

## INDICE

<b>Sommario</b>	pag. 3
<b>Summary</b>	pag. 4
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 5
Controllo di qualità dell'RNA	pag. 6
<i>Nonsense-Mediated mRNA Decay</i> (NMD)	pag. 7
Ruolo dell'NMD nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica	pag. 9
La regolazione post-trascrizionale delle proteine ribosomali	pag. 11
<i>Splicing</i> alternativo ed NMD regolano l'espressione delle proteine ribosomali di mammifero	pag. 13
Meccanismi molecolari dello <i>splicing</i> alternativo	pag. 16
Elementi in <i>cis</i> che influenzano l'evento di <i>splicing</i> alternativo	pag. 17
Fattori in <i>trans</i> nello <i>splicing</i> alternativo	pag. 19
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 23
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 25
Culture cellulari e transfezioni	pag. 26
Costrutti plasmidici	pag. 26
Produzione della proteina ricombinante di fusione GST-L3	pag. 27
Saggio di <i>filter-binding</i>	pag. 27
Saggio di GST <i>pull-down</i>	pag. 28

Approcci bioinformatici	pag. 29
Saggio di RNA- <i>immunoprecipitazione</i>	pag. 30
Analisi di RT-PCR	pag. 31
Saggio di RNA <i>pull-down</i>	pag. 31
<i>Western blotting</i>	pag. 33
<b>RISULTATI</b>	pag. 34
Interazione indiretta tra la proteina rpL3 ed il proprio trascritto primario	pag. 35
Identificazione dei <i>partner</i> proteici della proteina rpL3	pag. 38
hnRNP H1 lega l'introne 3 del gene rpL3	pag. 41
Analisi del ruolo funzionale dell'interazione rpL3-hnRNP H1	pag. 44
Identificazione dei fattori in <i>trans</i> che legano l'introne 3 del gene <i>rpL3</i>	pag. 45
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 48
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 57
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	pag. 61

## Sommario

Il gene per la proteina ribosomale umana rpL3 presenta, oltre all'isoforma canonica dell'mRNA che porta alla traduzione, un'isoforma alternativa, derivante da una parziale ritenzione dell'introne 3 del gene, che è substrato del *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD), un meccanismo che degrada RNA contenenti codoni di stop prematuri (PTC). Quando la proteina rpL3 è presente in eccesso nella cellula, essa provoca l'incremento del livello di isoforma alternativa, e un decremento dell'isoforma canonica. E' stato pertanto proposto un modello di auto-regolazione post-trascrizionale a *feedback* negativa della proteina rpL3 mediato dall'associazione tra *splicing* alternativo ed NMD, in cui rpL3 regola negativamente la propria espressione modulando l'evento di *splicing* alternativo. L'obiettivo di questo progetto è quello di comprendere i dettagli molecolari di tale autoregolazione. A tale scopo, abbiamo identificato, tramite GST *pull-down*, due fattori coinvolti nella regolazione dello *splicing*, hnRNP H1 e SF2/p32, che interagiscono *in vitro* con rpL3. hnRNP H1 regola lo *splicing* attraverso il legame a sequenze ricche in G, dette *G-runs*. Per verificare l'ipotesi che hnRNP H1 lega l'introne 3 del gene *rpL3*, abbiamo utilizzato un saggio di RNA-immunoprecipitazione. Il risultato di tale esperimento indica che hnRNP H1 è in grado di legare *in vivo* l'introne 3. Da approcci bioinformatici, inoltre, è emersa la presenza di numerose *G-runs* nell'introne 3. Nel contempo, abbiamo identificato altri fattori in *trans* che legano l'introne 3, tra cui una proteina regolatrice dello *splicing*, KHSRP. Tali risultati sembrano indirizzarci verso l'ipotesi di un

complesso multi-proteico che, in condizioni di eccesso della proteina rpL3 nella cellula, sia responsabile della selezione del sito di *splicing* criptico.

### Summary

The *rpL3* gene produces, besides the canonic isoform of mRNA, that expresses the rpL3 protein, an alternative isoform, which is due to a partial retention of intron 3, that is a natural target of the Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD). NMD is an mRNA surveillance pathway that selectively degrades mRNAs containing premature stop codons (PTC). The over-expression of the rpL3 protein causes an increase of the alternative isoform level and a decrease of the canonic one. This indicates that rpL3 regulates its own production by a negative feedback loop and suggests the possibility that NMD participates in this regulatory loop by degrading the non-functional alternatively spliced transcript.

The aim of this study is to understand the molecular mechanisms of this post-transcriptional regulation of rpL3. We identified two factors involved in splicing regulation, hnRNP H1 and SF2p32, that interact *in vitro* with rpL3. hnRNP H1 regulates the splicing through the binding to G-rich sequences, called *G-runs*. In order to verify the hypothesis that hnRNP H1, besides its binding to rpL3, binds the region of the rpL3 transcript involved in the alternative splicing, we used RNA-immunoprecipitation assay. Our results showed the binding *in vivo* of hnRNP H1 to the intron 3 of the *rpL3* gene. Moreover, through bioinformatic approaches, we found many *G-runs* in the intron 3. Finally, we identified other factors that interact with the intron 3; among these, we found a regulatory protein of the splicing, KHSRP. Our data

suggest that a multiprotein complex may be assembled on the intron 3, and may be responsible of an accurate splice site selection depending of rpL3 protein level in the cell.

## **INTRODUZIONE**

### ***Controllo di qualità dell'RNA***

Nel corso dell'evoluzione gli organismi eucarioti hanno sviluppato svariati meccanismi, operanti ai vari livelli dei processi post-trascrizionali e traduzionali, per realizzare un controllo di qualità degli RNA messaggeri prodotti ed assicurare così la fedeltà e l'accuratezza dell'espressione genica (Hilleren and Parker 1999).

La biosintesi degli mRNA richiede una sequenza integrata e coordinata di eventi che portano alla formazione di una molecola di trascritto maturo "programmato" per un destino specifico e regolato nella cellula. Tali eventi includono la trascrizione del pre-mRNA, l'aggiunta del *cap* all'estremità 5' della molecola, lo *splicing*, la poliadenilazione dell'estremità 3', l'*export* dal nucleo al citoplasma, ed infine la traduzione sul ribosoma. A causa di tale complessità sono inevitabili gli errori che la cellula può compiere durante ciascuno degli eventi attraverso cui procede la maturazione dell'RNA.

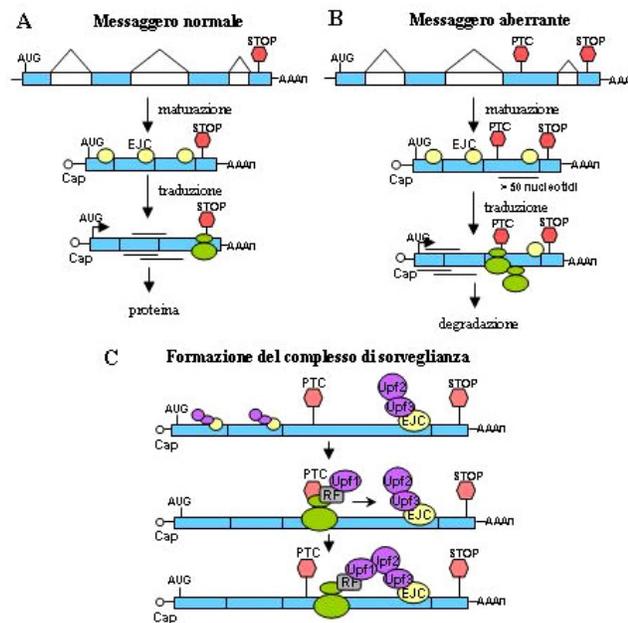
Il controllo di qualità degli mRNA si esplica attraverso i cosiddetti meccanismi di *mRNA surveillance*, che sono finalizzati al riconoscimento e alla rapida eliminazione di mRNA contenenti errori (Vasudevan and Peltz 2003). Ogni fase della produzione della catena nascente dell'RNA e del suo metabolismo (trascrizione, *processing* ed *export*) è dunque sottoposta ad un rigoroso monitoraggio della qualità della molecola, in modo da assicurare che solo le molecole appropriatamente maturate, e quindi capaci di codificare per una proteina funzionale, possano lasciare il nucleo ed essere tradotte sul ribosoma (Lykke-Andersen 2001; Mitchell and Tollervey 2001). Esistono nel nucleo complessi macchinari di degradazione, ad attività esonucleasica sia

5'→3' che 3'→5', deputati al controllo dello *splicing* e della formazione delle estremità del trascritto, e quindi alla degradazione degli mRNA aberranti; tali complessi modulano il rilascio dei trascritti accuratamente processati per l'*export*, oppure, alternativamente, la ritenzione dei trascritti al sito di trascrizione per la successiva degradazione (Moore 2002).

### ***Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)***

Uno dei meccanismi di sorveglianza dell'RNA più ampiamente studiati è l'*NMD (Nonsense-mediated mRNA decay)*. Si tratta di uno specifico *pathway* di degradazione post-trascrizionale, ampiamente conservato negli eucarioti, che consente alla cellula di riconoscere e degradare in maniera rapida e selettiva mRNA contenenti un codone di stop prematuro (*premature stop codon*, PTC) (Maquat 2005). Un PTC è il risultato di mutazioni nonsense o *frameshift* introdotte da errori durante la duplicazione del DNA e che sono causa del 30% delle malattie genetiche umane (Frischmeyer and Dietz 1999), o di errori nella trascrizione o nello *splicing* dell'RNA. In entrambi i casi, il *pathway* dell'*NMD* riconosce e degrada tali mRNA mutati, prevenendo così la formazione di proteine tronche potenzialmente tossiche per la cellula (Hilleren and Parker 1999). Nei mammiferi un PTC è definito funzionalmente come un codone di stop *in-frame* che è localizzato ad una distanza maggiore di 50-55 nucleotidi a monte della successiva giunzione esone-esone in un messaggero maturo (Nagy and Maquat 1998; Maquat 2004). Tale definizione suggerisce l'importanza dello *splicing* nel riconoscimento del codone di stop prematuro. Durante le fasi finali del processo di *splicing*, infatti, un complesso multiproteico definito *exon-junction complex (EJC)* è depositato, approssimativamente a 20-24

nucleotidi a monte della giunzione esone-esone (Le Hir, Izaurralde et al. 2000); in tal modo la posizione degli introni rimossi risulterebbe “segnata” per il successivo monitoraggio ad opera del macchinario traduzionale. E’ stato ipotizzato che, durante la traduzione di un messaggero normale, l’EJC ed i fattori ad esso associati siano spiazzati dal trascritto ad opera del ribosoma (fig.1A-B); invece, se la traduzione termina prematuramente, a monte del codone di stop normale, allora almeno un complesso EJC rimane associato all’mRNA e agisce come *marker* di riconoscimento per il macchinario di sorveglianza (fig.1C) (Wilusz, Wang et al. 2001; Schell, Kulozik et al. 2002; Chang, Imam et al. 2007).



**Figura 1: (A-B) Riconoscimento di un codone di stop prematuro (PTC) nei mammiferi.** Durante la maturazione del pre-mRNA i complessi EJC (*exon junction complex*) sono depositati a monte di ciascuna giunzione esone-esone. Nel primo ciclo di traduzione, il ribosoma spiazza i complessi che incontra lungo il messaggero fino a raggiungere il codone di stop. Se tale codone è fisiologico (A), esso è generalmente localizzato nell’ultimo esone, per cui il ribosoma elimina tutti gli EJC presenti sulla molecola; se il codone di stop è localizzato a più di 50 nucleotidi a monte della successiva giunzione, esso è un PTC (B). In tale caso, almeno un complesso EJC rimane depositato dopo la terminazione della traduzione e va a costituire il segnale per l’attivazione del *pathway* NMD. (C) **Formazione del complesso di sorveglianza.** Il complesso EJC include il fattore Upf3, che interagisce direttamente con le proteine del complesso al momento della sua formazione nel nucleo, ed il fattore Upf2, che si associa dopo l’*export* dal nucleo mediante l’interazione con Upf3. Al termine della primo ciclo di traduzione, i fattori di rilascio (RF) reclutano Upf1. In un messaggero contenente un PTC, lo

spostamento di tale complesso nella regione a valle del PTC provoca la collisione con l'EJC e la formazione del complesso attivo di sorveglianza mediante l'interazione tra Upf1 ed Upf2.

L'NMD gioca un ruolo significativo nell'eziologia di molte malattie genetiche umane e forme ereditarie di cancro. Uno degli esempi più significativi che illustra l'importanza clinica dell'NMD è quello della  $\beta$ -talassemia, una grave forma ereditaria di anemia causata da mutazioni nel gene della  $\beta$ -globina. In tale caso l'NMD riveste il ruolo di modulatore fenotipico della malattia. Infatti, gran parte delle mutazioni che introducono PTC generano una forma di talassemia che è recessiva grazie all'effetto protettivo dell'NMD; gli individui eterozigoti sono sani perché l'allele mutato genera un mRNA contenente PTC che è degradato da tale *pathway*, e quindi non producono la proteina tronca difettosa. Al contrario, mutazioni PTC nel terzo ed ultimo esone del gene generano una forma rara di talassemia dominante, in cui l'mRNA mutato è in grado di sfuggire all'NMD ed è tradotto in una proteina tronca che causa la precipitazione tossica di catene insolubili di globina (Li and Wilkinson 1998; Frischmeyer and Dietz 1999).

### ***Ruolo dell'NMD nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica***

L'NMD è un meccanismo evolutivamente molto conservato. Tale processo è stato infatti osservato in lievito, piante, nematodi, *Drosophila* e in varie classi di vertebrati, soprattutto nei mammiferi. L'enorme pressione selettiva a cui è stato sottoposto tale processo non è da imputare solo al suo ruolo come meccanismo di correzione di errori. Infatti, nell'ultimo decennio è stato attribuito all'NMD un più ampio significato biologico in un'enorme varietà di contesti fisiologici (Culbertson 1999; Holbrook, Neu-Yilik et al.

