

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

**TESI DI DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E
MOLECOLARE (XVIII CICLO)**

STUDIO DEL FATTORE NUCLEARE CBF1

Dottoranda: Dott.ssa Maria Carmela Lubrano

Relatore: Prof.ssa Adriana Furia

Coordinatore: Prof. Giuseppe D'Alessio

Anno 2005 - 2006

INDICE

ABBREVIAZIONI

SOMMARIO

SUMMARY

CAPITOLO I

INTRODUZIONE pag. 8

CAPITOLO II

MATERIALI E METODI pag. 20

2.1 Costruzione delle sonde di permutazione circolare pag. 20

2.2 Saggi EMSA e Analisi di permutazione circolare pag. 20

2.3 Costruzione di plasmidi per l'espressione dei mutanti di CBF1 pag. 21

2.4 Sintesi in vitro di proteine pag. 24

2.5 Saggio di *pull down* pag. 24

2.6 Analisi di RT-PCR pag. 25

2.7 Costruzione delle sonde di *phasing* pag. 25

2.8 Analisi di *phasing* pag. 26

2.9 Clonaggio della sequenza codificante la proteina Nrarp pag. 27

2.10 Espressione di proteine in batteri pag. 27

2.11 Isolamento e solubilizzazione corpi di inclusione pag. 28

2.12 Purificazione e *refolding* di *his tag*-TIG e *his tag*-Nrarp
su colonna cromatografica pag. 29

2.13 Ceppi batterici utilizzati pag. 29

2.14 Terreni utilizzati per la crescita di *E.coli* pag. 30

2.15 Antibiotici utilizzati pag. 30

CAPITOLO III

RISULTATI pag. 31

3.1 Caratterizzazione del frammento di CBF1 ottenuto per
proteolisi limitata pag. 31

3.2 Produzione ed analisi di mutanti di delezione di CBF1	pag. 32
3.3 Analisi EMSA dei mutanti di delezione	pag. 34
3.4 Il dominio TIG influenza la conformazione indotta nel DNA legato	pag. 35
3.5 Costruzione delle sonde di <i>phasing</i>	pag. 36
3.6 Analisi di <i>phasing</i> dei complessi CBF1/DNA e CBF1 Δ TIG/DNA	pag. 37
3.7 Influenza delle sequenze fiancheggianti sul <i>bending</i> del DNA indotto da CBF1	pag. 37
3.8 Analisi dei trascritti di CBF1	pag. 38
3.9 Espressione di Nrarp	pag. 39
CAPITOLO IV	
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 53
BIBLIOGRAFIA	pag. 55

ABBREVIAZIONI

IL-6	Gene dell'interleuchina 6
IL-6kB	sito di legame κB presente sul promotore dell'interleuchina 6
TBE 1X	Tris 90mM; acido borico 90mM; EDTA 4mM
EMSA	<i>Elettroforetic mobility shift assay</i>
NP-40	Nonidet P40
EDTA	Acido etilen-diammino tetracetico
DTT	ditiotreitolo
TE1X	Tris 10mM; EDTA 1mM
TNE1X	Tris 10mM; EDTA 1mM; NaCl 100mM
SDS	Sodio dodecil solfato
LB	Terreno batterico Luria-Bertani
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalattopiranoside
OD	densità ottica
T _m	temperatura di Melting
pSB10-20pH/CBF1	Plasmidi di <i>phasing</i> con il sito di legame per CBF1
CSL	famiglia di proteine a cui appartiene CBF1
CBF1	<i>C promoter binding factor</i>
TIG	<i>Transcription Ig-like factor</i>
BTD	<i>beta trefoil domain</i>
NTD	<i>N-terminal domain</i>
Nrarp	<i>Notch regulated ankyrin repeat protein</i>
ICN	Dominio citoplasmatico del recettore Notch
<i>his-tag</i>	coda di istidine clonata all'N-terminale
ΔCBF1(1-361)	mutante di CBF1 costituito dai primi 361 amminoacidi e quindi privo del dominio TIG
CBF1ΔTIG	CBF1 sottoposta a proteolisi limitata, mancante di parte della regione C-terminale (dominio TIG)
ΔCBF1(1-386)	mutante di CBF1 costituito dai primi 386 amminoacidi
ΔCBF1(1-414)	mutante di CBF1 costituito dai primi 414 amminoacidi

Δ CBF1(1-435)	mutante di CBF1 costituito dai primi 435 amminoacidi
Δ CBF1(360-500)	mutante di CBF1 mancante dei primi 359 amminoacidi, costituito quindi dal solo dominio TIG
Δ CBF1(178-361)	mutante di CBF1 costituito solo dal dominio centrale
Δ CBF1(178-500)	mutante di CBF1 costituito dai domini centrale e TIG
HAT	<i>Histone acetylase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>

SOMMARIO

E' noto che la struttura del DNA può subire cambiamenti conformazionali che possono influenzare la regolazione genica. Un cambiamento di conformazione che il DNA può assumere è il ripiegamento (*bending*) a cui è stata associata una grande importanza nella regolazione di diversi geni.

Nel mio lavoro di tesi ho studiato la proprietà della proteina CBF1 di indurre il piegamento del DNA ed in particolare il ruolo del dominio TIG (situato nella regione C-terminale) di cui non è nota la funzione. Tale dominio, infatti, dagli studi riportati in letteratura non risulta necessario né per la regolazione trascrizionale né per l'interazione con il sito di riconoscimento del DNA, ma dai risultati riportati nella mia tesi si evince che esso è in grado di modificare il piegamento del DNA bersaglio probabilmente con un effetto indiretto sulla conformazione della proteina. Recentemente è stata identificata una proteina nucleare *Notch regulated ankyrin repeat protein* (Nrarp) la cui espressione è trascrizionalmente attivata dal sistema CBF1/Notch, con cui direttamente interagisce regolandone a sua volta la stabilità. Dati di letteratura suggeriscono che la regione carbossi - terminale della proteina CSL in *Xenopus*, corrispondente al dominio TIG, è richiesta *in vivo* per il legame della proteina NRARP. Per verificare nel sistema umano queste interazioni e per intraprendere uno studio della struttura tridimensionale, ho clonato la sequenza codificante ed ho purificato la proteina ricombinante NRARP umana.

SUMMARY

Transcriptional activation of eukaryotic genes requires the assembly of multiprotein complexes on promoter and enhancer sequences. The right combination of factors binding to specific DNA sequences ensures specificity, and the contacts between the different proteins increase the stability of the complex. However, the various transcription factors are often bound to DNA at nonadjacent sites, and direct contacts between them are possible only if they are juxtaposed through the deformation of the DNA helix.

Some proteins have DNA bending activity and are thus expected to act as architectural factors. Analysis of protein–DNA interaction indicates that CBF1 (a member of the CSL protein family) induces DNA bending. In my study I have investigated the role of the C-terminal TIG domain of CBF1 in the ability of the protein to induce DNA bending. Results presented in this thesis confirm that, the TIG domain is not required for specific CBF1/DNA interaction and demonstrate that it plays a role in dictating the DNA conformation induced upon CBF1 binding.

Recently, a new intracellular component of the Notch signaling pathway it has been identified: Nrarp (Notch-regulated ankyrin-repeat protein). Nrarp expression is activated by the CSL-dependent Notch pathway. Conversely Nrarp forms a ternary complex with the ICN and the CSL protein and in *Xenopus* embryos promotes the loss of ICN. Literature data suggest that the C-terminal region of the *Xenopus* CSL homologue, TIG domain, is required *in vivo* for the interaction of the protein to NRARP. I have cloned and purified the human recombinant Nrarp protein to verify in the human system these interactions.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

La maggior parte dei fattori trascrizionali modifica la topologia del DNA a cui sono legati. Questa proprietà è un importante aspetto delle loro funzioni e partecipa al meccanismo di regolazione della trascrizione permettendo a fattori che si legano a siti del promotore lontani fra loro di agire in modo sinergico, favorendo la opportuna conformazione del promotore che consente corrette interazioni fra i fattori di regolazione ed il macchinario basale della trascrizione.

Il mio lavoro di tesi riguarda lo studio di un fattore trascrizionale in grado di indurre variazioni conformazionali del DNA: la proteina CBF1. L'acronimo CBF1 (*C promoter binding factor*) deriva dal ruolo centrale che la proteina svolge nella immortalizzazione delle cellule B mediata dal virus di *Epstein-Barr*, attivando la trascrizione dei geni regolati dal promotore C del genoma virale (Henkel T. *et al.*, 1994). CBF1 è una proteina cellulare che nella specie umana (la forma più studiata) ha un peso molecolare di 55.6 KDa ed è costituita da 500 residui amminoacidici (Henkel T. *et al.*, 1994; Kannabiran C. *et al.*, 1997). CBF1 è localizzata prevalentemente nel nucleo della cellula, è espressa costitutivamente ed in modo ubiquitario (Hamaguchi Y. *et al.*, 1992) ed è in grado di legare il DNA in corrispondenza di una sequenza eptamerica, GTGGGAA (Tun T. *et al.*, 1994), presente in diverse sequenze regolatrici della trascrizione di geni virali e cellulari. CBF1 appartiene alla famiglia delle proteine CSL ed è evolutivamente conservata, si riscontra infatti un elevato grado di identità nella struttura primaria fra omologhi di organismi evolutivamente distanti, come la specie umana (Amakawa R. *et al.*, 1993; Dou S. *et al.*, 1994), *Drosophila melanogaster* (*Suppressor of Hairless* Su(H) (Furukawa T. *et al.*, 1991; Schweisguth F. *et al.*, 1992), in *Caenorhabditis elegans* (Lag1) (Christensen S. *et al.*, 1996), nella specie murina (RBP-JK) e in *Xenopus laevis* (X-Su(H)) (fig. 1.1) (Hamaguchi Y. *et al.*, 1992; Matsunami N. *et al.*, 1989).

La funzione principale delle proteine CSL è quella di mediare la funzione di attivatori trascrizionali, quali Notch e EBNA2 (descritti in seguito), che non

sono in grado di legare direttamente il DNA. In assenza di attivatori, le proteine CSL reprimono la trascrizione, ma in loro presenza inducono la trascrizione dei geni da essi regolati. Le due opposte funzioni sono mediate dalla interazione con due distinti complessi proteici (Hsieh JJ. *et al.*, 1995) di coregolatori trascrizionali che includono HAT o HDAC.

I geni codificanti le proteine CSL sono noti sia fra i vertebrati (*H. sapiens*, murina e *X. Laevis*) che fra gli invertebrati (*D. melanogaster* e *C. elegans*). La struttura di questi geni, la cui estensione è di circa 50-70 Kb, è alquanto complessa. Sia nell'uomo che nel topo sono stati trovati diversi trascritti, prodotti da *splicing* alternativo o anche dall'uso di promotori diversi che coinvolgono gli esoni presenti all'estremità 5' del gene (fig. 1.1A).

Nella specie umana il gene codificante CBF1 ha un'estensione di 67 Kb ed è composto da 13 esoni, mentre il corrispondente gene murino ha un'estensione di 50 Kb ed è composto da 11 esoni. Inoltre in entrambe le specie sono stati trovati due pseudogeni privi di sequenze introniche e aventi i tre schemi di lettura interrotti da codoni di terminazione della traduzione.

Nella specie umana sono stati isolati tre tipi di mRNA diversi solo nella sequenza al 5' e derivanti dall'uso alternativo di 3 esoni denominati esone 1, N-1, N-2. Questi diversi trascritti codificano proteine di 500, 575 e 486 amminoacidi. Nella specie murina sono stati trovati due differenti tipi di mRNA, denominati RBP-2 ed RBP-2N che codificano rispettivamente, proteine di 526 e 487 amminoacidi. Le diverse forme della proteina presentano strutture N-terminali differenti tra loro per una decina di amminoacidi ed hanno in comune le sequenze codificate dagli esoni 2-11

In *Drosophila* il gene omologo Su(H) è costituito da 4 esoni e dà origine ad un mRNA codificante una proteina di 594 amminoacidi (Furukawa T. *et al.*, 1991).

In *C. elegans* il gene omologo LAG-1 è costituito da 12 esoni e dà origine ad un mRNA codificante una proteina di 673 amminoacidi (Christensen S. *et al.*, 1996).

Le proteine CSL presentano una struttura primaria molto simile in un'ampia varietà di specie e in essa sono particolarmente conservate diverse regioni funzionali essenziali per la sua attività biologica (Fig 1.1B). Di recente è stata determinata la struttura tridimensionale, mediante analisi cristallografica, della

proteina CSL in *C. elegans*: (Lag-1). Il *core* della proteina, altamente conservato in tutte le specie, è costituito da tre domini strutturali: il dominio centrale strutturato come β -trifoglio (BTD: *beta trefoil domain*), i domini N-terminale e C-terminale, che si strutturano in modo simile ai domini *Ig-like* ritrovati nei fattori trascrizionali della famiglia REL (RHR) (Fig.1.2) (Kovall *et al.*, 2004).

Diversi gruppi di ricerca hanno riportato i risultati di esperimenti di delezione e mutagenesi sito-diretta individuando i domini della proteina responsabili delle interazioni proteina-proteina e quelli deputati al legame al DNA.

Nella regione al centro del dominio BTD, nella zona compresa tra gli amminoacidi 192 e 233 è stato individuato il dominio di repressione trascrizionale; in questa regione avviene l'interazione sia con le proteine SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*) e CIR (*CBF1-interacting corepressor*), che regolano in senso negativo l'azione di CBF1 impedendo la trascrizione e sia con la proteina SKIP (*Ski-interacting protein*). Quest'ultima è invece presente sia nei complessi di CBF1 con funzioni di repressione che in quelli che hanno capacità di attivazione trascrizionale.

La repressione mediata da CBF1 si esplica, essenzialmente, attraverso la destabilizzazione delle interazioni che i fattori trascrizionali TFIID e TFIIA stabiliscono con il promotore (Olave I. *et al.*, 1998) e mediante il reclutamento di un complesso corepressore che comprende oltre alle proteine SMRT e CIR le proteine HDAC1, HDAC2, SAP30 e Sin3A (Hsieh JJ. *et al.*, 1999; Kao HY. *et al.*, 1998). La presenza di deacetilasi istoniche in questo complesso indica che il rimodellamento della cromatina è coinvolto nel meccanismo di repressione dei geni bersaglio.

Nella regione compresa tra i residui amminoacidici 179-361 (dominio BTD) che si sovrappone al dominio di repressione trascrizionale di CBF1, sono presenti le sequenze di interazione con le proteine Notch, EBNA2 e MAML (*Mastermind-like*), che agiscono come attivatori trascrizionali (Hsieh JJ. *et al.*, 1995; Hsieh JJ. *et al.*, 1996). MAML è una proteina di circa 1000 residui, espressa in modo ubiquitario ed è capace di legare contemporaneamente, con la sua regione N-terminale, CBF1 e ICN (regione citoplasmatica di Notch).

Un probabile sito di interazione proteina-proteina è stato localizzato tra gli amminoacidi 204-244. Questo regione risulta essere omologa ad un motivo presente nel dominio catalitico di proteine della famiglia delle integrasi sito specifiche, le ricombinasi, non condividendone però l'attività enzimatica. Questo motivo nelle proteine CSL è caratterizzato da molti residui acidi, una caratteristica condivisa dal dominio di transattivazione di molti fattori di trascrizione. Il dominio integrasico non è direttamente coinvolto nell'interazione con il DNA. Infatti esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno dimostrato che la sostituzione di alcuni amminoacidi al suo interno non cambia significativamente l'attività di legame al DNA (Chung CN. *et al.*, 1994). Esperimenti di mutagenesi sito-diretta, e la struttura cristallografica dell' omologo Lag1 hanno reso possibile l'individuazione di tre regioni della proteina necessarie per il legame al sito specifico del DNA: la prima è collocata tra gli amminoacidi 57-68, la seconda tra gli amminoacidi 192-201 e la terza tra gli amminoacidi 265-289 (CN. Chung *et al.*, 1994; Kovall RE. e Hendrickson W A. 2004). Un potenziale sito di fosforilazione per le MAP chinasi è stato individuato in corrispondenza della sequenza PVTP (amminoacidi 332-335) (D. Jacob *et al.*, 1999). Questa sequenza è conservata tra i vertebrati ed in *C. Elegans*.

In posizione 81-84 è localizzata una sequenza di localizzazione nucleare costituita da quattro residui di lisina che permette alla proteina di traslocare nel nucleo.

E' stato dimostrato che le proteine della famiglia CSL sono gli effettori nucleari del recettore di membrana Notch che regola l'inibizione laterale nella morfogenesi embrionale e partecipa a numerosi processi differenziativi dall'ematopoiesi alla maturazione dei timociti, nelle interazioni tra mesenchima e cellule endoteliali, nella differenziazione del bulbo pilifero ed altri ancora (Artavanis-Tsakonas S. *et al.*, 1995). Il recettore Notch è una proteina di membrana eterodimerica, costituita da un singolo dominio transmembrana e da estesi domini extracellulari ed intracellulari. La sua struttura è evolutivamente conservata e sono noti vari omologhi da *Drosophila*, *C. elegans* (rispettivamente GLP-1 e LIN-12) ai vertebrati superiori. Nei vertebrati sono note, inoltre, diverse forme della proteina (Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4/int) codificate da geni diversi; esse presentano un'alta

omologia di sequenza, anche se il numero di ripetizioni di tipo EGF che caratterizzano il dominio extracellulare può variare considerevolmente (Hsieh JJ. *et al.*, 1999).

La regione necessaria per il legame con il ligando è localizzata all' estremità N-terminale del dominio extracellulare, che comprende le numerose ripetizioni del motivo EGF-like (*epidermal growth factor*), più a valle si riscontra una regione ricca in residui di cisteina, costituita da tre ripetizioni prossimali alla membrana detta LNR (Notch/Lin 12). Il dominio intracellulare, che comprende l'estremità C-terminale, presenta una regione in grado di legare le proteine CSL (RAM: RBP-jk *associated molecule*), seguono sette ripetizioni in *tandem* del dominio tipo cdc10/anchirina (ANK), necessarie per la trasduzione del segnale in quanto mediano le interazioni con i coregolatori SKIP e MAML, segue la regione OPA caratterizzata da un elevato contenuto in residui di glutammina ed infine, alla estremità C-terminale si trova una sequenza PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) che regola il *turnover* della proteina (Zhou S. *et al.*, 2000; Nam Y. *et al.*, 2003).

