla regione -129/-1 del gene *plauf*, in presenza ed assenza di quantità crescenti di competitori specifici e aspecifici.

Corsia 1: Sonda incubata in assenza di estratti proteici; corsia 2: Sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici; corsie 3-5: Sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici e quantità crescenti di competitori specifici in eccesso molare (50x, 100x, 200x); corsie 6-8: Sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici e quantità crescenti di competitori aspecifici in eccesso molare (50x, 100x, 200x).

sequenza-specifico della regione del promotore prossimale con più di un fattore di trascrizione, come predetto per via bioinformatica.

Si è quindi tentato di dimostrare quale tra i possibili fattori trascrizionali potessero essere presenti allo stadio di blastula. Sono stati ripetuti saggi EMSA utilizzando la stessa sonda di 128 bp marcata terminalmente, ma in presenza di quantità crescenti di oligonucleotidi competitori per CREB e Oct-1 in eccesso molare (50x, 100x, 200x) e TATA-BP e NFY (100x, 200x, 400x) (ta. 3.1).

Nella figura 4.9 è possibile osservare che le bande non scompaiono in presenza dell'oligonucleotide riconosciuto dal fattore trascrizionale CREB (corsie 3-5) mentre solo la seconda banda scompare in presenza di quantità crescenti dell'oligonucleotide riconosciuto dal fattore trascrizionale Oct-1 (corsie 6-8).

Nella figura 4.10 (corsia 2) sono evidenti le tre bande a mobilità elettroforetica ritardata, che non scompaiono in presenza dell'oligo riconosciuto dal fattore trascrizionale TATA-BP (corsie 3-5), mentre solo la prima banda scompare in presenza dell'oligonucleotide riconosciuto dal fattore trascrizionale NFY (corsie 6-8).

Questi risultati suggeriscono un legame sequenza-specifico dei fattori trascrizionali Oct-1 e NFY con la regione del promotore prossimale, mentre escludono un legame dei fattori trascrizionali CREB e TATA-BP.

Al fine di verificare i risultati ottenuti e di analizzare anche la CAAT-box non canonica localizzata a -117, si è dunque deciso di eseguire saggi EMSA utilizzando come sonde gli oligonucleotidi rappresentanti ognuno la presunta sequenza consenso riconosciuta dai vari fattori trascrizionali.

In particolare, si è deciso di condurre saggi EMSA solo per le sequenze che negli esperimenti precedenti risultavano competere specificamente con la sonda da 128bp,

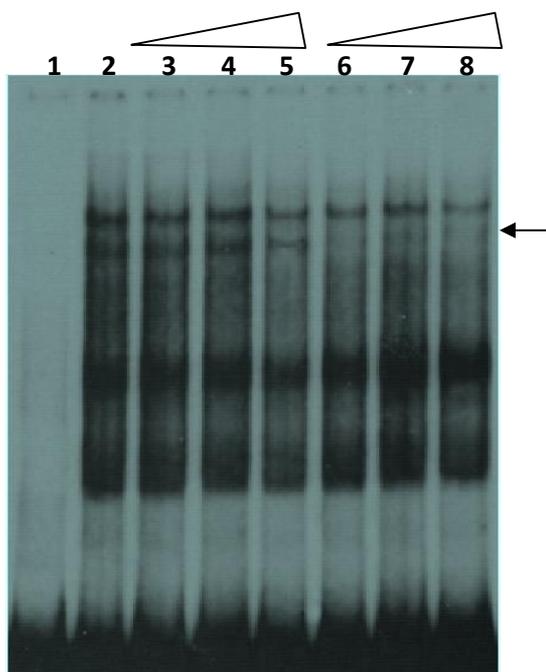


Figura 4.9: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni allo stadio di blastula e la sonda marcata corrispondente alla regione -129/-1 del gene *plauf*, in presenza ed assenza di quantità crescenti di competitori specifici.

Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratti proteici; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici e quantità crescenti del competitore specifico CREB in eccesso molare (50x, 100x, 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici e quantità crescenti di competitore specifico Oct-1 in eccesso molare (50x, 100x, 200x).

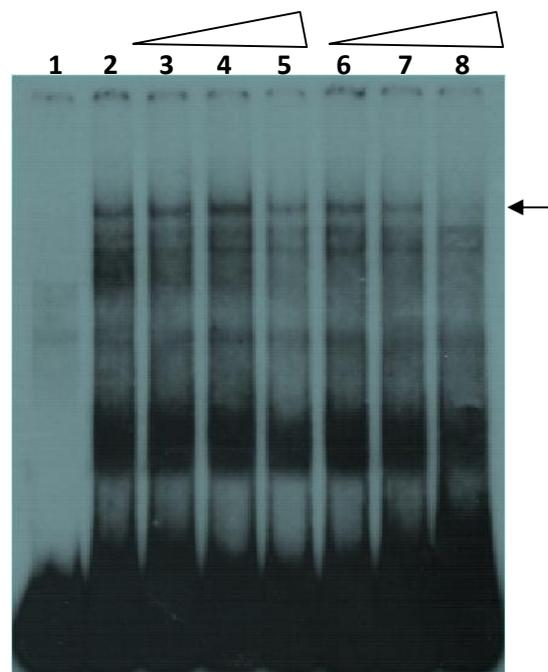


Figura 4.10: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni allo stadio di blastula e la sonda marcata corrispondente alla regione -129/-1 del gene *plauf*, in presenza ed assenza di quantità crescenti di competitori specifici.

Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratti proteici; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici e quantità crescenti del competitore specifico TATA-BP in eccesso molare (100x, 200x, 400x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratti proteici e quantità crescenti di competitore specifico NFY in eccesso molare (50x, 100x, 200x).

ovvero la sequenza CAAT/Inr riconosciuta dal fattore NFY e la sequenza ottamerica riconosciuta dal fattore OCT-1. Inoltre, è stato utilizzato lo stesso approccio per studiare la CAAT-BOX centrata a -117.

Il primo saggio EMSA (fig. 4.11) è stato condotto utilizzando la sonda oligonucleotidica marcata denominata NFY (tab. 3.1), corrispondente alla sequenza CAAT/Inr, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico e aspecifico in eccesso molare (50x, 100x, 200x). Come competitore aspecifico è stato utilizzato l'oligonucleotide (PL58/antiPL58) (tab. 3.1), contenente 23 bp del frammento da 649 bp, localizzato all'interno dell'introne 1 di *plauf*. La figura mostra una banda di ritardo (corsia 2) che scompare gradualmente in presenza di eccessi molari di competitore specifico (corsie da 3 a 5) e che permane in presenza di eccessi molari di competitore aspecifico (corsie 6 a 8). Come si può notare, è presente una seconda banda riferibile ad interazioni aspecifiche in quanto scompare anche in presenza di eccessi molari di competitore aspecifico. Questo risultato conferma che la sequenza CAAT/Inr, centrata a -89 nel promotore prossimale del gene *plauf*, è effettivamente coinvolta in interazioni specifiche con fattori proteici presenti allo stadio di blastula di *P. lividus* e che possa quindi essere coinvolta nella regolazione trascrizionale del gene.

Il saggio EMSA riportato in figura 4.12 è stato condotto utilizzando la sonda oligonucleotidica marcata (OCT1/antiOCT1), in presenza di quantità crescenti di competitore specifico e aspecifico in eccesso molare (50x, 100x, 200x). La figura mostra alcune deboli bande di ritardo (corsia 2) che scompaiono repentinamente in presenza di eccessi molari di competitore specifico (corsie da 3 a 5), ma scompaiono progressivamente anche in presenza di eccessi molari di competitore aspecifico (corsie da 6 a 8). Si può notare anche un'ulteriore banda riferibile ad interazioni aspecifiche in quanto scompare anche in presenza di eccessi molari di competitore aspecifico. Questo risultato ci induce ad ipotizzare

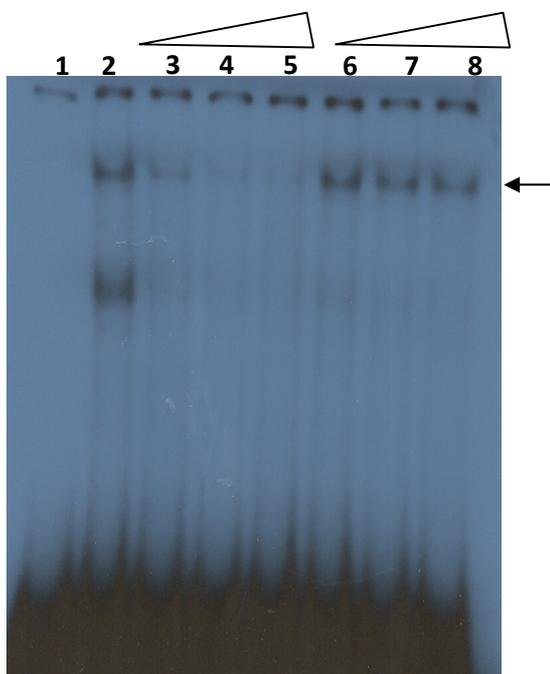


Figura 4.11: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni allo stadio di blastula e sonda marcata corrispondente alla CAAT/Inr centrata a -89, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico (NFY/antiNFY) e aspecifico (PL58/antiPL58).

Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratto proteico; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore specifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x).

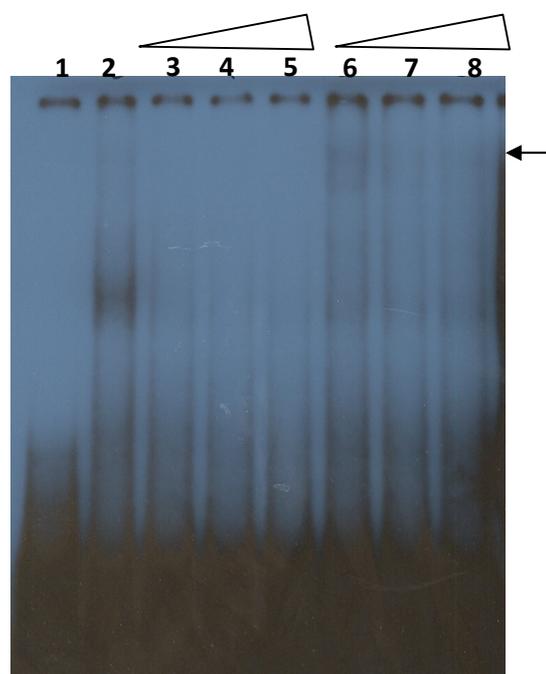


Figura 4.12: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni di blastula e sonda marcata corrispondente all'ottamero legato dal fattore trascrizionale OCT-1, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico (OCT1/antiOCT1) e aspecifico (PL58/antiPL58).

Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratto proteico; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore specifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x).

che qualora la sequenza ottamerica fosse legata dal fattore trascrizionale OCT-1, il suo legame non sarebbe molto stabile per lo meno nelle condizioni sperimentali utilizzate.

Il saggio EMSA di figura 4.13 è stato condotto utilizzando la sonda oligonucleotidica marcata (CAAT/antiCAAT) contenente la sequenza della CAAT-box non canonica localizzata a -117, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico e aspecifico in eccesso molare (50x, 100x, 200x). La figura mostra che non vi è nessuna banda di ritardo specifica (corsia 2); l'unica banda di ritardo osservabile è riferibile ad interazioni aspecifiche tra sonde e fattori proteici presenti nell'estratto, in quanto la banda scompare sia in presenza di eccessi molari di competitore specifico (corsie da 3 a 5) che aspecifico (corsie da 6 a 8).

Questi risultati confermano il ruolo del fattore trascrizionale NFY ma lasciano dubbi su quello del fattore OCT-1.

Si è deciso di proseguire con lo studio della medesima zona di regolazione allo stadio di gastrula, in quanto è noto da dati pregressi che il trascritto per *plauf* è ancora presente in concentrazioni significative a questo stadio di sviluppo.

Allo scopo, si è allestito un saggio EMSA utilizzando la sonda marcata da 128 bp e 10 µg di estratto proteico di embrioni di *P. lividus* allo stadio di gastrula, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico e di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x, 200x). Il competitore aspecifico di 180 bp è lo stesso utilizzato per l'esperimento analogo effettuato con proteine di blastula.

È stata evidenziata una banda a mobilità elettroforetica ritardata (fig. 4.14, corsia 2) che scompare repentinamente già in presenza di 50x di competitore specifico (corsie 3-5), ma permane in presenza di eccessi molari (50x, 100x e 200x) di competitore aspecifico (corsie 6-8).

