

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dottorato di Ricerca in Biologia Avanzata

(Sistematica molecolare)

XVIII ciclo

**Studi molecolari di PLAUF,
una RNA *binding protein* in riccio di mare**

Coordinatore:

Prof.ssa Silvana Filosa

Candidata:

Dott.ssa Rosalia Leonardo

Docente guida:

Prof.ssa Laura Fucci

ANNO ACCADEMICO 2004/2005

Indice

<u>RIASSUNTO</u>	pag. 4
<u>INTRODUZIONE</u>	pag. 7
Gli elementi regolatori <i>in cis</i>	pag. 8
I fattori regolatori <i>in trans</i>	pag. 20
Struttura delle proteine che legano RNA	pag. 22
<u>SCOPO DELLA RICERCA</u>	pag. 36
<u>PROCEDURE SPERIMENTALI</u>	pag. 47
<i>3' Race</i>	pag. 48
Analisi di una <i>library</i> di cDNA mediante <i>plaque-hybridization</i>	pag. 48
Analisi di una <i>library</i> genomica	pag. 54
<i>Southern blotting</i>	pag. 56
Sintesi di cDNA mediante trascrizione inversa	pag. 57
Amplificazione mediante reazione di PCR	pag. 57
Estrazione di DNA plasmidico (miniprep, midiprep e maxiprep)	pag. 58
Clonaggio nel vettore di espressione pGEX-2T	pag. 59
Espressione ed estrazione proteica	pag. 62
Purificazione della proteina di fusione	pag. 63
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)	pag. 64

<i>Western blotting</i>	pag. 64
REMSA (RNA <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)	pag. 66
Saggio di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio	pag. 66
Preparazione del trascritto marcato	pag. 67
Ibridazioni in situ su embrioni <i>whole-mount</i>	pag. 69
<u>RISULTATI</u>	pag. 71
Identificazione e caratterizzazione dei cDNA codificanti PLAUF	pag. 72
Identificazione e definizione della struttura del gene <i>PLAUF</i>	pag. 75
Espressione <i>in vitro</i> e purificazione della proteina ricombinante	pag. 84
Saggi funzionali sulla proteina ricombinante GST-PLAUF	pag. 86
Preparazione di anticorpi policlonali contro PLAUF	pag. 89
Identificazione di PLAUF in un estratto proteico totale	pag. 91
Esperimenti di ibridazione <i>in situ</i>	pag. 95
<u>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</u>	pag. 97
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag. 104

Riassunto

La regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale consiste in una serie di eventi mediati da una complessa rete di interazioni RNA/proteine che dipendono dal riconoscimento di uno specifico mRNA da parte delle RNA-binding proteins (RNA-BPs). Nel riccio di mare *P. lividus* il trascritto che codifica per la variante dell'istone H3.3 è caratterizzato da una lunga 3'UTR che contiene motivi ARE (AU-Rich element) a cui sembrano legarsi almeno tre diverse proteine (45, 32 e 21 kDa); tale legame potrebbe essere implicato nella regolazione dell'emivita del trascritto.

Nel gruppo diretto dalla Prof.ssa L. Fucci era stato in precedenza isolato un cDNA codificante per la proteina PLAUF, così chiamata perchè omologa alle proteine della famiglia AUF1 identificate in ratto e uomo, che sono implicate nell'emivita di trascritti contenenti motivi AU-rich.

Esperimenti di *Northern blotting* avevano rivelato la presenza di almeno tre trascritti per PLAUF a diverso peso molecolare. Allo scopo di caratterizzare tali trascritti, dopo aver definito la presenza di un sito unico di inizio trascrizione, sono stati eseguiti esperimenti di 3' *Race* ed analisi di una nuova *library* di espressione. Tali approcci hanno dimostrato che i tre trascritti si differenziano per la lunghezza della 3'UTR e quindi deriverebbero dall'utilizzo di siti alternativi di poliadenilazione. Inoltre attraverso esperimenti di RT-PCR, è stata dimostrata la presenza di un ulteriore forma di trascritto generato per *splicing* alternativo che produce una proteina più corta di 23 aminoacidi. Si è passati quindi a identificare e analizzare il gene per PLAUF, attraverso lo "screening" di una *library* genomica. Il gene è risultato diviso in 10 esoni e 9 introni e l'esone 9 è quello che può essere allontanato mediante *splicing* alternativo.

Sulla base di diversi approcci sperimentali la proteina PLAUF potrebbe corrispondere alla

proteina da 32 kDa che lega la 3'UTR del trascritto per l'istone H3.3, influenzandone l'emivita. La proteina di fusione GST-PLAUF è stata quindi espressa *in vitro* e purificata, ne è stata analizzata la capacità di legare la 3'UTR dell'istone H3.3 e di influenzarne l'emivita. Essa lega specificamente *in vitro* la 3'UTR dell'istone H3.3 e sembra proteggere il trascritto dalla degradazione. E' stato quindi necessario preparare anticorpi contro PLAUF per correlare la proteina PLAUF ai dati ottenuti con gli estratti proteici da embrioni di *P. lividus* e quindi alla proteina da 32 kDa. Esperimenti di *Western blotting* hanno identificato una proteina di 32 kDa nell'estratto proteico da embrioni di riccio di mare allo stadio di gastrula. Inoltre, in esperimenti di *Supershift*, gli anticorpi anti-PLAUF hanno identificato la proteina nel complesso di legame al trascritto per l'istone H3.3. Quindi la proteina PLAUF corrisponde alla proteina da 32 kDa capace di legare il trascritto per H3.3 e di influenzarne l'emivita. Inoltre esperimenti di ibridazioni *in situ* hanno dimostrato che gli mRNA per PLAUF e per H3.3 colocalizzano in embrioni a diversi stadi di sviluppo.

In conclusione tutti i dati riportati suggeriscono che PLAUF potrebbe legare anche *in vivo* la 3'UTR dell'istone H3.3 e regolarne l'emivita. Inoltre questi risultati dimostrano che PLAUF conserva con le proteine AUF1 parte della sequenza aminoacidica, l'organizzazione del gene e anche probabilmente la funzione biologica, nonostante ci siano state sostituzioni di domini.

Keywords: PLAUF, stabilità, *P. lividus*, RNA-binding protein

Introduzione

Dopo che un gene è stato trascritto si devono completare molti processi molecolari prima di ottenere il prodotto proteico che, a sua volta, può essere soggetto a maturazione e *targeting*. Gli eventi post-trascrizionali che interessano l'RNA e su cui si esercita regolazione riguardano il processamento dell'mRNA, il trasporto dal nucleo al citoplasma, la localizzazione dell'mRNA, il *turnover* del trascritto e la traduzione. Questi processi sono controllati attraverso una complessa rete di interazioni RNA/proteine che dipendono dal riconoscimento di uno specifico mRNA da parte delle RNA-Binding Proteins (RNA-BPs). Questo riconoscimento può essere mediato dalla 5'UTR, dalla regione codificante o dalla 3'UTR del trascritto, che sono definiti elementi regolatori *in cis*, mentre i fattori proteici che riconoscono e legano queste regioni vengono definiti fattori *in trans*.

GLI ELEMENTI REGOLATORI *IN CIS*

Gli elementi regolatori localizzati nella 5'UTR sono molto spesso coinvolti nella regolazione traduzionale. Il riconoscimento mediato dalla 5'UTR può coinvolgere il sito interno di ingresso dei ribosomi (IRES), le *Open Reading Frame* a monte (uORF), le strutture secondarie dell'mRNA e il cap all'estremità 5'. L'mRNA che codifica per c-myc è trascritto da quattro differenti promotori, di cui due (P1 e P2) producono mRNA con lunghe 5'UTR che contengono IRES. Questi siti vengono riconosciuti e legati da RNA-BPs, che ne regolano la traduzione: le IRES vengono legate da hnRNPC con una conseguente attivazione della traduzione di c-myc (Kim et al., 2003). Analogamente è stato osservato che mutazioni nelle IRES regolano negativamente l'espressione di c-myc (Chappell et al., 2000).

Nel caso del proto-oncogene *mdm2* sono le *Open Reading Frame* a monte (uORF) a giocare un ruolo decisivo nella regolazione post-trascrizionale. Sono stati caratterizzati due mRNA con 5'UTR differenti, generati mediante l'utilizzo di promotori alternativi, L-*mdm2* (con una lunga 5'UTR) e S-*mdm2* (con una corta 5'UTR). La lunga 5'UTR contiene due uORFs che determinano una significativa diminuzione dell'efficienza di traduzione dell'mRNA. La corta 5'UTR invece permette un'elevata efficienza di traduzione. In questo modo l'utilizzo di un promotore piuttosto che l'altro può determinare una iperespressione di *mdm2* (Okumura et al., 2002).

Anche le ORF giocano un ruolo nella regolazione post-trascrizionale: un peptide neosintetizzato può influenzare l'efficienza della traduzione, così come la presenza di un codone raro potrebbe determinare una pausa durante la traduzione. Sequenze localizzate nella ORF possono però anche essere coinvolte nel processo di degradazione dell'mRNA.