IL recettore Notch viene sintetizzato come un unico polipeptide che va incontro ad un primo taglio proteolitico a valle di LNR nell'apparato del Golgi ad opera di una proteasi a serina appartenente al gruppo delle furine (Fig. 1.3A). Le due parti determinate dal taglio restano associate tra loro e si ritrovano sulla membrana cellulare a formare il recettore eterodimerico (Lai E. 2004). Il recettore Notch viene attivato dal legame con il suo ligando, una proteina transmembrana tipo I appartenente alla famiglia DSL (Delta, Serrate, Lag-2 identificate rispettivamente nei vertebrati, in *D. Melanogaster* e *C. elegans*). Anche le proteine DSL presentano un dominio extracellulare ricco di ripetizioni in *tandem* del motivo EGF-like (Zhou S. *et al.*, 2000). Numerosi studi biochimici e genetici hanno portato ad un modello di attivazione di Notch. Quando il recettore interagisce con un ligando DSL, esso subisce due tagli proteolitici: il primo è mediato da un membro della famiglia di metalloproteasi ADAM (*A disintegrin and metalloprotease*), il secondo avviene a valle del dominio transmembrana ad opera di una γ -secretasi, costituita da un complesso multiproteico. In tal modo, viene generato un dominio intracellulare di Notch libero (ICN) che trasloca nel nucleo ed interagisce con CBF1 mediante il dominio RAM. In seguito a questa

interazione viene rimossa la repressione indotta da CBF1 ed attivata la trascrizione dei geni bersaglio (Logeat F. *et al.*, 1998; Chan YM *et al.*, 1998; Six E. *et al.*, 2003).

CBF1 (e in generale le proteine CSL) funziona come un repressore trascrizionale in assenza del segnale di Notch, reclutando un complesso multiproteico di co-repressori trascrizionali (Mumm e Kopan, 2000). In particolare, CBF1 interagisce direttamente con i co-repressori SMRT/N-CoR (*silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor/ nuclear repressor*) (Kao HY. *et al.*, 2000; Zhou S. *et al.*, 2001), CIR (*CBF1-interacting co-repressor*) (Hsieh J. *et al.*, 1999), KyoT2 (Qin H. *et al.*, 2004) e con il fattore nucleare SKIP (una proteina adattatrice che interagisce simultaneamente con CBF1 e i co-repressori) (Zhou S. *et al.*, 2000). Dettagli molecolari sulla repressione mediata da CBF1 non sono completamente compresi, ma è noto che co-repressori associati a CBF1 reclutano deacetilasi istoniche (HDAC) che regolano il rimodellamento della cromatina (fig. 1.3B) (Lai E. 2002).

ICN compete con CBF1 per il legame con il complesso co-repressore e attiva la trascrizione reclutando il co-attivatore MAM, proteine con attività di istone acetil-trasferasi (HAT) come CBP/p300, pCAF, GCN5, l'RNA polimerasi II (Oswald F. *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2002; Wallberg *et al.*, 2002; Lin SE. 2002) e SKIP che svolge un ruolo fondamentale nell'orchestrare la conversione di CBF1 da repressore trascrizionale, legato a SMRT e HDAC, ad un attivatore trascrizionale legato a Notch. Per il corretto legame tra SKIP e Notch è necessario il quarto elemento ripetuto nel dominio ANK presente su quest'ultimo. Infatti mutazioni in questo sito rendono Notch incapace di attivare la trascrizione. ICN interagisce con CBF1 principalmente attraverso il dominio RAM e con SKIP attraverso le ripetizioni di tipo anchirina (Zhou S. *et al.*, 2000; Hsieh JJ. *et al.*, 1999).

La famiglia di proteine MAM, controparte nei mammiferi del gene *mastermind* di *Drosophila*, è stata recentemente identificata e appare funzionare specificamente nel segnale di Notch. Il gene *mastermind* in *Drosophila* codifica per una proteina nucleare ricca in glutammina. La famiglia di proteine nella specie umana hMAML consiste di tre membri: MAML1, MAML2, MAML3 (Petcherski A. G. *et al.*, 2000; Wu L. *et al.*, 2000) caratterizzati da un dominio basico N-terminale implicato nell'interazione con ICN e CBF1 (Nam

Y. *et al.*, 2003) e due domini acidi (I e II) nella regione centrale e C-terminale. La proteina MAML sembra anche essere coinvolta nella modulazione della durata del segnale di Notch (Fryer C.J. *et al.*, 2004) promuovendone l'iperfosforilazione e la successiva degradazione. Recentemente è stata individuata una nuova proteina Nrarp (*Notch regulated ankirin repeat protein*) di 114 amminoacidi che sembra essere implicata, insieme a MAM, nel meccanismo di degradazione di Notch. L'espressione del gene Nrarp, altamente conservato durante l'evoluzione (Krebs L. T. *et al.*, 2001; Topczewska J. M. *et al.*, 2003), è attivata dalla via Notch/CSL (Lahaye K. *et al.*, 2002). L'analisi bioinformatica di tale proteina rivela che essa include nella regione C-terminale due ripetizioni del tipo anchirina (fig. 1.3C). È stato provato che la sovraespressione di Nrarp in embrioni di *Xenopus* inibisce l'attivazione dei geni regolati da Notch e produce fenotipi consistenti con la perdita del segnale di questo recettore. È stato dimostrato che Nrarp lega ICN e CBF1 solo quando sono entrambi presenti, quest'interazione incrementa i livelli di ICN legato a CBF1 ma i livelli totali di ICN decrementano. Inoltre, l'esistenza di un complesso quaternario in presenza della proteina MAM induce ad ipotizzare che Nrarp, insieme a MAM, promuova la degradazione di Notch attraverso modifiche post-traduzionali con un meccanismo di *feed back* negativo (Lamar E. *et al.*, 2001; Yun T. J. e Bevan M. J. 2003; Pirot P. *et al.*, 2004).

Il numero dei geni regolati da Notch finora identificati è limitato. Essi includono HES-1 e HES-5; la MAP Chinasi fosfatasi LIP-1; e regolatori del ciclo cellulare p21 WAF1/Cip1; ciclina D1; e CDK2 e Nrarp (Hansson E. M. *et al.*, 2004). I geni meglio caratterizzati nei mammiferi sono gli omologhi di una famiglia di repressori della trascrizione detti HES (*Hairy and Enhancer of Split*).

Sono note patologie umane associate a mutazioni inattivanti geni Notch, è stato anche riscontrato che una patologia umana ereditaria a trasmissione autosomica dominante (*CASADIL: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*) è dovuta ad una mutazione nel gene Notch 3 che lo inattiva (Joutel A. *et al.*, 1996). Altre patologie ereditarie sono associate a mutazioni inattivanti i ligandi di Notch (disostosi spondilocostale e sindrome di Alagille).

Anche alcune neoplasie possono essere ricondotte ad alterazioni cromosomiche che generano forme costitutivamente attive di Notch. In particolare, una traslocazione cromosomica di una porzione del gene umano di Notch1, che genera una forma deleta della proteina priva del dominio extracellulare, è frequentemente associata a leucemie dei linfociti T.

Alcuni virus come EBV (*Epstein-Barr virus*) e l'*herpes* virus associato al sarcoma *Kaposi* (KSHV), influenzano il segnale Notch.

Il virus di Epstein-Barr causa malattie linfoproliferative in individui con deficienze nel sistema immunitario, quali ad esempio il linfoma di Burkitt, il linfoma di Hodgkin, altri linfomi delle cellule T o B, il carcinoma anaplastico nasofaringeo e alcuni carcinomi del tratto gastrointestinale. L'infezione da EBV converte i linfociti B primari *in vitro* in cellule linfoblastoidi immortalizzate in cui è espresso un numero limitato di proteine. Fra queste EBNA2 e EBNA1 sono espresse per prime nella infezione di linfociti B primari e attivano la trascrizione da promotori virali e cellulari. EBNA2, come NIC, non riconosce direttamente le sequenze regolatrici del promotore ma si associa alla proteina CBF1. EBNA2 attiva promotori cellulari come CD21, CD23, *c-fgr* e *c-myc* ed i promotori virali *Cp*, per l'espressione della serie di proteine EBNA, e per l'espressione della proteina LMP (*latent membrane protein 1*). EBNA2 dunque gioca un ruolo chiave nella conversione di linfociti B primari umani in cellule linfoblastoidi immortalizzate ed agisce in modo analogo a NIC, competendo con il complesso co-repressore legato a CBF1 (Ling *et al.*, 1993; Henkel *et al.*, 1994).

La proteina CBF1 è in grado di legare numerosi promotori tra cui anche quello del gene dell'interleuchina-6 (IL-6) ed interviene nel meccanismo di regolazione in senso negativo, competendo con il fattore trascrizionale NF- κ B, principale attivatore del gene. Il sito di legame di CBF1 è parzialmente sovrapposto al sito κ B del gene di IL-6, occupandone quattro coppie di basi poste al 3' (Palmieri *et al.*, 1999). In condizioni basali CBF1 lega costitutivamente il promotore del gene IL-6 e agisce reprimendo la trascrizione basale anche in presenza di altri attivatori trascrizionali.

Studi sull'interazione tra CBF1 e il sito κ B del gene dell'IL-6 hanno mostrato anche che CBF1 induce il piegamento (*bending*) della regione del promotore.

Il *bending* è un cambiamento conformazionale del DNA a cui è stata associata grande importanza nella regolazione di diversi geni. Fin dallo studio del ruolo delle HMGY(I) nella induzione virale del promotore dell'IFN β molti esempi in letteratura dimostrano che le proprietà architetturali di proteine che legano le sequenze regolatrici del DNA giocano un ruolo centrale nel meccanismo di attivazione genica. Studi condotti dal gruppo del Prof. Tom Maniatis hanno dimostrato che per l'attivazione del gene dell'interferone β non è solo necessario il complesso formato dai fattori trascrizionali, ma hanno un ruolo molto importante le proteine non istoniche HMG-I(Y) (*high mobility group protein*). Quest'ultime modificano ulteriormente la conformazione del DNA, inducendo il piegamento del gene dell'interferone β , contribuendo all'attivazione trascrizionale con un effetto puramente conformazionale (Thanos D. *et al.*, 1993; Falvo J. V. *et al.*, 1995; Thanos D. *et al.*, 1995). Anche numerosi fattori trascrizionali sequenza-specifici inducono cambiamenti conformazionali nel DNA (*bending*) e fra questi CBF1 (Palmieri *et al.*, 1999). In molti sistemi è stato dimostrato che questa proprietà è cruciale per la funzione trascrizionale. Un esempio appropriato è dato dagli studi sulle proteine SRY, che regolano il differenziamento testicolare, e le proteine omologhe SOX. Mutazioni in SRY che inducono una modesta variazione del *bending* indotto nel DNA correlano con fenotipo di disgenesia testicolare e reversione sessuale nell'uomo (Phillips N. B. *et al.*, 2006; Li B. *et al.*, 2006) e per le omologhe proteine SOX è stato dimostrato che l'alterazione del *bending* modifica l'attività trascrizionale (Scaffidi P. *et al.*, 2001).

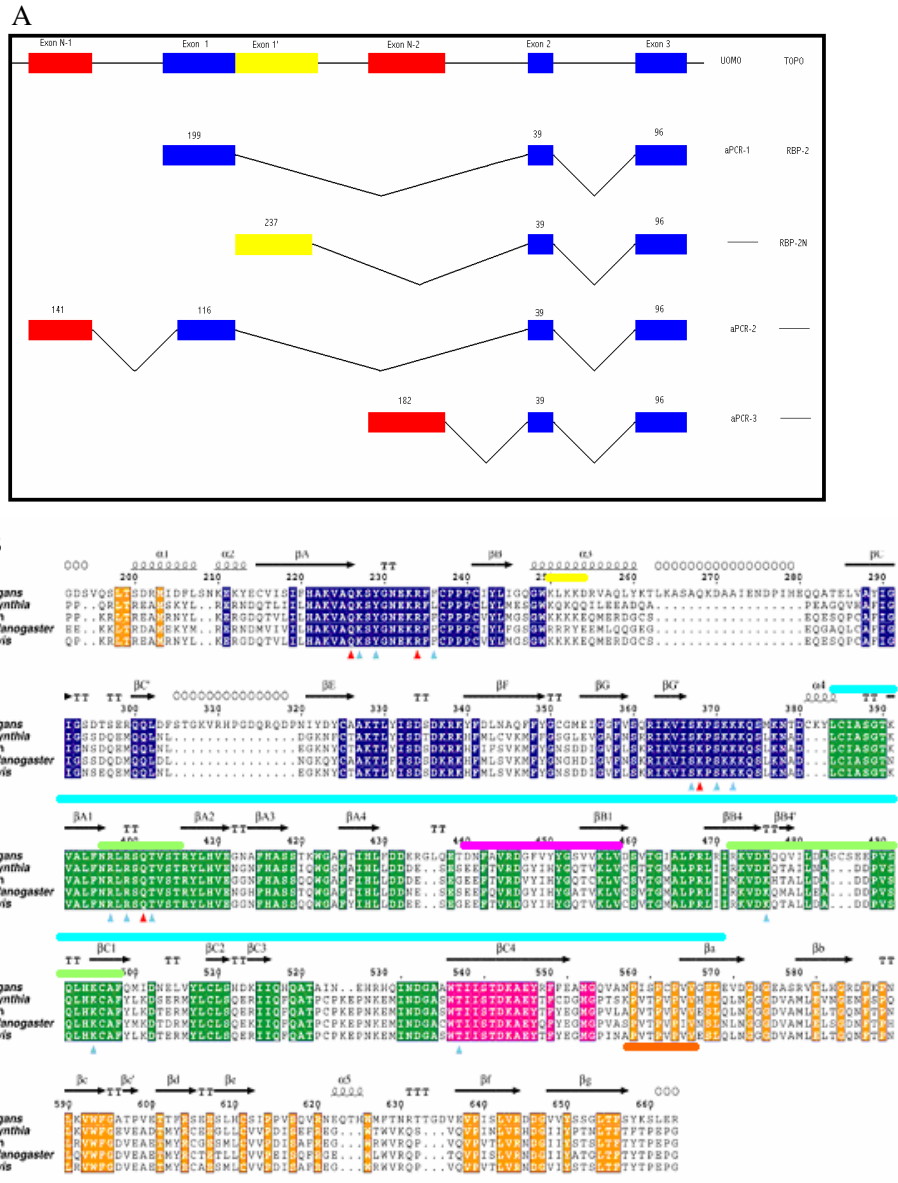


Figura 1.1 A. Schema dello *splicing* alternativo degli esoni al 5' del gene codificante la proteina CSL murina e umana. L'organizzazione genica degli esoni al 5' è indicata nella prima linea. I riquadri in blu indicano gli esoni comuni al gene umano e a quello murino. I riquadri in rosso e quelli in giallo indicano gli esoni specifici, rispettivamente del gene umano e del gene murino. RBP-2 ed RBP-2N indicano i prodotti di *splicing* nella specie murina mentre aPCR-1, aPCR-2 ed aPCR-3 indicano i prodotti di *splicing* nella specie umana.

B. Allineamento di sequenze degli ortologi di CSL da *C. elegans*, *Halocynthia*, *H. sapiens*, *D. melanogaster*, e *X. laevis*.

La linee superiori indicano: in giallo il segnale di localizzazione nucleare, in azzurro il dominio di attivazione trascrizionale, in verde chiaro la regione di interazione specifica con il DNA, in viola il dominio di repressione trascrizionale, in arancio il possibile sito di fosforilazione riconosciuto dalle MAP chinasi. I riquadri colorati in blu, verde, arancio, e magenta indicano rispettivamente il dominio N-terminale, centrale e C-terminale e la catena polipeptidica β4 che prende contatto con tutti e tre i domini. I triangoli in rosso e celeste indicano rispettivamente gli amminoacidi che interagiscono specificamente con il DNA e quelli che interagiscono in modo non specifico. Gli elementi di struttura secondaria sono indicati con α = α elica, β= filamento β e T= turn, gli amminoacidi che costituiscono le anse di connessione tra gli elementi di struttura secondaria.