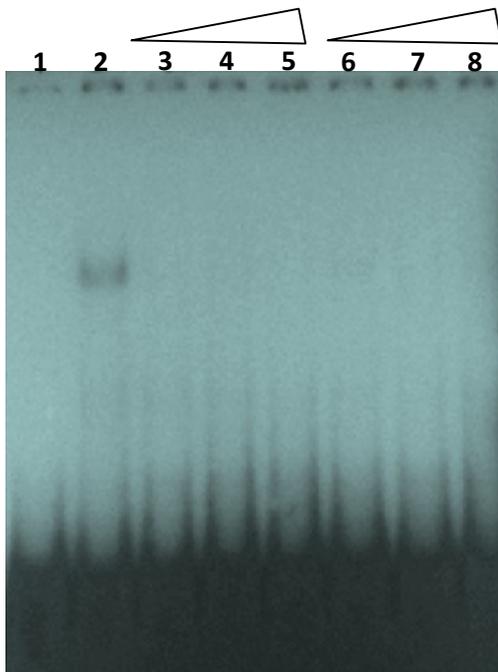


Figura 4.13: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni di blastula e sonda marcata corrispondente alla CAAT-box centrata a -117 lungo il promotore prossimale del gene *plauf*, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico (CAAT/antiCAAT) e aspecifico (PL58/antiPL58).

Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratto proteico; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore specifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x).

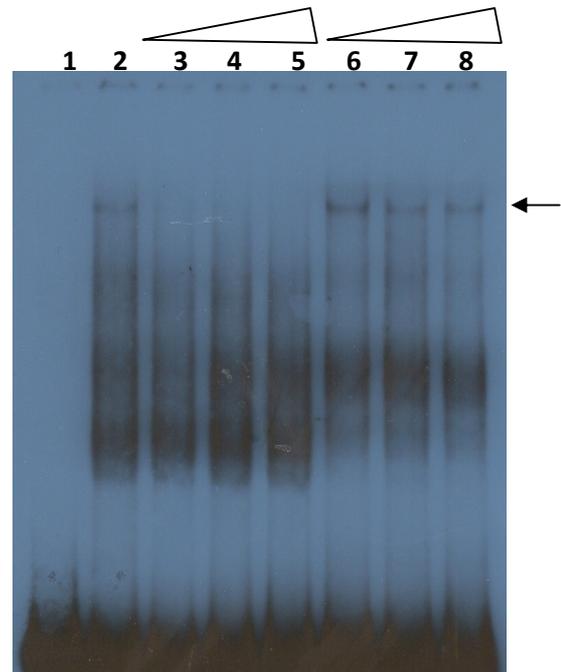


Figura 4.14: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni di gastrula e sonda marcata corrispondente alla regione -129/-1 del gene *plauf*, in assenza e presenza di quantità crescenti di competitore specifico e aspecifico. Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratto proteico; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico; corsie 3-5: Sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore specifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x).

Questo risultato suggerisce che allo stadio di gastrula vi sono ancora fattori proteici specifici leganti la zona promotrice prossimale del gene *plauf*.

Allo scopo di identificare il/i fattori trascrizionali, si è deciso di verificare se il ritardo fosse dovuto ancora alla presenza del fattore NFY che va a legare la CAAT/Inr.

Dunque, si è eseguito un saggio EMSA utilizzando la sonda oligonucleotidica marcata (NFY/antiNFY) con 10 µg di estratto proteico di embrioni di *P. lividus* allo stadio di gastrula, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico e aspecifico in eccesso molare (50x, 100x, 200x).

La figura 4.15 mostra una banda a bassa mobilità elettroforetica poco rilevabile, oltre alla formazione di una forte banda aspecifica (corsia 2) che scompare in presenza di eccessi molari sia di competitore specifico (corsie da 3 a 5) che aspecifico (corsie da 6 a 8).

Questo dato ci permette di concludere che allo stadio di gastrula il fattore trascrizionale NFY è presente in concentrazioni molto basse e ci induce a pensare che sia espresso qualche altro fattore proteico che va a legarsi ad un'altra sequenza localizzata lungo il promotore prossimale del gene *plauf*.

Per poter chiarire completamente la situazione allo stadio di gastrula, si è deciso di proseguire con saggi EMSA dove si sono utilizzate come sonde marcate le singole sequenze consenso presenti nel promotore prossimale del gene *plauf*.

Il saggio EMSA di figura 4.16 è stato condotto utilizzando la sonda oligonucleotidica marcata corrispondente alla sequenza consenso legata dal fattore trascrizionale CREB, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico e aspecifico in eccesso molare (50x, 100x, 200x). La figura 4.16 mostra una banda di ritardo (corsia 2) che scompare in presenza di eccessi molari di competitore specifico (corsie da 3 a 5) e che permane in presenza di eccessi molari di competitore aspecifico (corsie 6 a 8).

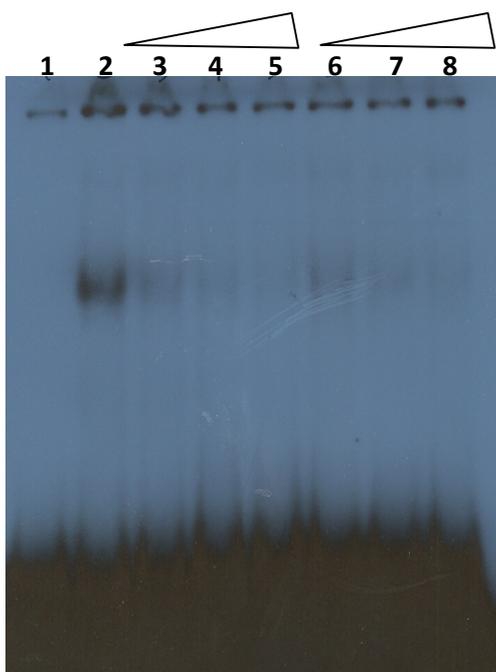


Figura 4.15: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni allo stadio di gastrula e sonda marcata corrispondente alla CAAT/Inr (sequenza legata dal fattore trascrizionale NFY), in presenza di quantità crescenti di competitore specifico (NFY/antiNFY) e aspecifico (PL58/antiPL58). Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratto proteico; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore specifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x).

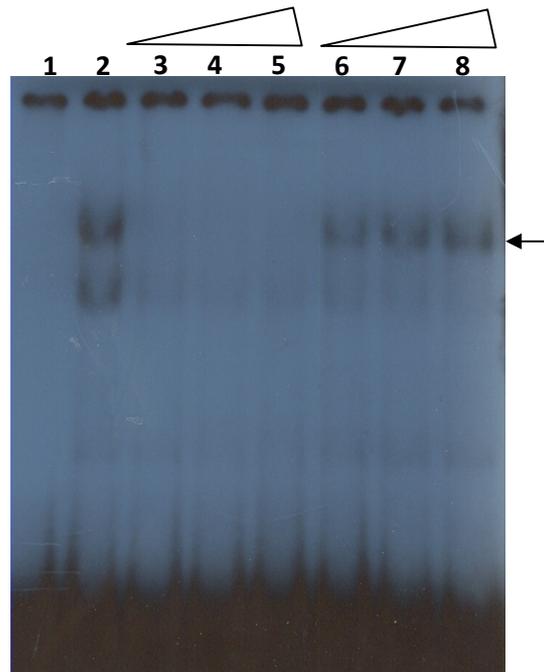


Figura 4.16: Autoradiografia di un saggio EMSA eseguito con 10 μg di estratti proteici da embrioni allo stadio di gastrula e sonda marcata corrispondente alla sequenza legata dal fattore trascrizionale CREB, in presenza di quantità crescenti di competitore specifico (CREB/antiCREB) e aspecifico (PL58/antiPL58). Corsia 1: sonda incubata in assenza di estratto proteico; corsia 2: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico; corsie 3-5: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore specifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x); corsie 6-8: sonda incubata in presenza di 10 μg di estratto proteico e quantità crescenti di competitore aspecifico in eccesso molare (50x, 100x e 200x).

Come si può notare è presente anche una seconda banda riferibile ad interazioni aspecifiche in quanto scompare anche in presenza di eccessi molarali di competitore aspecifico.

In base ai risultati *in vitro* finora ottenuti, si potrebbe ipotizzare che allo stadio di gastrula si attui una sostituzione di fattori trascrizionali, passando dal principale fattore trascrizionale NFY al fattore trascrizionale CREB.

4.4 Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

È noto in letteratura che la dimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 è associata a regioni della cromatina trascrizionalmente attive. Esperimenti di *Western Blotting* effettuati su istoni estratti da riccio di mare hanno dimostrato che l'anticorpo Antidimetil H3K4 umano, disponibile in commercio, è in grado di riconoscere anche gli istoni modificati del riccio di mare. Utilizzando quindi tali anticorpi, è stato messo a punto un protocollo di immunoprecipitazione della cromatina o ChIP (*Chromatin Immuno-Precipitation*) per studiare i livelli di interazione *in vivo* del promotore del gene *plauf* con l'istone H3 modificato nella lisina 4 per dimetilazione (H3K4). La tecnica è stata utilizzata su nuclei estratti da embrioni di riccio di mare allo stadio di blastula.

La cromatina frammentata per sonicazione è stata fatta interagire dapprima con il siero antidimetil H3K4 o con il siero non immune, e successivamente con la resina Protein A-Sepharose.

Sono state raccolte sia le frazioni legate ed eluite dalla resina, sia le frazioni non legate. Questi campioni sono stati sottoposti ad estrazione con una miscela di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico. Dopo estrazione, la concentrazione di DNA è stata determinata attraverso la misura dell'assorbanza al Nanodrop.

Al termine degli esperimenti di CHIP è stata recuperata una rilevante quantità di DNA nei campioni non legati alla resina trattata sia con anticorpi Antidimetil H3K4 (Unbound Antidimetil, UAd) che con siero non immune (Unbound non immune, UNI).

Dopo l'eluizione sono stati recuperati 2 µg di DNA dalla resina trattata con antidimetil H3K4 (Bound Antidimetil, BAd) ma nulla di determinabile dalla resina trattata con siero non immune.

30 ng di ciascun campione sono stati sottoposti ad amplificazione mediante *Real Time PCR*, utilizzando coppie di primers che amplificano la regione promotrice e la regione codificante del gene *plauf* (rispettivamente PL71-PL72 e PL32-PL35) e la coppia di primer Spe1-Spe2 della regione promotrice del gene H3L, utilizzato come controllo interno. Ciascun campione della CHIP è stato preparato in duplicato. Sono state preparate curve standard utilizzando quantità diverse dei DNA clonati delle tre regioni ($5 \cdot 10^{-1}$ pg, $5 \cdot 10^{-3}$ pg, $5 \cdot 10^{-5}$ pg); ogni standard è stato preparato in triplicato.

Dall'amplificazione mediante *Real Time PCR* sono stati ottenuti i valori di ciclo soglia o Ct (*Cycle threshold*) degli standard, che sono stati correlati alla quantità iniziale nota di DNA, tanto per le zone promotrice e codificante del gene *plauf*, quanto per la zona promotrice del gene H3L (figura 4.17).

Mediante *Real Time PCR*, inoltre, sono stati ottenuti i valori del ciclo soglia dei campioni che, attraverso le curve degli standard, hanno permesso di conoscere le quantità (esprese in fg) dei geni *plauf* e *H3L* presenti nei campioni (tabella 4.1).

Infine, per escludere l'esistenza di falsi positivi, tutti gli amplificati ottenuti mediante *Real Time PCR* sono stati controllati su un gel di agarosio all'1% (figura 4.18).

Si è così dimostrato che piccole quantità della regione promotrice e della cds del gene *plauf* sono state trattenute sulla resina trattata con l'anticorpo antidimetil H3K4; quindi

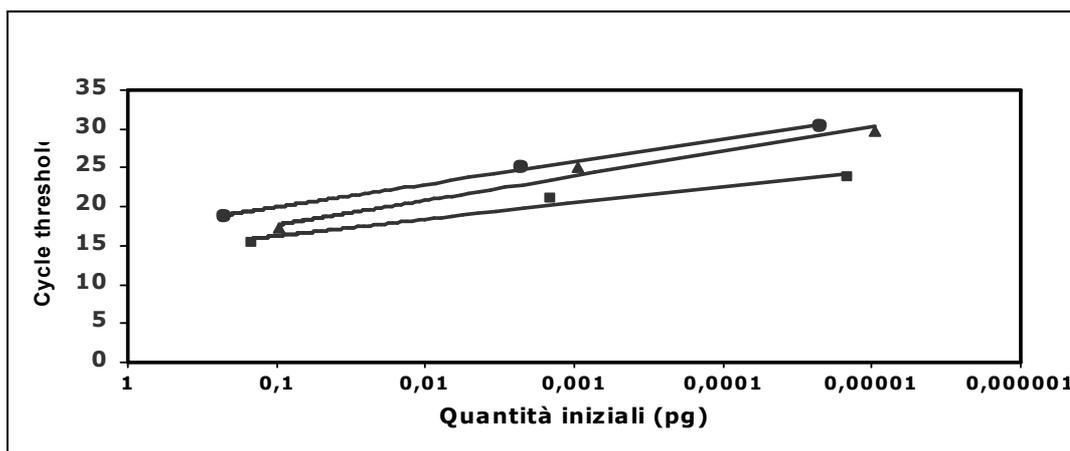


Figura 4.17: Nel grafico sono rappresentate le rette di taratura ottenute riportando i valori del ciclo soglia in relazione al log delle quantità (espresse in pg) della regione promotrice (■) e della sequenza codificante di *plauf* (▲) e del promotore del gene *H3L* (●) utilizzato come controllo interno.