Sono stati ben caratterizzati i determinanti per l'instabilità degli mRNA presenti nelle regioni ORF (CRD, *Coding Region Determinant*) dei trascritti per *c-fos* e *c-myc*. Nella regione codificante per *c-fos* è stato identificato un CRD che è coinvolto nella deadenilazione e nella destabilizzazione dell'mRNA. Una regione di 87 nucleotidi è sufficiente per determinare la rapida degradazione di un RNA *reporter*, mediante il legame ad un complesso di proteine. Parte di questa regione ricca in purine è stata utilizzata per purificare un complesso di proteine costituito da UNR, hnRNPd, PABP1, NSAP1 e PAIP1. Questo complesso proteico è stato anche chiamato "bridging complex" in quanto sembra legare contemporaneamente la CRD e le regioni 3' e 5' terminali. La PABP1 (Poli(A) *Binding Protein* 1) interagisce con la coda di poli(A) e con il CRD, mentre la PAIP1 (Poli(A) *Interacting Protein* 1) interagisce contemporaneamente con la

PABP1 e la proteina eIF4A, un componente della fase iniziale della traduzione. La specificità di legame del complesso proteico al CRD è determinato dalla presenza della RNA-BP UNR. È stato inoltre verificato che la PABP1 è in grado di interagire direttamente con il fattore trascrizionale di inizio eIF4G, facendo da ponte tra la 5' e la 3'UTR; questa interazione sembrerebbe essere associata con la protezione della coda di poli(A) e un'efficiente traduzione dell'mRNA. Questo sistema servirebbe ad assicurare che l'mRNA sia tradotto almeno una volta prima di essere degradato, e quindi a rendere la degradazione di c-fos traduzione-dipendente. È stato dimostrato che una iperespressione delle proteine del complesso determinano una stabilizzazione dell'mRNA che contiene il CRD (Grosset et al., 2000).

Anche la regolazione della stabilità dell'mRNA per c-myc viene definita traduzione-dipendente; l'mRNA per c-myc contiene un CRD capace di legare un fattore proteico CRD-BP. La regolazione della stabilità dell'mRNA per c-myc, mediata dal CRD, risiede nella competizione di legame tra le endonucleasi e la CRD-BP, entrambe capaci di legare i ribosomi. La CRD-BP è stata purificata da cellule della linea eritroleucemica umana K562 e caratterizzata: essa appartiene alla famiglia delle *RNA-Binding Proteins* caratterizzate da quattro motivi KH (*K-homology*) nella regione C-terminale e due *RNA-Recognition Motifs* (RRM) nella regione N-terminale.

Molteplici sono le sequenze delle 3'UTR, che legando le RNA-BPs, svolgono importanti funzioni regolatorie sulla traducibilità e sulla stabilità del trascritto. Un punto di controllo presente nelle 3'UTR è la coda di poli(A); questa viene prima aggiunta nel nucleo dopo la trascrizione ma una volta nel citoplasma, è soggetta ad un equilibrio dinamico tra l'allungamento e l'accorciamento. Lo stato di adenilazione dell'mRNA

contemporaneamente controlla ed è controllato dalla traduzione. Un mRNA con una lunga coda di poli(A) è tradotto con elevata efficienza a differenza di un mRNA con una corta coda di poli(A). Analogamente, la rimozione della coda di poli(A) è spesso il primo passo verso la degradazione del trascritto; un mRNA con una lunga coda di poli(A) è più stabile di un mRNA con una corta coda di poli(A) (Osborne et al., 2003).

Per altri messaggeri poliadenilati può verificarsi una degradazione in direzione $5' \rightarrow 3'$ preceduta dall'allontanamento del cap e indipendente dall'accorciamento della coda di poli(A). E' il caso di un mutante del gene PGK1 di lievito che si degrada anche 10 volte più velocemente del trascritto parentale. Esso presenta un tratto di poli(G) nella 3'UTR del trascritto che forma una struttura a doppio filamento e impedisce l'accesso alle esonucleasi che lavorano in direzione $3' \rightarrow 5'$ (Muhlrاد and Parker, 1994) (Figura 1).

Tra le sequenze *in cis* presenti nelle 3'UTR si distinguono le IRE (Iron Responsive Element), i tratti ricchi di pirimidine e le sequenze ricche in AU. I trascritti caratterizzati dalle IRE sono riconosciuti e legati dalle proteine IRPs (Iron Responsive Proteins) in condizioni di basse concentrazioni di ferro intracellulare. Questa interazione stabilizza il trascritto e determina, per esempio, la produzione del recettore per la transferrina implicato nel trasporto di ferro all'interno della cellula. Quando la concentrazione di ferro nella cellula aumenta, le IRPs perdono la loro capacità di legame e si dissociano dal trascritto, determinando l'attacco del meccanismo degradativo.

L'espressione di alcuni geni è regolata a livello post-trascrizionale mediante le regioni ricche in pirimidine presenti nelle 3'UTR. Nelle cellule stellate epatiche la stabilità dell'mRNA per il collagene $\alpha 1(I)$ aumenta drasticamente quando le proteine αCP legano

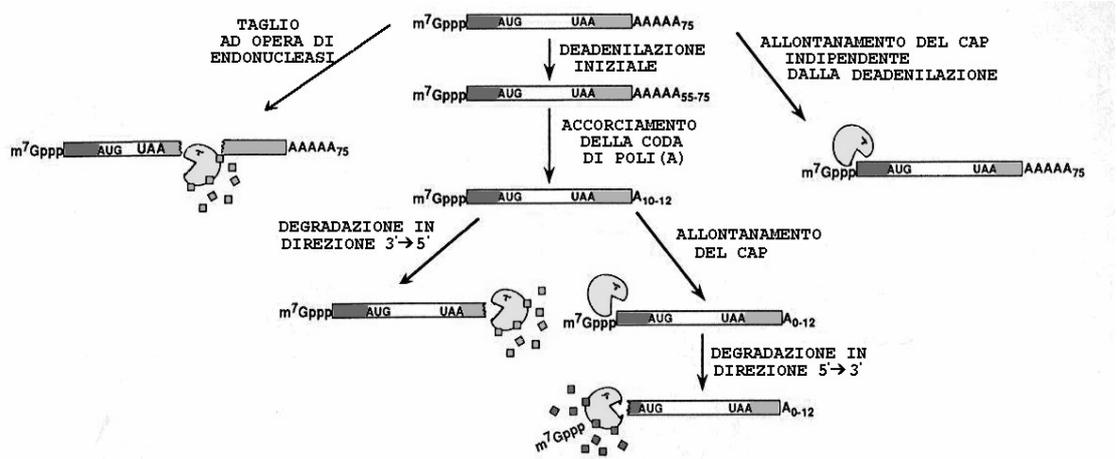


Figura 1: Rappresentazione schematica di alcuni meccanismi di degradazione dei trascritti poliadenilati.

le regioni ricche in CU presenti nella 3'UTR, in seguito ad attivazione cellulare (Figura 2) (Lindquist et al., 2004).

Nella determinazione dell'emivita di un trascritto di fondamentale importanza sono le sequenze ricche in AU (AREs, *AU Rich Elements*) localizzate nelle 3'UTR di molti mRNA instabili codificanti per citochine, oncoproteine e proteine coinvolte nello sviluppo del sistema nervoso (Chung et al., 1996). Nella 3'UTR del trascritto di bcl-2 a monte delle ARE, recentemente è stata individuata una regione di 131 nucleotidi ricca in CA, implicata nella regolazione dell'emivita del trascritto in compartecipazione con le ARE, probabilmente modulando la risposta a stimoli diversi (Lee et al., 2004).

La regolazione dell'emivita dell'mRNA risulta quindi essere un importante punto di controllo della regolazione dell'espressione genica, in quanto la degradazione di un mRNA non è determinato dall'attività di nucleasi non specifiche che degradano il substrato indiscriminatamente. Piuttosto così come la trascrizione, il processamento e la traduzione dell'mRNA, la degradazione dell'mRNA è un processo regolato finemente, che dipende da sequenze *in cis* e da fattori *in trans*.

Gli elementi *in cis* giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'emivita di un trascritto: specifiche proteine possono riconoscere e legare questi elementi per proteggere gli mRNA dalla degradazione o per promuovere la degradazione richiamando enzimi degradativi (Bevilacqua et al., 2003).

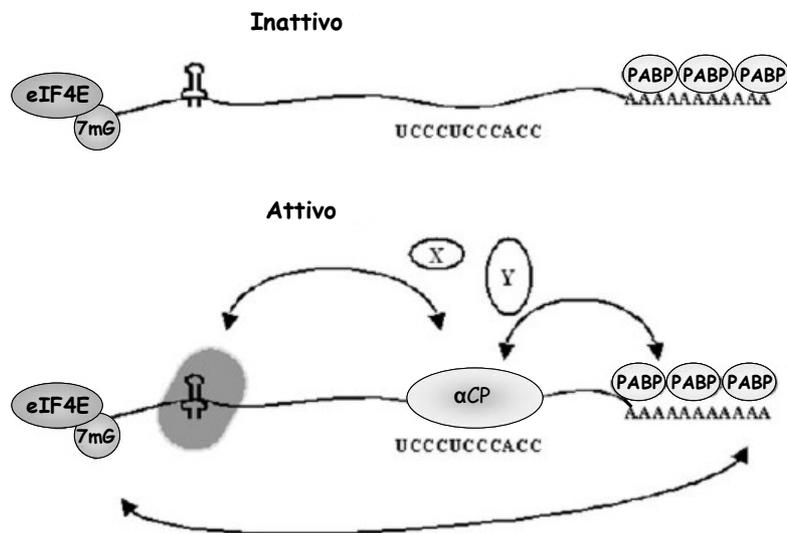


Figura 2: Schema del modello dell'attività stabilizzante operata dalla proteina α CP sul trascritto del collagene α 1(I). Nelle cellule epatiche inattivate la proteina α CP non lega il trascritto che viene così degradato velocemente. Nello stato di attivazione il legame dell' α CP stabilizza il legame delle PABPs alla coda di poli(A) e inoltre facilita l'interazione con le proteine all'estremità 5'; ciò determina una maggiore stabilità e traducibilità del trascritto.