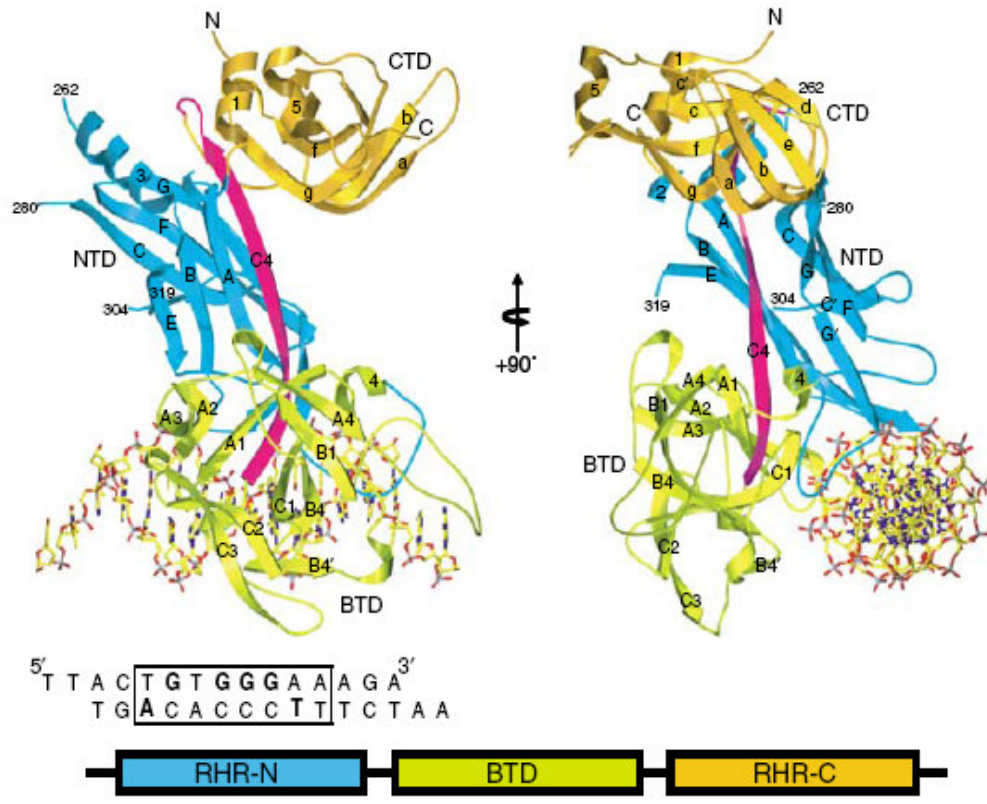
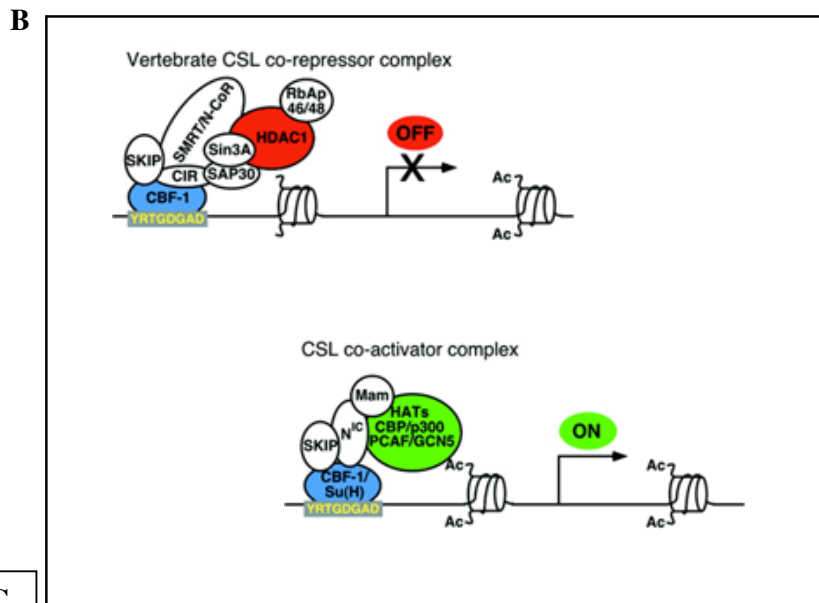
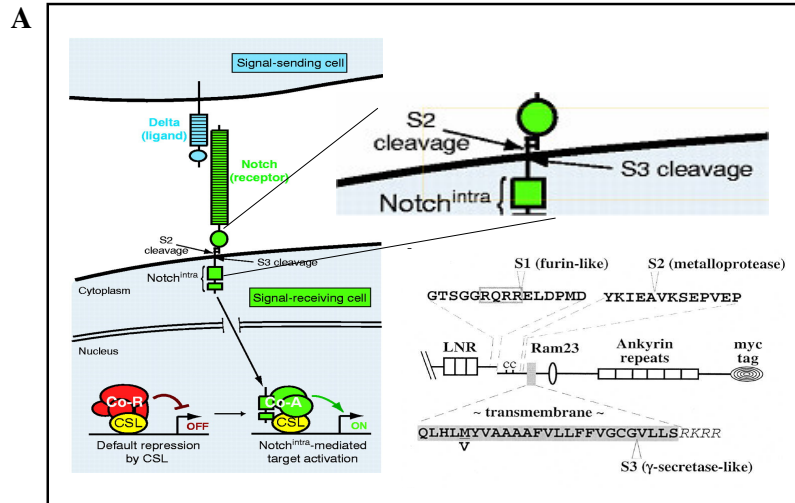


Figura 1.2 Struttura tridimensionale del complesso CBF1-DNA. NTD è di colore blu, BTM verde, e CTD (dominio TIG) arancione, in magenta la catena β n° 4, che interagisce con tutti e tre i domini. (Koval *et al.*, 2004).



C

1:MSQAELSTCSAPQTQRIFQEAVRKGNLTQELQSLNQNTNCFNVNSFGP
 EGQTALHQSVIDGNLELVKLLVCFGADIRLANR**DGWSALHIAAFGGHQDI**
VLYLITKAKYAASGR 114

Figura 1.3 **A.** Maturazione proteolitica e attivazione del recettore eterodimerico di membrana di tipo I denominato *Notch*. **B.** CBF1 in assenza o in presenza del segnale di *Notch* reprime o attiva la trascrizione. **C.** Struttura primaria della forma umana di Nrarp. I due domini anchirinici sono evidenziati in giallo ed in verde.

CAPITOLO II

MATERIALI E METODI

2.1 Costruzione delle sonde di permutazione circolare

Per la costruzione delle sonde di permutazione circolare è stato utilizzato il plasmide pBENDII (Kim J. *et al.*, 1989), in cui è stato clonato, tra una ripetizione diretta contenente una serie di siti di restrizione, un oligonucleotide di 22 bp ATGTGGGATTTTCCCATG contenente il sito di legame per CBF1 (indicato in giallo) del gene IL-6. Il plasmide è stato sottoposto a digestione con opportuni enzimi di restrizione (EcoRI/SalI, BglII, XhoI, XmaI, BamHI, XbaI/HindIII) in modo da ottenere una serie di frammenti della stessa lunghezza (140bp) che rappresentano una permutazione circolare della stessa sequenza. I frammenti sono separati dal plasmide mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide all' 8% (29:1 con bis acrilammide) TBE 1X (90mM Tris, 90mM acido borico e 4mM EDTA); la corsa è effettuata a 270V costanti in tampone TBE 1X. Estratti dal gel mediante elettroeluzione (McDonnell M. W. *et al.*, 1977), sottoposti al procedimento di marcatura con l'enzima DNA polimerasi SEQUENASE e poi separati dai nucleotidi radioattivi liberi, mediante una gel filtrazione su resina Sephadex G50. Lo stesso procedimento è stato seguito per ottenere le sonde di permutazione circolare con tre basi mutate fiancheggiando il sito di legame di CBF1:

Mut-1κB ATGTAATATTTTCCCATG.

2.2 Saggi EMSA e Analisi di permutazione circolare

I saggi EMSA (Faggioli L. *et al.*, 1997) sono stati effettuati incubando la proteina di interesse e la sonda di DNA marcata con ³²P, per 20' a temperatura ambiente, in presenza di uno specifico tampone di legame (Tris/HCl 20mM pH 7.5, NaCl 0.1M, glicerolo 4%, NP40 0.1%, DTT 1mM; 30ng/μl). I campioni dopo l'incubazione sono caricati su gel di poliacrilammide al 5% in condizioni non denaturanti. La corsa elettroforetica è condotta a 270 V per circa 2h in tampone TBE 0.5X. Il gel viene quindi trasferito su carta da filtro Whatman 3MM ed essiccato a 80 °C per 2h. Successivamente è sottoposto ad autoradiografia in presenza di schermi intensificatori a -80°C. La specificità di legame della proteina al DNA è verificata, mediante l'aggiunta di

oligonucleotidi non marcati, in un eccesso molare di circa 70 volte rispetto alla sonda di DNA, che corrispondono alla sequenza di riconoscimento del gene dell'interleuchina 6 (IL-6) oppure da oligonucleotidi con sequenza diversa che, secondo la specifica sequenza, possono competere con la sonda per il legame alla proteina come Mut1-κB o non competere come IL-2κB (GGGGATTCACCCAT).

2.3 Costruzione di plasmidi per l'espressione dei mutanti di CBF1

Per la produzione delle proteine delete e per la costruzione del dominio TIG isolato ho mutato il cDNA di CBF1, clonato in pRsetB, adoperando il sistema di mutagenesi sito diretta della PROMEGA "*GeneEditor in vitro Site-Directed Mutagenesis System*". Il procedimento prevede l'uso di oligonucleotidi a sequenza nota in cui sono introdotte le mutazioni desiderate. Il campione di DNA da mutagenizzare è ibridato contemporaneamente con due oligonucleotidi che introducono due mutazioni in punti diversi: una all'interno della sequenza codificante la proteina di interesse e l'altra all'interno del gene che codifica per la resistenza all'ampicillina. Quest'ultima mutazione crea una resistenza ad un miscela di antibiotici, forniti dalla PROMEGA, che permette la selezione delle cellule trasformate con il plasmide mutagenizzato.

I vari passi della reazione di mutagenesi sono i seguenti :

- Fosforilazione dell'oligonucleotide mutagenico al 5'
- Denaturazione alcalina del DNA template
- Ibridazione del DNA con i due oligonucleotidi
- Sintesi del filamento mutante con l'enzima T4 DNA Polimerasi
- Trasformazione e crescita in terreno SOC delle cellule competenti BMH71-18 muts derivate da *E. coli*, che sono difettive della capacità di riparare i nucleotidi non appaiati
- Trasformazione delle cellule competenti del ceppo di *E. coli* JM109
- Selezione delle colonie ricombinanti attraverso analisi di restrizione

Gli oligonucleotidi utilizzati per la creazione dei mutanti deleti nella regione C-terminale presentano al loro interno la tripletta per il codone di STOP, al fine di generare la proteina tronca, e un sito aggiuntivo per un opportuno enzima di restrizione che mi ha permesso, attraverso un semplice analisi di restrizione, di verificare le mutazioni.

In seguito sono riportati gli oligonucleotidi utilizzati per la creazione dei mutanti deleti al C-terminale di CBF1

SEQUENZA DEL CDNA CODIFICANTE GLI AMMINOACIDI 357-363

5' GTA GAG AGC CTT CAG TTG AAT GGC GG 3'
3' CAT CTC TCG GAC GTC ATC TTA CCG CC 5'

PstI

Oligonucleotide utilizzato per la creazione del mutante Δ CBF1 1-361

L'oligonucleotide progettato corrisponde alla sequenza codificante gli amminoacidi 357-363, ha una lunghezza di 26 basi ed una T_m (temperatura di Melting) di 76°C; in esso la tripletta codificante l'amminoacido 362 è sostituita da un codone di terminazione della sintesi proteica (evidenziato in rosso). E' presente inoltre una seconda mutazione che inserisce il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione Pst1, allo scopo di facilitare l'identificazione della sequenza di cDNA mutato.

SEQUENZA DEL CDNA CODIFICANTE GLI AMMINOACIDI 383-391

5' CGA GTG TGG TTT GGG GAT GTA GAA GCT G 3'
3' GCT CAC ACC AAA ACT CTA GAT CTT CGA C 5'

BglII

Oligonucleotide utilizzato per la creazione del mutante Δ CBF1 1- 386

L'oligonucleotide progettato corrisponde alla sequenza codificante gli amminoacidi 383-391, ha una lunghezza di 28 basi ed ha una T_m di 74°C; in esso la tripletta codificante l'amminoacido 387 è sostituita da un codone di terminazione della sintesi proteica (evidenziato in rosso). E' presente inoltre una seconda mutazione che inserisce un sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione Bgl II, allo scopo di facilitare l'identificazione della sequenza di cDNA mutato.

SEQUENZA DEL cDNA CODIFICANTE GLI AMMINOACIDI 412-418

5' CGA GAA GGT TGG AGA TGG GTC CGG CAA C 3'
3' GCT CTT CCA ACT TCT AGA CAG GCC GTT G 5'

BglII

Oligonucleotide utilizzato per la creazione del mutante Δ CBF1 1-414

L' oligonucleotide progettato corrisponde alla sequenza codificante gli amminoacidi 412-418, ha una lunghezza di 28 basi ed ha una T_m di 74 °C; in esso la tripletta codificante l' amminoacido 415 è sostituita da un codone di terminazione della sintesi proteica (evidenziato in rosso). E' presente inoltre una seconda mutazione che inserisce il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione BglIII, allo scopo di facilitare l' identificazione della sequenza di cDNA mutato.

SEQUENZA DEL CDNA CODIFICANTE GLI AMMINOACIDI 433-440

5' GGA ATC ATT TAT TCC ACC AGC CTT AC 3'
 3' CCT TAG TAA ATC TAG AGG TCG GAA TG 5'

BglIII

Oligonucleotide utilizzato per la creazione del mutante Δ CBF1 1-435

L'oligonucleotide progettato corrisponde alla sequenza, ha una lunghezza di 26 basi ed ha una T_m di 62°C; in esso la tripletta codificante l'amminoacido 436 è sostituito da un codone di terminazione della sintesi proteica (evidenziato in rosso). E' presente inoltre una seconda mutazione che inserisce il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione BglIII, allo scopo di facilitare l' identificazione della sequenza di cDNA mutato.

SEQUENZA DEL CDNA CODIFICANTE GLI AMMINOACIDI 355-363

5' CCT GTG GTA GAG AGC CTT CAG TTG AAT G 3'
 3' GGA CAC CAT CTC TCT AGA GTC AAC TTA C 5'

BglIII

Oligonucleotide utilizzato per la creazione del dominio TIG (360-500)

L'oligonucleotide progettato corrisponde alla sequenza codificante gli amminoacidi 355-363, ha una lunghezza di 28 basi ed una T_m di 76°C; in esso è presente una mutazione silente che inserisce il sito di restrizione BglIII. Per esprimere il dominio TIG come proteina isolata ho eliminato dal plasmide pRSET B/CBF1, in cui è inserito il cDNA codificante la forma di CBF1 di 500 aa, la sequenza nucleotidica codificante i primi 359 amminoacidi di CBF1. A tal fine ho inserito all'interno della sequenza codificante per CBF1 un sito di restrizione per l'enzima BglIII in corrispondenza del nucleotide 1075 proprio nel punto in cui inizia il dominio TIG da me identificato.

La scelta di tale sito di restrizione è stata dettata dal fatto che essa risulta presente solo nel *polilinker* di pREST B, immediatamente a monte del cDNA di CBF1 ed inoltre manca nella sequenza nucleotidica che codifica il dominio TIG. Il procedimento conserva ininterrotto lo schema di lettura del *tag* istidinicico e del dominio TIG posto a valle. Poi dopo aver trasformato il ceppo JM109 di *E.coli* con la miscela di ligasi, ho identificato le colonie contenenti il plasmide ricombinante con un'analisi di restrizione di minipreparazioni di DNA plsmidico, utilizzando lo stesso enzima.

Per la creazione dei mutanti CBF1(178-500) e CBF1(178-361) ho amplificato per PCR la regione di cDNA di interesse contenuta rispettivamente nei plasmidi pRsetB/CBF1 e pRsetB/CBF1(1-361) utilizzando come inneschi gli aligonucleotidi ol.Kpn178: GCGGGGGTACCCATGGACTTATGC che ibrida nel cDNA di CBF1 nella regione codificante gli aminoacidi 178-180, con al 5' la sequenza di riconoscimento dell'enzima di restrizione NcoI e il codone d'inizio e ol.pRset3':GGCTTTGTTAGGATCCGGATCAAGC che ibrida con la regione sul polilinker di pRsetB a valle di CBF1 e contiene al 3' il sito di restrizione per l'enzima di restrizione HindIII.

2.4 Sintesi in vitro di proteine

Per la sintesi delle proteine ricombinanti ho utilizzato un sistema d'espressione in vitro che accoppia trascrizione e traduzione (*TNT Quick Coupled Transcription Traslation Systems della Promega*), con una resa di 150-300 ng di proteina per 50 µl di reazione.

2.5 Saggio di pull down

La precipitazione della proteina di fusione *His-Tag* CBF1 sintetizzata in vitro è stata realizzata su resina *Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech)*. Si sedimenta, mediante centrifugazione a 500g per 5 minuti, una quantità di resina sufficiente a legare la proteina di interesse (la capacità di legame della resina è utilizzata è di 5mg di proteina *His-Tag*/ml di resina). Dopo un lavaggio con 5 volumi di acqua distillata, la resina viene caricata con 0.5 vol. di NiSO₄ 0.1 M nuovamente lavata per tre volte con 5 vol. di acqua distillata ed infine, risospesa in 1 vol. di *Start Buffer* 1X (NaHPO₄ 20Mm, NaCL 0.5M, imidazolo 10Mm pH 7.4). La resina così preparata viene incubata con un'aliquota del lisato (12.5), in cui è stata prodotta la proteina *His-Tag* CBF1 marcata con ³⁵S, in *Start buffer* 1X per 30 minuti a temperatura ambiente, in lenta agitazione.

Dopo il legame, il complesso resina/*His-Tag* CBF1 è raccolto mediante centrifugazione a 500g per 5 minuti e sottoposto a tre lavaggi con 10 volumi di Start Buffer 1X. Successivamente ad uno dei campioni, formato dal complesso resina/*His-Tag* CBF1, viene aggiunta una soluzione contenente 10ng/ μ l proteinasi K in presenza di PBS 1X e NP-40 0.2% e si lascia incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in lenta agitazione. La proteina così trattata viene poi raccolta con una centrifugazione a 500g per 5 minuti e sottoposta a tre lavaggi con 1 volume ciascuno di una soluzione contenente PBS 1X e NP-40 0.2%. Infine i pellet vengono preparati per un' analisi in SDS-PAGE. La specificità di legame alla resina è stata verificata in esperimenti pilota.

2.6 Analisi di RT-PCR

Per effettuare l'analisi di RT-PCR ho estratto l'RNA da cellule in coltura (cellule di fibroblasti murini, cellule umane di glioblastoma e di carcinoma tiroideo) utilizzando il metodo basato sull'estrazione differenziata di RNA mediante solventi organici, in questo caso fenolo a pH acido (Sallcup e Washington, 1983). Un'aliquota di RNA (circa 5 μ g) è stata sottoposta ad elettroforesi su gel di agarosio all'1.2%, per controllarne l'integrità. L'analisi di RT-PCR è stata effettuata con il kit della Invitrogen *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, utilizzando come innesco al 3' un oligonucleotide deossi poli T (dT₁₂₋₁₈) ed al 5' l'oligonucleotide E9-5':AGGAATTCCTTCCTGGACAATCATTAGC che ibrida il trascritto di CBF1 al centro dell'esone 9.