Tabella 4.1: Valori dei cicli soglia (C_t) e corrispondenti quantità (Q) in fg delle regioni promotrice e codificante del gene *plauf* e della regione promotrice del gene *H3L* presenti nei campioni di blastula.

	C_t (Cycle threshold)	Q (fg)
BAd <i>H3L</i> (promotore)	25,28	1,53
BAd <i>plauf</i> (promotore)	19,82	2,05
BAd <i>plauf</i> (cds)	22,76	2,38

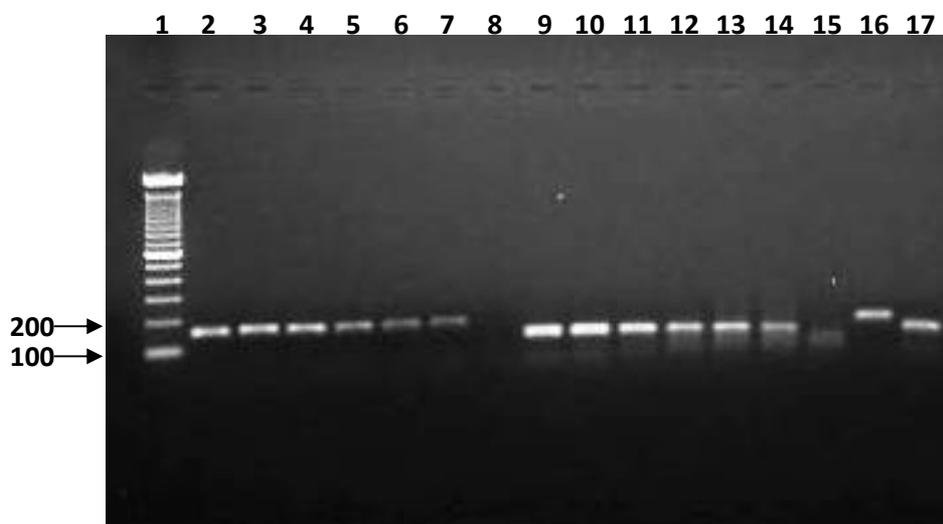


Figura 4.18: Elettroforesi su gel di agarosio all'1% di prodotti di amplificazione ottenuti mediante *Real Time PCR* sui campioni di DNA derivati dall'esperimento ChIP.

Corsia 1: Marker 100 bp; corsie 2-7: amplificati ottenuti su varie concentrazioni del clone CPP1 con la coppia di primer PL71-72; corsie 9-14: amplificati ottenuti su varie concentrazioni del clone H3L con la coppia di primer Spe1-Spe2; corsie 8 e 15: controlli negativi effettuati rispettivamente con la coppia di primers PL71-PL72 e Spe1-Spe2; corsia 16: amplificazione sul DNA legato alla resina (BAd) con la coppia di primer PL71-PL72; corsia 17: amplificazione sul DNA legato alla resina (BAd) con la coppia di primer Spe1-Spe2.

ambidue le regioni risultano associate a tratti di cromatina ricchi in H3K4 dimetilato e quindi trascrizionalmente attivi.

4.5 Studi funzionali *in vitro*

Allo scopo di ottenere la proteina PLAUF per studi funzionali la regione codificante del cDNA è stata clonata in un vettore di espressione. Si è utilizzato il vettore di espressione pGEX-2T sotto un promotore inducibile con IPTG: in questo sistema le proteine vengono espresse come proteine di fusione con la GST. In tale vettore è stata clonata parte della regione codificante della proteina dalla posizione 109 alla 1130, ottenuta mediante PCR con oligonucleotidi PL11 e PL2 su stampo del cDNA di PLAUF. Dopo trasformazione chimica dei batteri *E. coli* BL21, è stata verificata mediante PCR la presenza dell'inserto. L'espressione della proteina ricombinante è stata indotta nei batteri mediante IPTG. Dopo alcuni tentativi per la messa a punto dell'esperimento, si è ottenuta la proteina ricombinante da 60 kDa che è visibile nel lisato di batteri indotti con IPTG (fig. 4.19a, corsia 4) a differenza del lisato da batteri non indotti (fig. 4.19a, corsia 2). Nella corsia 3 è evidente la proteina GST di controllo espressa in batteri trasformati con il solo vettore pGEX-2T.

La proteina ricombinante GST-PLAUF è stata purificata mediante cromatografia di affinità su una colonna impaccata con Glutathione-Sefarosio e analizzata per SDS-PAGE. Una banda maggioritaria del peso molecolare atteso è stata eluita dalla colonna dopo l'aggiunta del glutathione (fig. 4.19b, corsie 5-10).

Allo scopo di caratterizzare il ruolo della regione ricca in glicina, presente nella proteina PLAUF, è stato necessario creare anche un costrutto con una delezione del tratto di cDNA codificante per tale regione. Si è utilizzato il clone pGEX-2T/PLAUF contenente quasi l'intero cDNA per PLAUF da cui è stata rimossa tale regione mediante doppia digestione con

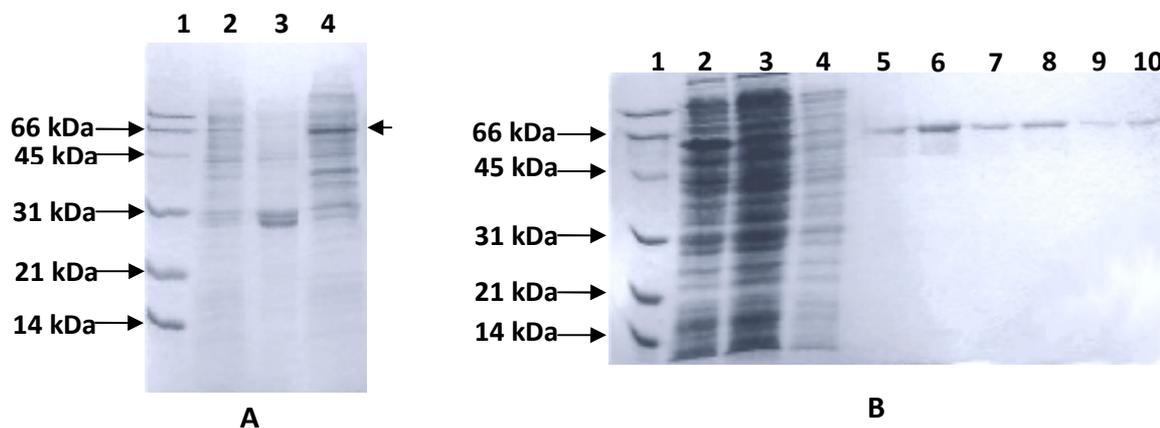


Figura 4.19: A) Elettroforesi su gel di poliacrilammide e colorazione con Coomassie Blue di estratti proteici da batteri prima e dopo induzione:

Corsia 1: marcatori di peso molecolare; corsia 2: lisato totale di batteri trasformati con pGEX-2T contenente il cDNA *plauf*, prima dell'induzione; corsia 3: lisato totale di batteri trasformati con il solo vettore pGEX-2T, dopo induzione; corsia 4: lisato totale di batteri trasformati con pGEX-2T contenente il cDNA *PLAUF*, dopo induzione.

B) Elettroforesi su gel di poliacrilammide e colorazione con Coomassie Blue dell'estratto proteico applicato su colonna Glutazione-Sefarosio e delle frazioni:

Corsia 1: marcatori di peso molecolare; corsia 2: lisato totale di batteri trasformati con pGEX-2T contenente il cDNA *plauf*, dopo induzione; corsie 3 e 4: frazione del lisato non legata alla colonna Glutazione-Sefarosio; corsie 9-10 frazioni eluite dalla colonna contenenti la proteina di fusione.

Smal ed EcoRI. Smal ha il sito di taglio interno all'inserto in posizione 760 ed EcoRI taglia nel vettore in posizione 940. La digestione rimuove una regione di 375 bp contenente anche il codone di stop della traduzione e ne crea uno nuovo a valle dell'inserto che provoca l'inserzione di tre amminoacidi aggiuntivi.

In seguito alla digestione il vettore con l'inserto deletato è stato richiuso su se stesso attraverso una reazione di ligasi e clonato in cellule batteriche. Il clone batterico così ottenuto è stato utilizzato per l'espressione della proteina GST- Δ PLAUF, priva della regione ricca in glicine, dopo induzione con IPTG e la proteina deletata è stata purificata come precedentemente descritto per la proteina completa.

Nella figura 4.20 è mostrato il risultato dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS sul quale sono stati analizzati i lisati totali dei batteri trasformati con il costrutto del vettore pGEX-2T/ Δ PLAUF, indotti (corsia 1) e non indotti (corsia 2). Inoltre è stato caricato l'ultimo lavaggio della colonna prima dell'eluizione con glutatione ridotto (corsia 3) e le 5 frazioni eluite dalla colonna (corsie 4-8). Come si vede dalla figura, l'induzione con IPTG porta all'espressione di una proteina di fusione di circa 54 kDa, assente nel lisato non indotto e presente invece nelle 5 frazioni eluite.

La proteina PLAUF, come le proteine AUF1 in altri organismi, potrebbe essere implicata nella modulazione dell'emivita dell'mRNA a cui si lega, caratterizzata da una lunga 3'UTR ricca in AU. Allo scopo di verificare la possibile implicazione di PLAUF nella regolazione dell'emivita del trascritto istonico H3.3, sono stati effettuati saggi di stabilità sul trascritto PCR1 (costituito da parte della 3'UTR del cDNA per l'istone H3.3 e precisamente dai nucleotidi 779-1006) in lisati di reticolociti di coniglio, in presenza della proteina GST-PLAUF o della sola GST come controllo. Come è mostrato in figura 4.21 almeno l'80% del trascritto PCR1 è degradato dopo 60 minuti. In presenza della proteina GST-PLAUF, la stabilità del

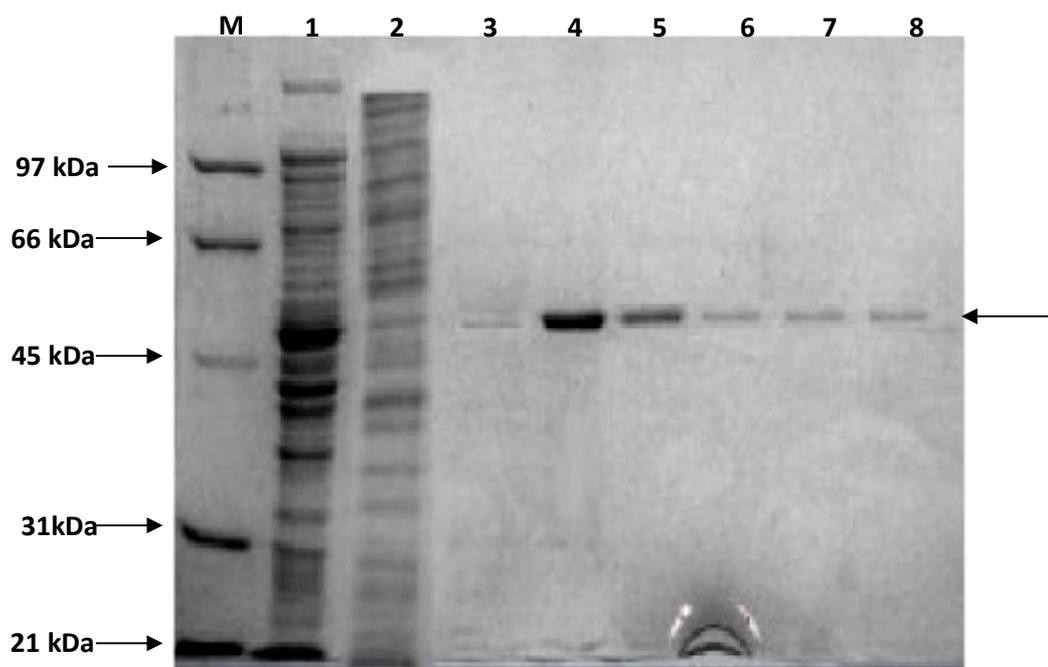


Figura 4.20: Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS dopo colorazione con Coomassie Blue dell'eluizione della colonna di Glutathione-Sefarosio.