2004). Tale processo, infatti, influenza la stabilità di diverse classi di trascritti normali che sono fisiologicamente prodotti dalla cellula, come ad esempio gli mRNA delle selenoproteine, alcuni mRNA che hanno *open reading frames* a monte, ed alcuni mRNA che contengono un introne entro la regione 3'UTR (Sun, Li et al. 2001; Mendell, Sharifi et al. 2004). Un importantissimo contributo è dato dall'NMD anche nel processo fisiologico, unico degli eucarioti superiori, della maturazione del sistema immune (Li and Wilkinson 1998; Frischmeyer and Dietz 1999).

Nella recente letteratura il significato biologico dell'NMD è ulteriormente arricchito da un'ampia lista di esempi di geni in cui l'espressione del trascritto degradato dal meccanismo di sorveglianza è un evento "programmato" della cellula che ha lo scopo di abbassare i livelli del prodotto proteico funzionale. Nell'ottica di questa modalità di espressione, il processo dell'NMD assume un nuovo e fondamentale ruolo come meccanismo di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. Tale sistema di regolazione si esplica attraverso l'azione coordinata di uno *splicing* alternativo regolato, che produce il trascritto normale e quello non produttivo contenente il codone di stop prematuro, e l'azione dell'NMD che, degradando il trascritto aberrante, contribuisce alla modulazione dei livelli delle isoforme di RNA e quindi del prodotto proteico nella cellula. Svariati approcci bioinformatici, inoltre, danno supporto alla possibilità che il meccanismo di regolazione post-trascrizionale che associa lo *splicing* alternativo e l'NMD operi su larga scala (Lewis, Green et al. 2003).

Un modello per tale sistema regolativo, definito RUST (*regulated unproductive splicing and translation*) è stato proposto, ad indicare appunto

questa modalità di regolazione negativa dell'espressione che sfrutta un evento di *splicing* per generare isoforme non produttive che sono degradate dall'NMD anziché tradotte in proteina (Hillman, Green et al. 2004). Negli ultimi anni sono stati descritti diversi esempi di proteine regolate mediante RUST (Sureau, Gattoni et al. 2001; Wollerton, Gooding et al. 2004; Mansilla, Lopez-Sanchez et al. 2005).

### ***La regolazione post-trascrizionale delle proteine ribosomali***

L'espressione delle proteine ribosomali è strettamente regolata in modo da assicurare che si accumulino quantità equimolari di rRNA e proteine per il corretto assemblaggio nelle subunità del ribosoma. La velocità di sintesi di tali proteine è anche correlata allo stato fisiologico delle cellule, al tipo cellulare, alle fasi del ciclo cellulare, alle condizioni ambientali (Angelastro, Klimaschewski et al. 2000; Bortoluzzi, d'Alessi et al. 2001). La regolazione fine della biosintesi delle proteine ribosomali è necessaria per la vitalità di cellule individuali ed interi organismi, e squilibri di tale regolazione possono condurre a conseguenze critiche come trasformazione neoplastica (Vaarala, Porvari et al. 1998), apoptosi (Khanna, Sen et al. 2003; Jang, Lee et al. 2004), malformazioni dello sviluppo (Torok, Herrmann-Horle et al. 1999; Marygold, Coelho et al. 2005).

E' noto che l'espressione delle proteine ribosomali negli eucarioti può essere regolata ai livelli della trascrizione (Zhao, Sohn et al. 2003; Perry 2005), traduzione (Levy, Avni et al. 1991), e *splicing* (Fewell and Woolford 1999; Vilardell, Chartrand et al. 2000). La regolazione della biosintesi delle proteine ribosomali a livello dello *splicing* è meno documentata di quella a livello

trascrizionale e traduzionale. Tuttavia tale modalità di controllo post-trascrizionale ha un ruolo fondamentale nell'assicurare un fine e veloce aggiustamento della quantità di alcune r-proteine in diversi organismi eucariotici. In lievito almeno 2 geni sono regolati tramite un meccanismo a *feedback* in cui le proteine ribosomali legano il proprio pre-mRNA prevenendo il loro *splicing* (Fewell and Woolford 1999; Vilardell, Chartrand et al. 2000).

Nell'uomo, due esempi di autoregolazione della sintesi delle proteine ribosomali attraverso l'inibizione del proprio *splicing* sono stati trovati di recente. La proteina umana rpS26 sopprime lo *splicing* del proprio pre-mRNA *in vitro* (Ivanov, Malygin et al. 2005). Il legame di tale proteina al suo pre-mRNA, infatti, può prevenire il riconoscimento dei segnali di *splicing* da parte dei componenti del macchinario dello spliceosoma, interferendo così nel suo assemblaggio. Tuttavia il meccanismo molecolare di tale autoregolazione *in vivo* non è stato ancora chiarito. Un altro esempio di autoregolazione post-trascrizionale della sintesi delle proteine ribosomali umane è fornito dalla proteina rpS13. Tale proteina inibisce la rimozione dell'introne 1 dal suo pre-mRNA *in vitro*. E' stato dimostrato che tale proteina lega specificamente il proprio pre-mRNA e che la sovrapproduzione di rpS13 nelle cellule di mammifero interferisce con lo *splicing* del proprio pre-mRNA mediante un meccanismo a *feedback* (Malygin, Parakhnevitch et al. 2007).

L'autoregolazione sembra essere dunque un potente meccanismo mediante il quale il livello di ciascuna proteina individuale nella cellula può essere controllato indipendentemente; ciò può essere cruciale per le funzioni extra-ribosomali delle proteine ribosomali. Infatti, oltre alle loro funzioni nell'assemblaggio del ribosoma (Ferreira-Cerca, Poll et al. 2005) e nella

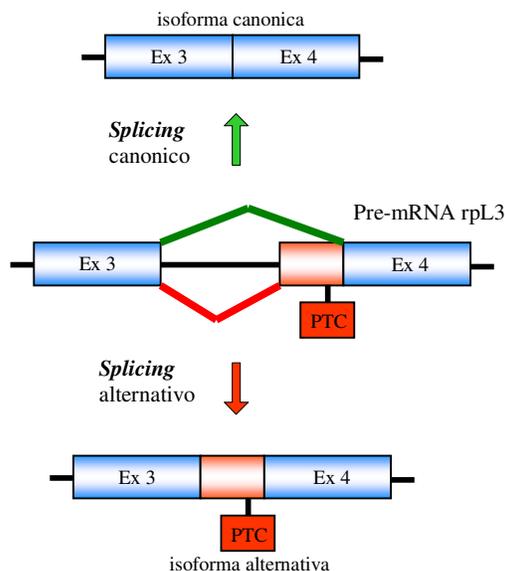
traduzione degli mRNA (Graifer, Molotkov et al. 2004; Bulygin, Chavatte et al. 2005), molte proteine ribosomali sono coinvolte in una varietà di processi extra-ribosomali (Wool 1996).

### ***Splicing alternativo ed NMD regolano l'espressione delle proteine ribosomali di mammifero***

Nella recente letteratura si sta facendo strada la possibilità che lo *splicing* alternativo e l'NMD possano contribuire ad una regolazione fine a livello post-trascrizionale delle proteine ribosomali eucariotiche. In *C. elegans*, infatti, i geni per le proteine ribosomali (rp) L3, L12, L10a e L7a producono, oltre al trascritto produttivo, un trascritto alternativo in cui l'incompleta rimozione di un introne causa l'inserimento di uno o più PTC (Mitrovich and Anderson 2000). In particolare per rpL12 è stato suggerito un meccanismo di autoregolazione in cui l'accumulo o la carenza della proteina endogena promuove la produzione, rispettivamente, del messaggero non produttivo, substrato dell'NMD, o di quello produttivo, destinato alla sintesi proteica. Inoltre, in un recente lavoro di predizione di isoforme di mRNA prodotti per *splicing* alternativo nel genoma umano, è stata proposta per 11 geni codificanti per proteine ribosomali la possibilità di generare isoforme che sono substrati del processo NMD. Sono inclusi in questo gruppo i geni per rpL3, rpL12 ed rpL10a, omologhi degli rp-geni regolati mediante l'NMD in *C. elegans* (Lewis, Green et al. 2003).

Allo scopo di indagare il ruolo dell'NMD nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione degli rp-geni umani, nel laboratorio dove ho svolto il dottorato sono state identificate delle isoforme alternative di mRNA

per le proteine ribosomali rpL3 ed rpL12 umane. Tali isoforme sono il risultato di un'incompleta rimozione della porzione all'estremità 3' dell'introne 3 (fig.2) e dell'introne 1, rispettivamente, dei trascritti primari dei geni *rpL3* ed *rpL12*.



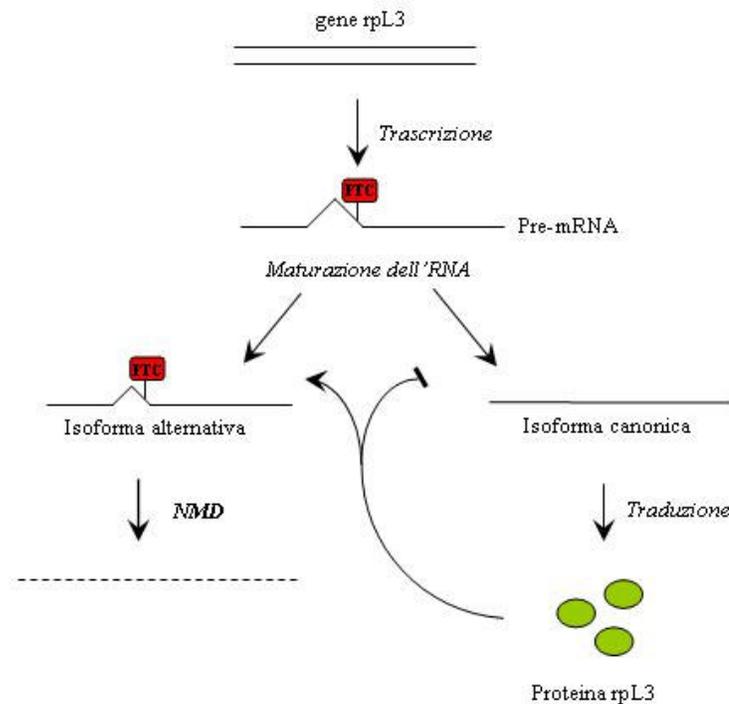
**Figura 2: Modalità di *splicing* del gene *rpL3*.** Il pre-mRNA della proteina ribosomale umana rpL3 può essere sottoposto a due modalità di *splicing*: (1) canonico, che porta alla formazione dell'isoforma canonica di mRNA maturo, che viene esportata nel citoplasma e tradotta nella proteina rpL3; (2) alternativo, che porta alla formazione di un'isoforma aberrante del messaggero di rpL3, che è data dalla ritenzione dei 180 nucleotidi all'estremità 3' dell'introne 3 del gene rpL3. Tale isoforma non è produttiva e viene degradata dal *pathway* dell'NMD.

Data la presenza di codoni di stop prematuri nelle isoforme alternative, gli mRNA aberranti così formati sono degradati dal macchinario dell'NMD (Cuccurese, Russo et al. 2005). Inoltre è stato valutato il significato biologico dell'espressione delle isoforme alternative identificate come substrato dell'NMD, attraverso lo studio della conservazione dell'evento di *splicing* in altre specie di mammiferi. In particolare la regione dell'introne 3 del gene umano *rpL3*, coinvolta nello *splicing* alternativo, presenta un'identità del 90% con la sequenza dello stesso nel topo. Tali osservazioni suggeriscono che questo meccanismo di regolazione dell'espressione possa essere stato conservato nel corso dell'evoluzione per modulare la produzione di una classe

di proteine, la cui sintesi deve essere strettamente regolata per la biogenesi dei ribosomi.

Infine, si è focalizzata l'attenzione sul ruolo funzionale della produzione del trascritto alternativo in associazione al meccanismo di sorveglianza nella regolazione dell'espressione genica, indagando sul coinvolgimento del prodotto proteico nella modulazione del processo di *splicing*. E' stato dimostrato che l'iper-espressione della proteina rpL3 produce un aumento del livello dell'isoforma alternativa di mRNA di rpL3 ed una concomitante diminuzione del livello di isoforma canonica. Il risultato è una diminuzione del prodotto proteico, in quanto l'isoforma alternativa, essendo aberrante perché contenente PTC, viene degradata dall'NMD (Cuccurese, Russo et al. 2005).

Tali risultati hanno consentito di proporre un modello di auto-regolazione post-trascrizionale a *feedback* negativa della proteina rpL3 sullo *splicing* alternativo del proprio gene (fig.3). Secondo tale modello, in condizioni normali, il gene *rpL3* viene trascritto e maturato seguendo lo *splicing* canonico, per cui viene tradotta la proteina rpL3. Ma quando quest'ultima è presente in eccesso nella cellula, essa va ad inibire lo *splicing* canonico e/o a favorire lo *splicing* alternativo, provocando così una diminuzione della sua stessa sintesi (Cuccurese, Russo et al. 2005). Tuttavia i dettagli molecolari del processo di modulazione dello *splicing* alternativo da parte della proteina rpL3 non sono noti.



**Figura 3: Modello di regolazione post-trascrizionale del gene rpL3.** La trascrizione del gene genera un pre-mRNA che può essere sottoposto a due diverse modalità di *splicing*; i livelli della proteina libera rpL3 regolano tale scelta. In condizioni normali di crescita, lo *splicing* prosegue verso la modalità canonica e produce un trascritto funzionale per la traduzione del prodotto proteico; quando la proteina rpL3 è in eccesso, essa promuove lo *splicing* alternativo che produce una isoforma di mRNA non produttiva, perché contenente un PTC, che è rapidamente degradata dal processo NMD.