2.7 Costruzione delle sonde di *phasing*

Per la preparazione delle sonde di *phasing* ho utilizzato i vettori pSB 10-12-14-16-18-20 (Drak J. E Crothers DM. 1991). I vettori pSB10-20, che derivano dal plasmide pGem, contengono il set di poli A e per ogni plasmide una spaziatura variabile da 10-20 bp e tra il set di poli A il sito di clonaggio in cui verrà inserito il sito di legame per CBF1. Tale spaziatura consente di avere sia una traslazione tra il sito di legame per CBF1 e la sequenza dotata di *bending* intrinseco, sia una rotazione di circa 72° per ogni dinucleotide aggiunto; in tal modo dopo 10.5 bp è completato il giro d'elica. I vettori pSB sono sottoposti a digestione con EcoRI (Promega) e Sac I (Boehringer-Manheim) ed i frammenti risultanti vengono separati dal plasmide mediante elettroforesi in gel di agarosio allo 0.8% ed elettroeluzione (McDonell M. W. *et al.*, 1977). Per

introdurre nei plasmidi pSB 10-20 il sito di riconoscimento per CBF1, sono stati utilizzati due oligonucleotidi complementari tra loro recanti tale sito:

5'AATTCTGGGATTTTCCCATGAGAGCT3'

3' ACCCTAAAAGGGTACTC 5'

I due oligonucleotidi ibridati sono poi fosforilati con 15 U di Polinucleotide Chinasi T4 (Promega) ed inseriti nei plasmidi pSB 10-20 utilizzando l'enzima DNA Ligasi del fago T4 (Promega). I plasmidi così ottenuti sono utilizzati per trasformare cellule di *E. coli DH5 α* competenti.

Per il riconoscimento delle colonie batteriche ricombinanti ho utilizzato la tecnica della *colony hybridation*. Tale tecnica consiste nell'ibridazione del DNA contenuto nelle cellule di singole colonie batteriche con una sonda radioattiva che sia complementare al frammento di DNA clonato. Sono state selezionate alcune colonie che crescono su terreno selettivo contenente ampicillina ciascuna trasformata con un plasmide della serie di pSB 10-20 ricombinanti, e poste in colture liquide in provette da 1.5 ml di terreno LB-Amp per 3h a 37°C, in agitazione. 3 μ l di ogni coltura cellulare sono depositati su filtri di nylon (*Hybond M-N⁺*, membrana ottimizzata per il trasferimento di acidi nucleici, Amersham Pharmacia biotech, 0.45 μ m) ed in seguito i filtri sono poggiati su capsule Petri contenenti terreno solido LB-Agar e Ampicillina. Le piastre sono poi lasciate in incubazione a 37°C per la notte. In seguito i filtri vengono trattati come riportato da Woo ed altri (Benton WD. e Devis RW. 1977; Woo *et al.*, 1978 e 1979). In seguito i plasmidi ricombinanti pSB 10-20 pH/CBF1 contenenti il set di poli A, la spaziatura variabile tra il sito di riconoscimento di CBF1 e il set di poli A, ed il sito CBF1 sono sottoposti a 35 cicli di PCR utilizzando l'enzima AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*), eseguendo il seguente profilo termico: 95°C per 10''; 41 °C per 30''; 72°C per 30''. Nella reazione sono stati utilizzati dei *primers* che che ibridano nella regione a monte del sito di clonaggio e a valle della sequenza contenente il *bending* intrinseco.

E 208: 5'TATGTATCATACACATAC 3'

E 188: 3'GAAATTAATACGACTCAC 5'

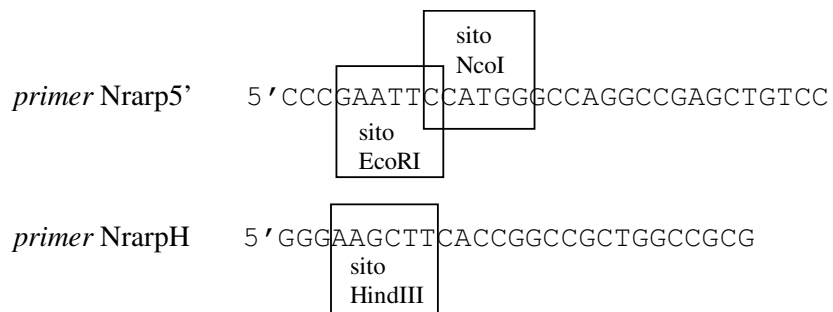
2.8 Analisi di *phasing*

50 ng di ciascun frammento di DNA ottenuti per PCR sono stati marcati all'estremità 5' con $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP utilizzando l'enzima Chinasi del fago T4 (PNK T4 USB) e dATP $\gamma^{32}\text{P}$ 3.3 pmoli/ μl (3000 Ci/mmol); le sonde marcate sono state poi separate dai nucleotidi liberi mediante gel filtrazione su resina Sephadex G50.

Per permettere il legame della proteina con la sequenza nucleotidica bersaglio, si procede incubando la proteina d'interesse e la sonda per 20' a T ambiente, in presenza di uno specifico tampone di legame (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 4%, glicerolo, 0.1% NP40, 1mM DTT). I campioni, dopo l'incubazione sono caricati su gel di poliacrilammide all'8% in condizioni native. La corsa elettroforetica avviene a voltaggio costante, $\Delta V = 200\text{V}$, per circa 20 ore in tampone 0.5X TBE (45 mM Tris, 45 mM acido borico e 2 mM EDTA), il gel viene poi essiccato sotto vuoto a 80°C per 2 h e successivamente sottoposto ad autoradiografia, in presenza di schermi intensificatori a -80°C.

2.9 Clonaggio della sequenza codificante la proteina Nrarp

Per clonare la sequenza codificante la proteina Nrarp nei plasmidi di espressione pGem e pRsetB ho amplificato il cDNA di Nrarp direttamente da 500ng di DNA estratto da una linea cellulare umana, essendo tale gene privo di introni. Ho utilizzato prima i *primer* E5 e NrarpY per amplificare il cDNA e poi i *primer* Nrarp5' e NrarpH che possedendo i siti di restrizione per gli enzimi NcoI ed EcoRI al 5' ed HindIII al 3', mi hanno permesso di clonare Nrarp sia nel plasmide Pgem che in PrsetB, quest'ultimo mi ha consentito di esprimere la proteina con un *tag* istidinico all'N-terminale



2.10 Espressione di proteine in batteri

La metodologia utilizzata per esprimere le proteina *his-tag* TIG e *his-tag* Nrarp in batteri è la seguente.

Una singola colonia di cellule batteriche BL21-DE 3 trasformate con il plasmide ricombinante opportuno è preinoculata in 5 ml di terreno liquido LB in presenza di antibiotico ed incubata a 37 °C in agitazione per tutta la notte. Un'aliquota di questa coltura è inoculata in un opportuno volume di terreno liquido in un rapporto finale di 1:100 e mantenuta in agitazione a 37 °C, seguendo la crescita fino a quando l'assorbanza a 600 nm è uguale a 1 OD. Raggiunta tale densità ottica l'espressione della proteina è indotta incubando la sospensione batterica in presenza di IPTG a concentrazioni finali variabili (tra 0.1 e 1 mM); l'induzione è effettuata in agitazione per un numero di ore variabili da 4 a 16.

Le cellule sono poi raccolte mediante centrifugazione della coltura a 7000 x g per 10' a 4 °C. Il pellet è risospeso in 50 µl di tampone di lisi per ml di coltura batterica contenente 10 mM Tris/HCl a pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5 mg/ml lisozima, 0.1 mg/ml DNasi I, 10 mM CaCl₂, ed è lasciato per 30' in ghiaccio. Seguono tre cicli di congelamento-scongelo (tre minuti per ogni passaggio) incubando la sospensione a -70 °C ed a 42 °C alternativamente; tale procedura favorisce la rottura delle membrane cellulari. Le cellule così trattate sono incubate a 37 °C per 30 minuti. Dal lisato ottenuto è possibile separare la frazione proteica solubile da quella insolubile, centrifugando i campioni per 10' a 13000 rpm a 4 °C. Il sopranatante costituisce la frazione solubile, mentre il pellet è la frazione insolubile. Le frazioni ottenute possono essere analizzate mediante SDS-PAGE aggiungendo il tampone di carico.

2.11 Isolamento e solubilizzazione dei corpi di inclusione

Le proteine ricombinanti *his-tag* TIG e *his-tag* Nrarp sono entrambi prodotte, in grandi quantità, nei corpi di inclusione. E' stato perciò necessario isolarle e solubilizzarle da tale frazione proteica. A tal fine le cellule batteriche trasformate con il plasmide ricombinante pRSET B/TIG o pRsetB/Nrarp vengono raccolte per centrifugazione e risospese in una soluzione 20 mM di Tris/HCl a pH 8 (4ml per 100ml di coltura). La sospensione ottenuta è sottoposta a sonicazione intermittente, in ghiaccio, mediante 20 cicli alternati di 10''.

I corpi di inclusione separati dalla frazione solubile mediante centrifugazione a 18000 x g per 10' a 4 °C, vengono risospesi in una soluzione detergente (2M urea, 20 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 2% Triton X-100 a pH 8) per favorire la disgregazione del materiale particolato, e nuovamente sottoposti a sonicazione seguita da centrifugazione. Per favorire ulteriormente la solubilizzazione e l'allontanamento delle proteine contaminanti, il *pellet* è sottoposto ad un secondo lavaggio in presenza di urea e poi lavato in tampone privo di urea.

I corpi di inclusione così isolati sono solubilizzati in una soluzione denaturante (20mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM di imidazolo, 6 M Guanidina Idrocloruro, 3 mM 2-mercaptoetanolo pH 8). Questo passaggio oltre ad evitare fenomeni di aggregazione delle proteine, ne garantisce la completa denaturazione.

La soluzione ottenuta è sottoposta ad agitazione per 60' a temperatura ambiente e poi centrifugata a 15000 x g per 15' a 4 °C. Il sopranatante, contenente la proteina di interesse, viene sottoposto a filtri da 0.45 µm (Millipore).

2.12 Purificazione e *refolding* di *his-tag* TIG e *his-tag* Nrarp su colonna cromatografica

Dopo aver isolato e solubilizzato i corpi di inclusione la soluzione proteica contenente la proteina di interesse viene caricata su di una colonna di agarosio "*HiTrap Chelating*" della *Pharmacia Biotech*. Questa colonna consente di purificare la proteina ricombinante *his tag*-TIG sfruttando l'affinità del *tag* esaistidinico per gli ioni nichel immobilizzati su colonna. Ho utilizzato un tampone di equilibrio costituito da 20 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 5mM imidazolo, 6 M guanidina idrocloruro, 3 mM 2-mercaptoetanolo pH 8, adoperato anche per solubilizzare i corpi inclusi. Il campione è stato caricato su colonna con una velocità di flusso di 0.5 ml/min. Seguono due lavaggi, il primo con 10 ml del tampone di equilibrio e il secondo con 10 ml di un tampone contenente urea (20 mM di Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazolo, 6 M urea, 3 mM 2-mercaptoetanolo pH 8). Le proteine legate alla colonna sono rinaturate mediante 30 ml di un gradiente lineare decrescente di urea (6M – 0M) in 20 mM di Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM di imidazolo, 3 mM 2-mercaptoetanolo pH 8, effettuato con una velocità di flusso pari a 0.2 ml/min. Dopo un lavaggio con 5 ml di un tampone privo di urea, la proteina viene eluita utilizzando 20 ml di un gradiente lineare di imidazolo (20-500 mM) in 20 mM

Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 3mM 2-mercaptoetanolo pH 8. Vengono raccolte 20 frazioni di 1 ml, ciascuna delle quali è analizzata mediante SDS-PAGE per verificare la presenza della proteina di interesse. Le frazioni contenenti la proteina vengono riunite e sottoposte a dialisi in un tampone, una condizione salina che favorisce la solubilizzazione della proteina, 3 mM 2-mercaptoetanolo, che garantisce un ambiente riducente che impedisce l'ossidazione delle cisteine.

Per purificare la proteina ricombinante *his tag*-Nrarp ho utilizzato lo stesso sistema adoperato per la purificazione della proteina ricombinante *his tag*-TIG. Durante la purificazione su colonna ho utilizzato un tampone contenente Na₂HPO₄ 25 mM pH 7.5, 0.15 M NaCl

2.13 Ceppi batterici utilizzati

- **BMH 71-18 mutS**
- **JM109**
- **E.coli BL21 (DE3)**

Per le caratteristiche dei ceppi batterici si rimanda al manuale di laboratorio Molecular cloning (Maniatis CSH 1982)

2.14 Terreni utilizzati per la crescita di *E.coli*

- **LB (LURIA-BERTANI):** 10g/l triptone, 5g/l estratto di lievito, 10g/l NaCl e 2mM NaOH.
- **PIASTRE LB:** 10g/l triptone, 5g/l estratto di lievito, 10g/l NaCl, 15g/l agar, 2mM NaOH.
- **SOC :** 20g/l triptone, 5g/l estratto di lievito, 10ml/l NaCl 1M, 2.5ml/l KCl 1M, 10ml/l Mg₂ (sterilizzato per filtrazione), 10ml/l glucosio 2M (sterilizzato per filtrazione).

2.15 Antibiotici utilizzati

- **Ampicillina** [0.1 mg/ml]
- **MIX Antibiotico** di selezione del Kit GENE EDITOR (PROMEGA).

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Caratterizzazione del frammento di CBF1 ottenuto per proteolisi limitata

Nel laboratorio in cui ho svolto la mia attività di tesi è stato dimostrato che la proteina CBF1 induce piegamento del DNA bersaglio (fig. 3.1).

CBF1, sottoposta ad idrolisi limitata con proteinasi K, produce un frammento capace ancora di legare in modo specifico il DNA bersaglio in saggi EMSA. Esperimenti di permutazione circolare indicano che tale proteina tronca induce un piegamento del DNA più attenuato. Infatti come mostrato in figura 3.2 i complessi DNA/CBF1 sottoposta ad idrolisi limitata con proteinasi K formano una curva più appiattita rispetto ai complessi DNA/CBF1 integra. Al fine di caratterizzare la struttura del prodotto di proteolisi, ho utilizzato la proteina CBF1 sintetizzata *in vitro* in presenza di Metionina marcata con ³⁵S. Per ottenere la sintesi della proteina ho clonato la sequenza codificante CBF1 nel vettore di espressione pRsetB che presenta un *tag* esaistidinico a monte del sito multiplo di clonaggio ed una sequenza regolatrice che consente la trascrizione *in vitro* diretta dalla RNA polimerasi del fago T7. La proteina contiene dunque il *tag* all'estremità N-terminale, utile per poterla isolare con una resina di affinità contenente ioni Nichel. La proteina legata alla resina può essere separata per centrifugazione dai contaminanti e direttamente analizzata in un sistema elettroforetico in condizioni denaturanti (saggi di *pull-down*) e poi visualizzata mediante autoradiografia come mostrato in fig.3.2. Nella linea 2 è evidente una banda di circa 60KDa che corrisponde al campione eluito dalla resina di affinità e che presenta la stessa mobilità elettroforetica dell'*input* (linea 1); nella linea 3 il campione trattato con proteinasi K appare come una banda di circa 48 KDa, corrispondente ad un frammento della proteina mancante di 120-150 residui amminoacidici. Poiché i campioni preparati per l'analisi in SDS-PAGE presentano le proteine legate alla resina (linea 2 e 3), quindi contenenti l'ammino terminale esaistidinico, la banda osservata nel campione trattato con proteinasi K verosimilmente manca della regione C-terminale. Queste osservazioni indicano che almeno un sito particolarmente

suscettibile all'attacco della proteasi è localizzato nella regione di CBF1 che corrisponde alla sequenza amminoacidica 350-380. Analizzando la struttura primaria di CBF1 con il programma RPS-blast disponibile in rete che consente di fare predizioni sulla struttura tridimensionale, sulla presenza di domini conservati ed eventualmente sulla funzione di questi domini, ho ottenuto ulteriori informazioni. La ricerca ha messo in evidenza che il segmento compreso tra gli amminoacidi 361-444, presente nella regione C-terminale della proteina CBF1, adotta probabilmente un *folding* simile al dominio *Ig-like* presente in molti fattori trascrizionali, denominato dominio TIG. In seguito, la determinazione della struttura tridimensionale, mediante analisi cristallografica, di Lag-1, omologo di CBF1 in *C. elegans*, ha confermato la predizione strutturale (Lamar *et al.*, 2004). Il *core* della proteina comprende tre domini strutturali: un dominio centrale, un dominio N-terminale ed un dominio C-terminale, organizzati rispettivamente come una struttura detta β -trifoglio (BTD), e due domini *Ig-like*, simili a quelli identificati nei fattori trascrizionali della famiglia REL (RHR) (fig. 1.2).

3.2 Produzione ed analisi di muntanti di delezione di CBF1

Gli esperimenti di permutazione circolare indicano che il frammento proteolitico di CBF1, mancante del dominio C-terminale (dominio TIG) induce un pieamento del DNA più attenuato rispetto a quello indotto da CBF1 integra. Tali dati preliminari mi hanno indotto a focalizzare l'attenzione sullo studio del dominio TIG ed a questo scopo ho progettato una serie di plasmidi codificanti la proteina CBF1 deleta completamente o in parte del dominio TIG, ed infine un plasmide per ottenere l'espressione del dominio TIG isolato, per provarne il ruolo negli effetti conformazionali indotti da CBF1 nel DNA.