LE SEQUENZE RICCHE IN AU

Struttura e funzione

Le sequenze ricche in AU sono un importante esempio di elementi *in cis* presenti nelle 3'UTR che controllano l'emivita dei trascritti. Le ARE furono per la prima volta individuate nelle 3'UTR del trascritto per il TNF (*Tumor Necrosis Factor*) del topo e dell'uomo, così come negli mRNA delle linfochine e del GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor*) umani, e nei trascritti per la fibronectina nel ratto e nell'uomo (Caput et al. 1986). Tali trascritti sono instabili e quindi è stato proposto che i motivi ARE svolgessero un'importante funzione nella regolazione della stabilità dei trascritti. Questa ipotesi fu subito verificata da Shaw e Kamen (1986) che inserirono una sequenza ARE di 51 nucleotidi del GM-CSF nella 3'UTR del trascritto stabile per la β -globina del coniglio; ciò determinò una rapida degradazione. Dal 1986 la struttura delle ARE è stata studiata per individuare il determinante chiave dell'emivita dei trascritti. Analisi di sequenza degli mRNA di molti oncogeni e citochine portarono all'identificazione di motivi presenti in copie multiple in molte 3'UTR; questi motivi sono costituiti da tratti di 50-150 nucleotidi ricchi in AU. Le ARE contengono molto spesso la sequenza pentamerica AUUUA; studi successivi hanno dimostrato che il motivo AUUUA gioca un ruolo destabilizzante, sebbene la sola presenza del pentamero AUUUA in una sequenza ricca in AU non ne garantisce la funzione destabilizzante. Studi di mutagenesi sulle ARE hanno individuato nella sequenza UAUUUUAU, ripetuta tre volte, la sequenza determinante la destabilizzazione di un mRNA chimerico; tale funzione viene svolta mediante il legame di fattori destabilizzanti (Lagnado et al., 1994). Nel 1995, Zubiaga e collaboratori arrivarono alla conclusione che il nonamero UUAUUUAUU è il motivo

funzionale minimo per la destabilizzazione degli mRNA. Successivamente è stato dimostrato che questo nonamero potrebbe non rappresentare l'unico motivo chiave delle ARE o la minima sequenza *consensus* di tutte le ARE. Infatti molte ARE funzionali, identificate negli mRNA di c-jun e c-myc, non lo contengono. Un'ipotesi molto accreditata negli ultimi tempi prevede che, oltre alle sequenze ARE consenso, siano di fondamentale importanza le sequenze fiancheggianti ricche in AU o in CU, che determinerebbero una strutturazione a stem-loop riconosciuta dalle diverse ARE-BPs, come nel caso del trascritto per la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (Hajarnis et al., 2005) e del trascritto per il TNF- α (Fialcowitz et al., 2005).

Le ARE, che agiscono *in vivo* come determinanti della (in)stabilità, sono anche potenti stimolatori della rimozione del cap all'estremità 5' (Gao et al., 2001) e dei processi di deadenilazione (Xu et al., 1997). Questi dati suggeriscono che la rimozione del cap gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'emivita degli mRNA.

Classificazione ed evoluzione

Non è del tutto chiaro l'elemento caratterizzante critico che determina la funzione delle ARE, in quanto esse differiscono considerabilmente nella lunghezza in basi, nel contenuto in AU e nel numero di motivi AUUUA che contengono. Le ARE furono inizialmente divise in due gruppi: il primo gruppo era caratterizzato dalla presenza del pentamero AUUUA a differenza del secondo gruppo che non lo contiene. Successivamente il gruppo caratterizzato dalla presenza del pentamero AUUUA è stato diviso in due sottogruppi, il primo gruppo presenta i pentameri AUUUA intervallati da sequenze ricche in uracili, mentre il secondo sottogruppo presenta i pentameri AUUUA associati in *cluster* (Chen e Shyu, 1995). Recentemente sono state proposte nuove

classificazioni sulla base delle ripetizioni del pentamero AUUUA; ciò è stato possibile mediante la costruzione di *database* per le ARE. Sono stati costruiti due *databases*, uno che raccoglie le sequenze non tradotte degli mRNA eucariotici (UTRdb) e un altro che raccoglie i segnali regolatori delle UTR (UTRsite) (Pesole et al., 2002). L'analisi di questi *databases* ha supportato l'ipotesi che le sequenze ARE siano conservate durante l'evoluzione e che le ARE siano associate a trascritti differentemente espressi. Le ARE dei trascritti per le citochine e per gli oncogeni dei mammiferi sono molto conservate rispetto alle sequenze delle ORF degli stessi trascritti: per esempio tra la regione codificante dell'interleuchina 3 (IL-3) del topo e dell'uomo vi è il 45% di omologia, mentre le regioni ARE delle 3'UTR presentano il 93% di omologia. Un'analisi filogenetica delle ARE di bcl-2 mostra che i geni di uomo, topo e pollo e perfino dell'ortologo nel nematode *C. elegans* sono molto conservati (Schiavone et al., 2000). Recentemente è stato identificato un trascritto nel lievito, la cui stabilità è regolata dalle ARE nelle 3'UTR in un modo simile alle ARE dei trascritti per il TNF α e c-fos nei mammiferi; ciò suggerirebbe che il meccanismo di regolazione dell'emivita mediato dalle ARE è evolutivamente conservato a partire dal lievito all'uomo (Vasudevan e Peltz, 2001).

Regolazione dell'emivita degli mRNA mediata dalle ARE

I meccanismi di regolazione del *turnover* mediata dalle ARE sono eterogenei sia per quanto riguarda la velocità di degradazione che per le caratteristiche della degradazione stessa. Questa eterogeneità potrebbe dipendere presubimilmente dalle diverse RNA-BPs capaci di riconoscere le ARE e dalle diverse interazioni RNA-proteine e proteine-proteine che sono alla base della regolazione dell'emivita del trascritto (Figura 3). Diversamente

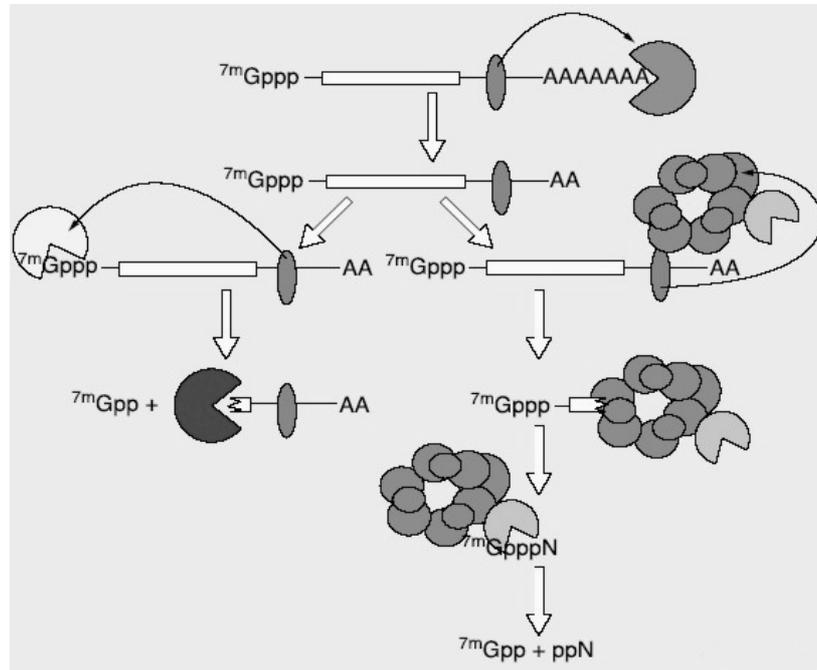


Figura 3: Schema di degradazione dipendente dalla deadenilazione correlato alla presenza di ARE. E' mostrato un trascritto alla cui 3'UTR è legata una RNA-BP (ovale viola) che determina la deadenilazione del trascritto ad opera di una nucleasi (pacman verde); l'interazione della RNA-BP con il complesso dell'esosoma (ovali blu) causa una degradazione del trascritto a partire dall'estremità 3', mentre il richiamo di un'enzima capace di rimuovere il cap al 5' (pacman giallo) determina la degradazione del trascritto in direzione 5' → 3'.

dai meccanismi di interazione tra DNA e proteine che dipendono essenzialmente dalla struttura primaria del DNA, nei sistemi biologici in cui sono coinvolti gli RNA si riconosce il ruolo fondamentale sia della struttura primaria che secondaria degli RNA, che viene riconosciuta dalle RNA-BPs. Di conseguenza le proteine che legano gli elementi *in cis* delle 3'UTR possono essere definite come sequenza-specifiche o struttura-specifiche. È stato suggerito che l'associazione-dissociazione alle ARE di specifici fattori, come nel caso della proteina Hsp70 (*Heat Shock Protein*), determinerebbe la formazione di strutture secondarie che porterebbero all'esposizione degli elementi *in cis* critici per il riconoscimento da parte delle RNA-BPs. Hsp70 è stata isolata in un complesso proteico contenente le *ARE-Binding Proteins* (ARE-BPs) (Gallouzi et al., 2000). È stato suggerito che l'associazione ARE-ARE-BPs potrebbe determinare un rimodellamento delle strutture dell'mRNA, con un conseguente richiamo di altre RNA-BPs, in particolare di proteine come le RNA elicasi o di proteine effettrici come le ribonucleasi, con conseguente rimodellamento o degradazione del trascritto stesso (Mukherjee et al., 2002).