M: marcatore di peso molecolare (Standard Low Range, Biorad); corsia 1: lisato totale di batteri trasformati con pGEX-2T/PLAUF Δ dopo induzione; corsia 2: lisato totale di batteri trasformati con pGEX-2T/PLAUF, prima dell'induzione; corsia 3: ultimo lavaggio della colonna contenente la frazione del lisato non legata alla resina Glutathione-Sefarosio; corsie 4-8: frazioni eluite dalla colonna contenenti la proteina GST- Δ PLAUF.

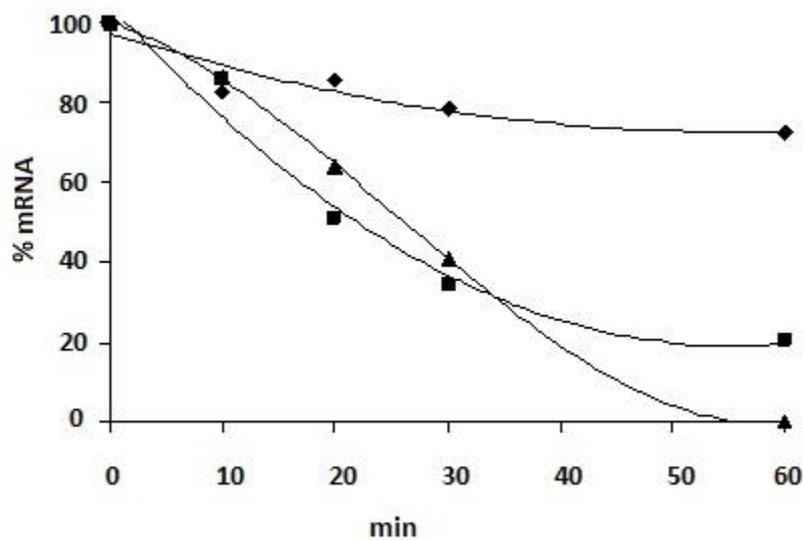


Figura 4.21: Grafico dell'andamento della stabilità del trascritto in presenza di GST-PLAUF (◆), in presenza di GST (▲) o in assenza di proteine (■); i dati riportati nel grafico rappresentano la media di tre esperimenti.

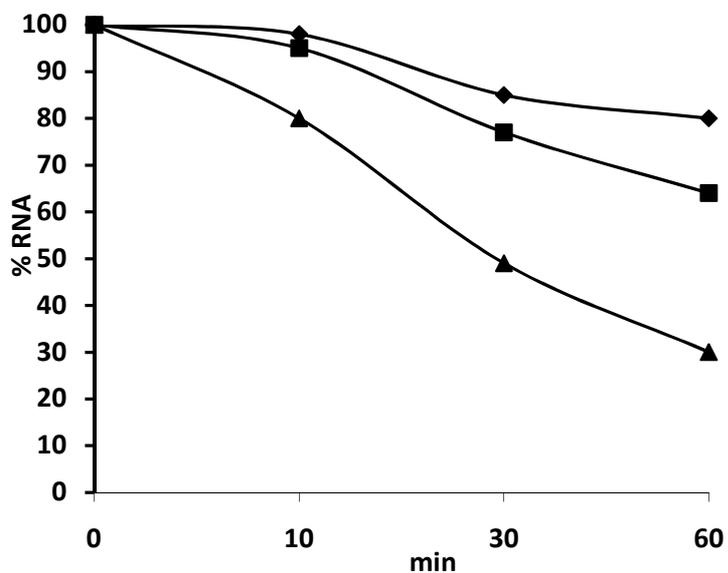


Figura 4.22: Stabilità del trascritto H3.3 PCR1 in presenza di GST-PLAUF completa (◆), in presenza di GST-PLAUF deleta (▲) o in assenza di proteine (■).

trascritto PCR1 aumenta almeno di tre volte, mentre la proteina GST purificata non ha nessun effetto protettivo. Questi dati indicano che il legame di PLAUF alla 3'UTR influenza la velocità di degradazione del trascritto per l'istone H3.3.

Anche la proteina deleta della regione *glycine-rich* è stata utilizzata in saggi di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio.

La figura 4.22 mette in evidenza come il trascritto H3.3 PCR1 marcato da solo abbia un'emivita più breve rispetto allo stesso trascritto in presenza della proteina deleta e della proteina completa. Ciò suggerisce che la regione ricca in glicina non svolga un ruolo fondamentale nella regolazione dell'emivita dei trascritti.

4.6 Studi funzionali *in vivo*

Allo scopo di determinare il ruolo della proteina PLAUF nello sviluppo embrionale del riccio di mare, sono stati effettuati esperimenti *in vivo* attraverso due approcci.

Dapprima sono stati effettuati saggi per monitorare l'effetto dell'antisiero anti-PLAUF sullo sviluppo degli embrioni, che sono stati trattati con quantità crescenti (50, 100 e 200 µg) di antisiero. Come controllo è stato osservato lo sviluppo degli stessi campioni in presenza delle medesime quantità di siero non immune. Il trattamento è stato eseguito a 15 ore di sviluppo, allo stadio di blastula non natante, mentre le osservazioni sono state effettuate a 45 ore di sviluppo. Gli embrioni trattati sono stati messi a confronto con embrioni di riccio di mare non trattati alle stesse ore di sviluppo (fig. 4.23a e b).

A 50 µg non si osservano alterazioni significative nello sviluppo degli embrioni rispetto agli embrioni non trattati.

A 100 µg di antisiero anti-PLAUF la maggior parte degli embrioni resta sul fondo poiché non riesce ad uscire dalla membrana di fecondazione.

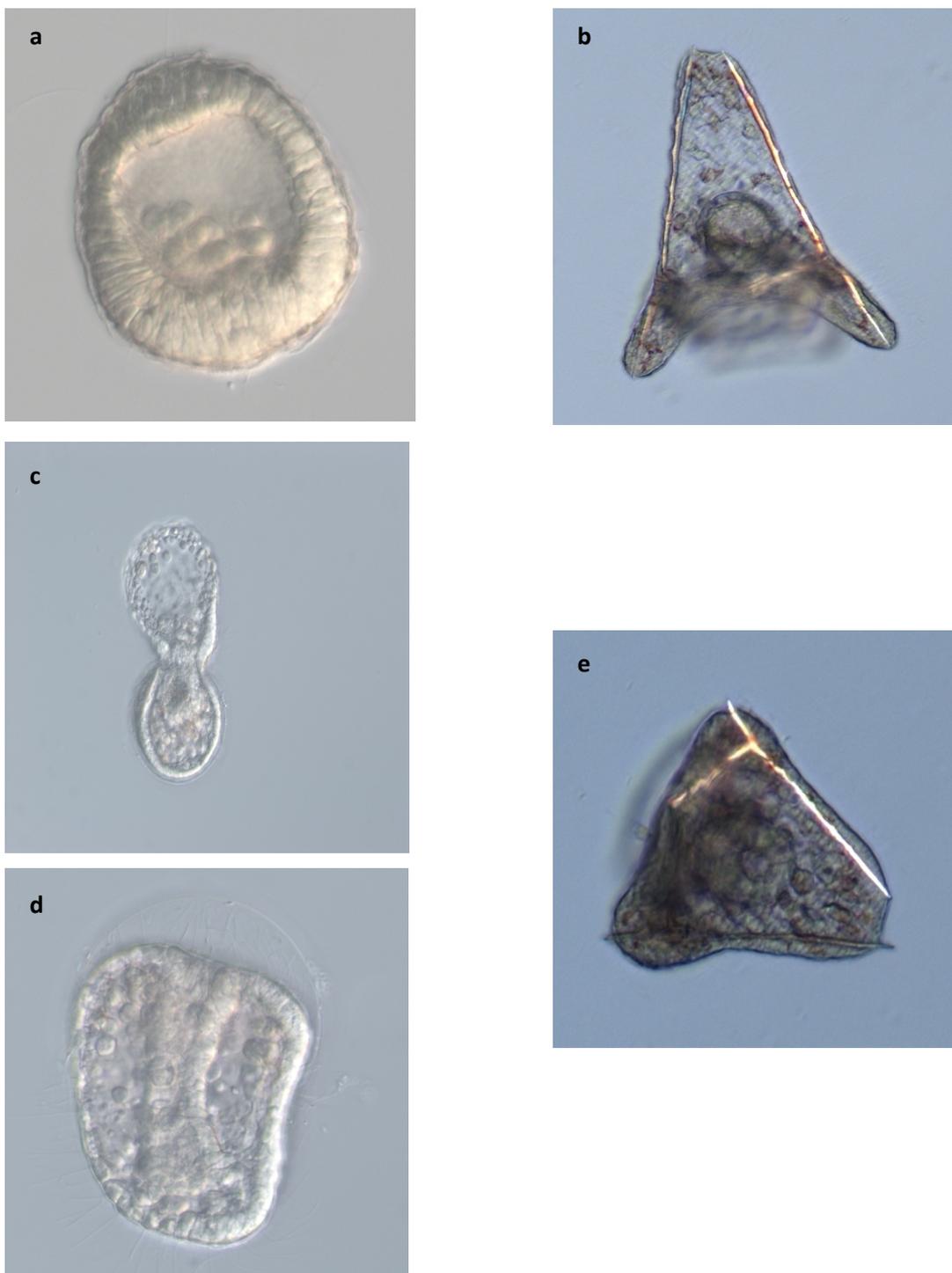


Figura 4.23: Embrioni di riccio di mare in saggio funzionale con anticorpi anti-PLAUF. **a e b:** embrioni non trattati agli stadi di blastula e pluteo; **c e d:** embrioni trattati con 200 µg di antisiero (45 ore di sviluppo); **e:** embrioni trattati con 200 µg di siero non immune di coniglio.

Gli effetti diventano ancora più evidenti quando 200 µg di antisiero sono aggiunte al mezzo: gli embrioni presentano grosse anomalie nello sviluppo, molte sono esogastrule ed alcuni si fermano allo stadio di gastrula/prisma (fig. 4.23c e d). Gli embrioni trattati con il siero non immune solo in piccola percentuale restano sul fondo e presentano lievi aberrazioni nello sviluppo, ma la gran parte di essi riesce a raggiungere lo stadio di pluteo (fig. 4.23e).

In seguito sono state effettuate microiniezioni, in uova non fecondate, di quantità crescenti di oligonucleotidi morfolino antisenso, allo scopo di effettuare il *knock-down* del gene *plauf* e monitorarne gli effetti sullo sviluppo degli embrioni. Come duplice controllo, sono state iniettate nelle uova non fecondate anche una soluzione priva del morfolino e contenente solo il colorante fluorescente (rodamina) utilizzato per la selezione degli embrioni, ed in altri una soluzione contenente morfolino senso. Le figure 4.24l e 4.25m mostrano embrioni di riccio di mare non trattati rispettivamente agli stadi di gastrula e pluteo.

Sono state effettuate iniezioni di morfolino senso e antisenso alle concentrazioni di 50, 100, 150 e 200 µM e sono stati monitorati gli effetti di tali iniezioni sugli embrioni fino a 48 ore di sviluppo.

Tali esperimenti di microiniezione comportano una letalità media del 10%, in quanto un embrione su dieci dopo le prime segmentazioni non procede ad alcun tipo di differenziamento nello sviluppo e risulta incapace di uscire dalla membrana di fecondazione. Non è stato pertanto tenuto conto di questi embrioni nella discussione degli effetti del morfolino. Inoltre, tutti gli embrioni iniettati, compresi quelli di controllo, presentano una riduzione dell'attività natatoria e un lieve ritardo nello sviluppo se paragonati ad embrioni non trattati.

Gli embrioni derivanti da uova iniettate con una concentrazione di morfolino antisenso pari a 50 μM (fig. 4.24a e 4.25a) non mostrano alterazioni significative, se paragonati a quelli iniettati con pari concentrazione di morfolino senso (fig. 4.24b e 4.25b) e a quelli iniettati con solo colorante rodamina (fig. 4.24c e 4.25c).

Gli embrioni iniettati con 100 μM morfolino antisenso presentano nel 50% dei casi delle lievi asimmetrie e una riduzione della mobilità agli stadi di gastrula e pluteo tale da risultare galleggianti ma non attivamente natanti (fig. 4.24d e 4.25d). Quelli iniettati con la stessa concentrazione di morfolino senso (fig. 4.24e e 4.25e) presentano solo un lieve ritardo nello sviluppo e una ridotta attività natatoria, ma non differiscono da quelli iniettati con sola rodamina.