Ho ottenuto il clone del dominio TIG isolato eliminando dal plasmide pRSET B/CBF1 la sequenza nucleotidica codificante i primi 359 amminoacidi di CBF1 (dettagli della procedura per la costruzione del plasmide pRSET B/TIG in Materiali e Metodi). Le proteine espresse nel ceppo BL-21 di *E.coli*, difettivo per le proteasi Lon ed OmpT, e gli opportuni controlli sono stati analizzati mediante SDS-PAGE (fig 3.3A). Si osserva la presenza di una banda di forte intensità con peso molecolare atteso per la proteina *his tag*-TIG (19.5 kDa) nel solo lisato batterico totale di cellule trasformate con il plasmide ricombinante pRSET B/TIG; la proteina di fusione è presente essenzialmente in forma

denaturata nei corpi di inclusione (fig. 3.3B). La proteina ricombinante *his tag-TIG* è stata legata ad agarosio *HiTrap Chelating*, *Pharmacia Biotech*, purificata e rinaturata in gradiente negativo di urea. L'analisi in SDS-PAGE delle frazioni eluite (fig. 3.3C) ha mostrato che la proteina di interesse costituisce la frazione proteica dominante nell'eluato, essenzialmente priva di contaminanti. Le frazioni eluite contenenti la proteina di interesse, sono state riunite e sottoposte a dialisi in una soluzione 25mM Na₂HPO₄ pH 7.5, 0.1 M NaCl, 3mM 2-mercaptoetanololo per rimuovere l'imidazolo. Per avere una conferma sperimentale che la proteina TIG abbia assunto una struttura tridimensionale ho analizzato la variazione di fluorescenza dei residui di triptofano in condizioni denaturanti. Lo spettro di fluorescenza della proteina presenta un massimo a 341 nm che è un valore tipico per residui di triptofano poco esposti al solvente. Dopo denaturazione in 6M guanidina idrocloruro ho osservato uno spostamento del massimo di fluorescenza verso il rosso, dovuto ad una maggior esposizione al solvente dei residui di triptofano, ed una variazione dell'intensità della fluorescenza (fig. 3.3D).

Gli spettri di fluorescenza sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Chimica, sotto la guida della Prof. L. Birolo, che ringrazio per il suo insegnamento.

I mutanti di CBF1 progettati portano alla produzione di quattro proteine che differiscono tra loro di circa 20 amminoacidi (fig. 3.4A; dettagli della procedura di mutagenesi in Materiali e Metodi). La proteina meno estesa, denominata *his-tagΔCBF1(1-361)*, è costituita da 361 amminoacidi e corrisponde al frammento di CBF1 mancante degli esoni 10 e 11, codificanti il dominio TIG. Un altro mutante di delezione è costituito da 386 amminoacidi e differisce dal primo mutante perché contiene 25 residui in più alla estremità C-terminale; questa proteina presenta la stessa mobilità elettroforetica del frammento proteolitico di CBF1 prodotto dalla proteinasi K. Infine, le ultime due proteine progettate, rispettivamente costituite da 414 e 435 amminoacidi contengono frammenti più estesi del dominio TIG.

Precedenti prove di espressione in batteri avevano portato ad un accumulo della proteina CBF1, di lunghezza completa, nei corpi d'inclusione in cui si trova in una forma denaturata. La procedura di purificazione e rinaturazione applicata per il dominio TIG isolato non risulta soddisfacente per la proteina intatta, che non è stabile in soluzione e tende a formare precipitati. In lisato di

reticolociti invece è possibile ottenere la proteina in forma nativa, probabilmente per la presenza di fattori che assistono correttamente il processo di *fold*ing.

Le proteine tronche al C-terminale sono state sintetizzate in presenza di Metionina marcata con ³⁵S, analizzate per SDS-PAGE e rilevate per autoradiografia (fig. 3.4B e C). Le distanze di migrazione delle bande rilevate sono in accordo con i valori dei pesi molecolari dedotti dalle sequenze amminoacidiche:

<i>his-tag</i> CBF1(1- 361)	45236 Da
<i>his-tag</i> CBF1(1- 386)	47959Da
<i>his-tag</i> CBF1(1-414)	50988 Da
<i>his-tag</i> CBF1(1- 435)	53502 Da

3.3 Analisi EMSA dei mutanti di delezione

Per verificare la capacità dei mutanti di delezione di interagire in maniera specifica con il DNA ho eseguito dei saggi EMSA usando come sonda un oligonucleotide (denominato IL-6κB) contenente il sito di legame di CBF1 presente nel promotore del gene della interleuchina-6, marcato con ³²P.

Nei saggi ho utilizzato degli oligonucleotidi non marcati come competitori per analizzare la specificità di legame, come indicato in figura 3.5A.

I mutanti di delezione mostrano, nei saggi EMSA, un segnale molto meno intenso in paragone a quello prodotto da simili quantità di CBF1 di lunghezza completa. L'analisi del mutante *his-tag*ΔCBF1(1-361), privo di tutto il dominio TIG, non sempre consente di osservare un legame specifico alla sequenza bersaglio; i mutanti *his-tag*ΔCBF1(1-386) e *his-tag*ΔCBF1(1-414) legano in modo specifico il DNA bersaglio, invece, per il mutante *his-tag*ΔCBF1(1-435) non è stato possibile potuto mettere in evidenza il legame alla sonda. Questo risultato potrebbe essere spiegato da una conformazione diversa strutturalmente da quella nativa che non permette un *fold*ing corretto. I risultati confermano comunque i dati precedentemente riportati in letteratura che indicano nelle regioni comprese tra gli amminoacidi 192-201 e 265-289, contenute nel mutante di delezione *his-tag*ΔCBF1(1-361), le sequenze necessarie al riconoscimento del DNA che dunque non coinvolgono direttamente il dominio TIG.

il dominio TIG, che da solo non interagisce con il DNA, è però, in grado di formare un complesso ternario DNA/mutanti di delezione C-terminale/ TIG (fig. 3.5B). Le forme delete di CBF1 costituite rispettivamente da 361, 386 e 414 amminoacidi formano complessi con la sonda IL-6 kB (oligonucleotide contenente il sito di legame di CBF1 del promotore di IL-6) marcata con ^{32}P che risultano essere ulteriormente ritardati in presenza del dominio TIG, raggiungendo la stessa migrazione del complesso formato dalla proteina integra CBF1 con la sonda, o di poco superiore (fig. 3.6A). Questo risultato mostra una forte interazione fra il dominio TIG e la restante parte della proteina, tale da ricostituire la proprietà della completa molecola anche se lo scheletro covalente della catena polipeptidica è interrotto.

3.4 Il dominio TIG influenza la conformazione indotta nel DNA legato

E' noto, da studi condotti nel laboratorio in cui ho svolto la tesi, che CBF1 purificata da colture cellulari induce piegamento nel DNA a cui si lega.

Ho analizzato i tre mutanti di delezione già descritti in grado di formare complessi specifici con il DNA, per valutarne gli effetti conformazionali indotti nel DNA legato ed ho ottenuto risultati simili in tutti i casi. Mostro dunque, a titolo di esempio, gli esperimenti effettuati con il mutante *his-tagCBF1Δ(1-386)*. In queste analisi si utilizzano come sonde radioattive frammenti di DNA, di uguale lunghezza, che rappresentano permutazioni circolari della stessa sequenza, contenente il sito di legame di CBF1 al DNA. Il sito di legame per la proteina si trova in posizioni diverse e l'effetto del ripiegamento è tanto maggiore quanto più questo è situato vicino al centro del frammento, producendo perciò una diversa conformazione che si riflette in un ritardo nella mobilità elettroforetica del complesso. Dunque se la proteina induce il piegamento del DNA è possibile evidenziarlo mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti.

Come si evince dalla figura 3.6B In presenza del solo mutante *His-tagCBF1Δ(1-386)* le bande del complesso DNA/proteina separate nella regione di linearità del gel risultano formare una curva alquanto appiattita, invece l'effetto del ripiegamento sul DNA bersaglio è accentuato in presenza del complesso formato da *His-tagCBF1Δ(1-386)* e *His-tagTIG(360-500)*.

Questo risultato dimostra che il dominio TIG ha un ruolo importante nel determinare il grado di piegamento del DNA indotto dalla proteina CBF1.

3.5 Costruzione delle sonde di *phasing*

Gli esperimenti di permutazione circolare consentono di valutare solo genericamente l'ampiezza dell'effetto sulla conformazione del DNA, non di determinare eventuali differenze nell'assetto tridimensionale dei due segmenti del DNA che delimitano l'angolo del piegamento indotto. Al fine di valutare in modo più preciso le differenze indotte da CBF1 nativa e da CBF1 Δ TIG, sulla conformazione del DNA nelle tre dimensioni, ho progettato esperimenti di *phasing*. Per effettuare questa analisi è necessario disporre di sonde contenenti il sito di legame di CBF1 disposto a distanza variabile fra 10 e 20 bp (cioè un completo giro d'elica) da una specifica sequenza caratterizzata da un angolo intrinseco, costituita da sei tratti di AAAAAA (*set* di A) ciascuno con un *bending* intrinseco nel DNA di circa 18°. Tale valore è stato determinato da Koo *et al.* (Koo *et al.*, 1990), misurando la cinetica di ciclizzazione di oligonucleotidi di DNA contenenti sequenze di A in fase. I valori ottenuti con questo metodo sono in accordo con le determinazioni derivanti da analisi al microscopio elettronico (Griffith *et al.*, 1986). Per il clonaggio delle sei sonde di *phasing*, ho utilizzato una serie di sei vettori (pSB-10,-12,-14,-16,-18,-20) contenenti EcoR I e SacI, usati per clonare il sito di legame di CBF1 a distanza progressivamente maggiore di due coppie di basi dalla sequenza che genera il *bending* intrinseco. La spaziatura variabile consente di avere sia una traslazione tra il sito specifico di legame con la proteina CBF1 e la sequenza di poli A, sia una rotazione di ca. 72°C per ogni dinucleotide aggiunto; in modo tale che dopo 10 bp venga ripristinato il giro d'elica. I cloni ricombinanti sono stati identificati mediante ibridazione (fig. 3.7A) con l'oligonucleotide contenente il sito di legame di CBF1 marcato con ³²P. Dai plasmidi ricombinanti ho amplificato per PCR la regione opportuna (fig. 3.7B), ottenendo così le sei sonde di DNA 10-20 pH-CBF1, (Fig.3.8A) lunghe 230-240 bp, contenenti il sito CBF1, una spaziatura variabile da 10-20 e il set di A dotato di piegamento intrinseco.

Dal gel di poliacrilammide (fig. 3.8C) si può notare che le sonde di DNA pur essendo di 230-240 bp, migrano invece come sonde di ca. 500 bp. Tale migrazione anomala è dovuta al piegamento del DNA causato dal *set* di poli A.

3.6 Analisi di *phasing* dei complessi CBF1/DNA e CBF1 Δ TIG/DNA

Per comprendere le differenze di piegamento del DNA, indotte da CBF1 nativa e CBF1 trattata con proteinasi K, ho eseguito un saggio di *phasing* nel quale ho incubato le sei sonde 10/12/14/16/18/20 pH/CBF1 sia con la proteina nativa che con la proteina *His-tag*CBF1 Δ TIG. I saggi di *phasing* indicano che la proteina mancante del dominio TIG induce un diverso piegamento del DNA bersaglio rispetto alla proteina nativa (Fig. 3.9A). L'entità del ritardo elettroforetico di ciascun complesso relativamente alla migrazione della sonda libera indica se la proteina induce, in ogni particolare sonda, un effetto additivo rispetto al *bending* intrinseco o se invece vi si oppone. La traslazione e rotazione progressiva del sito di legame di CBF1 nelle sonde di *phasing*, rispetto al centro di curvatura intrinseco, implica che l'additività dell'effetto osservato sia dipendente dalla distanza fra il centro di curvatura intrinseco e quello indotto dalla proteina nel complesso. La comparazione fra la serie dei campioni formati dalla proteina CBF1 nativa e quelli formati dalla proteina *his-tag*CBF1 Δ TIG mostra un evidente differenza nel *pattern* del ritardo elettroforetico. Tale risultato indica, quindi, che le due forme di CBF1 sono in grado entrambe di piegare il DNA, ma in modo diverso. Riportando in grafico le differenze di mobilità elettroforetica tra il complesso e la sonda libera, normalizzate rispetto alla media delle differenze, in funzione della spaziatura variabile, si può evidenziare che CBF1 nativa e *his-tag*CBF1 Δ TIG piegano in modo diverso rispetto al piegamento intrinseco dovuto al *set* di A (Fig. 3.9C). Più precisamente il complesso CBF1 integra con la sonda 14 pH/CBF1 rappresenta il punto di mobilità massima, invece il complesso formato da *his-tag*CBF1 Δ TIG con la stessa sonda di DNA rivela il punto di mobilità minima. Questo risultato indica che le due forme di CBF1 inducono un piegamento opposto.

3.7 Influenza delle sequenze fiancheggianti sul *bending* del DNA indotto da CBF1

Un'altra variabile che può influenzare la conformazione del DNA nel complesso con la proteina è la natura della sequenza di DNA fiancheggiante il sito di legame. E' stato dimostrato, ad esempio, che varianti dei siti κ B, dotati di un piegamento intrinseco diverso, formano complessi con il fattore

trascrizionale eterodimerico NF- κ B in cui il piegamento del DNA indotto dalla proteina è invertito relativamente al piegamento intrinseco e di entità diversa in rapporto alla specifica sequenza consenso κ B implicata.

Nel promotore dell'IL6, il sito di legame di CBF1 è parzialmente sovrapposto al sito di legame per NF- κ B. Per verificare se tale sequenza nucleotidica, fiancheggiante il sito di legame di CBF1, moduli l'effetto di *bending* determinato da CBF1 ho condotto saggi di permutazione circolare con sonde denominate Mut-1 κ B recanti tre basi del sito κ B, fiancheggianti la sequenza riconosciuta da CBF1, mutate. Ho, quindi sostituito la sequenza contenente il sito di legame di CBF1 ATGTGGGATT**TTCCCAT**G clonata nel plasmide PbindII con la sequenza ATGTAATATT**TTCCCAT**G mutata solo nel sito di legame di NF- κ B. I plasmidi ricombinanti sono stati identificati mediante un'analisi di restrizione differenziale con l'enzima di restrizione SspI. La sonda di DNA è stata ottenuta amplificando mediante PCR l'opportuna regione (dettagli della analisi in Materiali e Metodi). L'analisi di permutazione circolare è risultata essere perfettamente sovrapponibile all'analisi fatta in presenza della sonda non mutata, per cui in questo esperimento non ho rilevato alcuna influenza indotta dalla variazione della sequenza fiancheggiante sull'effetto di *bending* del DNA nel complesso.

3.8 Analisi dei trascritti di CBF1

L'analisi bioinformatica indica che la codifica del dominio TIG, che come ho dimostrato influenza in modo molto evidente la conformazione del DNA nel complesso con CBF1, parte con l'inizio dell'esone 10 e comprende l'esone 11. Ho già descritto la struttura dei messaggi derivati da *splicing* alternativo al 5' del trascritto, non è stata mai studiata invece una eventuale eterogeneità dei trascritti nella regione 3'. La corretta conformazione dei complessi DNA proteina gioca un ruolo fondamentale nella regolazione genica (Falvo *et al.*, 1995), dunque eventuali prodotti di *splicing* alternativo che eliminino la codifica del dominio TIG, darebbero luogo ad una proteina CBF1 con proprietà regolative diverse dalla forma che lo contiene. Dunque, considerando i risultati ottenuti dalle analisi di *phasing* ho ipotizzato che la cellula potesse servirsi alternativamente di CBF1 e della forma priva del dominio TIG per regolare differentemente la trascrizione genica. A questo proposito è da notare che in

certe linee cellulari murine ed umane CBF1 rivela due forme, una che rappresenta la forma canonica ed un'altra con un peso molecolare apparente più basso (fig. 3.10A). Al fine di esaminare la presenza di una qualsiasi forma di CBF1 priva del dominio TIG ho effettuato delle analisi sull'RNA messaggero. In particolare ho condotto i miei esperimenti sull'RNA di cellule di fibroblasti murini NIH3T3 che, come mostrato in figura 3.10A, presentano due forme di CBF1. Il sistema di analisi consiste in RT-PCR innescata al 3' da un oligonucleotide deossi poli T (dT₁₂₋₁₈) ed al 5' da un oligonucleotide che ibridizza il trascritto di CBF1 al centro dell'esone 9 (E9-5'). Sia la lunghezza (circa 2950bp) che l'analisi di restrizione dei frammenti amplificati corrispondono esattamente al cDNA della proteina CBF1 nota, contenente il TIG (fig. 3.10B e C). Benchè questa analisi non sia ovviamente conclusiva, non ho riscontrato alcuna evidenza che *in vivo* sia prodotto un messaggio privo degli esoni codificanti il TIG.

3.9 Espressione di Nrarp

In letteratura è riportato che Nrarp è una piccola proteina di 114aa, che viene trascrizionalmente indotta dal sistema CBF1/Notch e che a sua volta regola il *turn-over* di Notch attraverso un meccanismo di *feed-back* negativo (Lamar *et al.*, 2001). Dati di letteratura indicano che in *C.elegans* Nrarp lega CBF1 interagendo con il dominio TIG, ho quindi deciso di studiare il coinvolgimento di tale proteina nel sistema CBF1/Notch per verificare il ruolo del dominio TIG per l'interazione con Nrarp nel sistema umano e per investigare eventuali variazioni della conformazione del DNA nel complesso con CBF1 determinate dal legame con Nrarp. Ho potuto clonare la sequenza codificante la proteina Nrarp direttamente dal gene umano perchè esso è privo di introni. Ho quindi amplificato il cDNA di Nrarp utilizzando come stampo il DNA umano e *primer* appropriati. La sequenza codificante è stata poi inserita in vettori di espressione procariotici (fig. 3.11) ed ho così ottenuto la proteina Nrarp ricombinante con un tag istidinico all'N-terminale.

Ho analizzato le proteine espresse nel ceppo BL-21 di *E.coli* e gli opportuni controlli mediante SDS-PAGE (Fig 3.11A). Si può notare la presenza di una banda di forte intensità dal peso molecolare corrispondente a quello atteso per la proteina *his tag*-Nrarp (17 KDa) nel solo lisato batterico totale di cellule trasformate con il plasmide ricombinante; questa banda è dovuta

all'espressione della proteina eterologa ed è assente nel lisato batterico di cellule trasformate con il plasmide non ricombinante pRSET B. La proteina di fusione è presente in forma denaturata nei corpi di inclusione (fig. 3.11B).