Risulta evidente che il contesto cellulare in cui avviene il riconoscimento ARE-ARE-BPs è di fondamentale importanza, in quanto la presenza di fattori proteici può in qualche modo mediare questo riconoscimento. Sempre più chiaro è inoltre che il controllo dell'espressione genica a livello post-trascrizionale dipende dal tipo cellulare e da particolari stimoli extracellulari (Schiavone et al., 2000). Un esempio è rappresentato dal trasportatore di amminocidi cationici, Cat-1, che trasporta con elevata efficienza la lisina e l'arginina. Il trascritto per Cat-1 contiene ARE nella sua 3'UTR. L'assenza di amminoacidi determina un aumento della stabilità e della traduzione del trascritto per Cat-1 (Yaman et al., 2002). Simultaneamente aumenta la concentrazione citoplasmatica di

HuR, che si lega alla regione della 3'UTR di Cat-1. In questo caso, una risposta adattativa delle cellule ad uno stress nutrizionale probabilmente determina un aumento della stabilità degli mRNA nutrienti-sensibili mediato dal legame di HuR.

I FATTORI REGOLATORI *IN TRANS*

Quasi tutti gli elementi che regolano la traduzione e la stabilità svolgono il loro ruolo mediante il legame all'mRNA. Le RNA-BPs possono agire direttamente alterando questi processi o indirettamente richiamando altre proteine sull'mRNA. La competizione tra i fattori che proteggono e quelli che degradano un trascritto, e tra gli attivatori e gli inibitori della traduzione, determina la quantità totale di proteina prodotta da un mRNA. Sono state attualmente identificate, caratterizzate e clonate molte proteine capaci di legare le ARE. Il legame di questi fattori alle ARE può avere sia effetti negativi che positivi sui processi di degradazione, traduzione e localizzazione degli mRNA. Nonostante si è cercato di chiarire il meccanismo attraverso cui le ARE-BPs agiscano per regolare l'emivita di un trascritto, molto rimane ancora da chiarire. Una delle ipotesi prevede che le AUBPs interagiscano direttamente con le deadenilasi, modulandone l'attività. Un altro meccanismo prevede che il complesso ARE-proteine influenzi l'interazione tra coda di poli(A) e le PABPs, o tra il fattore eIF4e e il cap al 5', lasciando l'accesso libero alle poli(A) ribonucleasi. Un'altra ipotesi prevede il richiamo dell'esosoma da parte delle AUBPs, con conseguente degradazione dei trascritti (Chen et al., 2001). Tale ipotesi si concilia con difficoltà con l'effetto di protezione esercitato da alcune AUBPs che, legandosi alle ARE, inibiscono la degradazione del messaggero (Van Hoof e Parker, 2002).

Tra le differenti proteine che legano i motivi ARE, le proteine Elav (*Embryonic Lethal Abnormal Vision*) sono state caratterizzate per la loro capacità di regolare l'emivita e la traduzione di mRNA. Le proteine Elav sono una famiglia di proteine essenziali per lo sviluppo del sistema nervoso della *Drosophila*. Nei mammiferi e in *Xenopus*, la famiglia Hu consiste di tre membri che sono regolati durante lo sviluppo e sono tessuto-specifici, HuB, HuC, e HuD; la proteina HuR è tra le proteine Elav la più caratterizzata, e la sua espressione risulta essere indipendente dal tessuto e dalla linea cellulare. La proteina HuR lega con elevata affinità i motivi ARE, e sebbene la sua localizzazione cellulare sia essenzialmente nucleare, essa trasporta i trascritti dal nucleo al citoplasma, regolandone l'emivita e la traduzione (Brennan and Steitz, 2001).

La Tristetraprolina (TTP) appartiene a un gruppo di proteine CCCH *Tandem Zinc Finger* (TZF); il motivo CCCH *Zinc Finger* che la caratterizza è stato individuato in proteine di vari organismi che vanno dall'uomo al lievito. È stato dimostrato che la TTP regola l'emivita del trascritto per GM-CSF mediante il processo di deadenilazione (Carballo et al., 2000). Un meccanismo alternativo prevede invece che nella regolazione dell'emivita dell'mRNA di GM-CSF siano coinvolti meccanismi come l'ubiquitinazione e l'attività del proteosoma (Laroia et al., 2002).

Le *Heat Shock Proteins* (Hsps) sono un gruppo di proteine caratterizzate per il loro coinvolgimento nel fenomeno del *folding in vivo* in condizioni di *stress*; le Hsps sono inoltre implicate in altri meccanismi che riguardano il metabolismo dell'RNA nei procarioti e negli eucarioti. Durante uno stress termico la proteina Hsp70 lega i trascritti con le ARE, con una conseguente stabilizzazione dei trascritti; rimane ancora da chiarire attraverso quale meccanismo la Hsp70 svolga questa sua funzione (Laroia et al., 1999).

Una delle ipotesi prevede che la proteina possa competere direttamente con le AUBPs per il legame ai motivi ARE, influenzando in questo modo la capacità di questi fattori di indurre o inibire la degradazione dell'mRNA. È stato inoltre ipotizzato che sia possibile una competizione tra Hsp70 e i fattori regolatori della traduzione come TIAR e TIA-1, visto che alcuni trascritti in condizioni di stress non sono più tradotti (Kedersha et al., 2000).

Nell'ambito delle proteine che legano la ARE, hanno un ruolo di rilievo le proteine della famiglia AUF1, quattro proteine che differiscono per il peso molecolare, generate mediante un meccanismo di *splicing* alternativo (Wagner et al., 1998).

STRUTTURA DELLE PROTEINE CHE LEGANO RNA

Studi mirati all'interazione tra RNA e proteine hanno portato all'identificazione di alcuni motivi conservati nelle proteine che legano gli RNA, questi motivi sono caratterizzati da una sequenza amminoacidica e una struttura tridimensionale molto conservata da organismo ad organismo. Molte proteine di legame all'RNA hanno una struttura modulare in cui un motivo si può ripetere più di una volta all'interno della proteina o essere localizzato accanto a motivi ausiliari (Weighardt et al., 1996).

Il motivo di legame all'RNA ritrovato nella maggior parte delle proteine è il motivo RRM (*RNA Recognition Motif*), che è composto da circa 90-100 amminoacidi ed è presente in una o più copie in proteine di animali, piante, funghi e batteri che legano sia RNA messaggeri che RNA ribosomali e snRNA (Burd and Dreyfuss, 1994). Il motivo RRM è costituito da 90-100 amminoacidi ed è composto di due corte sequenze RNP1 (KGFVGVXF) e RNP2 (LFVGNL) separate da amminoacidi idrofobici. La struttura

tridimensionale del motivo è costituita da quattro foglietti β e due α -eliche orientate perpendicolarmente, in cui i residui degli amminoacidi delle sequenze consenso sporgono alternativamente all'esterno del motivo o nella cavità interna. I residui carichi si trovano così orientati verso l'ambiente circostante in una posizione ideale per interagire con l'RNA tramite legami a idrogeno, mentre i residui idrofobici sono posizionati nella parte interna del dominio e interagiscono con i residui idrofobici delle α -eliche mantenendo la struttura tridimensionale del dominio (Burd and Dreyfuss, 1994). Sembra che la struttura secondaria dell'RRM non si modifichi durante il legame all'RNA, e che lasci l'RNA accessibile al legame con altre proteine (Dreyfuss et al., 2002). Gli amminoacidi strettamente conservati nelle sequenze consenso RNP-1 e RNP-2, sebbene cruciali per il legame all'RNA, probabilmente non discriminano tra le diverse sequenze ribonucleotidiche. Tuttavia molte proteine di legame all'RNA contengono più di un motivo RRM e le regioni che separano questi RRM sono piuttosto conservate, suggerendo che proprio queste regioni potrebbero essere implicate nel riconoscimento specifico delle sequenze dell'RNA (Allain et al., 2000). In ogni caso, proteine che posseggono più di un RRM possono legare nello stesso momento più sequenze di RNA anche con affinità diverse, indicando che ogni dominio si mantiene comunque come un'unità indipendente (Shamoo et al., 1995). Le sequenze consenso RNP-1 ed RNP-2 sono state trovate anche in un altro motivo di legame all'RNA: il *Cold-Shock Domain* (CDS). Questo motivo è costituito da circa 70 amminoacidi che si dispongono a formare una struttura tridimensionale con cinque foglietti β da cui sporgono i residui basici delle sequenze consenso RNP-1 ed RNP-2 che interagiscono con l'RNA.

La presenza dello stesso motivo CDS all'estremità N-terminale di proteine diverse suggerisce l'ipotesi della presenza di un'unica sequenza proteica ancestrale, conservatasi durante il corso dell'evoluzione per le sue importanti funzioni cellulari e presente già prima della divergenza tra batteri ed eucarioti (Graumann and Marahiel, 1998).

Nonostante la similitudine delle sequenze consenso RNP-1 ed RNP-2 presenti nei motivi CDS ed RRM, studi di struttura tridimensionale hanno evidenziato che non si può parlare di evoluzione da un comune antenato. Infatti la struttura dei foglietti β del CDS è a croce greca, molto diversa da quella assunta dai foglietti β del motivo RRM: questo fa pensare che ci sia stata una pressione selettiva su due sequenze analoghe che ha creato un substrato con struttura e funzione molto simile, dove i residui basici sporgono e attraggono lo scheletro dei fosfati dell'RNA e i residui aromatici interagiscono con le basi azotate. In conclusione durante l'evoluzione si sarebbero formati in modo indipendente due domini che svolgono la stessa funzione (Park et al., 2000).

In alcune proteine di Cianobatteri e Piante il motivo CDS è spesso associato ad un motivo ricco in Glicina (Sommerville, 1999; Maruyama et al., 1999) che può essere formato da circa 15 residui, come nelle proteine di Cianobatteri, o arrivare a circa 80 residui come nelle proteine di Piante. La maggior parte delle proteine caratterizzate dal motivo Gly-Rich sono prodotte in risposta a stress di temperatura. Analisi filogenetiche hanno messo in evidenza che i motivi Gly-Rich di Eucarioti e Cianobatteri però non sono di origine comune ma la struttura molto simile e l'espressione dipendente da stress termici sono solo il risultato di un evento di evoluzione convergente.