### ***Meccanismi molecolari dello splicing alternativo***

Numerosi studi sono stati compiuti di recente per comprendere il meccanismo molecolare alla base della regolazione dell'espressione genica degli eucarioti tramite l'evento di *splicing* alternativo. Quest'ultimo costituisce, infatti, un potente e versatile meccanismo per controllare l'espressione genica e per fornire una diversificazione funzionale delle proteine (Maniatis and Tasic 2002), in quanto consente la produzione di molteplici RNA messaggeri a partire da un singolo gene, attraverso la selezione di differenti combinazioni di siti di *splicing* all'interno di un mRNA precursore. A livello post-trascrizionale lo *splicing* alternativo consente l'espressione di distinte proteine o isoforme di

RNA in differenti tessuti o tipi cellulari, a specifici stadi di sviluppo, o semplicemente come risposta alle mutevoli esigenze della cellula (Lopez 1998; Herbert and Rich 1999).

La selezione dei siti di *splicing* richiede la presenza dei siti di *splicing* al 5' e al 3', la sequenza *consensus* del *branch point* (*branch point sequence*, BPS) e il tratto di polipirimidine (*polypyrimidine tract*, PPT). Tuttavia, tali elementi in *cis* canonici, non forniscono sufficienti informazioni per il riconoscimento dei confini introne-esone da parte del complesso dello "spliceosoma" (Senapathy, Shapiro et al. 1990).

### ***Elementi in cis che influenzano l'evento di splicing alternativo***

Il riconoscimento alternativo degli esoni durante lo *splicing* richiede la presenza di elementi di regolazione positiva e negativa aggiuntivi, che sono distinti dai sopracitati segnali di *splicing* costitutivi (Smith and Valcarcel 2000; Black 2003). Tali sequenze accessorie possono essere classificate in base alla loro posizione, nel seguente modo: attivatori dello *splicing* esonici (ESEs, *exonic splicing enhancers*), silenziatori dello *splicing* esonici (ESSs, *exonic splicing silencers*), attivatori dello *splicing* intronici (ISEs, *intrinsic splicing enhancers*) e silenziatori dello *splicing* intronici (ISSs, *intrinsic splicing silencers*); tutti questi elementi contribuiscono alla definizione di un esone (Blencowe 2000; Hovhannisyanyan and Carstens 2005). Anche se poco è noto circa la regolazione dello *splicing* alternativo nei vertebrati, sempre più studi mostrano esempi di regolazione dello *splicing* grazie all'identificazione di svariati elementi regolatori *cis-acting* sia negli esoni che negli introni.

Le due classi più caratterizzate di regolatori in *cis* dello *splicing* sono gli ESE e gli ESS. Questi elementi generalmente funzionano reclutando fattori proteici che interagiscono con componenti del macchinario dello *splicing* come le snRNPs U1 e U2 (Wu and Maniatis 1993; Kohtz, Jamison et al. 1994). Svareti gruppi di ESE sono noti; tra questi vi sono elementi ricchi in purine ed elementi ricchi in AU (adenina e uracile) (Zheng 2004). I motivi ESE sono presenti nella maggior parte degli esoni alternativi e costitutivi dei mammiferi, e promuovono l'inclusione degli esoni principalmente reclutando membri della famiglia delle proteine SR (*serine-arginine-rich*, SR), che funzionano da attivatori dello *splicing* (Schaal and Maniatis 1999; Blencowe 2000).

In contrapposizione agli effetti positivi degli ESE, sono stati identificati degli ESS, che agiscono da silenziatori dello *splicing*, interagendo con membri della famiglia delle ribonucleoproteine nucleari eterogenee (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, hnRNPs) (Chen, Kobayashi et al. 1999; Wang, Xiao et al. 2006)

Come nella regolazione esonica, le sequenze in *cis* con effetti positivi o negativi sulla reazione di *splicing* presenti negli introni compongono gli *enhancers* o i *silencers* di *splicing* rispettivamente (ISE e ISS). Al pari degli elementi esonici, questi elementi sono spesso trovati in *clusters* per costituire complesse sequenze regolatrici. Tali regioni sono altamente conservate tra le specie, e sono spesso identificate da allineamenti di sequenza.

Svareti elementi sono noti agire da ISE, ma le proteine che mediano i loro effetti sono meno ben caratterizzate degli ESE. La funzione degli ISE sembra dipendere dal loro legame con le proteine SR (Gallego, Gattoni et al. 1997; Hastings, Wilson et al. 2001). *Enhancers* e *silencers* intronici sono

spesso costituiti da intricate combinazioni di elementi positivi e negativi che assemblano in larghi complessi RNP.

### ***Fattori in trans nello splicing alternativo***

Gli elementi in *cis* sopra menzionati rappresentano i siti di legame per varie classi di proteine regolatrici dello *splicing* che, interagendo con tali elementi, contribuiscono alla selezione dei siti di *splicing* appropriati.

Le proteine SR sono una famiglia di fattori di *splicing* strutturalmente correlati e altamente conservati, che contengono uno o più domini di riconoscimento all'RNA (RRM) e un dominio caratteristico C-terminale ricco di arginina e serina (arginine/serine RS domain) (Cartegni and Krainer 2002). Il dominio RRM media il legame sequenza-specifico all'RNA, mentre il dominio RS sembra essere coinvolto principalmente nelle interazioni proteina-proteina (Xiao and Manley 1997; Mayeda, Sreter et al. 1999). Le proteine SR sono fattori essenziali sia per lo *splicing* costitutivo (Zahler, Lane et al. 1992) che per quello alternativo, e regolano la selezione dei siti di *splicing* alternativi in un modo concentrazione-dipendente (Zahler, Neugebauer et al. 1993) in parte antagonizzando l'attività della famiglia delle hnRNP proteins (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP) quali ad esempio hnRNP A1 (Mayeda and Krainer 1992). Le SR proteins sono in grado di agire nelle prime fasi dell'assemblaggio del macchinario dello *splicing* (Manley and Tacke 1996). Nove proteine SR sono finora note: SF2/ASF, SC35, Srp20, SRp40, SRp75, SRp55, 9G8, SRp30c e una proteina avente una struttura più divergente dalle altre della famiglia SR, p54 (Bourgeois, Lejeune et al. 2004). SF2/ASF e SC35 sono tra le proteine SR più caratterizzate tra quelle umane identificate

finora. La proteina SF2/ASF ha la capacità di favorire lo *splicing* costitutivo, ma anche di regolare lo *splicing* alternativo quando iper-espressa *in vivo* o aggiunta in eccesso a saggi di *splicing in vitro* (Fu 1995). E' stato recentemente osservato il coinvolgimento di SF2/ASF in vari tumori umani, in cui il fattore sembra agire da oncoproteina, avendo un ruolo sia nello stabilirsi che nella progressione della trasformazione neoplastica (Karni, de Stanchina et al. 2007).

Le proteine hnRNP sono un ampio gruppo di molecole identificate per la loro associazione con i precursori degli mRNA non ancora sottoposti a *splicing* (*heterogeneous nuclear RNA*, hnRNA) nel nucleo delle cellule di mammifero, e sembrano essere implicate nella maturazione dell'mRNA e in altri aspetti del metabolismo dell'RNA e del suo trasporto (Krecic and Swanson 1999). La più studiata tra queste proteine, hnRNP A1, è implicata in diversi processi, inclusi lo *splicing* e il mantenimento della lunghezza dei telomeri (LaBranche, Dupuis et al. 1998). Oltre ad A1, una serie di proteine diverse per tipo e numero di domini di legame all'RNA sono state identificate (Krecic and Swanson 1999). Il preciso ruolo delle proteine hnRNP nell'espressione genica riflette probabilmente la loro specificità di legame all'RNA. Dati di letteratura, infatti, hanno dimostrato che diverse hnRNPs hanno affinità per ribo-omo-polimeri immobilizzati, come le poly(G), che sono legate dalla famiglia delle hnRNP H (Matunis, Xing et al. 1994).

Membri del sottogruppo H della famiglia delle hnRNP sono F, H, H1 e 2H9, tutte coinvolte nel *processing* dell'mRNA e con estesa omologia di sequenza tra loro. Negli uomini, hnRNP F, H, H1 e 2H9 sono codificate da differenti geni e mostrano una caratteristica comune di due (hnRNP 2H9) o tre (hnRNP F, H, e H1) sequenze ripetute di un dominio di legame all'RNA detto

motivo di riconoscimento quasi-RNA (quasi-RNA *recognition motif*, qRRM) per la sua remota somiglianza al motivo di riconoscimento all'RNA, e due domini ausiliari ricchi in glicina (Honore, Rasmussen et al. 1995). hnRNP H e H1 sono identiche al 96% e mostrano proprietà e funzioni comuni (Honore, Rasmussen et al. 1995). Esse sono state trovate associate con le proteine della matrice nucleare (Holzmann, Korosec et al. 1997) .

Diversi studi dimostrano il coinvolgimento di hnRNP H nella regolazione dello *splicing* con effetti variabili. hnRNP H, infatti, agisce come repressore dello *splicing* quando legata ad un ESS nell'esone 7 del gene della  $\beta$ -tropomiosina di ratto (Chen, Kobayashi et al. 1999) partecipando all'esclusione di questo in cellule non-muscolari, ma come attivatore quando legato ad un elemento simile nell'esone 2 di Tat dell'HIV (Caputi and Zahler 2002). hnRNP H lega anche elementi di *splicing* regolatori negli introni: è stato infatti riportato che la proteina hnRNP H fa parte di un complesso *enhancer* di *splicing* intronico nell'esone neuronale specifico N1 di c-src, interagendo con hnRNP F e funzionando come eterodimero (Chou, Rooke et al. 1999).

hnRNP H1 è stata implicata nella formazione dell'estremità 3' del pre-mRNA (Bagga, Arhin et al. 1998), ma studi molto recenti sottolineano il suo ruolo sempre più evidente nella regolazione dello *splicing* tramite il legame a sequenze ricche in G, dette *G-runs*, con effetti variabili.

Le *G-runs* sono sequenze di tre o quattro guanosine ripetute in tandem, principalmente distribuite negli introni umani immediatamente a valle dei siti di *splicing* al 5' e/o a monte dei siti di *splicing* al 3' (Nussinov 1989). L'importanza di tali sequenze nel controllo dello *splicing* è stata mostrata in numerosi studi sia in eventi fisiologici, rappresentando un elemento importante

per lo *splicing* di introni costitutivi nella  $\beta$ -tropomiosina di pollo (Sirand-Pugnet, Durosay et al. 1995),  $\alpha$ -globina umana (McCullough and Berget 1997) e ormone della crescita umana (McCarthy and Phillips 1998) che patologici (Romano, Marcucci et al. 2002)

Un esempio di regolazione dello *splicing* che sottolinea la rilevanza fisiologica di tale fenomeno nell'evitare il manifestarsi di alcune patologie è rappresentato dal polimorfismo 844ins68 del gene della cistationina- $\beta$ -sintasi. Tale polimorfismo comporta la costruzione di un sito di *splicing* criptico al 3' più prossimale rispetto a quello canonico; tuttavia tale polimorfismo genera un trascritto normale, che non porta alla patologia, grazie alla capacità di hnRNP H1 di legare le *G-runs* presenti nella sequenza polimorfica, favorendo così la selezione del sito di *splicing* 3' distale canonico (Romano, Marcucci et al. 2002). Ciò permette il recupero della sequenza *wild-type* preservando così la funzione della proteina.

Altre evidenze del contributo di hnRNP H1 nella selezione del sito di *splicing* appropriato tramite il legame alle *G-runs* sono state rese note nella letteratura più recente, come nel caso del gene umano dell'apolipoproteina A-II (apoA-II) (Mercado, Ayala et al. 2005), e del gene della trombopoietina umana (THPO) (Marcucci, Baralle et al. 2007).

Tutti questi esempi mostrano come la scelta del sito di *splicing* appropriato sia un processo cruciale nella regolazione dell'espressione genica. Il delicato equilibrio che si instaura a livello dei confini esone-introne tra *enhancers* e *silencers* e i rispettivi fattori in *trans* rende ragione della complessità di tale fenomeno nel *processing* dell'mRNA sia in eventi fisiologici che patologici.

## **SCOPO DELLA TESI**

Scopo di questo progetto è la comprensione dei meccanismi molecolari dell'auto-regolazione post-trascrizionale della proteina ribosomale umana rpL3. Il gene per la proteina della subunità maggiore del ribosoma, *rpL3*, oltre all'isoforma canonica che porta alla traduzione della proteina, produce un'isoforma alternativa non produttiva, che viene degradata, in quanto è un substrato naturale del *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD). L'NMD è un meccanismo di controllo di qualità dell'mRNA che riconosce e degrada selettivamente RNA contenenti codoni di stop prematuri (PTC). Tale processo può essere inquadrato in un generale sistema di regolazione post-trascrizionale ottenuta mediante l'associazione con l'evento di *splicing* alternativo, che porta alla produzione di mRNA aberranti in quanto contengono PTC.

E' stato precedentemente dimostrato che la proteina rpL3, quando presente in eccesso nella cellula, determina l'aumento dell'isoforma alternativa e diminuzione di quella canonica; pertanto è stato proposto un modello di autoregolazione post-trascrizionale a feedback negativa di rpL3 mediata dall'associazione dello *splicing* alternativo con l'NMD.