Per la produzione di grandi quantità della proteina, ho quindi isolato i corpi di inclusione e da questi la proteina ricombinante *his tag*-Nrarp è stata purificata utilizzando una colonna di agarosio *HiTrap Chelating, Pharmacia Biotech*.

La proteina legata alla colonna è stata sottoposta a gradiente negativo di Urea (6M-0M) per favorirne la rinaturazione, ed eluita in gradiente di imidazolo (20mM-500mM). Infine l'analisi in SDS-PAGE delle frazioni eluite (fig. 3.11B) ha mostrato che la proteina di interesse costituisce la frazione proteica dominante nell'eluato (circa il 90%). La quantità di proteina purificata è circa 6 mg per litro di coltura batterica.

Le frazioni eluite contenenti la proteina di interesse, sono state unite e sottoposte a dialisi in una soluzione 50mM Na₂HPO₄ pH 7.5, 0.1 M NaCl, e 3mM 2-mercaptoetanolo ed utilizzate per ulteriori analisi.

Dati recenti di letteratura mostrano che il dominio C-terminale (TIG) della proteina CSL in *Xenopus* è necessario per l'interazione con Nrarp *in vivo*. Al fine di studiare, nel sistema umano la regione di CBF1 implicata nel legame con la proteina Nrarp, e di determinare l'effetto del complesso sulla conformazione del DNA legato *in vitro*, ho prodotto altri due mutanti di delezione basandomi sui dati derivati della struttura cristallografica di CBF1 (Koval *et al.*, 2004). Ho progettato un mutante di CBF1 privo del dominio N-terminale, costituito, quindi, dal dominio BTD e dal dominio TIG *his-tag*ΔCBF1(178-500) ed uno privo anche del dominio TIG, ovvero il solo dominio BTD *his-tag*ΔCBF1(178-361). Questo insieme di mutanti permetterebbe di identificare il ruolo di ciascun dominio di CBF1 nella interazione con Nrarp.

Ho condotto degli esperimenti *in vitro* utilizzando sia *his-tag* Nrarp purificata da batteri che quella priva del *tag* e sintetizzata in lisato di reticolociti. Poiché Nrarp lega CBF1 in un complesso ternario con NIC, ho incubato insieme Nrarp e NIC sia con CBF1 integra che con i diversi mutanti di delezione di CBF1. Per osservare la formazione del complesso ho utilizzato diversi approcci tecnici: saggi EMSA, saggi di *pull-down* e saggi di *cross-linking* con gluteraldeide (Sandra S. *et al.*, 2004). Tali esperimenti non mi hanno però consentito di

visualizzare in nessun caso la formazione del complesso ternario. Poiché tali condizioni tecniche non risultano essere adeguate per l'osservazione del complesso ternario potrebbe essere opportuno utilizzando, come è stato già riportato per l'omologo di CBF1 in *Xenopus*, esperimenti in ambiente cellulare. La proteina *his-tag* Nrarp è stata anche purificata in quantità utili per uno studio strutturale mediante risonanza magnetica nucleare.

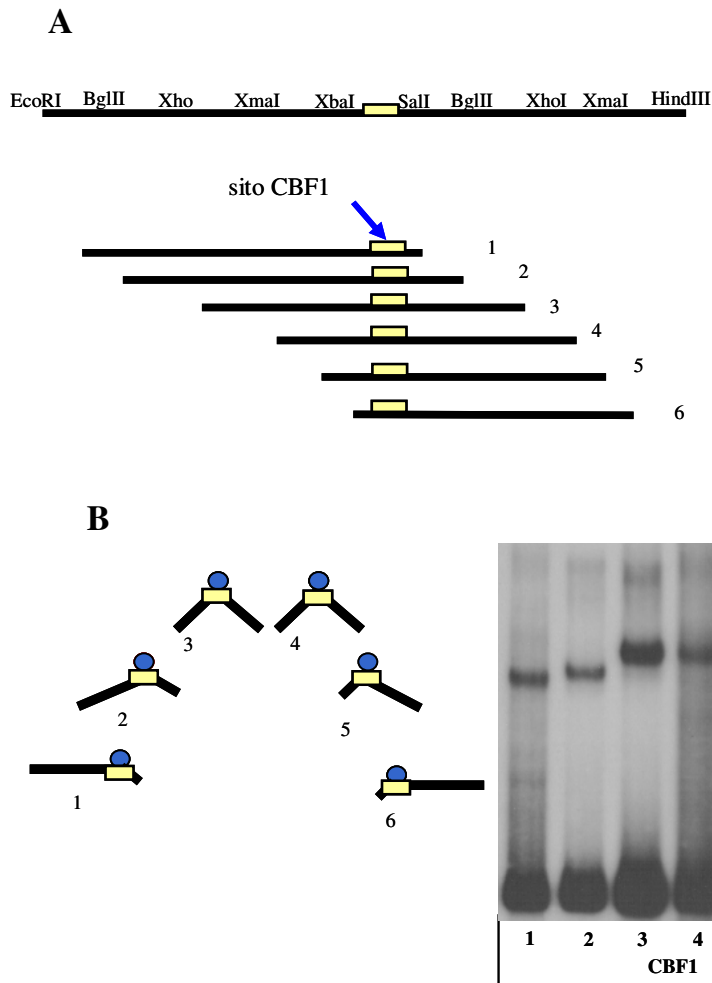


Figura 3.1. **A.** Rappresentazione schematica delle sei sonde di DNA, utilizzate nelle analisi di *bending*. Esse rappresentano la permutazione circolare del sito di legame di CBF1 presente nel gene di IL6 (colorato in giallo). **B.** Schema della migrazione elettroforetica dei complessi sonda/CBF1 (in blu è rappresentata la proteina CBF1); se la proteina è in grado di piegare il DNA, essa conferisce ai complessi una differente migrazione elettroforetica dipendente dalla posizione del sito di legame. Gel EMSA (5%) dei complessi sonda/CBF1. Le sonde utilizzate per il saggio sono: 1) EcoRI-Sal I; 2) Bgl II; 3)Xho I; 4) Xma I; 5) BamH I; 6) Xba I- Hind III.

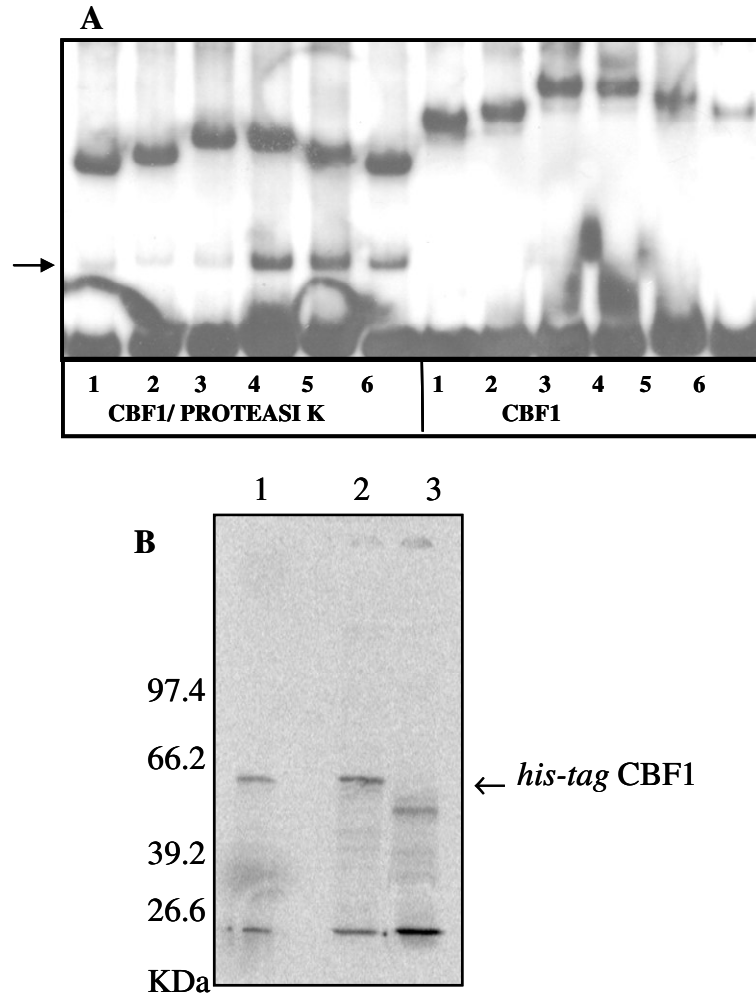


Figura 3.2. A. Analisi di spostamento della mobilità elettroforetica con sonde di permutazione circolare in complesso con la proteina CBF1, in presenza ed in assenza di proteinasi K. Le sonde utilizzate per il saggio sono: 1) EcoRI-Sal I; 2) Bgl II; 3) Xho I; 4) Xma I; 5) BamH I; 6) Xba I- Hind III (vedi Materiali e Metodi). La freccia indica segnali aspecifici.

B. Analisi in 8% SDS-PAGE del saggio di *pull-down*, con la resina *Chelating Sepharose Fast Flow*, della proteina *his-tag* CBF1 sintetizzata *in vitro* in presenza di Metionina marcata con ^{35}S .

1. *his-tag*CBF1 input

2. *his-tag*CBF1 eluita dalla resina di affinità

3. *his-tag* CBF1 trattata con proteinasi K ed eluita dalla resina di affinità

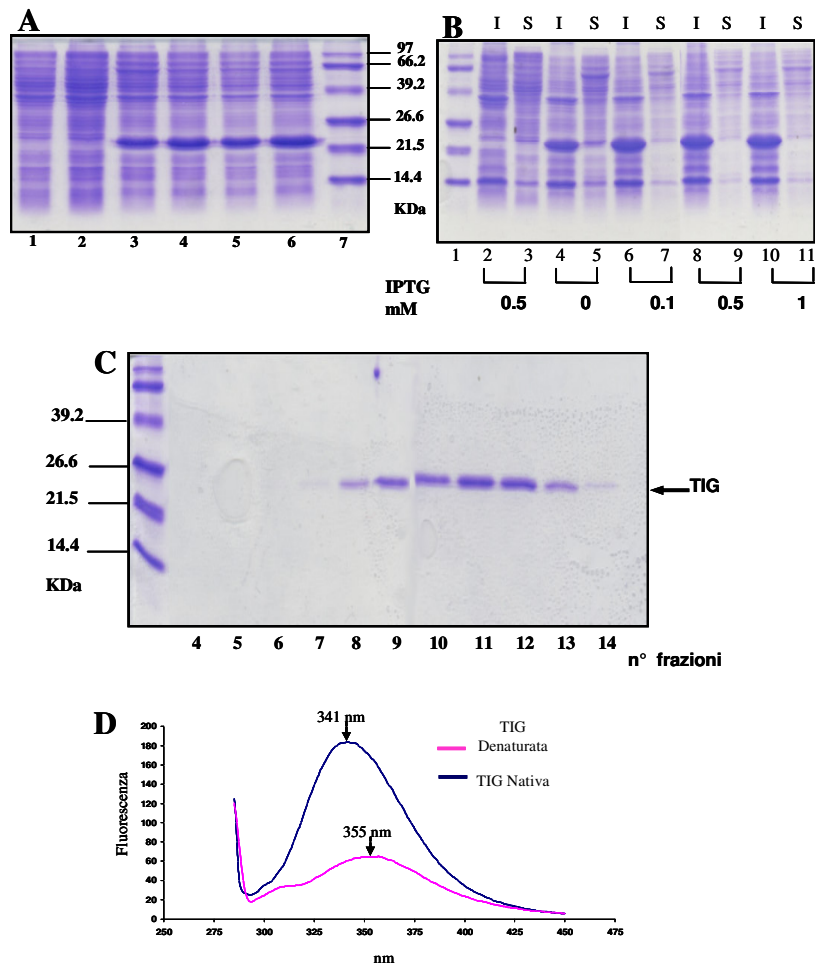


Figura 3.3. A. Analisi 15% SDS-PAGE dei lisati cellulari di cellule trasformate con il plasmide pRSET B e pRSET B/TIG.

Cellule trasformate con il plasmide pRSET B:

1.non indotte;2.indotte con 0.5 mM IPTG

Cellule trasformate con il plasmide ricombinante pRSET B/TIG :

3.non indotte; 4.indotte con 0.1 mM IPTG; 5.indotte con 0.5 mM IPTG

6.indotte con 1 mM IPTG; 7.Marcatori di peso molecolare. **B.** Analisi 15% SDS-PAGE 1.

marcatori di peso molecolare; 2,3. frazioni proteiche solubili (S) e insolubili (I) di cellule

trasformate con il plasmide pRSET B; 4,11. frazioni proteiche solubile e insolubile di cellule

trasformate con il plasmide pRSET B/TIG indotte con diverse concentrazioni di IPTG. **C.**

Analisi in 15% SDS-PAGE delle frazioni della proteina *his tag*-TIG eluite con gradiente di

imidazolo dalla resina *HiTrap Chelating* della Pharmacia Biotech. **D.** Spettri di fluorescenza della proteina *his tag*-TIG, le condizioni di registrazione degli spettri sono descritte nel testo.

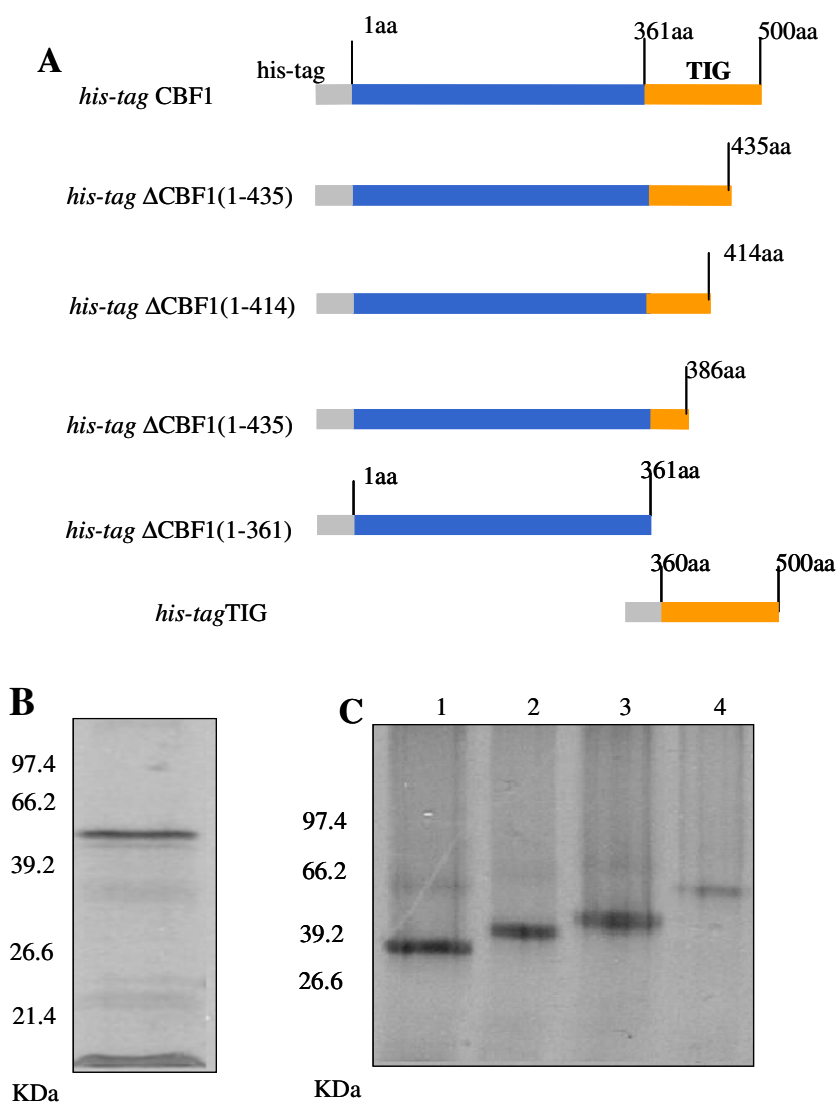


Figura 3.4. A. Schema dei mutanti di delezione ricombinanti della proteina CBF1
B. Analisi in 12% SDS-PAGE del mutante di delezione *his-tag*Δ CBF1(1-361) sintetizzato in vitro in presenza di Met ³⁵S. **C.** Analisi in 8% SDS-PAGE di mutanti di delezione di CBF1 sintetizzati in vitro in presenza di Met ³⁵S
 1) *his-tag* CBF1Δ(1- 386)
 2) *his-tag* CBF1Δ(1- 414)
 3) *his-tag* CBF1Δ(1-435)
 4) *his-tag* CBF1

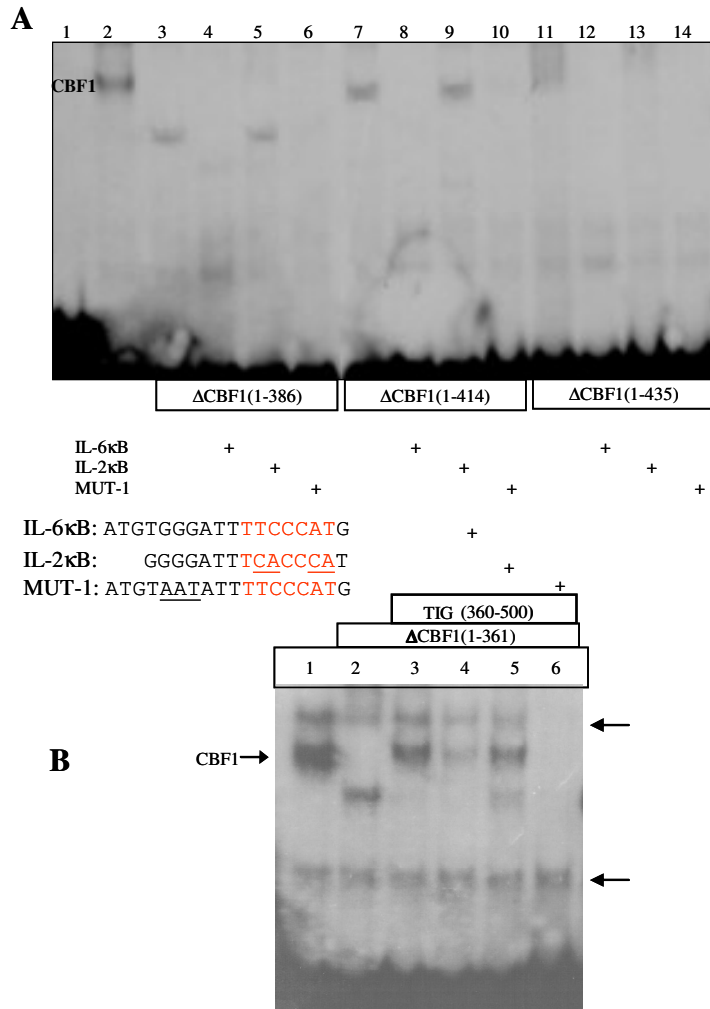


Figura 3.5 A. Saggio EMSA dei mutanti di CBF1 con delezioni nella regione C-terminale, in presenza della sonda IL-6κB marcata con ^{32}P . Nella linea 1 è presente la sola sonda marcata, mentre nella linea 2 è presente la proteina CBF1 (costituita da 500 amminoacidi) in presenza della sonda. Il saggio è condotto in presenza delle proteine mutanti e con gli oligonucleotidi competitori, come indicato. **B.** Saggio EMSA dei mutanti di delezione di CBF1 al C-terminale in assenza e in presenza del frammento *his-tag*TIG (360-500) purificato (130ng). La sonda utilizzata è IL-6κB marcata con ^{32}P . Nella linea 1 è mostrato *his-tag*CBF1(500 aa) con la sonda. Il saggio è condotto con il mutante di delezione *his-tag*ΔCBF1(1-361), sia con la sola sonda (linea 2) sia in presenza del frammento TIG (linea 3) e dei competitori: IL-6κB (linea 4), IL-2κB (linea 5), Mut-1κB (linea 6).