Il motivo Gly-Rich è stato ritrovato anche in proteine di Ascidiacei, Mammiferi e Insetti non coinvolte nella risposta a stress termici. Il ruolo del motivo Gly-

Rich in queste proteine potrebbe quindi essere un altro: sia nel caso della hnRNP A1 di Uomo che in Sex-lethal di *Drosophila*, il motivo Gly-Rich sembra essere coinvolto nell'interazione con altre proteine e quindi nella formazione di dimeri o complessi multiproteici (Wang et al., 1997). Un altro motivo di legame all'RNA molto conservato è la RGG-box, costituita da ripetizioni degli amminoacidi Arg-Gly-Gly intervallate da amminoacidi aromatici. Non si conosce il numero minimo di ripetizioni RGG necessarie per svolgere tale funzione, anche se la maggior parte delle proteine che contengono una RGG-box hanno circa 4-6 ripetizioni RGG (Burd and Dreyfuss, 1994). Questo motivo è stato trovato spesso insieme ad altri motivi di legame all'RNA, come nel caso delle hnRNP, dove si trova sempre una RGG-box accanto ad alcuni RRM e al motivo Gly-Rich (Kiledjian and Dreyfuss, 1992). Per questo è stato ipotizzato che il suo ruolo sia quello di aumentare l'affinità delle proteine all'RNA, rendendo più stabile l'interazione. Un ruolo fondamentale nel legare l'RNA è svolto proprio dalle cariche positive dell'Arginina; tuttavia la presenza di amminoacidi aromatici interspersi tra le ripetizioni RGG può contribuire alle interazioni con le basi azotate dell'RNA e le Glicine potrebbero fornire flessibilità alla proteina per accogliere la molecola di RNA.

Le Arginine delle RGG-box sono state ritrovate in alcuni casi metilate: questa modificazione post-traduzionale potrebbe modulare l'attività di legame all'RNA dei motivi RGG, non alterando il potenziale carico delle Arginine ma modificando l'ingombro sterico nel sito di legame all'RNA. La metilazione delle Arginine potrebbe anche modificare le interazioni proteina-proteina. E' stata trovata una metiltrasferasi specifica per le RGG-box, che è conservata in organismi evolutivamente molto lontani tra loro (Liu and Dreyfuss, 1995).

Il motivo più diffuso, nelle proteine che legano l'RNA, dopo le RRM, è il K *Homology Motif* (KH), identificato inizialmente nella proteina umana hnRNP K. E' costituito da circa 60 amminoacidi in maggioranza idrofobici, con una sequenza consenso VIGXXGXXI conservata in molti organismi. Ogni proteina di legame all'RNA può possedere da una a quindici copie di questo motivo, ciascuno dei quali è necessario per il legame all'RNA e coopera con gli altri (Burd and Dreyfuss, 1994). La presenza di questo motivo in organismi evolutivamente distanti suggerisce che si tratta di una struttura molto antica con importanti funzioni cellulari. Nei Metazoi le proteine che contengono il motivo KH sono implicate nella regolazione della trascrizione, della stabilità degli mRNA, della traducibilità e della localizzazione (Ostareck et al., 1998).

Nelle proteine di legame all'RNA sono stati ritrovati anche altri tipi di motivi comuni, come il motivo "Double-Stranded RNA Binding Motif" (DSRM) trovato in alcune proteine coinvolte nell'editing (Hall, 2002), il motivo ricco in Arginina (ARM) o il motivo ricco in Glutamina (Q Motif): alcuni di questi motivi spesso appartengono esclusivamente ad una famiglia di proteine e conferiscono la stessa funzione alle proteine che fanno parte del gruppo. I membri che costituiscono la famiglia di proteine appartengono a organismi diversi e la presenza di un motivo comune potrebbe essere il risultato di un fenomeno di evoluzione divergente in cui i residui amminoacidici importanti per svolgere la funzione si mantengono identici in tutti gli organismi. Tuttavia anche nel caso di queste famiglie di proteine la presenza di domini che svolgono la stessa funzione, aventi strutture tridimensionali simili, può essere solo il risultato di un fenomeno di evoluzione convergente, così come nel caso dei motivi RRM e CDS, i più frequenti nelle proteine che legano RNA.

LE PROTEINE AUF1

Le proteine AUF1, anche definite hnRNP, consistono di quattro isoforme prodotte mediante *splicing* alternativo, p37, p40, p42 e p45. Le diverse isoforme sono determinate dalla presenza o dalla assenza di un tratto di 19 aminoacidi (codificato dall'esone 2) e di un tratto di 49 aminoacidi (codificato dall'esone 7). La p37 manca di entrambi gli inserti; la p40 contiene solo quello da 19 aminoacidi; la p42 è caratterizzata solo dall'inserto di 49 aminoacidi, mentre la p45 li contiene entrambi (Figura 4). Le 4 isoforme nell'uomo sono codificate da un unico gene localizzato sul cromosoma 4 e caratterizzato da 10 esoni e 9 introni.

Le diverse isoforme AUF1 mostrano diversi livelli di affinità di legame per le ARE, con la p37 a maggiore affinità e la p40 ad affinità più bassa. Queste osservazioni suggeriscono che l'espressione differenziale delle 4 isoforme permette alle cellule un controllo differenziale della regolazione dell'emivita dei trascritti (Wagner et al., 1998). Bisogna però tener conto che le 4 isoforme sono soggette a modifiche post-traduzionali che possono modificare l'affinità di legame e il legame stesso. Sono stati condotti esperimenti allo scopo di correlare la fosforilazione delle AUF1 con la regolazione dell'emivita dei trascritti ricchi in ARE; questi esperimenti hanno messo in evidenza che la fosforilazione reversibile della p40 nelle posizioni amminoacidiche Ser83 e Ser87 determina un aumento dell'affinità di legame con le ARE del trascritto per TNF- α (Wilson et al., 2003). Questa modifica post-traduzionale della p40 determinerebbe anche un

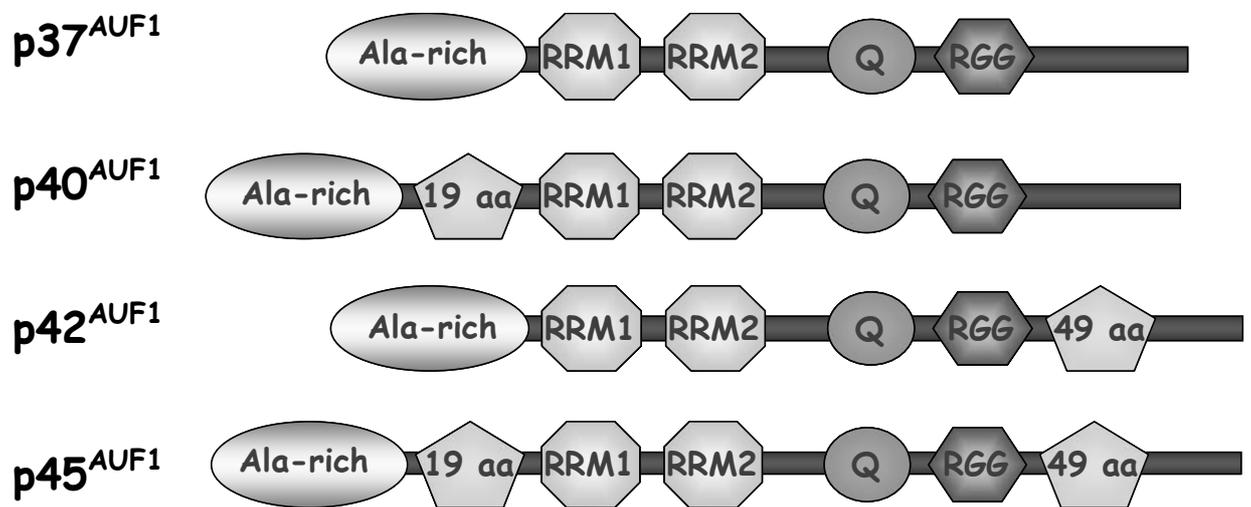


Figura 4: Rappresentazione schematica delle isoforme di AUF1.

cambiamento conformazionale del complesso proteina-RNA, che potrebbe determinare il richiamo di un complesso proteico diverso. In questo modo la fosforilazione della p40 potrebbe modulare la sua attività stabilizzante-destabilizzante. Studi recenti sulla regolazione del *turnover* del trascritto codificante SERCA2a hanno confermato l'importante ruolo della fosforilazione delle AUF1 (Blum et al., 2005).

Un modello più completo alla base della cinetica di degradazione dell'mRNA del TNF- α è stato recentemente proposto da Fialcowitz et al. (2005). Analisi termodinamiche e di mutagenesi hanno portato alla conclusione che le ARE, presenti nella 3'UTR del trascritto per il TNF- α , possono assumere una struttura a *stem-loop* che modula l'affinità di legame con le ARE-BPs. In particolare l'associazione con la p37^{AUF1} è fortemente inibita da questa struttura secondaria a differenza del legame con HuR che risente minimamente della struttura secondaria. Analisi filogenetiche hanno inoltre dimostrato che le sequenze fiancheggianti le ARE sono molto conservate e possono stabilizzare il *folding* della struttura *stem-loop in vivo* (Figura 5). Questi dati suggeriscono che le strutture secondarie possono influenzare la funzione delle ARE e quindi regolare il *turnover* degli mRNA modulando il legame con i differenti fattori *in trans*.