Gli embrioni derivanti da uova iniettate con 150 μM morfolino antisenso presentano nel 70% dei casi una mancata o parziale gastrulazione, che risulta in embrioni privi di archenteron o con archenteron solo parzialmente sviluppato (fig. 4.24f). A 48 ore di sviluppo il 50% degli embrioni, pur avendo raggiunto lo stadio di pluteo, si presentano di dimensioni ridotte rispetto ai controlli e mostrano alcune alterazioni morfologiche: si può notare una ridotta estensione delle braccia orali e una riduzione dell'allungamento lungo l'asse dorso-ventrale (fig. 4.25f); un altro 5% conserva la simmetria raggiata ed è privo di braccia orali, benché la scheletogenesi sia avvenuta e siano visibili cellule pigmentate (fig. 4.25g), a dimostrazione del fatto che un processo differenziazione è ancora presente. Tutti gli embrioni presentano scarsa mobilità e dimensioni ridotte rispetto agli embrioni di controllo. Gli embrioni iniettati con 150 μM morfolino senso (fig. 4.24g e 4.25h) non presentano differenze rilevanti con quelli iniettati con concentrazioni di 50 o 100 μM .

Infine, embrioni derivanti da uova iniettate con 200 μM morfolino antisenso presentano mancata gastrulazione nel 90% dei casi e assenza di mobilità già a 24 ore di

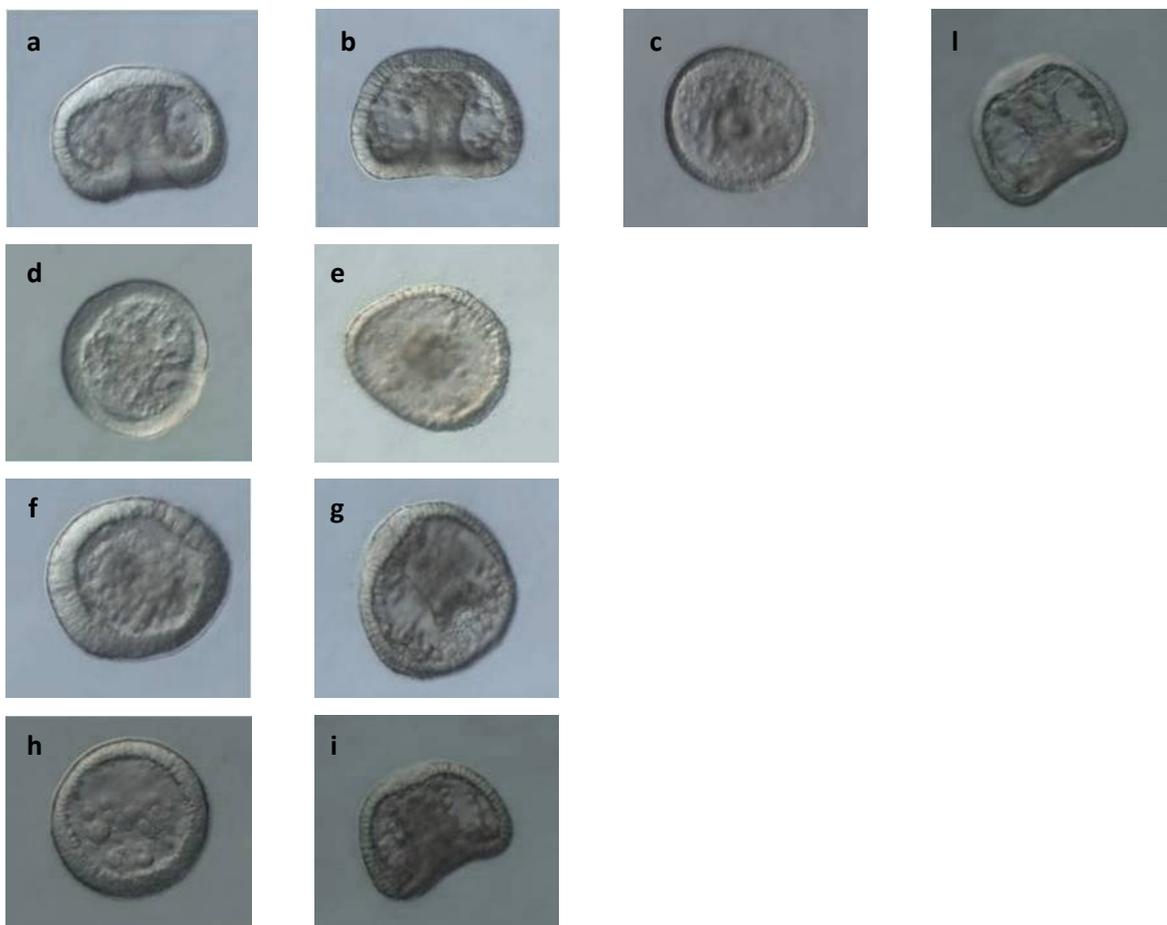


Figura 4.24: Embrioni di riccio di mare 24 ore dopo la fecondazione. Prima della fecondazione, le uova sono state iniettate con concentrazioni crescenti (50, 100, 150, 200 μM) di morfolino antisenso (a, d, f, h rispettivamente) e morfolino senso di controllo (b, e, g, i rispettivamente). In “c” è mostrato un embrione iniettato con una soluzione priva di morfolino. In “l” è mostrato un embrione non iniettato 24 ore dopo la fecondazione. La progressione dell’effetto è evidente.

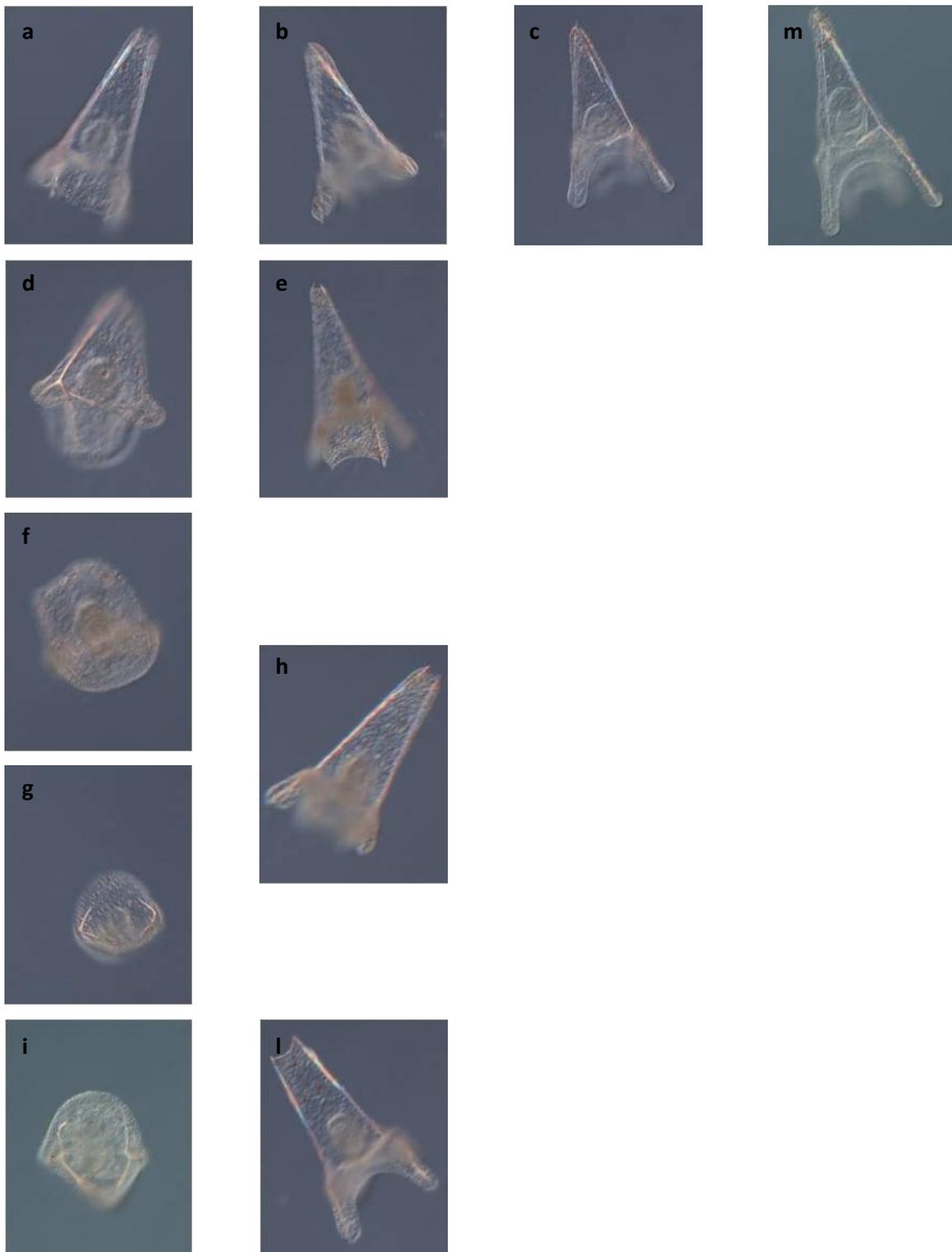


Figura 4.25: Embrioni di riccio di mare 48 ore dopo la fecondazione. Prima della fecondazione, le uova sono state iniettate con concentrazioni crescenti (50, 100, 150, 200 μM) di morfolino antisenso (a, d, f, g e i) e morfolino senso di controllo (b, e, h, l rispettivamente). In “c” è mostrato un embrione iniettato con una soluzione priva di morfolino. In “m” è mostrato un embrione non iniettato 48 ore dopo la fecondazione. La progressione dell’effetto è evidente.

sviluppo (fig. 4.24h). A 48 ore dalla fecondazione questi embrioni non presentano alcuna significativa differenziazione morfologica (fig. 4.25i). Tuttavia, anche a questa concentrazione sono visibili all'interno le spicole e alcune cellule pigmentate. Inoltre, tutti gli embrioni sono fermi sul fondo e non mostrano alcuna attività natatoria. Anche in questo caso, gli embrioni iniettati con una uguale concentrazione di morfolino senso (fig. 4.24i e 4.25l) non presentano alterazioni significative rispetto agli embrioni trattati con sola rodamina. In nessun caso è stato rilevato disturbo nello sviluppo dell'epitelio ciliato.

5. Conclusioni e Discussione

La proteina PLAUF è una delle poche *RNA-binding protein* identificate nel riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Pulcrano et al., 2005) e presenta numerose analogie con le proteine della famiglia AUF1 umana. Dai dati pregressi e da quelli analizzati nel presente lavoro, si può affermare che tali analogie non si limitano alla sequenza amminoacidica o all'organizzazione del gene, ma sembrano investire anche la sua funzione biologica.

Il gene *plauf* è organizzato in 9 introni e 10 esoni di diversa lunghezza, dei quali l'esone 9 può essere eliminato per *splicing* alternativo dando luogo ad una proteina più corta di 23 aminoacidi all'estremità C-terminale. Anche le AUF1 umane sono codificate da un gene, localizzato sul cromosoma 4, organizzato in 10 esoni e 9 introni (Wagner et al. 1998), che può essere sottoposto a diverse forme di *splicing*, dando luogo alla quattro isoforme conosciute di AUF1, denominate in base al peso molecolare p37_{AUF1}, p40_{AUF1}, p42_{AUF1}, e p45_{AUF1}. Esse si distinguono per la presenza o assenza di un tratto di 19 aminoacidi (codificato dall'esone 2) e di un tratto di 49 aminoacidi (codificato dall'esone 7). La p37 manca di entrambi gli inserti e la p40 contiene solo quello da 19 aminoacidi; la p42 è caratterizzata solo dall'inserto di 49 aminoacidi, mentre la p45 li contiene entrambi (Wagner et al., 1998).

Inoltre, PLAUF è codificata da almeno tre trascritti diversi, che possono essere generati mediante l'utilizzo di siti diversi di poliadenilazione e potrebbero subire una differente regolazione in quanto presentano 3'UTR diverse. Un meccanismo di questo tipo è stato già dimostrato per le AUF1, dove trascritti generati per *splicing* alternativo dell'esone 9 che presentano 3'UTR diverse possono essere regolati in modo differente: la presenza dell'esone 9 e dell'introne 9 regola negativamente l'espressione del gene *reporter* della luciferasi (Wilson et al., 1999).

Dall'analisi computazionale, inoltre, è emerso che un gene codificante una proteina omologa è presente anche nel riccio di mare *Strongylocentrotus purpuratus*, una specie ampiamente studiata presente nelle coste statunitensi e canadesi dell'oceano Pacifico, di cui è stato annotato l'intero genoma. Il confronto in banca dati ha rivelato che anche la regione del promotore prossimale è fortemente conservata nelle due specie.