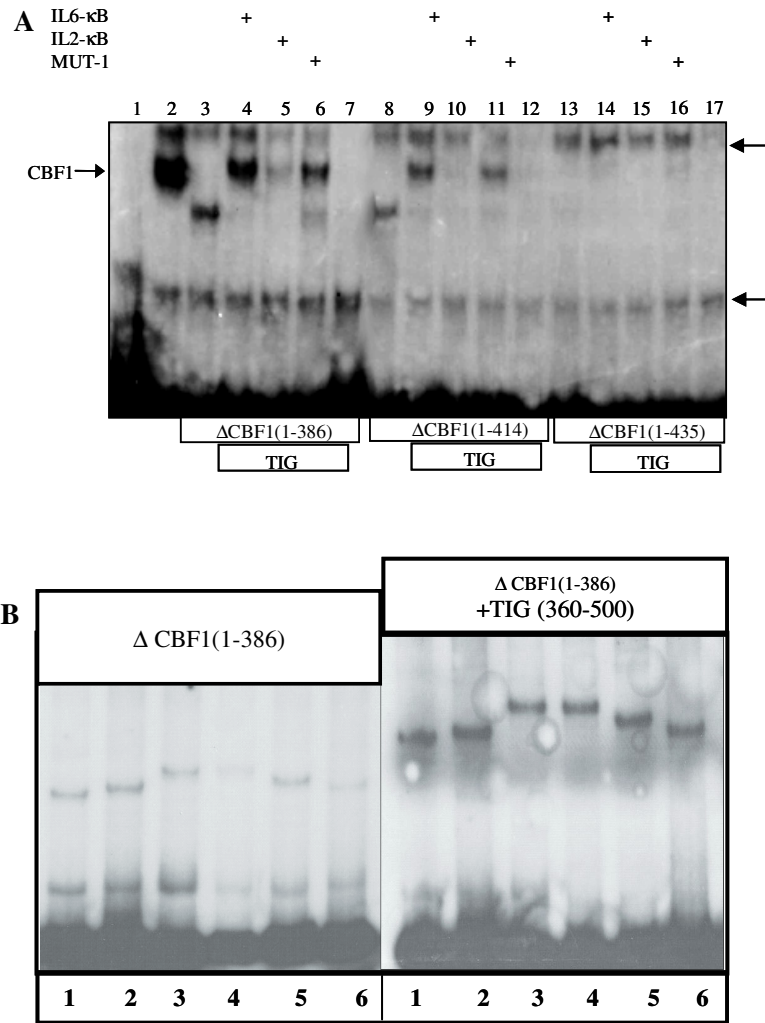


Figura 3.6. A. Analisi EMSA di mutanti di delezione della proteina CBF1. Nella linea 1 è presente la sola sonda, mentre nella linea 2 è presente CBF1 (500aa) con la sonda. Il saggio è condotto con i mutanti di delezione in presenza del frammento TIG e con gli oligonucleotidi competitori, come indicato. Le proteine *his-tag*CBF1, *his-tag*ΔCBF1(1-361), *his-tag*ΔCBF1(1-386), *his-tag*ΔCBF1(1-414) e *his-tag*ΔCBF1(1-435) sono state sintetizzate in lisato di reticolociti, il frammento TIG (purificato) è stato invece ottenuto per espressione in *E.coli*. Le frecce a destra indicano segnali aspecifici. **B.** Saggio di permutazione circolare condotto con la proteina mutata *his-tag*ΔCBF1(1-386). Il saggio è condotto in assenza e in presenza del frammento *his-tag*TIG(360-500), come indicato.

Le sonde utilizzate per il saggio sono (vedi anche Materiali e Metodi):

1) EcoRI-Sal I; 2) Bgl II; 3)Xho I; 4) Xma I; 5) BamH I; 6) Xba I- Hind III.

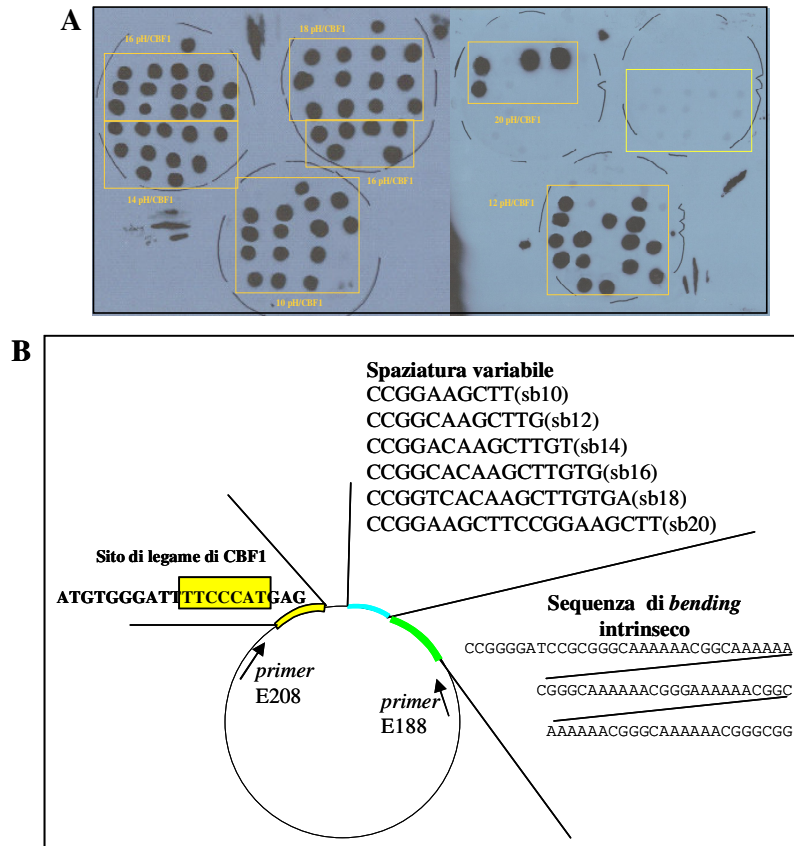


Figura 3.7 A. Analisi autoradiografica delle colonie batteriche lisate ibridate con l'oligonucleotide contenente il sito di legame per CBF1:

5'AATTCTGGGATTTCCCATGAGAGCT, marcato con³²P.

Evidenziati nei riquadri in arancio i cloni positivi contenenti i vettori ricombinanti (pSB 10,-12,-14,-16,-18, -20) che presentano il set di poli A e il sito di riconoscimento per CBF1 e tra questi la spaziatura variabile. Ogni vettore ricombinante differisce dall'altro per due nucleotidi aggiunti nella spaziatura variabile. Nel riquadro il giallo sono analizzate colonie batteriche recanti gli stessi plasmidi in cui è clonata una diversa sequenza. **B.** Schema: sequenze amplificate per PCR. Le sequenze sottolineate E208 ed E188 corrispondono ai *primer* utilizzati:

E208 5'ATACATAGTATGTGTATG
 E188 5'GAAATTAATACGACTCAC

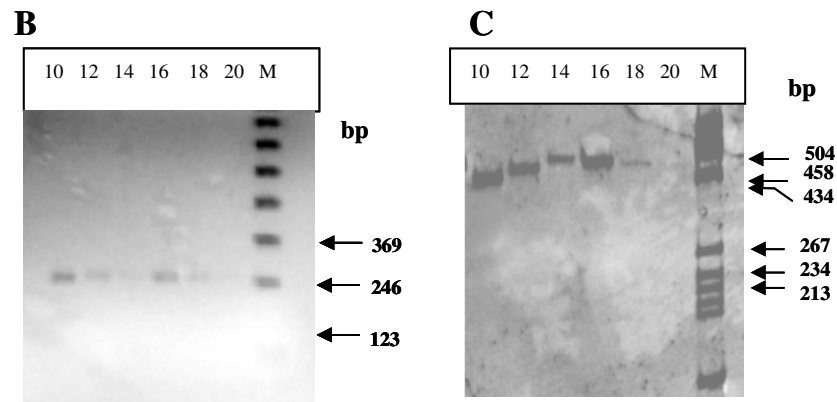
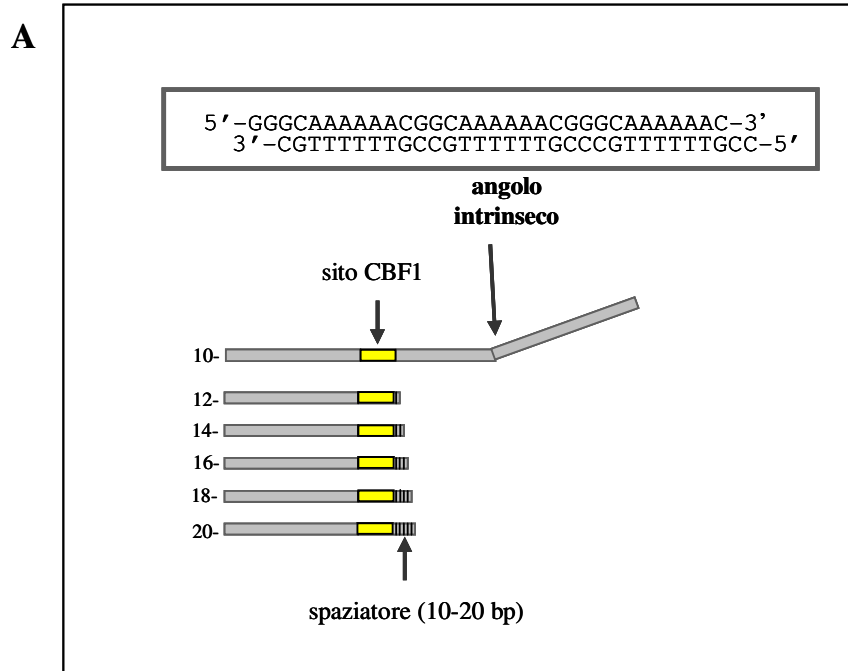


Figura 3.8 A. Struttura delle sonde di *phasing*. Sotto: **B**. Analisi su gel di agarosio (1.2%) delle sei sonde di *phasing*. **C**. Analisi su gel di poliacrilammide (5%) delle sei sonde di *phasing*.

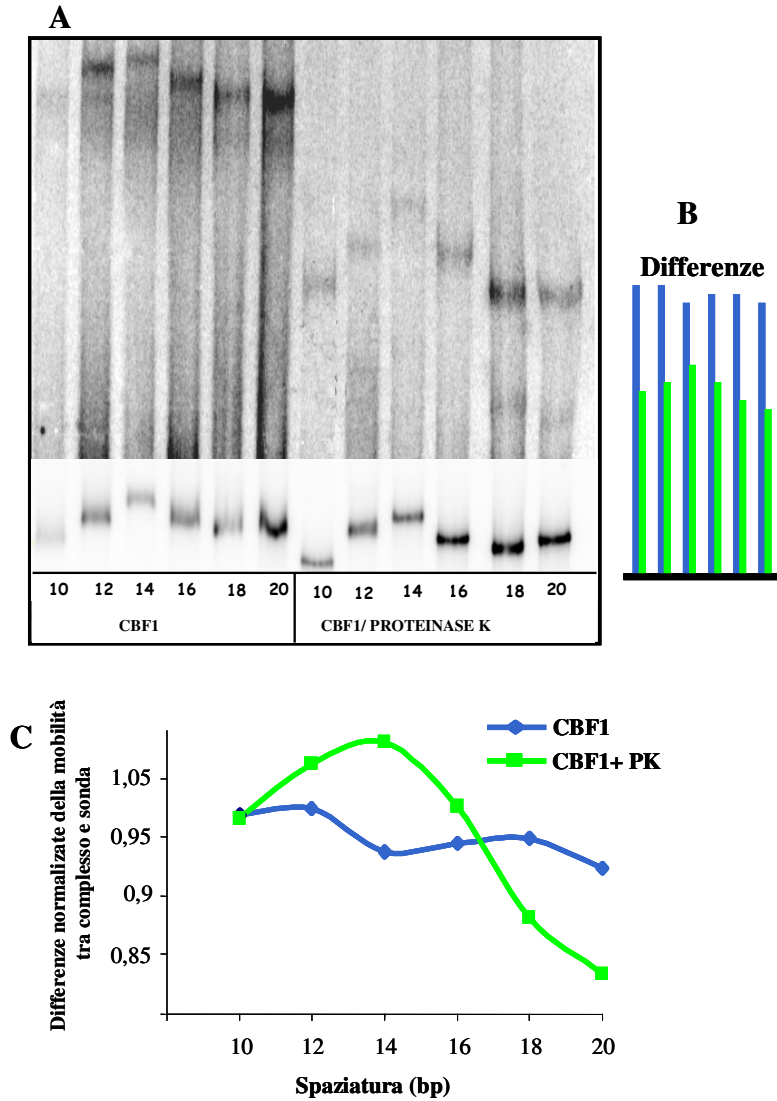


Figura 3.9. **A.** Saggio di *phasing*. Nelle prime sei linee i saggi sono condotti con un'aliquota del lisato di reticolociti di coniglio in cui è stata sintetizzata la proteina CBF1, in presenza delle sonde di *phasing* da 10-20 pH/CBF1. Nelle seconde sei linee i saggi sono stati condotti con CBF1 trattata con proteinasi K, in presenza delle sonde di *phasing* da 10-20 pH/CBF1. **B.** Differenze di mobilità tra complessi e sonde libere. **C.** Grafico del saggio di *phasing*: sull'asse delle ascisse è indicata la lunghezza della spaziatura variabile (10-20 bp). Sull'asse delle ordinate è indicata la differenza tra la mobilità della sonda libera e dei complessi sonda-proteina normalizzata rispetto alla media delle differenze.

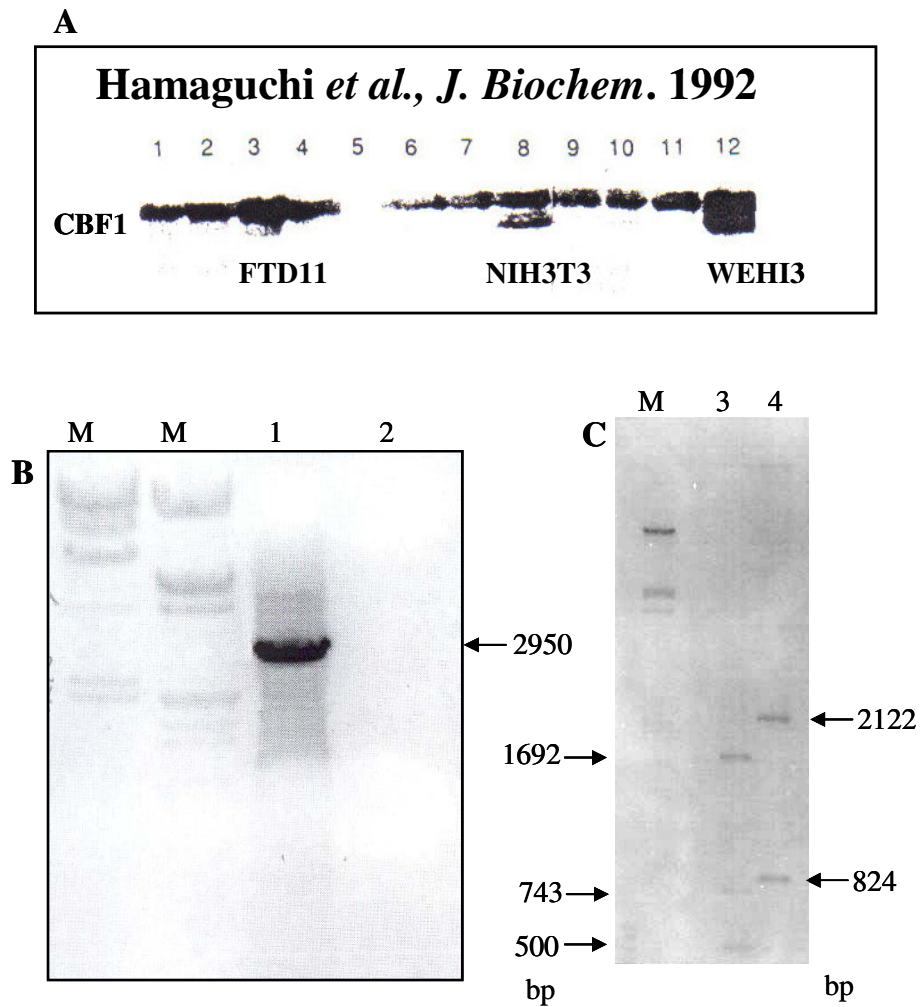


Figura 3.10. A. Nella figura è riportata l'analisi di *western blot* di estratti nucleari di diversi tipi cellulari con anticorpo anti CBF1 T6719. Linee cellulari: linea 1: 38B9; linea 2: Lyd9 (proB); linea 3: FTD11 (pro T); linea 4: BCL1 (B); linea 5: P3x63Ag8 (mieloma); linea 6: Scid-7 (preB); linea 7: L (fibroblasti); linea 8: NIH3T3 (fibroblasti), linea 9: Jurkat (T); linea 10: CESS (B); linea 11: SSK41 (B); linea 12: WEHI-3 (monociti). (Hamaguchi *et al.*, 1992). B. e C. Analisi su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR con *primer* specifici per la regione 3' del trascritto codificante CBF1 (0.8%). Linea 1: campione ottenuto con RT-PCR di RNA di cellule NIH3T3; linea 2: controllo di RT-PCR; linea 3: cDNA analizzato nella linea 1, digerito con PvuII; linea 4: cDNA analizzato nella linea 1, digerito con XbaI.