Inoltre un'altra differenza tra le 4 isoforme risiede nella localizzazione cellulare in quanto la p42 e la p45 sono essenzialmente nucleari, mentre la p37 e la p40 sono presenti sia nel nucleo che nel citoplasma; ciò indica una probabile funzione di *shuttle* tra nucleo e citoplasma delle due proteine, con conseguente trasferimento al citoplasma degli mRNA ad esse legate (Arao et al., 2000; Suzuki et al., 2005). Le quattro isoforme AUF1 sono soggette al meccanismo dell'ubiquitinazione in modo differenziale; l'iperespressione

dell'enzima UBPY, coinvolto nel meccanismo della degradazione proteolitica in modo ubiquitina-dipendente, riduce in modo forte e selettivo la presenza delle isoforme p37 e p40. Tale meccanismo sembrerebbe dipendere dall'assenza degli amminoacidi codificati dall'esone 7; infatti esperimenti di mutagenesi sull'isoforma p45 hanno dimostrato che la delezione di questo tratto determina una marcata degradazione della p45. Questo meccanismo di degradazione che coinvolge in modo diverso le quattro isoforme potrebbe essere un meccanismo di regolazione della degradazione degli ARE-mRNA, mediato dal processo dell'ubiquitinazione (Laroia et al., 2002).

Le AUF1 sono caratterizzate da due RNA *Recognition Motifs* (RRM), tipici delle proteine che legano mRNA. Esse formano complessi multimerici sulle ARE con proteine coinvolte nella regolazione della traduzione e dell'emivita di un mRNA (eIF4G, PABs, Hsp70). L'associazione delle AUF1 con l'mRNA è stata anche correlata con la formazione di una particolare struttura dell'RNA. Il complesso ARE-AUF1 potrebbe determinare il reclutamento di altri fattori *in trans*, e in questo caso la funzione delle AUF1 sarebbe quella di determinare un rimodellamento dell'mRNA, con l'esposizione dei fattori *in cis* critici per il legame con le altre RNA-BPs. Una delle proteine coinvolte in questo rimodellamento sembra essere Hsp70, che lega le AUF1 e ne determina l'ubiquitinazione e la successiva degradazione (Laroia et al., 1999).

Studi recenti hanno messo in evidenza che il bilancio tra le 4 isoforme delle AUF1 è di fondamentale importanza nella regolazione della stabilità dei trascritti ARE-dipendenti così come la relativa abbondanza di altri fattori proteici, quali HuR, TTP, BRF1 e BRF2. Il ruolo delle AUF1 nella regolazione dell'emivita dei trascritti va comunque ancora definito, infatti sono riportati sia effetti stabilizzanti che destabilizzanti delle AUF1, ciò

dipende dal contesto cellulare e da numerosi altri fattori. Tra tutti questi fattori risulta particolarmente importante il rapporto quantitativo tra le varie isoforme di AUF1; infatti esperimenti di RNAi effettuati con oligonucleotidi comuni a tutte le isoforme determinano una diminuzione delle 4 isoforme ma nessun effetto sul *turnover* del trascritto *reporter*; invece utilizzando oligonucleotidi comuni solo alla p40 e alla p45 si verifica un aumento della stabilità del trascritto *reporter*, mentre l'utilizzo di oligonucleotidi comuni solo alle isoforme p42 e p45 causano una leggera diminuzione della stabilità del trascritto *reporter* (Raineri et al., 2004).

Un altro importante parametro di cui tener conto è la competizione tra HuR e AUF1 (Figura 6); esse possono legarsi ai trascritti su siti adiacenti dello stesso trascritto o sullo stesso sito in maniera competitiva. Nel nucleo entrambe le proteine sono presenti in un complesso ribonucleoproteico e nel citoplasma si legano a trascritti diversi; infatti HuR colocalizza con l'apparato traduzionale e AUF1 con l'esosoma. L'orientamento di un trascritto verso l'apparato traduzionale o l'esosoma dipende dal trascritto stesso, dal tipo di complesso proteico che lo lega, dalle condizioni di stress e dal compartimento cellulare (Lal et al., 2004). Un valido esempio a questo proposito è il meccanismo di regolazione del trascritto per l'ATF3 (*Activating Transcription Factor 3*) nelle cellule HepG2 in seguito a condizioni di stress determinate da carenze in aminoacidi. L'emivita dell'mRNA per l'ATF3 aumenta considerevolmente in condizioni di stress e questo fenomeno è correlato con un'interazione più forte del trascritto con HuR e più debole con AUF1 (Pan et al., 2005).

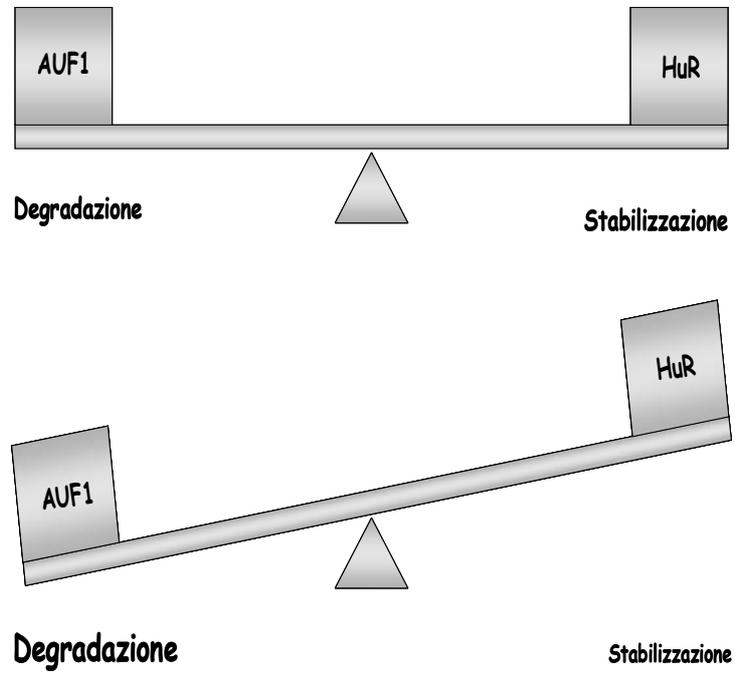


Figura 6: Rappresentazione schematica della competizione tra le proteine stabilizzanti (HuR) e destabilizzanti (AUF1) sui trascritti da esse legate.

Recentemente è stato proposto il coinvolgimento dell'esosoma nel meccanismo di degradazione degli ARE-mRNA (Figura 7) (Chen et al., 2001; Mukherjee et al., 2002). Sono stati proposti due modelli per spiegare come l'esosoma possa discriminare i trascritti ricchi in ARE. Un modello si basa sull'osservazione che la proteina dell'esosoma PM-Scf75 è una ARE-BP: questo suggerisce un meccanismo per il quale l'esosoma si leghi direttamente, senza intermediari, al suo substrato (Mukherjee et al., 2002). Il secondo modello si basa sull'osservazione che il riconoscimento delle ARE richiede AUBPs che possono interagire con l'esosoma e facilitare l'assemblaggio sul trascritto (Chen et al., 2001).

Enokizono e collaboratori (2005) hanno suggerito il coinvolgimento delle hnRNP anche nel meccanismo di protezione dei telomeri. Le estremità telomeriche a singolo filamento possono formare una struttura quadruplex che causa un effetto inibitorio sull'attività di allungamento delle telomerasi. Il legame delle hnRNP con i telomeri sembrerebbe destabilizzare il quadruplex e quindi lasciare libero l'accesso alle telomerasi. Questi risultati suggeriscono un possibile ruolo biologico delle hnRNP nell'omeostasi dei telomeri mediato dal legame ai telomeri, che determinerebbe un rimodellamento del DNA.

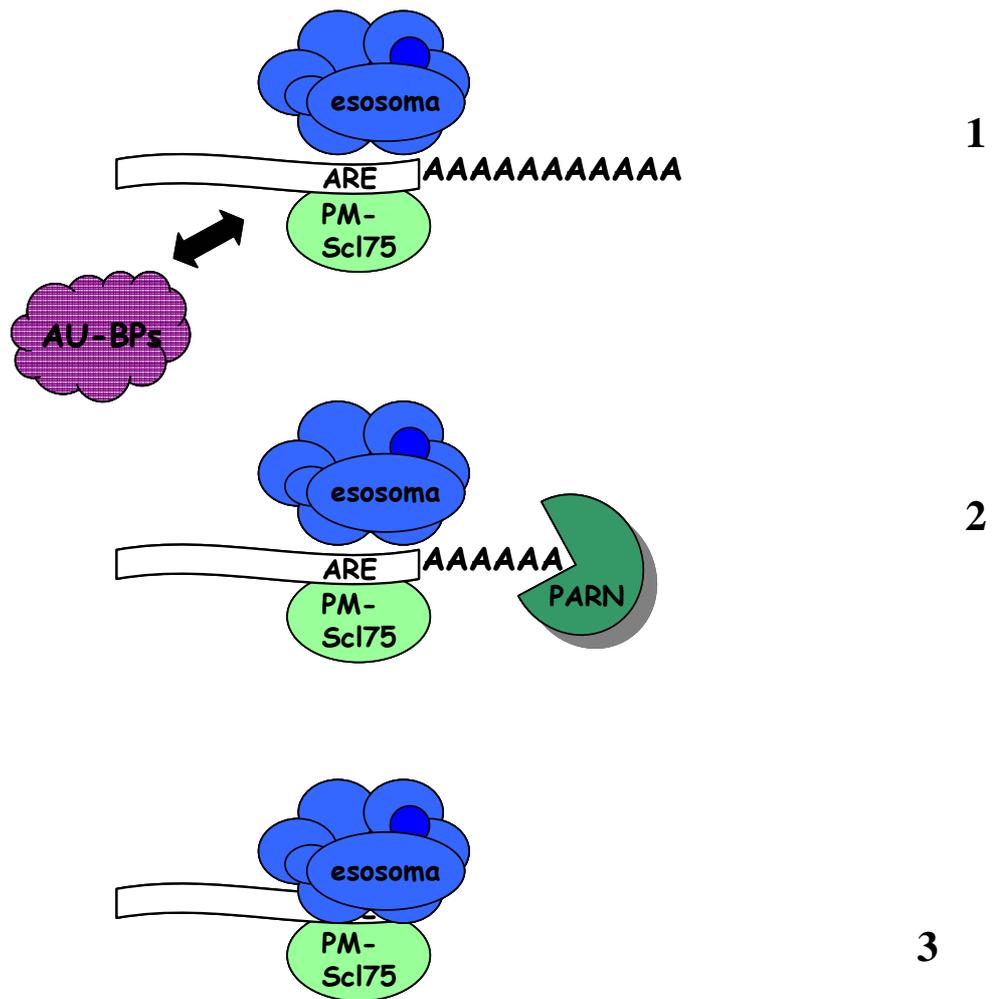


Figura 7: Schema della regolazione del *turnover* dei trascritti in mammiferi ad opera dell'esosoma. 1) Caricamento del complesso dell'esosoma sul trascritto promosso dalle ARE-BPs; 2) L'esosoma promuove la deadenilazione; 3) Dopo la deadenilazione, il trascritto è legato più efficientemente dall'esosoma e infine degradato.