Dal punto di vista funzionale, PLAUF sembra essere coinvolta nella regolazione dell'emivita di trascritti contenenti ARE, e in particolar modo nel turnover del trascritto per la variante istonica *cell-cycle independent* H3.3. Tale dato è stato ottenuto *in vitro* tramite saggi di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio, che dimostrano che la 3'UTR di H3.3 presenta un'emivita più lunga in presenza di PLAUF, espressa come proteina di fusione con GST. Nell'uomo, invece, in particolar modo p37_{AUF1} e p40_{AUF1} sono associate con l'accelerazione del turnover di mRNA contenenti ARE (Bevilacqua et al., 2003). Tuttavia, per conoscere il ruolo di PLAUF *in vivo* saranno necessarie ulteriori analisi, in quanto in letteratura viene riportato che l'effetto delle proteine AUF1 è principalmente destabilizzante sui trascritti a cui esse si legano; l'effetto però dipende dai rapporti tra le diverse isoforme delle AUF1 e dall'interazione con i partner proteici.

È pertanto ipotizzabile che, come avviene nel caso delle AUF1, anche PLAUF possa avere target multipli e possa interagire in concerto con altri partner proteici. A questo proposito è importante sottolineare che precedenti esperimenti di gel filtrazione dell'estratto proteico totale di embrioni di riccio di mare hanno dimostrato che la proteina da 32 kDa viene eluita nelle frazioni corrispondenti ad un peso molecolare superiore a 66 kDa, suggerendo che PLAUF faccia parte di un complesso.

La proteina PLAUF è caratterizzata da due motivi RRM, un motivo ricco in glutammina, un motivo RGG e un motivo ricco in glicina.

È noto che i due motivi RRM sono implicati nel legame all'RNA (Dreyfuss et al., 2002) e il motivo ricco in glutammina è coinvolto nell'interazione proteina-proteina (Escher et al., 2000). Il motivo RGG sembra svolgere un ruolo importante nella modulazione del legame all'RNA (Kzhyshkowska et al., 2001). Analisi bioinformatiche utilizzando il database Pfam (*Protein family database*) (Finn et al., 2008) hanno suggerito che, oltre ai motivi RRM, PLAUF possa presentare un dominio RVP (*Retroviral Aspartyl-Protease*), che è recentemente stato dimostrato essere richiesto per l'omodimerizzazione di DDI1 (*DNA Damage-Inducible 1*) un recettore coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare in *Saccharomyces cerevisiae* (Gabriely et al., 2008). È del resto noto che il motivo RRM di legame all'RNA è anche in grado di legare altre proteine (Fribourg et al., 2003).

Paragonando la proteina PLAUF alle AUF1, emerge chiaramente che la principale differenza strutturale risiede nell'assenza, all'estremità N-terminale di PLAUF, della regione ricca in alanina, nota per il ruolo svolto nel processo di dimerizzazione. PLAUF invece presenta un dominio ricco in glicina all'estremità C-terminale. Questo motivo è caratteristico di molte proteine che legano gli RNA.

In natura esistono varie proteine contenenti il motivo *Glycine-rich*; inizialmente sono state isolate nei Cianobatteri e successivamente nell'uomo, nel topo, in *Xenopus* e nelle piante (Czaplinski et al., 2005). Tali proteine sono espresse maggiormente in seguito a condizioni di stress, soprattutto di natura termica, e si accumulano prevalentemente a livello nucleare (Shinozuka et al., 2006).

Allo scopo di investigare il possibile ruolo di tale regione nella regolazione dell'emivita del trascritto per l'istone H3.3, sono stati condotti saggi di stabilità sul trascritto PCR1 in lisati di reticolociti di coniglio in presenza anche della GST-PLAUF deleta della regione *Gly-rich*. È risultato che circa il 70% del trascritto PCR1 è degradato dopo 60 minuti, ma la stabilità del

trascritto PCR1 aumenta in presenza della proteina GST-PLAUF completa e la proteina GST-PLAUF delecta si comporta in modo simile alla proteina completa. Questi dati indicano quindi che l'assenza della regione ricca in glicina non ha effetti rilevanti sulla capacità di PLAUF di influenzare l'emivita della 3'UTR per l'istone H3.3.

Nell'uomo, le AUF1 svolgono diversi ruoli cruciali, regolando l'espressione di molti geni sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. Uno studio recente (Palanisamy et al., 2008) ha dimostrato che oltre il 30% dei trascritti contenuti nella saliva umana presenta motivi AUUUA e che oltre il 70% di questi sono riscontrabili in carcinomi del cavo orale. È stato dimostrato che le AUF1 svolgono un ruolo chiave nella regolazione di questi trascritti.

Negli ultimi anni, si sono accumulate sempre più evidenze che assegnano alle AUF1 anche il ruolo di *DNA-binding protein*, con una funzione nella regolazione della trascrizione, come nel caso di rENK (Dobi et al., 2006), tramite meccanismi di interazione diretta o indiretta (Tolnay et al., 2002) con regioni *AT-rich* di DNA a doppio filamento.

Per determinare il ruolo *in vivo* della proteina PLAUF sono stati utilizzati due approcci.

Come primo approccio, sono stati condotti esperimenti trattando embrioni di riccio di mare allo stadio di blastula con siero anti-PLAUF. La presenza dell'antisiero provoca ritardi e aberrazioni nello sviluppo embrionale in un numero molto elevato di embrioni. Solo un numero molto basso di embrioni presenta ritardo quando viene utilizzato il siero non immune. Inoltre, un dato interessante è rappresentato dal fatto che il trattamento con antisiero sortisce effetto solo su embrioni allo stadio di blastula prima della schiusa, poiché questi non riescono ad uscire dalla membrana di fecondazione. L'aggiunta di antisiero non provoca, invece, alterazioni nello sviluppo di embrioni a stadi più avanzati. Certamente non è facilmente identificabile un particolare fenotipo ma il danno sullo sviluppo è evidente.

Come secondo approccio sperimentale si è utilizzato il silenziamento genico attraverso iniezione in uova non fecondate di oligonucleotidi morfolino antisenso. Sono state utilizzate concentrazioni crescenti (50, 100, 150 e 200 μM) di morfolino antisenso e, come controllo, di morfolino senso. Inoltre, è stato monitorato lo sviluppo di embrioni non iniettati e iniettati con una soluzione priva di morfolino. Anche in questo caso, è difficile identificare un fenotipo preciso, in quanto il danno sembra investire la capacità dell'embrione di differenziarsi e in particolar modo di specializzare la regione del polo vegetativo, dove si formano le braccia orali e l'intestino della larva. Tuttavia, la progressione dell'effetto, con l'incremento delle concentrazioni iniettate, è evidente negli embrioni trattati con morfolino antisenso e praticamente assente nei controlli, andando progressivamente da una riduzione della mobilità a ritardi e alterazioni nel processo di gastrulazione, a perdita della simmetria e infine ad assenza di differenziamento morfologico dell'embrione alle concentrazioni più elevate.

Un risultato interessante è dato dalla mancata formazione delle braccia orali, in quanto esperimenti precedenti di *whole mount in situ hybridization* avevano dimostrato che i trascritti per PLAUF e istone H3.3, suo presunto target, si localizzano entrambi soprattutto nella regione del polo vegetativo e, più tardi, delle braccia orali e dell'archenteron.

Se la funzione di PLAUF è proprio quella di regolare l'emivita del trascritto per l'istone H3.3, non sorprende che il suo silenziamento possa avere effetti letali sullo sviluppo del riccio. La variante istonica H3.3 è stata infatti correlata con l'attivazione trascrizionale (Loyola & Almouzni, 2007) in quanto può sostituire l'istone H3 nella cromatina attiva trascrizionalmente ed è caratterizzato da un arricchimento di modifiche associate a stati di attiva trascrizione, come metilazione in K4 e acetilazione in K9. Questi risultati hanno portato

all'ipotesi dell'*H3 barcode*, secondo cui le diverse varianti dell'istone H3 marcano la cromatina in stadi trascrizionali diversi (Hake & Allis, 2006).

Inoltre, di recente è stato dimostrato che AUF1 interagisce con il complesso di rimodellamento della cromatina (Lee et al., 2008), svolgendo un ruolo fondamentale nel differenziamento neurale.

Non è pertanto sorprendente che il morfolino (e il siero anti-PLAUF) abbia effetti diffusi e comprometta il differenziamento in embrioni di riccio ai primi stadi di sviluppo, quando è richiesta una "esplosione" di attivazione trascrizionale che deve portare l'embrione allo sviluppo e al differenziamento.

Come detto in precedenza, tuttavia, lo stato cromatinico di geni in attiva trascrizione può essere influenzato dalla sostituzione della variante H3.3 all'istone replicativo H3. Alla luce di questo dato, è particolarmente interessante conoscere la regolazione dell'espressione del gene per la proteina PLAUF, in quanto questa, contribuendo a regolare H3.3, potrebbe avere effetto sullo stato trascrizionale di un gran numero di geni. Questo aspetto è stato affrontato attraverso due approcci: da una parte l'analisi dello stato cromatinico del gene *plauf* e dall'altra l'isolamento della regione *upstream* del gene e lo studio del promotore prossimale. Circa il primo approccio si è studiato il livello di dimetilazione dell'istone H3K4 della regione cromatinica contenente il gene *plauf* in embrioni allo stadio di blastula.

Il gruppo ϵ -amminico delle lisine può essere mono-, di- o tri-metilato e questi diversi stati di metilazione potrebbero rappresentare un livello di regolazione dell'espressione genica. La dimetilazione di H3 in posizione K4 potrebbe inibire la metilazione di altre lisine, tra le quali K9, in modo da impedire la formazione di regioni genomiche silenti, attivando di fatto la trascrizione (Ng et al., 2003). Ruthenburg e collaboratori (2007) hanno dimostrato

che la metilazione sulla lisina 4 (K4) ad opera della metilasi istonica SET7 comporta attivazione genica nell'uomo. In particolare la di-metilazione e la tri-metilazione dell'istone H3 sulla K4 sembra essere un marcatore epigenetico globale nelle regioni eucromatiche.

Per questo motivo, sono stati messi a punto esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina, al fine di analizzare lo stato cromatinico del gene *plauf* in nuclei estratti da embrioni di riccio allo stadio di blastula. Per immunoprecipitare la cromatina è stato scelto l'anticorpo anti-Dimetil H3K4, data la maggiore diffusione della dimetilazione all'interno di regioni trascritte rispetto alle altre modifiche istoniche per metilazione (Sims III et al., 2003). L'antidimetil H3K4 commerciale è rivolto contro l'H3K4 umano, ma abbiamo dimostrato che è in grado di riconoscere specificamente anche l'istone H3 di riccio di mare, che presenta il 98% di identità con quello umano.

In ognuno degli esperimenti eseguiti non si sono mai ottenuti nell'eluizione quantità apprezzabili di DNA dalla resina trattata con siero non immune, invece è stato eluito DNA dalla resina trattata con antidimetil H3K4. Tale frazione di DNA quindi interagisce *in vivo* in embrioni allo stadio di blastula con cromatina contenente dimetil H3K4.

Esperimenti di amplificazione mediante *Real Time PCR* effettuati su tale frazione, utilizzando sia una coppia di oligo che amplificasse la regione promotrice sia una che amplificasse un tratto della sequenza codificante di *plauf*, indicano che ambedue le regioni del gene risiedono in un tratto di cromatina ricco in istone H3 dimetilato in K4 e quindi trascrizionalmente attivo allo stadio di blastula. Come standard interno è stata selezionata la regione promotrice del gene H3L, anch'esso espresso a stadi più avanzati.

Per il secondo approccio, è stato necessario isolare ed analizzare la regione regolativa del gene, che non era stata isolata attraverso lo *screening* della *library* genomica di *P. lividus*. Infatti, tale *screening* aveva portato all'identificazione dell'intero gene *plauf*, ad eccezione

del primo esone, del sito donatore di *splicing* del primo introne e della regione di controllo (Pulcrano et al., 2005). Per tale motivo è stato effettuato un ulteriore *screening* della *library* genomica, utilizzando come sonda il frammento corrispondente al primo esone contenente la 5'UTR e la parte iniziale della regione codificante del gene. L'analisi ha portato all'identificazione di un clone della lunghezza totale di circa 12 kb, che contiene un frammento di circa 1,2 kb che ibrida con la sonda utilizzata per lo *screening*. Tale frammento da 1273 bp contiene solo 192 nucleotidi appartenenti alla regione promotrice, ed è costituito principalmente dall'esone 1 e dalla regione donatrice dell'introne 1 (895 nucleotidi). Inoltre nel genoma è localizzato a monte dei frammenti da 1223 bp, da 649 bp e da circa 2 kb (fig. 4.8).

Se si somma la regione donatrice dell'introne di 895 bp presente nel frammento da 1273 bp ai frammenti da 1223 bp, da 649 bp, da 2 kb e ad almeno 990 bp del tratto accettore dello stesso introne presente nel fago isolato in precedenza, la lunghezza totale del primo introne risulta essere maggiore di 5700 bp, il più lungo degli introni completamente sequenziati nel gene PLAUF.