L'obiettivo del mio lavoro è stato quello di chiarire il ruolo della proteina rpL3 nella modulazione dello *splicing* alternativo del proprio gene, attraverso l'identificazione di *partners* proteici di rpL3 coinvolti nell'evento suddetto e l'individuazione di elementi in *cis* che influenzano la selezione del sito di *splicing* criptico. La nostra ipotesi è che la proteina rpL3 moduli lo *splicing* tramite: (i) interazione diretta con il suo pre-mRNA inibendo il legame di fattori di *splicing* canonici o favorendo il legame di fattori di *splicing* alternativi, (ii) interazione indiretta tramite fattori in *trans*, che a loro volta intervengono modulando l'evento di *splicing* alternativo.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Colture cellulari e transfezioni***

La linea cellulare derivante da carcinoma polmonare umano Calu-6 è stata tenuta in coltura nel mezzo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) contenente 10% FBS, 2 mM di L-glutamina e 0.1 mM di aminoacidi non essenziali. Le linee cellulari derivanti da carcinoma della cervice uterina HeLa, e da adeno-carcinoma renale 293, sono state tenute in coltura nel mezzo DMEM contenente 10% FBS, 2 mM di L-glutamina. Per la reazione di transfezione, 7 µg del vettore di espressione ricombinante pcDNA3XHA-rpL3, contenente il cDNA della proteina rpL3, sono stati transfettati in cellule 293 tramite il metodo della coprecipitazione calcio-fosfato. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e sono state estratte le proteine delle frazioni nucleare e citoplasmatica.

### ***Costrutti plasmidici***

Le regioni A e B dell'introne 3 del gene *rpL3* sono state ottenute mediante amplificazione per PCR, usando come stampo il clone pGEM4Z-IVS3, contenente l'introne 3 del gene *rpL3*, disponibile in laboratorio. Le coppie di oligonucleotidi utilizzate sono le seguenti: 5'-CCATGCAGTCCCTAGCTT-3' (primer forward, 5F-A) e 5'-GGAAGCCCACTCAGTGAT-3' (primer reverse, 3R-A), e 5'-CCAGGGCAGAAAGGTTT-3' (primer forward, 5F-B) e 5'-GTAAAGGCCTTCTTCTTAG-3' (primer reverse, 3R-B) per le regioni A e B, rispettivamente. Tali regioni sono state clonate nel vettore pGEM4Z, utilizzando gli enzimi di restrizione EcoRI e HindIII. Il cDNA di *rpL3* è stato

clonato nel vettore pcDNA3XHA utilizzando gli enzimi EcoRI/XbaI. Tutti i clonaggi sono stati controllati mediante sequenziamento automatico.

### ***Produzione della proteina ricombinante di fusione GST-L3***

Il clone pGEX4T3-L3 contenente il cDNA per il gene della proteina ribosomale L3 era già disponibile in laboratorio. La proteina GST-rpL3 è stata prodotta in cellule di *E. coli* del ceppo BL21, trasformate con il clone suddetto, in seguito ad induzione regolata per 3 ore a 37°C grazie all'aggiunta al terreno di coltura di IPTG (isopropil- $\beta$ -tiogalattoside), un analogo di sintesi del lattosio che abolisce l'azione inibitoria del repressore *lac* sul promotore del vettore pGEX4T3, permettendo così la trascrizione e traduzione della proteina di fusione.

### ***Saggio di filter-binding***

Il saggio di *filter-binding* è stato effettuato mediante incubazione della proteina di fusione ricombinante GST-L3 (o GST come controllo) con l'RNA [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP-marcato ottenuto mediante trascrizione *in vitro* del clone pGEM4Z-IVS3 digerito con l'enzima di restrizione HindIII. La reazione di trascrizione è stata effettuata con la SP6 RNA polymerase (*Roche*) seguendo le istruzioni da manuale. La sonda ad RNA così prodotta è stata incubata (10 fmol, ossia 200.000 cpm, per ogni reazione di binding) in buffer TMK (50 mM TrisHCl pH 7.5, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M KCl) e denaturata per 10 minuti a 60°C. Poi la sonda è stata posta in ghiaccio per 10' per consentire la rinaturazione, mentre la proteina GST-L3 (o GST) è stata incubata in buffer TMK contenente glicerolo (50 mM TrisHCl pH 7.5, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M KCl, 40%

glicerolo, 1mM DTT, 0,5 mg/ml tRNA E. coli, 4 µg/ml BSA) e posta in ghiaccio. La proteina e la sonda ad RNA sono state unite, e i campioni sono stati incubati 30 minuti a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata legata alla membrana di nitrocellulosa (*Schleicher & Schuell*) pre-incubata in buffer TBS (20 mM TrisHCl pH 7.5, 500 mM NaCl) e montata sull'apparecchio, senza applicare il vuoto. Dopo aver effettuato 3 lavaggi con buffer TMK, applicando il vuoto, il filtro è stato asciugato ed il risultato è stato visualizzato per autoradiografia. Come controlli della specificità di legame, sono state utilizzate sonde ad RNA non correlati, costituiti dal vettore plasmidico pGEM4Z, e dal clone pGEM3-L7a, già disponibile in laboratorio, digeriti con gli enzimi di restrizione SspI ed Eco RI, rispettivamente, per la trascrizione *in vitro*.

### ***Saggio di GST pull-down***

Le cellule sono state raccolte in Buffer di lisi cellulare (400 µl per ogni piastra) (20mM Hepes-KOH pH8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0,5% NP-40, 0,25% sodio-deossicolato, 5 mM DTT, Mix inibitori di proteasi (*Roche*) 1X) e lisate mediante l'utilizzo di una siringa. Il lisato è stato lasciato 10' in ghiaccio, poi, dopo aver controllato la presenza dei nuclei al microscopio, è stato centrifugato 5' a 1500 rpm a 4°C. Il sovrnatante rappresenta la frazione citoplasmatica, mentre il pellet, costituito dai nuclei, è stato risospeso nel Buffer di lisi nucleare (200 µl per ogni campione) (20mM Hepes-KOH pH8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M NaCl, 20% glicerolo, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, Mix inibitori di proteasi (*Roche*) 1X) e lasciato 10' in ghiaccio. In seguito a centrifugazione a 13000 rpm per 10' a 4°C, il sovrnatante, ossia la frazione

nucleare, è stato recuperato e ne è stata determinata la concentrazione tramite il saggio colorimetrico BIORAD. Il *pre-clearing* è stato effettuato incubando 10 mg di estratti proteici nucleari con 3 volumi di Buffer di *pull-down* (50 mM TrisHCl pH 7.5, 0.4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerolo, 1% NP-40, 1 mM sodio-ortovanadato, 50 mM NaF, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, Mix inibitori di proteasi (Roche) 1X); sono stati aggiunti 20 µl di resina GSH-sefarosio (Amersham Biosciences) resa al 50% in PBS 1X, e la miscela è stata posta 1,5 ore a 4°C in rotazione. Il sovrantante, costituito dall'estratto nucleare *pre-cleared*, è stato recuperato ed incubato insieme a 100 µg della proteina GST-L3 (o GST) legata a sua volta alla resina GSH-sefarosio, e la miscela è stata incubata per 1,5 ore a 4°C in rotazione. La resina-GST-L3 è stata poi sottoposta a 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con 1X Washing Buffer (50 mM TrisHCl pH 7.5, 0.4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM sodio-ortovanadato, 50 mM NaF, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, Mix inibitori di proteasi (Roche) 1X). Le resine sono state successivamente recuperate dopo centrifugazione, e sono stati aggiunti 50 µl di 2X Protein Sample Buffer (100 mM TrisHCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% blu di bromofenolo, 20% glicerolo). I campioni sono stati separati per SDS-PAGE, colorati con Coomassie (BIORAD) e analizzati per spettrometria di massa.

### ***Approcci bioinformatici***

Per l'individuazione di elementi in *cis* che rappresentano siti di legame per fattori di *splicing* sull'introne 3 del gene *rpL3*, ci siamo avvalsi di metodi bioinformatici quali ESE-finder (Cartegni, Wang et al. 2003), RESCUE-ESE (Fairbrother, Yeo et al. 2004), e del sito [www.introni.it](http://www.introni.it).

### ***Saggio di RNA-immunoprecipitazione***

Gli estratti nucleo/citoplasma dalle cellule 293 sono stati preparati come descritto nella sezione *GST pull-down assay*. Il *pre-clearing* degli estratti è stato effettuato incubando 1 mg di estratti proteici nucleari con 30 µl di proteina *A/G plus agarose (Sigma)*, e portando a volume finale di 1 ml con Buffer 1X (10 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM sodio ortovanadato, 50 mM NaF, 0,5% NP-40, Mix di inibitori di proteasi 1X (*Roche*), 1 mM PMSF, Rnase OUT Inhibitor (*Roche*) 0,004 U/µl ). e lasciato per 1 ora a 4°C in rotazione. In seguito a centrifugazione per 1 minuto a 13000 rpm, il sovrinatante, cioè l'estratto nucleare *pre-cleared* è stato incubato con 1 µg di anticorpo policlonale anti-hnRNP H1 (*Santa Cruz Biotechnology*); la miscela è stata incubata per 14 ore a 4°C in rotazione. Il giorno seguente sono stati aggiunti 30 µl di proteina *A/G plus agarose (Sigma)* e lasciati a 4°C per 45 minuti in rotazione. Il sovrinatante è stato allontanato in seguito a centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto a 4°C, e sono stati effettuati 4 lavaggi con 1 ml di buffer 1X. Il pellet è stato infine risospeso in 100 µl TES Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS), e i campioni sono stati sottoposti a denaturazione blanda a 65°C per 15 minuti. 10 µl di ciascun campione sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12%, trasferiti su filtro di nitrocellulosa. Su tali filtri è stato poi effettuato un *western blotting* con l'anticorpo anti-hnRNP H1. Dai restanti 90 µl dei campioni è stato estratto l'RNA mediante il reagente Trizol (*Invitrogen*) secondo le istruzioni del manuale. L'RNA è stato trattato con Dnasi Rnasi free (*Roche*) per 1 ora a 37°C. La Dnasi è stata poi allontanata tramite estrazione fenolo/cloroformio, e l'RNA è stato precipitato con EtOH e risospeso in 20 µl acqua milliQ Rnasi

free; infine, ne è stata determinata la concentrazione tramite lo spettrofotometro.

### ***Analisi di RT-PCR***

Reazioni di RT-PCR sono state effettuate in seguito ad RNA-immunoprecipitazione, usando dei *primers* come descritto di seguito. La reazione di retrotrascrizione è stata condotta con circa 3 µg di RNA, con gli oligonucleotidi *reverse* precedentemente descritti 3R-A e 3R-B, per amplificare la regione A e B, rispettivamente, dell'introne 3 del gene *rpL3*, con la trascrittasi inversa *Superscript II (Invitrogen)*, seguendo le istruzioni del manuale. La reazione di PCR è stata eseguita secondo le procedure standard; in sintesi, i prodotti di cDNA alternativi sono stati amplificati per 30 cicli, con una temperatura di ibridazione di 54°C, per l'amplificazione della regione A, e di 52°C, per quella della regione B, utilizzando le seguenti coppie di oligonucleotidi: 5F-A/3R-A e 5F-B/3R-B. Per l'amplificazione della regione genomica della proteina ribosomale L7a dall'esone 2 all'esone 4 sono stati utilizzati i seguenti primers:

5F-L7a (5'-CGAAAGGAAAGAAGGCCAAG-3')

3R-L7a (5'-GTCTCTGGTCTGTACTIONGTG-3').

Tutti i prodotti di RT-PCR sono stati visualizzati con bromuro di etidio su gel di agarosio al 2%.

### ***Saggio di RNA pull-down***

Il plasmide pGEM4Z-IVS3B, contenente la regione B dell'introne 3 del gene *rpL3* sotto il controllo del promotore della SP6 RNA polimerasi è stata

trascritta *in vitro* con la SP6 RNA polimerasi (*Roche*). 15µg di RNA così ottenuto sono stati incubati in 400 µl di 0.1 M NaOAc pH 5.0 e 5mM sodium *m*-periodato (*Sigma*). Le miscele di reazione sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente al buio su una piastra rotante. L'RNA è stato poi precipitato in etanolo, lavato con EtOH 70% e risospeso in 100 µl di 0.1 M NaOAc pH 5.0. L'RNA così attivato è stato incubato con 100 µl di *beads* di acido adipico deidrazide-agarosio 50% *slurry* (*Sigma*) per ogni campione, per 12 ore al buio su una piastra rotante a 4°C. Le *beads* con l'RNA legato sono state poi centrifugate e lavate 3 volte con 1 ml di 2M NaCl e 3 volte con 1 ml di Washing Buffer (5mM HEPES pH 7.9, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8mM Magnesio Acetato). L'RNA legato alle *beads* è stato poi incubato su una piastra rotante con 1mg di estratto proteico nucleare da cellule 293 per 30 minuti a temperatura ambiente in 1,5 ml volume finale. Binding Buffer 10X (50 mM HEPES pH 7.9, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 8mM Magnesio Acetato, 5 mM DTT, 38% glicerolo, 7.5 mM GTP, 10 mM ATP) è stato aggiunto ad una concentrazione finale 1X, ed è stata aggiunta eparina come competitore ad una concentrazione finale di 7 µg/µl. La miscela proteica (estratto nucleare + eparina + binding buffer) è stata preparata prima dell'aggiunta delle *beads*, e posta 2 minuti a temperatura ambiente, poi divisa in differenti tubi (750 µl per ogni campione) contenenti le *beads*. Le *beads* sono state poi centrifugate a 3000 rpm per 3 minuti e lavate 4 volte con 1,5 ml di 1X Washing Buffer. Dopo il lavaggio finale 50 µl di *Protein Sample Buffer* standard per SDS-PAGE sono stati aggiunti alle *beads*, che sono state poste a 65°C per 5 minuti per una denaturazione blanda. I campioni sono stati poi sottoposti a SDS-PAGE (gel 12% acrilammide). In seguito a colorazione con il reagente Coomassie

(BIORAD), le bande proteiche sono state analizzate per spettrometria di massa, oppure sono state sottoposte a *western blotting*.