Scopo della ricerca

I geni istonici si classificano in due categorie, “replication-dependent” e “replication-independent”. I geni “replication-dependent” sono privi di introni e sono espressi durante la fase S del ciclo cellulare, a differenza dei geni “replication-independent” che presentano molto spesso gli introni e possono essere trascritti durante tutto il ciclo cellulare. Differenze sono rilevabili anche a livello dei trascritti: gli mRNA trascritti dai geni “replication-dependent” sono di piccola dimensione e con una breve 3’UTR che è caratterizzata da una sequenza palindromica a *stem-loop* molto conservata (Shumperli, 1986). I trascritti dei geni “replication-independent” sono lunghi, con lunghe 3’UTR e coda di poli(A).

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

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

Anche il confronto *in vivo* dell’emivita dell’ mRNA per l’istone H3.3 con quello dell’ mRNA per l’istone H3 *late*, che presenta una 3’UTR più corta ed è priva di motivi

ARE, ha suggerito il coinvolgimento della 3'UTR nella instabilità dei trascritti per l'istone H3.3.

In estratti da embrioni di *P. lividus* a vari stadi di sviluppo sono presenti proteine capaci di legare tale 3'UTR. La figura 8 mostra due proteine di 21 kDa e 45 kDa, rispettivamente, presenti già in embrioni allo stadio di 4 blastomeri; è inoltre presente una proteina di circa 32 kDa, sintetizzata in piccole quantità già allo stadio di blastula e in maggiori quantità allo stadio di gastrula.

Si potrebbe quindi ipotizzare un coinvolgimento di tali proteine nella regolazione dell'emivita del trascritto che presenta motivi ARE nella sua 3'UTR.

Per identificare le proteine capaci di legare la 3'UTR dell'istone H3.3, che potessero essere coinvolte nella regolazione dell'emivita del trascritto, è stata eseguita un'analisi di una *library* di espressione contenenti cDNA di embrioni di *P. lividus*, attraverso la metodica di Sagesser (Sagesser et al., 1997). La sonda utilizzata è rappresentata dalla 3'UTR dell'mRNA per l'istone H3.3. Questa metodica ha portato all'isolamento del clone *PLAUF1*, il cui inserto di 1253 bp codifica per una proteina che sembra legare la 3'UTR del trascritto per H3.3. Mediante analisi di sequenza è stato caratterizzato tale inserto, che contiene una breve 5'UTR, una regione codificante per una proteina di 361 amminoacidi e una corta 3'UTR che termina con una breve coda di poli(A) (Figura 9). La sequenza ha messo in evidenza la presenza di due possibili codoni di inizio, in posizione 38 e 107, di cui solo il primo è associato con una perfetta sequenza Kozak.

Dall'allineamento effettuato con le sequenze presenti in banca dati attraverso il programma Blast, la sequenza ha mostrato una elevata similarità della proteina di interesse

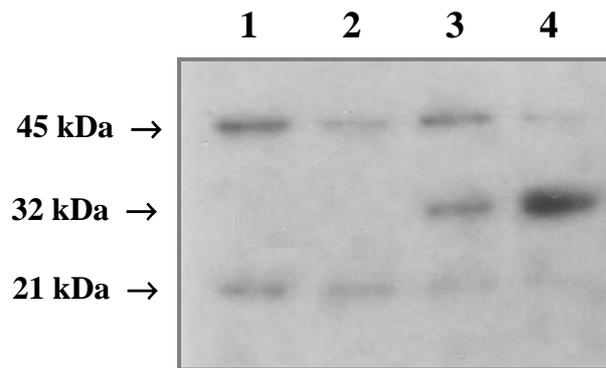


Figura 8: Autoradiografia di un esperimento di *Northwestern* su proteine presenti in estratti totali di embrioni di riccio di mare *P. lividus* a vari stadi di sviluppo. L'RNA marcato, utilizzato negli esperimenti di legame, è rappresentato dal trascritto corrispondente alla 3'UTR dell'mRNA per l'istone H3.3. Estratti proteici totali da embrioni allo stadio di: 4 blastomeri (corsia 1), morula (corsia 2), blastula (corsia 3), gastrula (corsia 4).

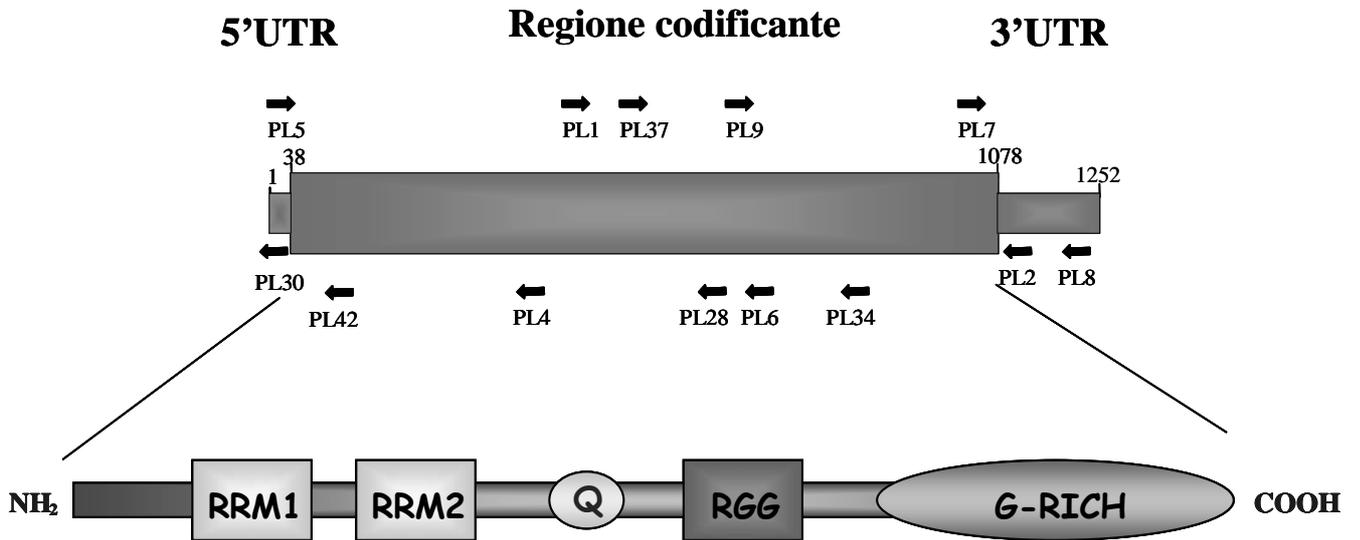


Figura 9: Rappresentazione schematica del cDNA e della proteina PLAUF da esso codificata. Sono riportate le posizioni degli oligonucleotidi utilizzati negli esperimenti di 3' *Race*, RT-PCR e di PCR.

di *P. lividus* con le proteine della famiglia AUF1 di uomo e di ratto; quindi la proteina è stata chiamata PLAUF.

Per verificare la capacità di PLAUF di legare la 3'UTR di H3.3, si è saggiato in esperimenti di REMSA (*RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay*), il lisato totale proteico del fago che contiene l'inserto *PLAUF1*, dopo induzione; come sonda è stata utilizzato un frammento di circa 200 nucleotidi (PCR1) della 3'UTR del trascritto per H3.3. Come è evidente dalla figura 10, quando il lisato totale proteico interagisce con la sonda risulta evidente una banda a mobilità ritardata (corsia 2). L'aggiunta del competitore specifico in eccesso molare 100x impedisce il legame della proteina alla sonda (corsia 5), a differenza dell'aggiunta di un competitore aspecifico (corsia 8); tali risultati suggeriscono che il legame è specifico.

È stata inoltre condotta un'analisi dell'espressione del gene per PLAUF su RNA totali da riccio di mare a vari stadi di sviluppo mediante saggi di *Northern blotting*; l'immagine autoradiografica mostra che sono presenti tre trascritti per PLAUF di circa 1.4, 1.8 e 2.6 kb rispettivamente (Figura 11A). I tre trascritti sono già presenti nelle uova non fecondate (corsia 1), diminuiscono di intensità allo stadio di 4 blastomeri (corsia 2), e aumentano gradualmente negli stadi di sviluppo successivi, fino a raggiungere un *plateau* allo stadio di blastula (corsia 5).

Per analizzare i tre diversi trascritti si è cercato di identificare il sito di inizio della trascrizione. È stato condotto quindi un esperimento di *Primer extension* su RNA totali allo stadio di morula e si è così identificato un unico sito maggioritario per l'inizio della trascrizione che corrisponde al primo nucleotide del cDNA identificato (Figura 12).