Effettuando un confronto con il gene AUF1 di *Homo Sapiens*, è stato possibile evidenziare che anche il primo introne del gene AUF1 è molto lungo e la sua lunghezza è di circa 13000 bp.

Il promotore prossimale così isolato è stato dapprima sottoposto ad analisi bioinformatica con il software Macht-Transfac. È risultato che la regione di regolazione a monte del gene PLAUF contiene: una TATA-box non canonica in posizione -58; una sequenza CAAT/Inr in posizione -84; una CAAT-box in posizione -117, riconosciuta dal fattore trascrizionale NFY; una sequenza ottamerica (5' TGCAAATT 3') riconosciuta dal fattore

trascrizionale OCT-1 in posizione -40; la sequenza 5' TGACGTC 3' riconosciuta dal fattore trascrizionale CREB in posizione -111 .

È stato da noi dimostrato che la regione promotrice -129/-1 del gene *plauf* è in grado di legare *in vitro* diversi complessi di fattori trascrizionali in maniera sequenza-specifica; su questa base è possibile ipotizzare che tali elementi siano coinvolti nella regolazione *in vivo* dell'espressione del gene. In particolare, l'interpretazione dei risultati forniti dai saggi di ritardo della mobilità elettroforetica ci ha portato ad ipotizzare che il promotore prossimale del gene *plauf* venga riconosciuto dai fattori trascrizionali NFY e OCT-1 allo stadio di blastula e forse dal solo fattore CREB allo stadio di gastrula. Tuttavia, i saggi condotti utilizzando oligonucleotidi forniscono risultati parzialmente discordanti per quanto riguarda il fattore OCT-1. Sotto questo aspetto, è possibile supporre che tale fattore, presente negli estratti proteici di blastula, come suggerito dai saggi EMSA con la sonda da 128 bp, formi un complesso meno stabile con l'oligonucleotide consenso, in quanto richiede altri cofattori interagenti con le sequenze laterali.

In base a quanto è stato rilevato attraverso questo approccio sperimentale, né la TATA-box non canonica ritrovata in posizione -58, né la CAAT-box in posizione -117 sembrano poter avere un ruolo nella regolazione dell'espressione di *plauf*.

Sembra invece particolarmente interessante la sostituzione che tali esperimenti hanno mostrato fra i due fattori trascrizionali NFY e CREB ai due stadi di sviluppo embrionale analizzati. In altri sistemi biologici, il destino di questi fattori trascrizionali e delle proteine AUF1 è fortemente intrecciato.

NFY, infatti, è una proteina eteromerică ubiquitaria legante CAAT composta da tre subunità: NFY-A, NFY-B, NFY-C, tutte essenziali per il legame al DNA. Fra i suoi target, sono conosciuti anche *c-jun*, un gene regolato a livello post-trascrizionale da AUF1, e *HSP70*, che

codifica per una proteina che affianca AUF1 nel complesso di rimodellamento cromatinico NuRD (Lee et al., 2008). Il fattore CREB è invece coinvolto nell'espressione del gene *c-fos*, che codifica un mRNA contenente ARE.

Questi dati possono essere interpretati sotto la luce della visione moderna dell'espressione genica come network integrato. Vari studi di RIP-chip hanno riportato che gli mRNA che codificano per *RNA-binding proteins* sono essi stessi fra i più comuni target di RBP in cellule di mammifero (Lopez de Silanes et al., 2004). Un'interpretazione di questi dati può essere che la "regolazione dei regolatori" può assicurare un sistema di bilanciamento auto-regolato e auto-limitato che assicuri la plasticità delle reti regolative post-trascrizionali in risposta a stimoli esterni (Mesarovic et al., 2004).

Allo stesso modo, PLAUF potrebbe essere al centro di una rete regolativa che può essere finemente regolata a seconda dello stadio di sviluppo embrionale e, quindi, delle esigenze dell'embrione in termini di attivazione trascrizionale. La sostituzione dei fattori trascrizionali coinvolti nell'espressione di *plauf* potrebbe rientrare in tale visione.

È stato recentemente dimostrato che le AUF1 mantengono in equilibrio la crescita cellulare regolando contemporaneamente l'espressione di geni oncosoppressori (p16 e p21) e di geni tumorali come DNMT1 (*DNA-MethylTransferase 1*), ed sono a loro volta regolate dal ciclo cellulare in diverse linee cellulari (Torrison et al., 2007).

Allo stesso modo si può ipotizzare che PLAUF influenzi l'espressione di H3.3 e sia a sua volta regolata in base agli stadi di crescita.

Data la complessità dei processi in cui PLAUF sembra operare e la quantità di interrelazioni che le proteine AUF1 umane presentano con altre macromolecole a funzione regolativa, solo ulteriori studi *in vivo* potranno gettare luce sulla sua reale importanza biologica.

Analisi ulteriori sui target della proteina PLAUF e sui partner con cui presumibilmente interagisce *in vivo*, potrebbero infine portare a disegnare la mappa di un sistema regolativo nell'embrione del riccio di mare. Dal momento che alle AUF1 sono state attribuite funzioni nella regolazione dell'espressione genica a molteplici livelli, dalla regolazione della stabilità degli mRNA (Brewer, 2002), alla trascrizione genica (Dobi et al., 2006), al rimodellamento della cromatina stessa (Lee et al., 2008), una sfida interessante sarà nei prossimi anni quella di unificare i diversi livelli di regolazione attraverso l'integrazione dei dati su larga scala (Brockmann et al., 2007).

6. Bibliografia

- Ahmad K. and Henikoff S. (2002). *The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly*. **Mol. Cell** 9: 1191–1200.
- Akhmanova A.S., Bindels P.C., Xu J., Miedema K., Kremer H., Hennig W. (1995). *Structure and expression of histone H3.3 genes in Drosophila melanogaster and Drosophila hydei*. **Genome** 38: 586-600.
- Albig W., Bramlage B., Gruber K., Klobeck H.G., Kunz J., Doenecke D. (1995). *The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B)*. **Genomics** 30: 264–272.
- Anantharaman V., Koonin E.V. and Aravind L. (2002). *Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism*. **Nucleic Acids Res.** 30: 1427–1464.
- Audic Y. and Hartley R.S. (2004). *Post-transcriptional regulation in cancer*. **Biol. Cell** 96: 479–498.
- Bakheet T., Williams B.R. and Khabar K.S. (2006). *ARED 3.0: The large and diverse AU-rich transcriptome*. **Nucleic Acids Res.** 34: D111–D114.
- Bakheet T., Frevel M., Williams B.R., Greer W. and Khabar K.S. (2001). *ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins*. **Nucleic Acids Res.** 29: 246–254.
- Barreau C., Paillard L. and H. Osborne B. (2005). *AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?* **Nucleic Acids Res.** 33: 7138–7150.
- Bevilacqua A., Ceriani M.C., Capaccioli S. and Nicolini A. (2003). *Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs*. **J. Cell. Physiol.** 195: 356-72.
- Breedon L.L. (2003). *Periodic transcription: a cycle within a cycle*. **Curr. Biol.** 13: 31–38.
- Brewer G. (2002). *Messenger RNA decay during aging and development*. **Ageing Res. Rev.** 1: 607-625.
- Brewer G. (1991). *An A+U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro*. **Mol. Cell Biol.** 11: 2460–2466.
- Brockmann R., Beyer A., Heinisch J.J., Wilhelm T. (2007). *Posttranscriptional expression regulation: What determines translation rates?* **PLoS Comput. Biol.** 3: e57.
- Burd C.G. and Dreyfuss G. (1994). *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins*. **Science** 265: 615-21.
- Butler J.S. (2002). *The yin and yang of the exosome*. **Trends Cell. Biol.** 12: 90–96.

- Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S. and Cerami A. (1986). *Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 1670–1674.
- Carrick D.M., Lai W.S., Blackshear P.J. (2004). *The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis.* **Arthritis Res. Ther.** 6: 248-264.
- Chaubet N., Clement B., Gigot C. (1992). *Genes encoding a histone H3.3-like variant in Arabidopsis contain intervening sequences.* **J. Mol. Biol.** 225: 569-574.
- Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L., Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M. and Karin M. (2001). *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs.* **Cell** 107: 451–464.
- Chen H., Hu B., Gacad M. A. and Adams J.S. (1998). *Cloning and expression of a novel dominant-negative-acting estrogen response element-binding protein in the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family.* **J. Biol. Chem.** 273: 31352-31357.
- Chen C.Y. and Shyu A.B. (1995). *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.* **Trends Biochem. Sci.** 20: 465–470.
- Chen C.-Y.A., Xu N. and Shyu A.B. (1995). *mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation.* **Mol. Cell Biol.** 15: 5777–5788.
- Chen C.-Y.A., Chen T.-M. and Shyu A.B. (1994). *Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function.* **Mol. Cell Biol.** 14: 416–426.
- Conne B., Stutz A. and Vassalli J.D. (2000). *The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology?* **Nature Med.** 6: 637–641.
- Czaplinski K., Kocher T., Schelder M., Segref A., Wilm M. and Mattaj I.W. (2005) *Identification of 40LoVe, a Xenopus hnRNP D family protein involved in localizing a TGF-beta-related mRNA during oogenesis.* **Dev. Cell.** 8: 505-515.
- David P.S., Tanveer R. and Port D.J. (2007). *FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1.* **RNA** 13: 1453-1468.
- de Boer E., Rodriguez P., Bonte E., Krijgsveld J., Katsantoni E., Heck A., Grosveld F., Strouboulis J. (2003). *Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100: 7480-7485.

- Dobi A., Szemes M., Lee C., Palkovits M., Lim F., Gyorgy A., Mahan M.A. and Agoston D.V. (2006). *AUF1 Is Expressed in the Developing Brain, Binds to AT-rich Double-stranded DNA, and Regulates Enkephalin Gene Expression*. **J. Biol. Chem.** 281: 28889–28900.
- Dreyfuss G., Kim V.N., Kataoka N. (2002). *Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 3: 195-205.
- Engel J.D., Sugarman B.J., Dodgson J.B. (1982). *A chicken histone H3 gene contains intervening sequences*. **Nature** 297: 434-436.
- Enokizono Y., Konishi Y., Nagata K., Ouhashi K., Uesugi S., Ishikawa F., Katahira M. (2005). *Structure of hnRNP D complexed with singlestranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by hnRNPD*. **J. Biol. Chem.** 280: 18862-18870.
- Escher D., Bodmer-Glavas M., Barberis A., Schaffner W. (2000). *Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans*. **Mol. Cell Biol.** 20: 2774-2782.
- Fasken M.B. and Corbett A.H. (2005). *Process or perish: quality control in mRNA biogenesis*. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 12: 482–488.
- Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coghill P.C., Sammut S.J., Hotz H-R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L.L. and Bateman A. (2008). *The Pfam protein families database*. **Nucleic Acids Res.** 36: D281–D288.
- Fribourg S., Gatfield D., Izaurralde E., Conti E. (2003). *A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex*. **Nat. Struct. Biol.** 10: 433-439.
- Fucci L., Aniello F., Branno M., Biffali E. and Geraci G. (1994). *Isolation of a new histone variant cDNA of P. lividus sea urchin: sequence and embryonic expression*. **Biochim. Biophys. Acta** 1219: 539-542.
- Gabriely G., Kama R., Gelin-Licht R. and Gerst J.E. (2008). *Different Domains of the UBL-UBA Ubiquitin Receptor, Ddi1/Vsm1, Are Involved in Its Multiple Cellular Roles*. **Mol. Biol. Cell** 19: 3625–3637.
- Garcia-Rodriguez L.J., Gay A.C. and Pon L.A. (2007). *Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast*. **J. Cell Biol.** 176: 197–207.
- Garneau N.L., Wilusz J. and Wilusz C.J. (2007). *The highways and byways of mRNA decay*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 8: 113–126.
- Gherzi R., Lee K.Y., Briata P., Wegmuller D., Moroni C., Karin M. and Chen C.Y. (2004). *AKH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery*. **Mol. Cell** 14: 571–583.