### ***Western blotting***

I campioni di proteine specificamente legatesi alla resina in seguito ad RNA *pull-down assay* sono stati sottoposti ad SDS-PAGE al 12% di acrilammide e trasferiti su filtri di nitrocellulosa (*Schleider & Schuell*) per *elettroblotting*. La proteina hnRNP H1 é stata rivelata con l'anticorpo primario policlonale di capra anti-hn RNP H1 (*Santa Cruz Biotechnology*) e con l'anticorpo secondario di rafano anti-capra coniugato alla perossidasi (*Amersham Biosciences*). La rilevazione è stata eseguita con il sistema di chemiluminescenza ECL (*Amersham Biosciences*).

## **RISULTATI**

### ***Interazione indiretta tra la proteina rpL3 ed il proprio trascritto primario***

Al fine di chiarire i dettagli molecolari del processo di autoregolazione post-trascrizionale della proteina rpL3, sono state formulate due ipotesi. La prima ipotizza che rpL3 possa modulare lo *splicing* alternativo del proprio gene tramite un'interazione diretta con il proprio pre-mRNA, impedendo in tal modo il legame di fattori di *splicing* canonici, oppure favorendo il legame di fattori di *splicing* alternativi. La seconda ipotesi invece predice che l'interazione fra la proteina rpL3 con il proprio pre-mRNA avvenga in maniera indiretta. rpL3, infatti, potrebbe interagire con co-fattori proteici dello *splicing* alternativo, favorendone il legame col proprio pre-mRNA, oppure potrebbe interagire con co-fattori dello *splicing* canonico, inibendo lo *splicing* costitutivo e favorendo quello alternativo.

Per verificare la prima ipotesi, abbiamo saggiato la capacità della proteina rpL3 di legare *in vitro* il proprio trascritto primario tramite il saggio quantitativo di *filter-binding*. Tale saggio consente non soltanto di individuare l'interazione tra la proteina e l'RNA, ma anche di determinarne l'affinità di legame in modo concentrazione-dipendente.

Tale tecnica necessita della produzione di una proteina ricombinante di fusione. A tale scopo il cDNA della proteina rpL3, lungo 1300 nucleotidi, è stato inserito in un vettore di espressione procariotico che ne consente la produzione su larga scala. Il vettore utilizzato a tale scopo è stato pGEX4T3. Tale vettore contiene un promotore inducibile, posto sotto il controllo del repressore *lac*. Il repressore *lacI<sup>q</sup>* presente sul plasmide stesso, si lega al promotore impedendo alla RNA polimerasi batterica di trascrivere il gene clonato; l'aggiunta al terreno di coltura di IPTG (isopropil- $\beta$ -tiogalattoside), un

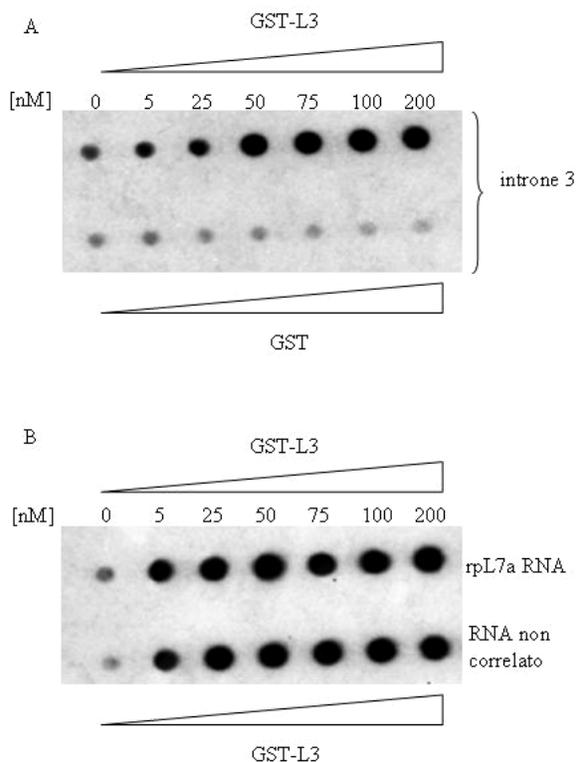
analogo di sintesi del lattosio, abolisce l'azione inibitoria del repressore *lac* legandosi ad esso e provocando il distacco dall'operatore. Subito a valle del promotore è presente il gene per l'enzima glutatione-S-transferasi (GST). La presenza di tale gene consente di ottenere una proteina di fusione che risulterà più stabile alla presenza delle proteasi della cellula ospite, e di semplificare la tappa di purificazione mediante l'utilizzo della resina glutatione-sefariosio. L'ospite batterico scelto per la produzione della proteina di fusione GST-rpL3 è costituito da un ceppo di *E.coli* denominato BL21. Le cellule batteriche contenenti il vettore sono state indotte con IPTG e, dopo la lisi cellulare, la proteina ricombinante è stata estratta e purificata.

Il saggio di *filter-binding* prevede, inoltre, l'utilizzo di una sonda ad RNA marcata con un isotopo radioattivo, in modo da consentire la visualizzazione del risultato mediante autoradiografia. Pertanto, la regione del gene *rpL3* sottoposta all'evento di *splicing* alternativo, corrispondente all'introne 3 del gene (fig.2), è stata clonata nel vettore plasmidico pGEM4Z, a valle del promotore della SP6 RNA polimerasi, e trascritta *in vitro* da parte dell'enzima SP6, utilizzando l'UTP come nucleotide marcato con il radioisotopo <sup>32</sup>P.

Concentrazioni crescenti della proteina GST-rpL3 o della proteina GST, utilizzata come controllo negativo dell'esperimento, sono state pertanto incubate con la sonda ad RNA. Come riportato in figura 4, a differenza del controllo GST, la proteina GST-rpL3 è capace di legare l'introne 3; inoltre, l'aumento della concentrazione di GST-rpL3 è proporzionale all'aumento dell'intensità del legame al proprio trascritto *in vitro*. Per verificare la specificità di legame, sono state utilizzate due sequenze di RNA non correlate:

una, proveniente dal cDNA della proteina ribosomale umana rpL7a, l'altra ottenuta in seguito a trascrizione *in vitro* del vettore plasmidico pGEM4Z. Come si può osservare dalla figura 4, la proteina GST-rpL3 lega anche tali sonde con affinità di legame simile a quella per il proprio trascritto, indicando un'assenza di specificità di legame.

Tali risultati indicano che la proteina rpL3 non è in grado di interagire specificamente col proprio trascritto primario e, pertanto, scartano l'ipotesi che rpL3 possa influenzare lo splicing alternativo del proprio gene interagendo direttamente col proprio pre-mRNA.



**Figura 4: Analisi dell'interazione tra rpL3 e l'introne 3.** In figura sono mostrati i risultati degli esperimenti del saggio di *filter-binding*. **A.** Concentrazioni crescenti della proteina ricombinante di fusione GST-rpL3, o della proteina GST (5, 25, 50, 75, 100, 200 nM) sono state incubate con una sonda ad RNA marcata con  $^{32}\text{P}$ , corrispondente all'introne 3 del gene rpL3. **B.** La proteina GST-rpL3 lega anche le sonde costituite da RNA non correlati, quali l'RNA del gene per la proteina ribosomale rpL7a, ed una regione del vettore plasmidico utilizzato per la trascrizione *in vitro*.

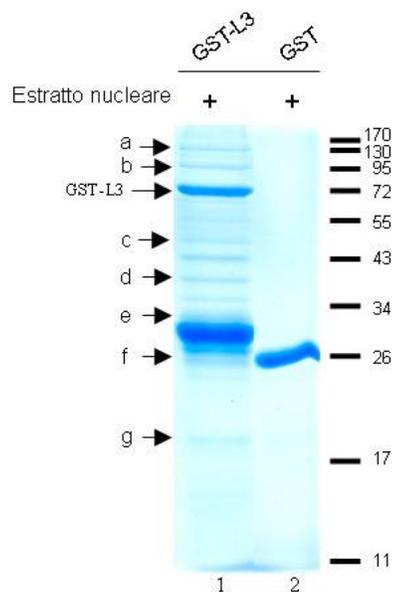
### ***Identificazione dei partner proteici della proteina rpL3***

I risultati precedentemente descritti hanno indirizzato verso l'ipotesi secondo cui la proteina rpL3 possa interagire indirettamente col proprio trascritto legandosi a co-fattori proteici.

Pertanto, allo scopo di individuare i *partner* proteici di rpL3 coinvolti nell'evento di *splicing* alternativo del gene *rpL3*, abbiamo utilizzato un saggio di interazione proteina-proteina *in vitro* su larga scala, il GST *pull-down assay*. Tale metodica prevede l'utilizzo della proteina ricombinante di fusione GST-rpL3 e di GST come controllo negativo. Tali proteine sono state incubate con un estratto proteico nucleare proveniente da cellule Calu6. Dopo la reazione di legame, le proteine legatesi in modo specifico alla proteina di fusione GST-rpL3 sono state quindi separate per SDS-PAGE. In figura 5 è mostrata la colorazione con Coomassie delle bande proteiche specifiche per GST-rpL3 (linea 1) mentre nel controllo negativo (solo GST) non sono presenti (linea 2). Le proteine individuate sono state identificate mediante analisi per spettrometria di massa.

Tra i fattori identificati mediante questo saggio, molte corrispondono a proteine ribosomali facenti parte di entrambe le subunità del ribosoma, quali rpS2, rpS5, rpS6, rpS8, rpS9, rpS11, rpS15a, rpS16, rpS17, rpS19 della subunità minore, ed rpL22, della subunità maggiore. Il ritrovamento di tali interattori ribosomali di rpL3 può essere chiaramente spiegato tenendo presente che la proteina rpL3 è localizzata sulla superficie della subunità maggiore del ribosoma ed è in grado di interagire non solo con l'RNA ribosomale, ma anche con altre proteine ribosomali (Ban, Nissen et al. 2000).

**Figura 5: Identificazione delle proteine che interagiscono specificamente con rpL3.** Risultati degli esperimenti di GST pull-down. 100 µg di GST-rpL3 o di GST (controllo) sono stati incubati con 10 mg di estratti proteici nucleari. Le frecce indicano le proteine identificate: RNA helicase A (a, 130 KDa), RNA helicase Gu (b, 100 KDa), hnRNP H1 (c, 50 KDa), nucleophosmin o B23 (d, 35 KDa), SF2p32 (e, 30 KDa) e proteine ribosomali rpS2, S5, S6, S8, S9, S11, S15a, S16, S17, S19 (f, 15-30 KDa) della subunità minore, ed rpL22 (g, 17 KDa) della subunità maggiore.



Altre proteine identificate appartengono alla famiglia delle RNA elicasi, quali RNA *helicase* A ed RNA *helicase* Gu. Tali proteine sono importanti per il rimodellamento di complessi RNA-proteine, e specificamente per la separazione delle molecole di RNA a doppio filamento e/o per lo spiazzamento delle proteine dall'RNA. Esse sono coinvolte in diversi aspetti del metabolismo dell'RNA, particolarmente nella biogenesi dei ribosomi e nello splicing dell'RNA (Bleichert and Baserga 2007). Recentemente, è stato riportato che l'RNA elicasi Gu interagisce direttamente con la proteina ribosomale rpL4, e che tale interazione è necessaria per la funzione di Gu nella maturazione dell'RNA ribosomale nelle cellule di mammifero (Yang, Henning et al. 2005). Il ruolo funzionale dell'interazione di rpL3 con tale famiglia di proteine è ancora da chiarire.

Un'altra proteina identificata, il cui coinvolgimento nel processo di biogenesi dei ribosomi sembra diventare sempre più cruciale, è la nucleofosmina, o B23. B23 è una fosfo-proteina (Szebeni, Hingorani et al.

2003) multifunzionale, che risiede nelle regioni granulari del nucleolo (Spector, Ochs et al. 1984). B23 è implicata in una varietà di processi cellulari inclusi l'assemblaggio dei ribosomi e la maturazione del pre-RNA ribosomale (Yung, Busch et al. 1985), la duplicazione del DNA (Takemura, Sato et al. 1999), il traffico nucleo/citoplasma (Szebeni, Herrera et al. 1995) e la duplicazione del centrosoma (Grisendi, Bernardi et al. 2005). La nucleofosmina gioca un ruolo chiave nella biogenesi dei ribosomi durante il trasporto dei componenti del ribosoma dal sito di sintesi nel nucleolo al citoplasma (Hingorani, Szebeni et al. 2000). Un ruolo fondamentale di B23 è quello di mediare, attraverso un meccanismo CRM-1-dipendente, l'*export* nucleare del complesso formato dalla proteina ribosomale L5 e dall'RNA ribosomale 5S (Yu, Maggi et al. 2006). Tali osservazioni consentono di ipotizzare che B23 sia coinvolta nel processo di *export* della proteina rpL3 nel citoplasma, tuttavia il ruolo funzionale dell'interazione rpL3-B23 è ancora da indagare.

Due fattori molto interessanti che interagiscono con la proteina ribosomale rpL3 sono la proteina SF2p32 (30 KDa) associata al fattore di *splicing* umano SF2/ASF, ed una proteina di 50 KDa, la proteina eterogenea nucleare H1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1*, hnRNP H1).

SF2p32 è stata originariamente isolata da cellule HeLa come complesso in associazione al fattore umano di *splicing* SF2/ASF (Krainer, Mayeda et al. 1991). SF2/ASF è un fattore coinvolto sia nello *splicing* costitutivo che alternativo, con effetti sia positivi che negativi su tale processo. La sua funzione sembra dipendere dal suo legame con i precursori degli mRNA (Kanopka, Muhlemann et al. 1996). SF2/ASF appartiene alla famiglia delle

proteine SR (*serine-arginin rich proteins*), caratterizzate da uno o due domini N-terminali di riconoscimento all'RNA (*recognition RNA motif*, RRM), ed un dominio C-terminale ricco di arginine e serine. E' stato dimostrato che SF2p32 interagisce con SF2/ASF e ne inibisce la funzione sia come stimolatore che come repressore dello *splicing*. Infatti, essa sembra inibire la fosforilazione di SF2/ASF, una modificazione essenziale sia per il legame stabile all'RNA che per le interazioni proteina-proteina durante la formazione del macchinario dello *splicing* (Petersen-Mahrt, Estmer et al. 1999). La funzione di SF2p32 rappresenta, quindi, un aspetto interessante ai fini della comprensione del meccanismo di modulazione dello *splicing* alternativo da parte di rpL3.