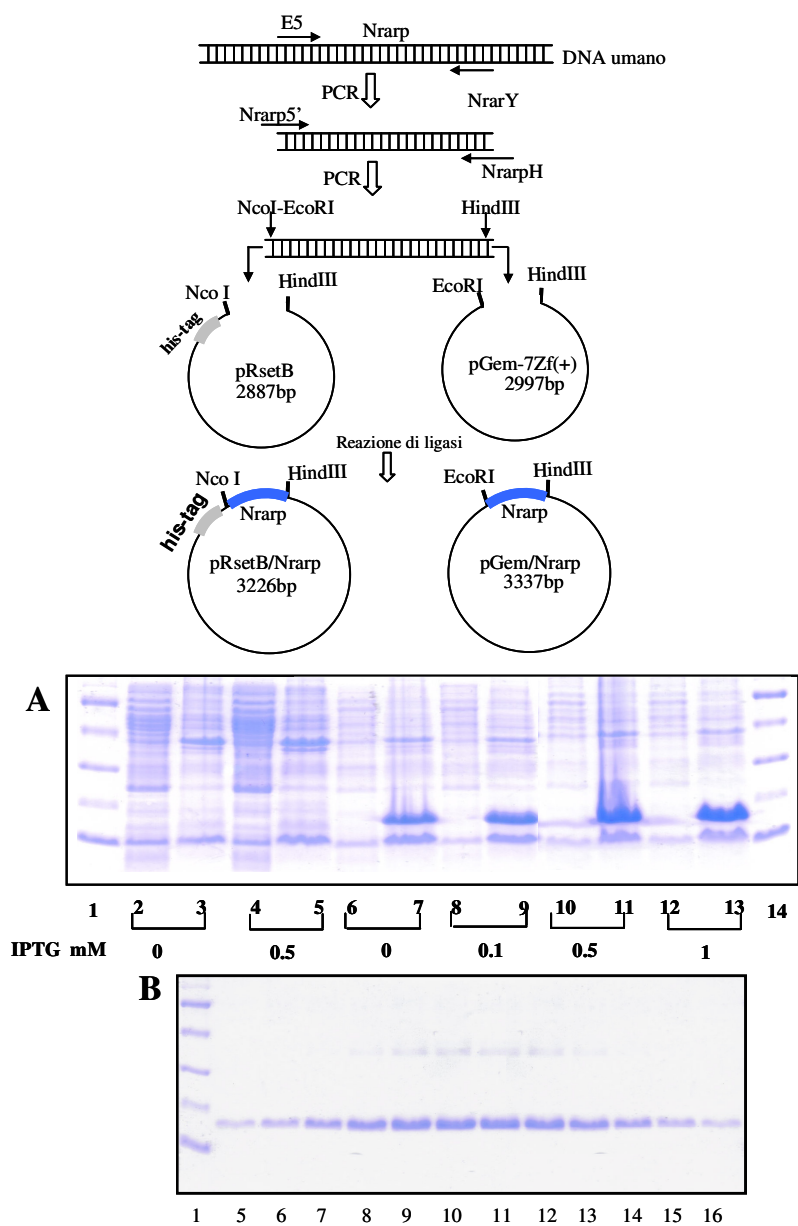


Figura 3.11 Schema di clonaggio per l'ottenimento dei plasmidi di espressione pRsetB/Nrarp e pGem/Nrarp **A.** Analisi 15% SDS-PAGE. 1 e 14. marcatori di peso molecolare; 2,3. frazioni proteiche solubili (S) e insolubili (I) di cellule trasformate con il plasmide pRSET B; 4,5. frazioni proteiche solubili (S) e insolubili (I) di cellule trasformate con il plasmide pRSET B indotte con IPTG; 6,13. frazioni proteiche solubile e insolubile di cellule trasformate con il plasmide pRSET B/Nrarp indotte con diverse concentrazioni di IPTG. **B.** Analisi in 15% SDS-PAGE delle frazioni 5 - 16 della proteina his tag-Nrarp eluite con gradiente di imidazolo dalla resina *Hitrap Chelating* della Pharmacia Biotech. Linea 1: marcatore di peso molecolare

CAPITOLO IV

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il mio lavoro di tesi ha riguardato lo studio della proteina nucleare CBF1, ubiquitaria ed evolutivamente conservata (famiglia delle proteine CSL).

CBF1 è un fattore trascrizionale in grado di legare il promotore di geni cellulari e virali in corrispondenza di una specifica sequenza eptamerica e di indurre variazioni conformazionali del DNA.

CBF1 (ed in genere le proteine della famiglia CSL) è l'effettore nucleare del recettore di membrana Notch che regola l'inibizione laterale nella morfogenesi embrionale e partecipa a numerosi processi differenziativi.

Numerosi studi biochimici e genetici hanno portato ad un modello di attivazione di Notch regolato da eventi di proteolisi. In tal modo viene generato un dominio intracellulare di Notch libero (ICN) che trasloca nel nucleo ed interagisce con CBF1, rimuovendo la repressione indotta da CBF1 stessa ed attivando la trascrizione dei geni bersaglio. CBF1 funziona dunque come un repressore trascrizionale, legando un complesso multiproteico di co-repressori in assenza del segnale di Notch. ICN compete con il complesso co-repressore per il legame a CBF1 ed attiva la trascrizione reclutando diverse proteine con funzione di coattivatori.

Nelle interazioni alternative di CBF1 con diversi complessi multiproteici risiede la base molecolare della regolazione dei fenomeni differenziativi dipendenti da Notch. E' ampiamente documentato in letteratura che tutte le interazioni descritte, sia con coattivatori che con il DNA bersaglio, mappano nei domini NTD e BTD, mentre il dominio TIG non appare direttamente coinvolto nella formazione dei complessi.

I risultati del mio studio identificano una funzione per il dominio TIG che consiste nell'imporre una specifica conformazione al DNA legato.

Molti esempi in letteratura dimostrano che le proprietà architettureali di fattori trascrizionali sequenza-specifici giocano un ruolo centrale nel meccanismo di

attivazione genica. Un esempio appropriato è dato dagli studi sulle proteine SRY (e le proteine omologhe SOX), che regolano il differenziamento testicolare. Mutazioni in SRY che inducono una modesta variazione del piegamento indotto nel DNA correlano con fenotipo di disgenesi testicolare e reversione sessuale nell'uomo; per le omologhe proteine SOX è stato direttamente dimostrato che l'alterazione del piegamento modifica l'attività trascrizionale.

Se la conformazione del DNA indotta da CBF1 è determinante per la funzione di regolazione trascrizionale, allora il ruolo del dominio TIG appare essenziale, considerando le notevoli differenze conformazionali del DNA evidenziate da analisi di *phasing* dei complessi ottenuti con CBF1 integra e CBF1 Δ TIG.

L'effetto della delezione del TIG sulla funzione trascrizionale non è stato affrontato in questo studio e quindi non mi è possibile derivarne una correlazione sperimentale, ma è significativo ricordare che il legame di una proteina con attività di piegamento del DNA è essenziale per consentire l'attivazione trascrizionale mediata dal fattore di risposta al siero, che lega un sito adiacente del promotore muscolo specifico della distrofina. La proteina con attività di *bending* è stata identificata ed è proprio CBF1 (Oliviero S. Dipartimento di Biologia molecolare, Università di Siena, comunicazione personale). Il sito di legame di CBF1 è, in questo promotore, parzialmente sovrapposto a quello di YY1, un altro regolatore trascrizionale con proprietà architettonali che impone un differente assetto conformazionale al DNA legato. Le conseguenze sull'attività trascrizionale del gene sono opposte: mentre il legame di CBF1 è richiesto per l'attivazione, il legame di YY1 inibisce la funzione trascrizionale mediata dal fattore di risposta al siero (Galvagni F. *et al.*, 1998).

La recente scoperta del ruolo regolativo di Nrarp nei confronti del complesso trascrizionale CBF1/Notch/co-regolatori ha posto in discussione un nuovo possibile ruolo per il dominio TIG. Dati di letteratura suggeriscono infatti che esso possa essere necessario al reclutamento di Nrarp e dunque alla regolazione temporale del segnale di Notch. Il clonaggio e la produzione della proteina ricombinante hanno permesso di avviare studi sulla struttura di Nrarp, ma non è stato possibile mettere in evidenza *in vitro* le interazioni descritte in letteratura da esperimenti in ambiente cellulare.

BIBLIOGRAFIA

- Amakawa R, Jing W, Ozawa K, Matsunami N, Hamaguchi Y, Matsuda F, Kawaichi M, Honjo T *Genomics* 1993 ; **17** (2): 306-315
- Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini ME. *Science* 1995 Apr 14; **268** (5208): 225-32
- Benton WD. and Davis RW. *Science* 1977 **196**: 180
- Chan YM, Yan YN *Cell*. 1998 Aug 21; **94** (4):423-6.
- Christensen S., Kodoyianni V., Bosenberg M., Friedman L., and Kimble J. *Development*. 1996 May; **122**(5):1373-83
- Chung CN, Hamaguchi Y, Honjo T, Kawaichi M. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 11; **22**(15):2938-44
- Drak J., and Crothers DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991 **88**, 3074-3078
- Dou S, Zeng X, Cortes P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Honjo T, Vales LD. *Mol Cell Biol*. 1994 May; **14** (5):3310-9
- Falvo JV, Thanos D, and Maniatis T *Cell* 1995; **83**: 1101-1111
- Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, Jones KA. *Genes Dev.* 2002 Jun 1; **16** (11):1397-411
- Fryer CJ, White JB, Jones KA. *Mol Cell*. 2004 Nov 19; **16** (4):509-20
- Furukawa T, Kawaichi M, Matsunami N, Ryo H, Nishida Y, Honjo T. *J Biol Chem*. 1991 Dec 5; **266** (34):23334-40.
- Galvagni F, Cartocci E, Oliviero S *J Biol Chem* 1998 ; **273** (50): 33708-33713
- Galvagni F, Lestingi M, Cartocci E, Oliviero S *Mol Cell Biol* 1997; **17** (3): 1731-1743
- Griffith J, Bleyman M, Rauch C A, Kitchin, P A, & Englund, P T *Cell* 1986; **46** (5): 717-724
- Hamaguchi Y, Yamamoto Y, Iwanari H, Maruyama S, Furukawa T, Matsunami N, Honjo T *J Biochem* 1992 ; **112** (3): 314-320
- Henkel T, Ling PD, Hayard SD, Peterson MG *Science* 1994 ; 265 (5168): 92-95
- Hsieh JJ, Hayward SD *Science* 1995 ; **268** (5210): 560-563
- Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, PetersonMG, Hayward SD *Mol Cell Biol* 1996; **16** (3): 952-959
- Hsieh JJ, Zhou S, Chen L, Young DB, Hayward SD *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96** (1): 23
- Kannabiran C, Zeng X, Vales LD. *Mol Cell Biol* 1997 ; **17** (1): 1-9

- Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T *Genes Dev* 1998 ; **12** (15): 2269-2277
- Kao HY, Downes M, Ordentlich P, Evans RM. *Genes Dev.* 2000 Jan 1; **14** (1):55-66.
- Kim J., Zwieb C., Wu C., and Adhya S., *Gene* 1989; **85**: 15-23
- Koo H-S, Drak J, Rice JA, Crothers DM *Biochemistry* 1990 ; **29**: 4227-4234
- Kovall RA, Hendrickson WA *The EMBO J* 2004; **23**: 3441-3451
- Krebs LT, Deftos ML, Bevan MJ, Gridley T. *Dev Biol.* 2001 Oct 1; **238** (1):110-9
- Lahaye K, Kricha S, Bellefroid EJ. *Mech Dev.* 2002 Jan; **110** (1-2):113-24
- Lai E. *Curr Biol.* 2002 Oct 29; **12** (21):R722-4
- Lai E. *Development.* 2004 Mar; **131** (5):965-73. Review
- Lam L. e Bresnick E. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11; **273** (37):24223-31.
- Lamar E, Deblandre G, Wettstein D, Gawantka V, Pollet N, Niehrs C, Kintner C. *Genes Dev.* 2001 Aug 1; **15** (15):1885-99.
- Li B., Phillips N. B., Jancso-Radek, A. Ittah V., Singh R., Jones D. N. Haas E. and Weiss M. A. *J. Mol. Biol.* 2006 **360**, 310–328
- Lin SE, Oyama T, Nagase T, Harigaya K, Kitagawa M. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27; **277**(52):50612-20
- Ling PD, Rawlins DR, Hayward SD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 15; **90** (20):9237-41
- Ling PD, Hsieh JJ, Ruf IK, Rawlins DR, Hayward SD *J Virol* 1994; **68**: 5375-5383
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7; **95** (14):8108-12
- Maita H, Kitaura H, Ariga H, Iguchi- Ariga SM *Exp Cell Res* 2005; **302** (2): 375-387
- Matsunami N, Hamaguchi Y, Yamamoto Y, Kuze K, Kangawa K, Matsuo H, Kawaichi M, Honjo T. *Nature.* 1989 Dec 21-28; **342** (6252): 934-7
- McDonnell M. W., Simon M. N. and Studier F. W., *J. Mol. Biol.* **110**: 119
- Mumm JS, Kopan R *Dev Biol* 2000; **228** (2): 151-165
- Nagaich KA, Zhurkin VB, Durell SR, Jernigan RL, Appella E, Harrington RE *Proc Natl Acad Sci* 1999 ; **96**: 1875-1880
- Nam Y, Weng AP, Aster JC, Blacklow SC *J Biol Chem* 2003; **278** (23): 21232-21239
- Olave I, Reinberg D, Vales LD. *Genes Dev* 1998; **12** (11): 1621-1637
- Oswald F, Tauber B, Dobner T, Bourteele S, Kostezka U, Adler G, Liptay S, Schmid RM. *Mol Cell Biol.* 2001 Nov; **21** (22): 7761-74.

- Palmieri M, Sasso MP, Monese R, Merola M, Faggioli L, Tovey M, Furia A. *Nucleic Acids Res* 1999 ; **27** (13): 2785-2791
- Petcherski AG, Kimble J. *Curr Biol.* 2000 Jun 29; **10** (13):R471-3
- N. B. Phillips, A. Jancso-Radek, V. Ittah, R. Singh, G. Chan, E. Haas and M. A. Weiss *J. Mol. Biol.* 2006 **358**, 172–192
- Pirot P, van Grunsven LA, Marine JC, Huylebroeck D, Bellefroid EJ. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 17; **322** (2): 526-34
- Qin H, Du D, Zhu Y, Li J, Feng L, Liang Y, Han H, *FEBS Letteres* 2004 **579** 1220-1226
- Sandra S. Szegedi and Timothy A. Garrow *Archives of Biochemistry and Biophysics* **426** (2004) 32–42
- Scaffidi P. and Bianchi M. E., *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2001 **276** (50) 47296–47302 Schweisguth F. and Posakony J. W. *Cell* 1992 **69** 1199-1212
- Six E, Ndiaye D, Laabi Y, Brou C, Gupta-Rossi N, Israel A, Logeat F. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24; **100** (13): 7638-43
- Stallcup M. R. and Washington L. D., *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 2802
- Topczewska JM, Topczewski J, Szostak A, Solnica-Krezel L, Hogan BL. *Gene Expr Patterns.* 2003 May; **3** (2): 169-71.
- Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T, Kawaichi M. *Nucleic Acids Res.* 1994 Mar 25; **22** (6): 965-71
- Wallberg AE, Pedersen K, Lendahl U, Roeder RG. *Mol Cell Biol.* 2002 Nov; **22** (22): 7812-9
- Woo, S.L.C. *Methods Enzimol* 1979 68:389
- Woo, S.L.C, Dugaiczky A., Tsai MJ., Lai EC., Catterall JF. and O'Malley BW. *Natl. Acad. Sci.* 1978 75: 3688.
- Wu L, Griffin JD *Sem in Canc Biol* 2004; **14**: 348-356
- Wu L. Sun T, Kobayashi K, Gao P and Griffin JD, *Mol. Cell. Biol.* 2002 **20**, 2400-2410
- Yun T. J. Bevan M. J. *J Immunol.* 2003 Jun 15; **170** (12): 5834-41
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD *Mol. Cell. Biol.* 2000; **20** (7): 2400-2410
- Zhou S. and Hayward SD *Mol. Cell. Biol.* 2001 **21**: 6222-6232