- Gingras A.C., Raught B. and Sonenberg N. (1999). *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. **Annu. Rev. Biochem.** 68: 913–963.
- Good P., Chen O., Warner S. and Herring D. (2000). *A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator*. **J. Biol. Chem.** 275: 28583–28592.
- Grigull J., Mnaimneh S., Pootoolal J., Robinson M.D., Hughes T.R. (2004). *Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals post transcriptional control of ribosome biogenesis factors*. **Mol. Cell. Biol.** 24: 5534–5547.
- Guo X., Gourronc F., Audic Y., Lyons-Levy G., Mitchell T. and Hartley R.S. (2008). *ElrA and AUF1 differentially bind cyclin B2 mRNA*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 377: 653–657.
- Gutierrez R.A., Ewing R.M., Cherry J.M. and Green P.J. (2002). *Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 11513–11518.
- Hake S.B., Allis C.D. (2006). *Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis"*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103: 6428–6435.
- Hake S.B., Garcia B.A., Duncan E.M., Kauer M., Dellaire G., Shabanowitz J., Bazett-Jones D.P., Allis C.D., Hunt D.F. (2006). *Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants*. **J. Biol. Chem.** 281: 559–568.
- Halbeisen R.E., Galgano A., Scherrer T. and Gerber A.P. (2008). *Post-transcriptional gene regulation: From genome-wide studies to principles*. **Cell. Mol. Life Sci.** 65: 798 – 813.
- Hawkins R.D. and Ren B. (2006). *Genome-wide location analysis: insights on transcriptional regulation*. **Hum. Mol. Genet.** 15: R1–R7.
- Hraba-Renevey S., Kress M. (1989). *Expression of a mouse replacement histone H3.3 gene with a highly conserved 3' noncoding region during SV40- and polyoma-induced G₀ to S-phase transition*. **Nucleic Acids Res.** 17: 2449–2461.
- Jenuwein T., Allis C.D. (2001). *Translating the histone code*. **Science** 293: 1074–1080.
- Johnson L., Mollah S., Garcia B.A., Muratore T.L., Shabanowitz J., Hunt D.F., Jacobsen S.E. (2004). *Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications*. **Nucleic Acids Res.** 32: 6511–6518.
- Kahvejian A., Svitkin Y.V., Sukarieh R., M'Boutchou M.N. and Sonenberg N. (2005). *Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms*. **Genes Dev.** 19: 104–113.

- Keene, J.D. and Lager, P.J. (2005). *Post-transcriptional operons and regulons co-ordinating gene expression*. **Chromosome Res.** 13: 327–337.
- Keene J.D. (1999). *Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96: 5–7.
- Kzhyshkowska J., Schütt H., Liss M., Kremmer E., Stauber R., Wolf H., Dobner T. (2001). *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1*. **Biochem. J.** 358: 305-14.
- La Cava A. and Albani S. (2000). Genetic immunization for the recovery and purification of recombinant proteins. **Protein Expr. Purif.** 18: 361-365
- Laemmli U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature** 227: 680–685.
- Lai W.S., Carrick D.M. and Blackshear P.J. (2005). *Influence of Nonameric AU-rich tristetraprolin-binding sites on mRNA deadenylation and turnover*. **J. Biol. Chem.** 280: 34365–34377.
- Lal A., Mazan-Mamczarz K., Kawai T., Yang X., Martindale J.L. and Gorospe M. (2004). *Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs*. **EMBO J.** 23: 3092–3102.
- Laroia G., Cuesta R., Brewer G. and Schneider R.J. (1999). *Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway*. **Science** 284: 499–502.
- Lee C., Gyorgy A., Maric D., Sadri N., Schneider R.J., Barker J.L., Lawson M. and Agoston D.V. (2008). *Members of the NuRD Chromatin Remodeling Complex Interact with AUF1 in Developing Cortical Neurons*. **Cereb. Cortex** 18: 2909-2919.
- Lope de Silanes, I. Fan J., Galbán C.J., Spencer R.G., Becker K.G., Gorospe M. (2004). *Global analysis of HuRregulated gene expression in colon cancer systems of reducing complexity*. **Gene Expr.** 12: 49–59.
- Loyola A. and Almouzni G. (2007). *Marking histone H3 variants: How, when and why?* **Trends Biochem. Sci.** 32: 425-433.
- Lu J.Y. and Schneider R.J. (2004). *Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay*. **J. Biol. Chem.** 279: 12974–12979.
- Lu J.Y. and Schneider R.J. (2003). *Nuclear import and export functions in the different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family*. **J. Biol. Chem.** 278: 20700–20707.

- Ma W.J., Cheng S., Campbell C., Wright A., and Furneaux H. (1996). *Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein*. **J. Biol. Chem.** 271: 8144–8151.
- Mangus D.A., Evans M.C. and Jacobson A. (2003). *Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression*. **Genome Biol.** 4: 1-14.
- Marzluff W.F. (2005). *Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts*. **Curr. Opin. Cell Biol.** 17: 274–280.
- Mata J., Marguerat S. and Bahler J. (2005). *Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective*. **Trends Biochem. Sci.** 30: 506–514.
- McKittrick E., Gafken P.R., Ahmad K. and Henikoff S. (2004). *Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101: 1525-1530.
- Mesarovic M.D., Sreenath S.N. and Keene J.D. (2004). *Search for organising principles: understanding in systems biology*. **Syst. Biol. (Stevenage)** 1: 19–27.
- Mito Y., Henikoff J.G., Henikoff S. (2005). *Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns*. **Nature Genetics** 37: 1090-1097.
- Moraes K.C., Quaresma A.J., Maehns K. and Kobarg J. (2003). *Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D)*. **Biol. Chem.** 384: 25–37.
- Mukherjee D., Gao M., O'Connor J.P., Raijmakers R., Pruijn G., Lutz C.S. and Wilusz J. (2002). *The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements*. **EMBO J.** 21: 165–174.
- Ng H.H., Robert F., Young R.A., Struhl K. (2003). *Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity*. **Mol. Cell.** 11: 709-19.
- Orphanides G. and Reinberg D. (2002). *A unified theory of gene expression*. **Cell** 108: 439–451.
- Paillard L. and Osborne H.B. (2003). *East of EDEN was a poly(A) tail*. **Biol. Cell** 95: 211–219.
- Palanisamy V., Park N.J., Wang J. and Wong D.T. (2008). *AUF1 and HuR Proteins Stabilize Interleukin-8 mRNA in Human Saliva*. **J. Dent. Res.** 87: 772–776.
- Peng S.S., Chen C.Y., Xu N., and Shyu A.B. (1998). *RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein*. **EMBO J.** 17: 3461–3470.

- Peng S.S., Chen C.Y. and Shyu A.B. (1996). *Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements*. **Mol. Cell Biol.** 16: 1490–1499.
- Puig S., Askeland E., Thiele D. (2005). *Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation*. **Cell** 120: 99–110.
- Pulcrano G., Leonardo R., Piscopo M., Nargi E., Locascio A., Aniello F., Branno M. and Fucci L. (2007). *PLAUF binding to the 3'UTR of the H3.3 histone transcript affects mRNA stability*. **Gene** 406: 124-33.
- Pulcrano G., Leonardo R., Aniello F., Mancini P., Piscopo M., Branno M. and Fucci L. (2005). *PLAUF is a novel P. lividus sea urchin RNA-binding protein*. **Gene** 347: 99-107.
- Raghavan A., Dhalla M., Bakheet T., Ogilvie R.L., Vlasova I.A., Khabar K.S., Williams B.R. and Bohjanen P.R. (2004). *Patterns of coordinate down-regulation of ARE-containing transcripts following immune cell activation*. **Genomics** 84: 1002–1013.
- Raghavan A., Ogilvie R.L. Reilly C., Abelson M.L., Raghavan S., Vasdewani J., Krathwohl M. and Bohjanen P.R. (2002). *Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes*. **Nucleic Acids Res.** 30: 5529–5538.
- Raineri I., Wegmueller D., Gross B., Certa U. and Moroni C. (2004). *Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference*. **Nucleic Acids Res.** 32: 1279–1288.
- Ruthenburg A.J., Allis C.D., Wysocka J. (2007). *Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark*. **Mol. Cell.** 25: 15-30.
- Sagesser R., Martinez E., Tsagris M. and Tabler M. (1997). *Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of cDNA expression library*. **Nucleic Acids Res.** 25: 3816-3822.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarkar S, Sinsimer KS, Foster RL, Brewer G, Pestka S. (2008). *AUF1 isoform-specific regulation of anti-inflammatory IL10 expression in monocytes*. **J. Interferon Cytokine Res.** 28: 679-691.
- Sarkar B., Xi Q., He C. and Schneider R.J. (2003). *Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform*. **Mol. Cell Biol.** 23: 6685–6693.
- Selinger D.W. Saxena R.M., Cheung K.G., Church G.M. and Rosenow C. (2003). *Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation*. **Genome Res.** 13: 216–223.

- Shinji, K. and Takeshi, M. (1992). *A protein binding to CArG box motifs and to single-stranded DNA functions as a transcriptional repressor*. **Gene** 119: 229-236.
- Shinozuka H., Hisano H., Yoneyama S., Shimamoto Y., Jones E.S., Forster J.W., Yamada T., Kanazawa A. (2006). *Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation*. **Mol. Genet. Genomics** 275: 399-408.
- Sims R.J. III, Nishioka K., Reinberg D. (2003). *Histone lysine methylation: a signature for chromatin function*. **Trends Genet.** 19: 629-639.
- Tagami H., Ray-Gallet D., Almouzni G., Nakatani Y. (2004). *Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis*. **Cell**. 116: 51-61.
- Tay N., Chan S.H. and Ren E.C. (1992). *Identification and cloning of a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like protein that functions as a transcriptional activator of the hepatitis B virus enhancer II*. **J. Virol.** 66: 6841-6848.
- Tolnay M., Juang Y.T., Tsokos G.C. (2002). *Protein kinase A enhances, whereas glycogen synthase kinase-3 beta inhibits, the activity of the exon 2-encoded transactivator domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D in a hierarchical fashion*. **Biochem. J.** 363: 127-136.
- Tolnay M., Baranyi L., and Tsokos G. C. (2000). *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 contains transactivator and DNA-binding domains*. **Biochem. J.** 348: 151–158.
- Tomari Y. and Zamore P.D. (2005). *Perspective: machines for RNAi*. **Genes Dev.** 19: 517–529.
- Torrisani J., Unterberger A., Tendulkar S.R., Shikimi K. and Szyf M. (2007). *AUF1 Cell Cycle Variations Define Genomic DNA Methylation by Regulation of DNMT1 mRNA Stability*. **Mol. Cell. Biol.** 27: 395–410.
- Wagner B.J., Demaria C.T., Sun Y., Wilson G.M. and Brewer G. (1998). *Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms*. **Genomics** 48: 195–202.
- Wang Y., Liu C.L., Storey J.D., Tibshirani R.J., Hershlag D. and Brown P.O. (2002). *Precision and functional specificity in mRNA decay*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 5860–5865.
- Waterborg J.H. (1990). *Sequence analysis of acetylation and methylation in two histone H3 variants of alfalfa*. **J. Biol. Chem.** 265: 17157-17161.
- Wilson G.M., Sun Y., Sellers J., Lu H., Penkar N., Dillard G. and Brewer G. (1999). *Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3'untranslated region*. **Mol. Cell. Biol.** 19: 4056-4064.

Wilusz C.J, Wormington M. and Peltz S.W. (2001). *The cap-to-tail guide to mRNA turnover*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2: 237-246.

Winzen R., Gowrishankar G., Bollig F., Redich N., Resch K. and Holtmann H. (2004). *Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR*. **Mol. Cell. Biol.** 24: 4835–4847.

Yang E. van Nimwegen E., Zavolan M., Rajewsky N., Schroeder M., Magnasco M. and Darnell J.E. (2003) *Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes*. **Genome Res.** 13: 1863–1872.

Zhang W., Wagner B.J., Ehrenman K., Schaefer A.W, Demaria C.T., Crater D., Dehaven K., Long L., and Brewer G. (1993). *Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1*. **Mol. Cell. Biol.** 13: 7652–7665.

Zubiaga A.M., Belasco J.G. and Greenberg M.E. (1995). *The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation*. **Mol. Cell Biol.** 15: 2219–2230.

Quello dei ringraziamenti è un esercizio forse abusato nei lavori scientifici. Tuttavia, posso sottrarmici proprio io? Penso di no.

E allora grazie alla prof.ssa Fucci, che mi ha guidato in questo non programmato viaggio all'interno della biologia molecolare; alla prof.ssa Piscopo, per la sua presenza umana e professionale; alla dott.ssa Branno della stazione zoologica, per la sua disponibilità e soportazione.

Grazie a tutti i compagni di viaggio, che sono troppi e non possono essere ricordati qui uno ad uno. Mi sento di nominare Mariachiara, che mi ha aiutato all'inizio del dottorato, Roberta, che ha condiviso con me tutto il percorso, e Diego, col quale ho spartito oneri e onori della fase finale; infine, i "dirimpettai" Aldo e Raffaele, gli altri membri della nostra piccola famiglia scientifica.

Alla mia famiglia bastano meno parole.

Questo lavoro è dedicato a mamma, papà e Desy, che sono le certezze viventi della mia esistenza (scusate se è poco) e a Lia, la luce sul mio sentiero. E alla memoria di Hari. Grazie a lei non dimenticherò mai da dove sono venuto.