La proteina hnRNP H1, appartiene al sottogruppo H della famiglia delle ribonucleoproteine nucleari eterogenee (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, hnRNPs). Anch'essa ha un ruolo importante nello *splicing* alternativo di svariati geni di mammifero, con effetti variabili (Romano, Marcucci et al. 2002; Mercado, Ayala et al. 2005; Marcucci, Baralle et al. 2007). Recentemente è stato dimostrato che la proteina hnRNP H1 lega sequenze di RNA ricche in G, dette *G-runs* (Romano, Marcucci et al. 2002; Mercado, Ayala et al. 2005; Marcucci, Baralle et al. 2007).

### ***hnRNP H1 lega l'introne 3 del gene rpL3***

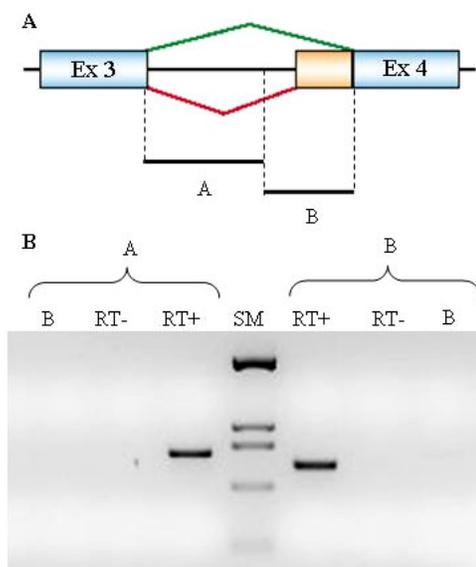
Per verificare se hnRNP H1, precedentemente identificato tramite il GST *pull-down assay* come interattore della proteina rpL3, sia in grado di legare *in vivo* anche il suo trascritto primario, in particolare l'introne 3, abbiamo utilizzato un saggio di RNA-immunoprecipitazione. Tale saggio prevede l'immunoprecipitazione della proteina di interesse, seguita dall'analisi

per RT-PCR dell'RNA per identificare i trascritti ad essa associati presenti nel complesso immunoprecipitato. Nel caso specifico, un estratto proteico nucleare di cellule HeLa è stato incubato con un anticorpo policlonale anti-hnRNP H1. Successivamente, l'RNA totale è stato estratto dai complessi RNA-hnRNP H1 e sottoposto ad RT-PCR.

Abbiamo scelto di amplificare due regioni dell'introne 3: la regione A, di 344 nucleotidi, che contiene la porzione dell'introne adiacente al sito donatore di *splicing*, e la regione B, di 289 nucleotidi, che invece contiene la regione dell'introne 3 ritenuta nell'isoforma alternativa del messaggero (figura 6A). Lo scopo è stato quello di verificare se l'interazione di hnRNP H1 con il trascritto dell'introne 3 avvenisse prevalentemente con la porzione ritenuta durante l'evento di *splicing* alternativo, o se avvenisse anche a monte di questa, poichè è noto che la posizione degli elementi *cis*-acting che influenzano la scelta del sito di *splicing* appropriato è indipendente dalla posizione del sito di *splicing* stesso.

**Figura 6: Analisi dell'interazione di hnRNP H1 con l'introne 3.**

**A.** Rappresentazione schematica dell'introne 3 del gene rpL3. **A:** regione adiacente al sito donatore dello *splicing*, **B:** regione dell'introne ritenuta nell'isoforma alternativa. **B.** Risultato dell'analisi per RT-PCR in seguito ad RNA-immunoprecipitazione della proteina hnRNP H1 in un estratto proteico nucleare di cellule HeLa. La proteina hnRNP H1 lega entrambe le regioni A e B (RT+). RT-: reazione di retrotrascrizione priva dell'enzima trascrittasi inversa. B: reazione di PCR priva del DNA stampo. SM: marcatore di peso molecolare.



La figura 6B mostra il risultato del saggio di RNA-immunoprecipitazione. Come si può osservare, la proteina hnRNP H1 lega sia la regione A che la regione B con la medesima intensità. Come controllo negativo è stata utilizzata la regione genomica compresa tra gli esoni 2 e 4 di un'altra proteina ribosomale, L7a, la cui amplificazione non ha prodotto alcun risultato (dati non mostrati).

Tali risultati indicano che la proteina hnRNP H1 lega *in vivo* sia la porzione adiacente al sito donatore dello *splicing*, che la regione dell'introne ritenuta nell'isoforma alternativa del messaggero contenente il sito di *splicing* criptico nell'introne 3 del gene. Poiché la funzione di hnRNP H1 come modulatore dello *splicing* è mediata dal suo legame alle *G-runs*, ci siamo avvalsi di strumenti bioinformatici per indagare la presenza di tali sequenze nell'introne 3 del gene *rpL3*, coinvolto nell'evento di *splicing* alternativo. Dall'analisi della sequenza dell'introne (tramite i programmi informatici ESE-finder, RESCUE-ESE e l'ausilio del sito [www.introni.it](http://www.introni.it)), è emersa la presenza di numerose *G-runs*, distribuite sia nella zona adiacente al sito di *splicing* al 5', che nei dintorni del sito di *splicing* criptico al 3' dell'introne 3 (fig.7).

**Figura 7: Sequenza dell'introne 3 del gene rpL3.**

In verde sono rappresentati il sito donatore di splicing all'estremità 5', GT, ed il sito di splicing accettore canonico all'estremità 3', AG; in rosso è rappresentato il sito di splicing accettore criptico al 3', AG. La regione dell'introne 3 ritenuta nell'isoforma alternativa del messaggero è sottolineata. In giallo sono evidenziate le *G-runs* (in grassetto).

```

5'ss
GTaaggaggaggccatgcagtccttagctggagctggagctggagagca
ggagcagcgtgtgcatggttctcagctctgtagcaggcaaggagctgctgtctgggt
tagttgctctcgaacagaaaaatacctggatcagactggccagccatctggttca
gccggaagctaacacctcattctgagtcaggtagtggtggtgctgaggaccca
gttggtgaggagtccaactagaaccaggagagtagcagaataaataaacccctata
ggcggcgaaggccctctgcccctgggtggaatgctccatttctctcatcactgagtg
cctcccagagcagaaaggtttgcccggagcaagaattggttgaatgctgtaact
3'ss criptico
aaataacctgtggacctctgtcAGctccgctcggctctgcccgatgagctccatcc
aggctccgctgctggtggaaaaggctccttagaagccgcaatgagctccatccca
cgcgtagccagtgctctccgctcaccctcggaggctgatgaaggcctgcacctg
3'ss canonico
gtcccccccacactgctctgctctgaAG

```

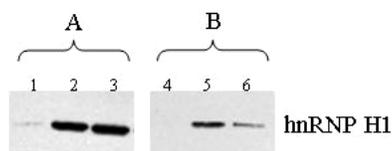
### ***Analisi del ruolo funzionale dell'interazione rpL3-hnRNP H1***

Avendo verificato il legame della proteina hnRNP H1 all'introne 3, ci siamo interessati di analizzare il ruolo funzionale di tale interazione. La nostra ipotesi di lavoro è che la proteina rpL3, quando presente in eccesso all'interno della cellula, possa sequestrare il fattore hnRNP H1, inibendo così l'azione di repressione da parte di tale fattore del sito di *splicing* criptico, e/o favorendo l'attività di un *enhancer* del sito criptico al 3'. Pertanto, per verificare l'effetto dell'iper-espressione di rpL3 sul legame di hnRNP H1 all'introne 3 del gene *rpL3*, abbiamo eseguito un *RNA pull-down assay* seguito da *western blotting*.

L'*RNA pull-down assay* è un saggio di cromatografia di affinità all'RNA, che consente di isolare da un estratto proteico proteine che legano specificamente l'RNA di interesse.

Le regioni A e B dell'introne 3 del gene *rpL3* trascritte *in vitro* sono state utilizzate come "esca" e immobilizzate su resina, e sono state incubate con un estratto proteico nucleare da cellule 293, sia in condizioni fisiologiche che di iper-espressione della proteina rpL3, ottenuta mediante transfezione con il vettore di espressione eucariotico pcDNA3XHA, che contiene il cDNA della proteina rpL3, fuso all'epitopo *tag* emoagglutinina A (HA). Le proteine legate specificamente all'RNA sono state separate per SDS-PAGE, trasferite su filtro di nitrocellulosa e sottoposte a *western blotting* utilizzando l'anticorpo anti-hnRNP H1.

La figura 8 mostra il risultato del saggio: come si può osservare, la proteina hnRNP H1 lega entrambe le regioni del trascritto primario dell'introne 3 in condizioni normali, mentre in condizioni di iper-espressione della proteina rpL3 si può notare una diminuzione del legame di hnRNP H1 alla regione B.



**Figura 8: Effetto dell'iper-espressione di rpL3 sul legame di hnRNP H1 all'introne 3.** In figura sono rappresentati i risultati dell'esperimento di RNA pull-down seguito da *western blotting* con un anticorpo anti-hnRNP H1. Le regioni A e B dell'introne 3 del gene *rpL3* sono state trascritte *in vitro*, ed incubate con estratti proteici nucleari, in condizioni fisiologiche (linee 2 e 5) o di iper-espressione della proteina *rpL3* (linee 3 e 6). Come controllo, gli estratti proteici nucleari, in condizioni di iper-espressione e non di *rpL3*, sono stati incubati soltanto con la resina (linee 1 e 4, rispettivamente).

Tali risultati sono preliminari, ma suggeriscono che, in condizioni normali, la proteina hnRNP H1 lega il trascritto primario dell'introne 3 del gene *rpL3*; quando la proteina *rpL3* è presente in eccesso nella cellula, essa lega in minor quantità la regione dell'introne 3 che è ritenuta nell'isoforma alternativa, suggerendo che questa possa avere un ruolo fondamentale nella scelta del sito di *splicing*. Tuttavia saranno necessari ulteriori esperimenti per confermare tali dati preliminari e per approfondire il ruolo funzionale dell'interazione *rpL3*-hnRNP H1.

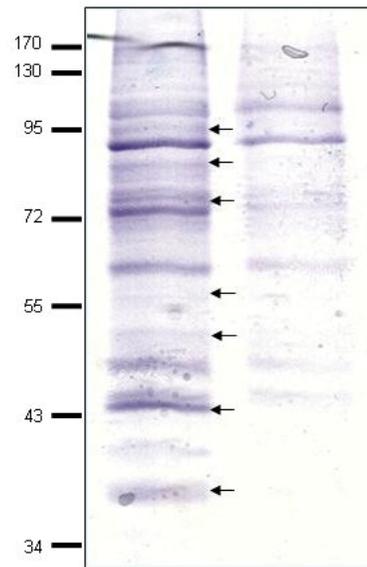
#### ***Identificazione di fattori in trans che legano l'introne 3 del gene rpL3***

Un altro aspetto importante per chiarire il meccanismo molecolare dell'evento di *splicing* alternativo è l'identificazione di fattori *in trans*, oltre ad hnRNP H1, che siano coinvolti nell'evento di *splicing* alternativo del gene *rpL3* tramite il legame con l'introne 3.

A tale scopo, abbiamo utilizzato l'RNA *pull-down assay*, seguito da analisi per spettrometria di massa. Come RNA "esca" è stata utilizzata la regione B dell'introne 3 del gene *rpL3*, trascritta *in vitro*, legata alla resina ed incubata con un estratto proteico totale proveniente da cellule HeLa. L'enorme

pressione selettiva a cui è stata sottoposta la regione B dell'introne 3 durante l'evoluzione ci fa pensare che possa contenere uno o più elementi in *cis* fondamentali per il legame a fattori di *splicing*. Le proteine legatesi al trascritto in modo specifico, in seguito ad eluizione, sono state separate per SDS-PAGE. La colorazione con Coomassie ha permesso di visualizzare specifiche bande proteiche (fig.9) che saranno analizzate per spettrometria di massa.

**Figura 9: Identificazione delle proteine che legano l'introne 3 del gene *rpL3*.** Colorazione con Coomassie delle proteine specificamente legate in vitro all'introne 3. Un estratto proteico totale in presenza (linea 1) o in assenza (linea 2) dell'RNA "esca" corrispondente all'introne 3. Le frecce indicano le proteine individuate.



Tra questi, molto interessante ci è sembrata la proteina regolatrice dello splicing, KHSRP (*K Homology-type Splicing Regulatory Protein*). KHSRP è una proteina che contiene diversi domini di legame all'RNA, coinvolta in numerosi processi cellulari. Studi recenti suggeriscono che la funzione di KHSRP nella degradazione dell'mRNA sia mediata dagli elementi ARE. Tali elementi rappresentano le sequenze destabilizzanti degli mRNA più caratterizzate (Wilusz and Wilusz 2004) e sono legati da proteine regolatrici, dette *ARE-binding proteins* (ARE-BP), che determinano l'emivita degli mRNA che li contengono. KHSRP funge da *ARE-binding protein*, in quanto i suoi quattro domini K-homology riconoscono gli elementi ARE ed interagiscono con il macchinario di degradazione dell'mRNA, promuovendo

l'eliminazione di vari mRNA sia *in vitro* che *in vivo* (Gherzi, Lee et al. 2004; Chou, Mulky et al. 2006).

Oltre alla sua funzione nella degradazione dell'mRNA, la proteina KHSRP ha un ruolo nello *splicing* alternativo di svariati geni di mammifero. Essa, infatti, è stata originariamente identificata come componente di un complesso proteico che si assembla su un *enhancer* di *splicing* intronico a valle dell'esone N1 neuronale-specifico del gene *c-src* (Min, Turck et al. 1997) di topo. Il trascritto primario di *c-src*, infatti, contiene un esone N1, che è inserito tra gli esoni 3 e 4 in cellule neuronali, mentre è eliminato in altri tipi cellulari (Martinez, Mathey-Prevot et al. 1987). L'inclusione dell'esone N1 nell'mRNA maturo a livello neuronale richiede un elemento *enhancer* di *splicing* intronico a valle dell'esone (Modafferi and Black 1997). Tale elemento è legato da un complesso multi-proteico, di cui fanno parte, oltre a KHSRP, anche hnRNP H e hnRNP F, tutte in grado di legare la sequenza *enhancer* (Chou, Rooke et al. 1999). Sempre più numerosi dati suggeriscono, quindi, che l'evento di *splicing* alternativo è un fenomeno molto complesso, che richiede il contributo di svariate proteine regolatrici. Tali proteine probabilmente cooperano o fungono da antagonisti l'un l'altro, costituendo complessi multi-proteici che influenzano la selezione del sito di *splicing* appropriato in specifici stadi o tipi cellulari. L'insieme di questi dati, seppur preliminari, sembra indirizzarci verso l'individuazione di un complesso multi-proteico che, in condizioni di eccesso della proteina rpL3 nella cellula, interagisce con essa regolandone la produzione attraverso il controllo dello *splicing* alternativo.

## **DISCUSSIONE**

Il controllo di qualità degli mRNA rappresenta una tappa di regolazione fondamentale nell'espressione dei geni a livello post-trascrizionale negli organismi eucarioti superiori. Esso si esplica attraverso numerosi meccanismi, che sono finalizzati al riconoscimento e all'eliminazione di mRNA aberranti.

Uno dei meccanismi di sorveglianza dell'mRNA più ampiamente studiati è il *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD), uno specifico *pathway* di degradazione post-trascrizionale che consente alla cellula di riconoscere e degradare in maniera rapida e selettiva mRNA contenenti codoni di stop prematuri della traduzione (PTC), risultanti da eventi di mutazioni nel DNA o da errori durante i processi di maturazione post-trascrizionale (Maquat 2005).

L'enorme pressione selettiva a cui è stato sottoposto l'NMD suggerisce che tale meccanismo possa funzionare non solo come processo di degradazione selettiva di mRNA aberranti, ma possa avere un ruolo biologico più ampio nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione fisiologica dei geni. Tale sistema di regolazione si esplica attraverso l'azione coordinata dell'evento di *splicing* alternativo, che produce il trascritto non produttivo contenente il PTC, e l'azione dell'NMD che, degradando tale trascritto, contribuisce alla modulazione dei livelli delle isoforme di RNA e quindi del prodotto proteico nella cellula.

Un esempio di tale regolazione post-trascrizionale è dato dalla proteina ribosomale umana, rpL3. Il gene per tale proteina è sottoposto a *splicing* alternativo. Durante tale processo, oltre all'isoforma canonica che porta alla traduzione della proteina, si genera anche un'isoforma alternativa data da una parziale ritenzione dell'introne 3. Tale isoforma è substrato naturale dell'NMD, in quanto contiene un PTC. I livelli di proteina rpL3 libera, cioè non associata

nelle subunità ribosomali, regolano la scelta tra le due modalità di *splicing*. Infatti, in condizioni normali di crescita, viene prodotto preferenzialmente il trascritto canonico funzionale per la traduzione del prodotto proteico; quando la proteina rpL3 è in eccesso, essa promuove lo *splicing* alternativo, con conseguente diminuzione dell'mRNA canonico e quindi della sintesi della proteina (Cuccurese, Russo et al. 2005).

I dati sperimentali in nostro possesso suggeriscono che il processo di regolazione post-trascrizionale al quale è sottoposta rpL3 possa essere indice di una sua funzione aggiuntiva al ruolo già noto di tale proteina nella formazione della subunità maggiore del ribosoma. Tale funzione si esplicherebbe attraverso la modulazione da parte di rpL3 dell'evento di *splicing* alternativo del proprio gene. E' noto, infatti, che molte proteine ribosomali, oltre alle loro funzioni nell'assemblaggio del ribosoma (Ferreira-Cerca, Poll et al. 2005) e nella traduzione dell'mRNA (Graifer, Molotkov et al. 2004; Bulygin, Chavatte et al. 2005), sono coinvolte in una varietà di processi extra-ribosomali (Wool 1996). In questa ottica, il ribosoma, oltre a funzionare come macchina per la sintesi proteica, agirebbe anche come deposito per proteine regolatrici (Mazumder, Sampath et al. 2003).

Numerosi dati evidenziano il coinvolgimento di rpL3 in svariati processi cellulari, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. I livelli della proteina rpL3 sono, infatti, positivamente correlati ai livelli di attività della telomerasi, a loro volta aumentati in linee cellulari di carcinoma esofageo (Bergqvist, Brattstrom et al. 2006). Inoltre, rpL3 è stata trovata come antigene tumorale nel cancro ovarico (Luo, Herrera et al. 2002), ed è coinvolta nella tumorigenesi del cancro del colon (Killian, Sarafan-Vasseur et al. 2006).

Ulteriori studi suggeriscono che la regolazione della sua sintesi sia correlata alla crescita cellulare. Infatti, è stato dimostrato che l'iper-espressione della proteina rpL3 di *N. tabacum* porta ad un blocco dell'espressione del gene *rpL3*, e ad un fenotipo cellulare anormale caratterizzato da un ritardo nello sviluppo e da un'inibizione della crescita; mentre, l'ipoespressione di rpL3 porta alla riduzione in numero e ad un aumento in grandezza delle cellule, suggerendo che rpL3 regola positivamente la divisione cellulare (Popescu and Tumer 2004). Tale proteina, infine, ha la capacità di legare l'elemento in *cis* TAR (*trans-activating responsive element*) nella LTR (*long terminal repeat*) del virus dell'HIV, favorendo il riconoscimento di tale elemento da parte della proteina TAT; rpL3 è stata per questo definita anche *TAR-binding protein* (Reddy, Suhasini et al. 1995).

Gli esperimenti condotti in questa tesi di dottorato hanno avuto l'obiettivo di chiarire il meccanismo molecolare alla base del processo di auto-regolazione della sintesi della proteina rpL3, focalizzando l'attenzione sul ruolo che essa svolge durante lo *splicing* alternativo del proprio gene.

La prima ipotesi di questo lavoro prevedeva un'interazione diretta tra la proteina rpL3 ed il proprio trascritto primario. In tal caso rpL3 avrebbe funzionato essa stessa da fattore di *splicing*, reclutando l'apparato dello spliceosoma sull'introne 3 del gene *rpL3*. L'interazione di rpL3 con il trascritto avrebbe potuto determinare un'inibizione del legame dei fattori di *splicing* canonici e/o favorire l'ingresso di fattori di *splicing* alternativi.

Gli esperimenti di *filter-binding* effettuati indicano che la proteina rpL3 non è in grado di legare il proprio trascritto in maniera specifica (fig.4).

In seguito a tali risultati abbiamo focalizzato i nostri studi su una seconda ipotesi, per la quale rpL3 svolgerebbe un'azione indiretta sul proprio pre-mRNA, influenzando la scelta del sito di *splicing* appropriato. Essa potrebbe, infatti, interagire con altri fattori proteici in *trans* che possono fungere da attivatori o repressori della reazione di *splicing* alternativo, e favorire il legame di tali fattori con il proprio trascritto. I risultati degli esperimenti di GST *pull-down* hanno condotto all'identificazione di svariati *partner* proteici di rpL3 (fig.5), tra cui due proteine regolatrici coinvolte nella regolazione dello *splicing* alternativo di svariati geni di mammifero, quali SF2p32 (Petersen-Mahrt, Estmer et al. 1999) e hnRNP H1 (Honore, Rasmussen et al. 1995).

SF2p32 è una subunità regolatrice del fattore umano di *splicing* SF2/ASF. Quest'ultimo appartiene alla famiglia delle proteine SR (*serine-arginin rich proteins*). La funzione di SF2p32 rappresenta un aspetto interessante ai fini della comprensione del meccanismo di modulazione dello *splicing* alternativo del gene *rpL3*, in quanto recentemente è stato dimostrato che SF2p32 interagisce con SF2/ASF e ne inibisce la funzione, prevenendo l'interazione con l'RNA (Petersen-Mahrt, Estmer et al. 1999). In particolare, SF2p32 impedisce la fosforilazione di SF2/ASF, modificazione necessaria per il suo legame con l'RNA e per l'interazione proteina-proteina durante la formazione dello spliceosoma (Petersen-Mahrt, Estmer et al. 1999). Il possibile coinvolgimento di SF2p32 nello *splicing* alternativo del gene *rpL3* sarà oggetto di studi futuri.

hnRNP H1 è una proteina appartenente alla famiglia delle ribonucleoproteine eterogenee nucleari (hnRNP), ed è coinvolta anch'essa

nella regolazione dello *splicing* di svariati geni di mammifero (Romano, Marcucci et al. 2002; Mercado, Ayala et al. 2005; Marcucci, Baralle et al. 2007). Diversi studi dimostrano che gli elementi in *cis* attraverso i quali hnRNP H1 esplica la sua azione di attivatore o repressore dello *splicing* sono sequenze ricche in G, denominate *G-runs*.

Inoltre, sono stati condotti esperimenti di RNA *pull-down* dai quali è stata identificata una proteina, KHSRP (*K Homology-type Splicing Regulatory Protein*), in grado di legare la regione dell'introne 3 trattenuta nell'isoforma alternativa (fig.9). KHSRP è una proteina regolatrice scoperta di recente (Min, Turck et al. 1997) che è coinvolta in numerosi processi cellulari, quali la degradazione degli mRNA contenenti elementi ARE e lo *splicing* (Gherzi, Lee et al. 2004; Min, Turck et al. 1997).

Questi risultati rappresentano un'evidenza a favore dell'ipotesi di un complesso multi-proteico, che si assembla sull'introne 3 e che è responsabile della selezione del sito di *splicing* appropriato. Studi precedenti, infatti, hanno dimostrato che hnRNP H1 fa parte, insieme alla proteina regolatrice KHSRP, di un complesso *enhancer* coinvolto nella reazione di *splicing* alternativo del gene *c-src* in cellule neuronali (Chou, Rooke et al. 1999).

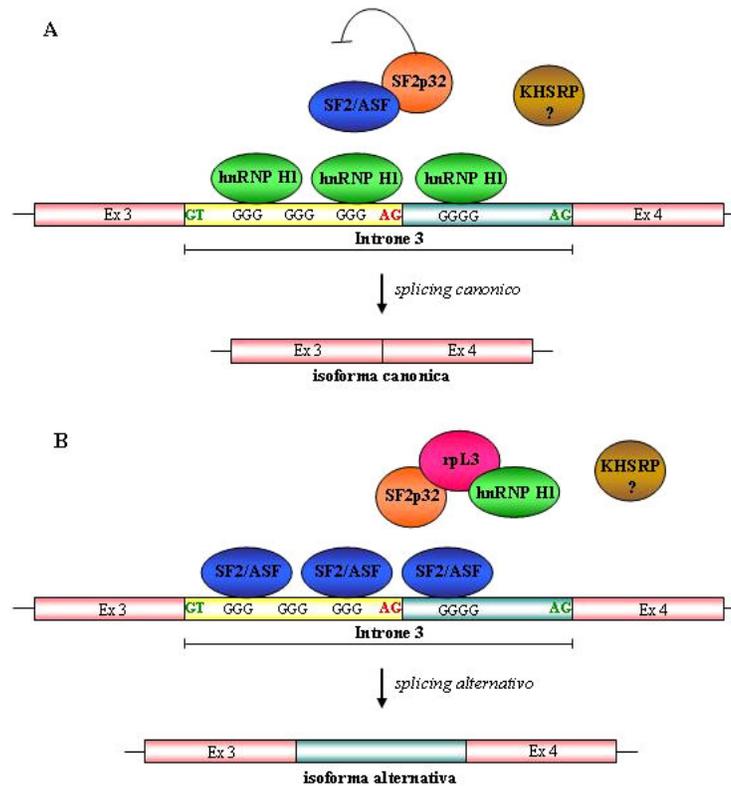
Tramite esperimenti di RNA-immunoprecipitazione, abbiamo dimostrato che hnRNP H1 lega *in vivo* l'introne 3 del gene *rpL3* (fig.6B). Inoltre, dati preliminari indicano che, in condizioni di iper-espressione di *rpL3*, il legame di hnRNP H1 all'introne diminuisce (fig.8), supportando l'idea che l'interazione di hnRNP H1 al trascritto primario possa essere influenzato dalla concentrazione di *rpL3* all'interno della cellula. In particolare la nostra ipotesi

di lavoro prevede che l'eccesso della proteina rpL3 nel nucleo possa in qualche modo sequestrare hnRNP H1 impedendone il legame col pre-mRNA.

Inoltre, la presenza di numerose *G-runs* nell'introne 3 suggerisce un possibile coinvolgimento di tali sequenze nella repressione della scelta del sito di *splicing* criptico tramite il legame ad hnRNP H1.

Da approcci bioinformatici è emersa la presenza di sequenze *consensus* putative per SF2/ASF nell'introne 3. L'aspetto interessante è che tali sequenze si sovrappongono a quelle *consensus* per il legame di hnRNP H1. Tali osservazioni inducono a supporre che le due proteine SF2/ASF e hnRNP H1 potrebbero funzionare da antagonisti, competendo per i propri siti di legame sull'introne 3. Ciò potrebbe rappresentare un punto di controllo cruciale nella scelta tra le due modalità di *splicing* alternativo e canonico.

Pertanto, possiamo ipotizzare un modello di regolazione post-trascrizionale di rpL3, secondo il quale, in condizioni normali di crescita, hnRNP H1 potrebbe legare le *G-runs* inibendo lo *splicing* alternativo. Per cui la modalità di *splicing* che viene scelta preferenzialmente è quella canonica (fig.10A). Tuttavia, quando rpL3 è presente in eccesso nella cellula, essa potrebbe sequestrare hnRNP H1, legare SF2p32 e sottrarla dal complesso SF2/ASF, rendendolo capace di legare l'RNA. Quest'ultimo, a tal punto, potrebbe legare le proprie sequenze *consensus*, in quanto esposte in seguito allo spiazzamento di hnRNP H1 e, pertanto, funzionare da attivatore nell'evento di *splicing* alternativo (fig.10B).



**Figura 10: Modello di regolazione post-trascrizionale della proteina rpL3.** **A.** In condizioni normali di crescita, la modalità di *splicing* canonica del pre-mRNA di rpL3 viene preferenzialmente scelta: la proteina hnRNP H1 lega le G-runs nell'introne 3, impedendo il riconoscimento del sito di *splicing* criptico. La proteina SF2p32 inibisce l'azione del fattore SF2/ASF, bloccando la sua azione nella reazione di *splicing*. **B.** In condizioni di iper-espressione della proteina rpL3, quest'ultima lega sia hnRNP H1, impedendogli di legare le G-runs, sia SF2p32. SF2/ASF, non più inibito dalla sua subunità regolatrice, è quindi libero di legare elementi in *cis*, in quanto esposti in seguito allo spiazzamento di hnRNP H1. Si ha pertanto un incremento del livello di isoforma alternativa, che è degradata dall'NMD. In verde sono evidenziati i siti di *splicing* donatore e accettore canonici, in rosso il sito di *splicing* accettore criptico.

I nostri dati, seppur preliminari, suggeriscono che la scelta del sito di *splicing* appropriato sia fortemente dipendente da delicati equilibri che si instaurano tra fattori in *trans* ed elementi in *cis* in seguito a fini variazioni della concentrazione delle proteine sottoposte all'auto-regolazione. In tale contesto, l'azione coordinata e cooperativa di alcune proteine bilanciata dall'azione antagonista di altre, costituisce un fattore determinante dell'evento di *splicing* alternativo.

Pertanto, obiettivo fondamentale sarà quello di comprendere in dettaglio il meccanismo molecolare mediante il quale i fattori proteici identificati siano in grado di influenzare lo *splicing* alternativo del gene *rpL3*, in relazione alle variazioni del livello di proteina libera all'interno della cellula.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Bagga, P. S., G. K. Arhin, et al. (1998). *Nucleic Acids Res* 26(23): 5343-50.
- Ban, N., P. Nissen, et al. (2000). *Science* 289(5481): 905-20.
- Bergqvist, M., D. Brattstrom, et al. (2006). *Dis Esophagus* 19(1): 20-3.
- Black, D. L. (2003). *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Bleichert, F. and S. J. Baserga (2007). *Mol Cell* 27(3): 339-52.
- Blencowe, B. J. (2000). *Trends Biochem Sci* 25(3): 106-10.
- Bourgeois, C. F., F. Lejeune, et al. (2004). *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78: 37-88.
- Bulygin, K., L. Chavatte, et al. (2005). *Biochemistry* 44(6): 2153-62.
- Caputi, M. and A. M. Zahler (2002). *EMBO J* 21(4): 845-55.
- Cartegni, L. and A. R. Krainer (2002). *Nat Genet* 30(4): 377-84.
- Cartegni, L., J. Wang, et al. (2003). *Nucleic Acids Res* 31(13): 3568-71.
- Chen, C. D., R. Kobayashi, et al. (1999). *Genes Dev* 13(5): 593-606.
- Chou, C. F., A. Mulky, et al. (2006). *Mol Cell Biol* 26(10): 3695-706.
- Chou, M. Y., N. Rooke, et al. (1999). *Mol Cell Biol* 19(1): 69-77.
- Cuccurese, M., G. Russo, et al. (2005). *Nucleic Acids Res* 33(18): 5965-77.
- Culbertson, M. R. (1999). *Trends Genet* 15(2): 74-80.
- Fairbrother, W. G., G. W. Yeo, et al. (2004). *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W187-90.
- Ferreira-Cerca, S., G. Poll, et al. (2005). *Mol Cell* 20(2): 263-75.
- Fewell, S. W. and J. L. Woolford, Jr. (1999). *Mol Cell Biol* 19(1): 826-34.
- Frischmeyer, P. A. and H. C. Dietz (1999). *Hum Mol Genet* 8(10): 1893-900.
- Fu, X. D. (1995). *RNA* 1(7): 663-80.
- Gallego, M. E., R. Gattoni, et al. (1997). *EMBO J* 16(7): 1772-84.
- Gherzi, R., K. Y. Lee, et al. (2004). *Mol Cell* 14(5): 571-83.
- Graifer, D., M. Molotkov, et al. (2004). *Nucleic Acids Res* 32(11): 3282-93.
- Grisendi, S., R. Bernardi, et al. (2005). *Nature* 437(7055): 147-53.
- Hastings, M. L., C. M. Wilson, et al. (2001). *RNA* 7(6): 859-74.
- Herbert, A. and A. Rich (1999). *Nat Genet* 21(3): 265-9.
- Hillman, R. T., R. E. Green, et al. (2004). *Genome Biol* 5(2): R8.
- Hingorani, K., A. Szebeni, et al. (2000). *J Biol Chem* 275(32): 24451-7.
- Holbrook, J. A., G. Neu-Yilik, et al. (2004). *Nat Genet* 36(8): 801-8.
- Holzmann, K., T. Korosec, et al. (1997). *Eur J Biochem* 244(2): 479-86.
- Honore, B., H. H. Rasmussen, et al. (1995). *J Biol Chem* 270(48): 28780-9.

Hovhannisyan, R. H. and R. P. Carstens (2005). *Mol Cell Biol* 25(1): 250-63.

Ivanov, A. V., A. A. Malygin, et al. (2005). *Biochim Biophys Acta* 1727(2): 134-40.

Kanopka, A., O. Muhlemann, et al. (1996). *Nature* 381(6582): 535-8.

Karni, R., E. de Stanchina, et al. (2007). *Nat Struct Mol Biol* 14(3): 185-93.

Killian, A., N. Sarafan-Vasseur, et al. (2006). *Genes Chromosomes Cancer* 45(9): 874-81.

Kohtz, J. D., S. F. Jamison, et al. (1994). *Nature* 368(6467): 119-24.

Krainer, A. R., A. Mayeda, et al. (1991). *Cell* 66(2): 383-94.

Krecic, A. M. and M. S. Swanson (1999). *Curr Opin Cell Biol* 11(3): 363-71.

LaBranche, H., S. Dupuis, et al. (1998). *Nat Genet* 19(2): 199-202.

Le Hir, H., E. Izaurralde, et al. (2000). *EMBO J* 19(24): 6860-9.

Levy, S., D. Avni, et al. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(8): 3319-23.

Lewis, B. P., R. E. Green, et al. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 189-92.

Li, S. and M. F. Wilkinson (1998). *Immunity* 8(2): 135-41.

Lopez, A. J. (1998). *Annu Rev Genet* 32: 279-305.

Luo, L. Y., I. Herrera, et al. (2002). *Br J Cancer* 87(3): 339-43.

Malygin, A. A., N. M. Parakhnevitch, et al. (2007). *Nucleic Acids Res.*

Maniatis, T. and B. Tasic (2002). *Nature* 418(6894): 236-43.

Manley, J. L. and R. Tacke (1996). *Genes Dev* 10(13): 1569-79.

Maquat, L. E. (2004). *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 89-99.

Maquat, L. E. (2005). *J Cell Sci* 118(Pt 9): 1773-6.

Marcucci, R., F. E. Baralle, et al. (2007). *Nucleic Acids Res* 35(1): 132-42.

Martinez, R., B. Mathey-Prevot, et al. (1987). *Science* 237(4813): 411-5.

Matunis, M. J., J. Xing, et al. (1994). *Nucleic Acids Res* 22(6): 1059-67.

Mayeda, A. and A. R. Krainer (1992). *Cell* 68(2): 365-75.

Mayeda, A., G. R. Sreaton, et al. (1999). *Mol Cell Biol* 19(3): 1853-63.

Mazumder, B., P. Sampath, et al. (2003). *Cell* 115(2): 187-98.

McCarthy, E. M. and J. A. Phillips, 3rd (1998). *Hum Mol Genet* 7(9): 1491-6.

McCullough, A. J. and S. M. Berget (1997). *Mol Cell Biol* 17(8): 4562-71.

Mendell, J. T., N. A. Sharifi, et al. (2004). *Nat Genet* 36(10): 1073-8.

Mercado, P. A., Y. M. Ayala, et al. (2005). *Nucleic Acids Res* 33(18): 6000-10.

Min, H., C. W. Turck, et al. (1997). *Genes Dev* 11(8): 1023-36.

Mitrovich, Q. M. and P. Anderson (2000). *Genes Dev* 14(17): 2173-84.

Modafferi, E. F. and D. L. Black (1997). *Mol Cell Biol* 17(11): 6537-45.

Moore, M. J. (2002). *Cell* 108(4): 431-4.

Nagy, E. and L. E. Maquat (1998). *Trends Biochem Sci* 23(6): 198-9.

Nussinov, R. (1989). *J Biomol Struct Dyn* 6(5): 985-1000.

Perry, R. P. (2005). *BMC Evol Biol* 5(1): 15.

Petersen-Mahrt, S. K., C. Estmer, et al. (1999). *EMBO J* 18(4): 1014-24.

Popescu, S. C. and N. E. Tumer (2004). *Plant J* 39(1): 29-44.

Reddy, T. R., M. Suhasini, et al. (1995). *AIDS Res Hum Retrov* 11(6): 663-9.

Romano, M., R. Marcucci, et al. (2002). *J Biol Chem* 277(46): 43821-9.

Schaal, T. D. and T. Maniatis (1999). *Mol Cell Biol* 19(3): 1705-19.

Senapathy, P., M. B. Shapiro, et al. (1990). *Methods Enzymol* 183: 252-78.

Sirand-Pugnet, P., P. Durosay, et al. (1995). *Nucleic Acids Res* 23(17): 3501-7.

Smith, C. W. and J. Valcarcel (2000). *Trends Biochem Sci* 25(8): 381-8.

Spector, D. L., R. L. Ochs, et al. (1984). *Chromosoma* 90(2): 139-48.

Sun, X., X. Li, et al. (2001). *Mol Biol Cell* 12(4): 1009-17.

Szebeni, A., J. E. Herrera, et al. (1995). *Biochemistry* 34(25): 8037-42.

Szebeni, A., K. Hingorani, et al. (2003). *J Biol Chem* 278(11): 9107-15.

Takemura, M., K. Sato, et al. (1999). *J Biochem (Tokyo)* 125(5): 904-9.

Vaarala, M. H., K. S. Porvari, et al. (1998). *Int J Cancer* 78(1): 27-32.

Vasudevan, S. and S. W. Peltz (2003). *Curr Opin Cell Biol* 15(3): 332-7.

Vilardell, J., P. Chartrand, et al. (2000). *RNA* 6(12): 1773-80.

Wang, Z., X. Xiao, et al. (2006). *Mol Cell* 23(1): 61-70.

Wilusz, C. J. and J. Wilusz (2004). *Trends Genet* 20(10): 491-7.

Wool, I. G. (1996). *Trends Biochem Sci* 21(5): 164-5.

Wu, J. Y. and T. Maniatis (1993). *Cell* 75(6): 1061-70.

Xiao, S. H. and J. L. Manley (1997). *Genes Dev* 11(3): 334-44.

Yang, H., D. Henning, et al. (2005). *FEBS J* 272(15): 3788-802.

Yu, Y., L. B. Maggi, Jr., et al. (2006). *Mol Cell Biol* 26(10): 3798-809.

Yung, B. Y., H. Busch, et al. (1985). *Biochim Biophys Acta* 826(4): 167-73.

Zahler, A. M., W. S. Lane, et al. (1992). *Genes Dev* 6(5): 837-47.

Zahler, A. M., K. M. Neugebauer, et al. (1993). *Science* 260(5105): 219-22.

Zhao, Y., J. H. Sohn, et al. (2003). *Mol Cell Biol* 23(2): 699-707.

Zheng, Z. M. (2004). *J Biomed Sci* 11(3): 278-94.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Desidero ringraziare la mia relatrice, la prof.ssa Concetta Pietropaolo, per l'esempio di professionalità e dedizione alla ricerca che è stata per me in questi anni di dottorato.*

*Ringrazio la professoressa Giulia Russo per i preziosi insegnamenti elargiti durante lo svolgimento della mia attività di laboratorio.*

*Ringrazio Annapina Russo per il costante supporto e la disponibilità offerti in ogni momento, e tutti i componenti del gruppo: Nicoletta, Morena, Anna, Marco, per i piacevoli e golosi momenti di svago trascorsi nelle pause tra una centrifugazione ed una corsa elettroforetica, ma soprattutto per l'amicizia che si è creata tra i banchi di laboratorio.*

*Un immancabile ringraziamento va a tutti i miei amici e parenti per la loro insostituibile presenza nel mio cammino, ed in particolare alla mia famiglia che da sempre con i suoi sforzi continua a sostenermi in ogni momento della mia vita.*

*Un ultimo, ma non ultimo, naturale ringraziamento va a Bruno, perché ogni giorno di più mi dona il colore più bello dell'arcobaleno della mia vita....*

*Grazie*

*Gabry*