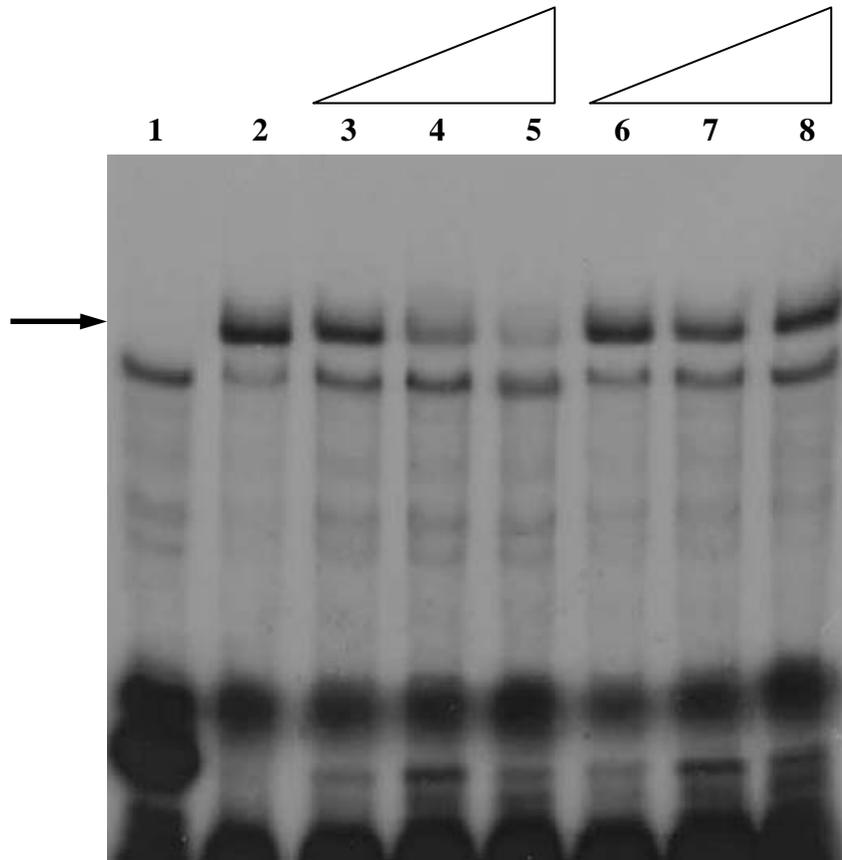


Figura 10: Autoradiografia di un saggio REMSA utilizzando il lisato proteico di fagi indotti e come sonda la 3'UTR del trascritto istonico H3.3. Corsia 1: trascritto incubato in assenza di proteine; corsia 2: trascritto in presenza di 20 μg di lisato proteico; corsie 3-5: competizione con il trascritto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

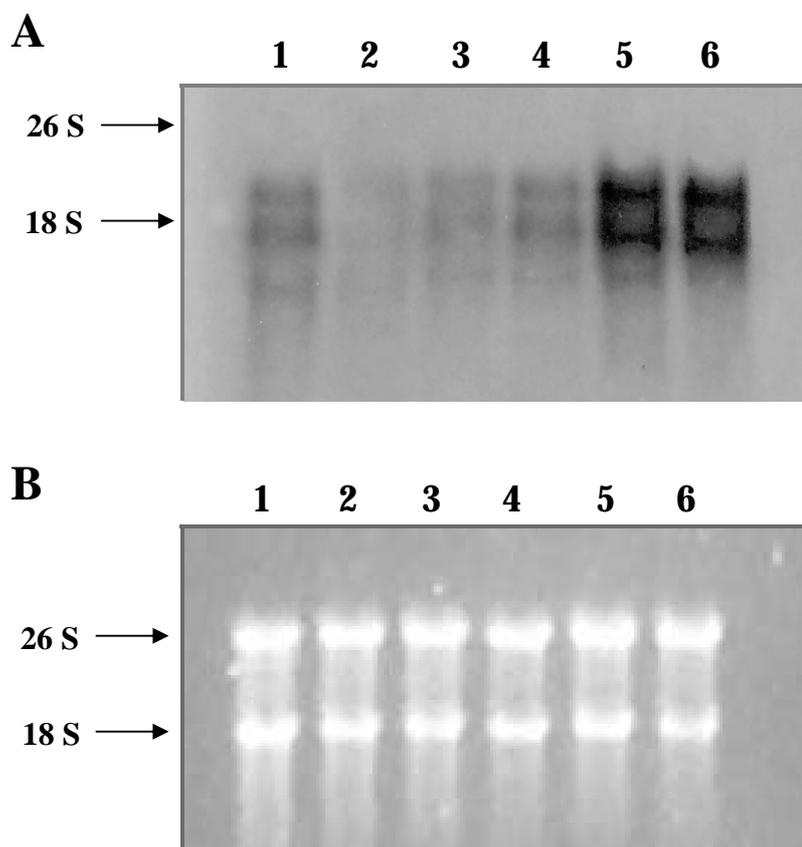


Figura 11: A) Autoradiografia di un esperimento di *Northern blotting* su RNA totali estratti da embrioni di riccio di mare *P. lividus* a vari stadi di sviluppo; la sonda utilizzata è il cDNA per la proteina PLAUF;

Corsie 1-6: uova; 4 blastomeri; 128 blastomeri; morula; blastula; prisma.

B) lo stesso gel del pannello A, dopo colorazione con bromuro d'etidio.

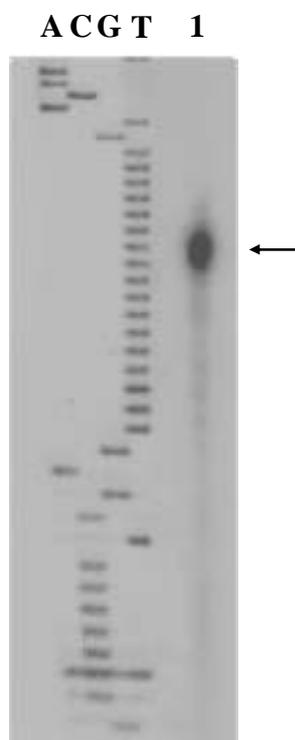


Figura 12: Saggio di *Primer extension* effettuato sugli RNA totali di embrioni di riccio di mare *P. lividus* allo stadio di morula (corsia 1). La reazione di sequenza (al centro) è stata eseguita sul DNA plasmidico contenente il cDNA per *PLAUF1*, utilizzando come oligonucleotide T7.

Attraverso esperimenti di RT-PCR su RNA totali allo stadio di morula si è invece dimostrata l'esistenza di fenomeni di *splicing* alternativo. Infatti utilizzando gli oligonucleotidi PL5-PL8 e PL1-PL8, oltre al frammento di peso molecolare atteso, si è ottenuto un frammento di peso molecolare inferiore (Figura 13, corsie 1-6). La piccola differenza in lunghezza dei frammenti non spiega certamente l'esistenza dei tre diversi trascritti.

Nel corso del dottorato di ricerca mi sono occupata dell'identificazione e caratterizzazione dei trascritti multipli e del gene che codifica PLAUF. A tale scopo sono stati condotti esperimenti di 3'*Race* e analisi di una diversa *library* di espressione, per identificare i trascritti di peso molecolare superiore a quello già identificato. Sono stati inoltre clonati e sequenziati i cDNA sintetizzati sui trascritti ottenuti per *splicing* alternativo.

È stato identificato il gene per PLAUF mediante analisi di una *library* genomica e ne è stata determinata la struttura genica, che è stata infine paragonata alla struttura del gene per le AUF1.

Sono stati inoltre condotti studi funzionali per verificare se le proprietà biologiche della proteina PLAUF fossero conservate come la sequenza proteica e la struttura genica. È stata quindi verificata la capacità di legare la 3'UTR del trascritto per la variante istonica H3.3 e la capacità di influenzarne l'emivita. Inoltre mediante esperimenti di ibridazioni *in situ*, sono stati localizzati i trascritti per H3.3 e per PLAUF in embrioni di riccio di mare a vari stadi di sviluppo.

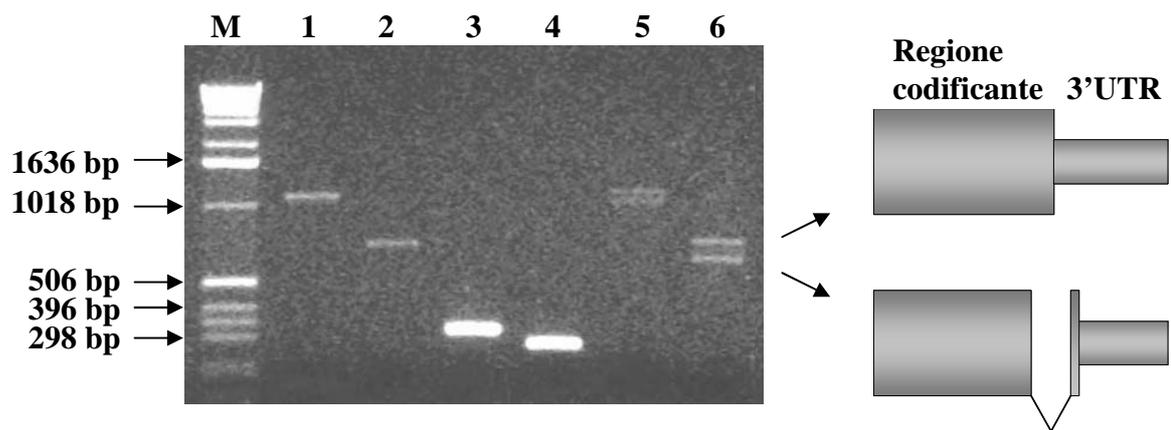


Figura 13: Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% di prodotti di RT-PCR ottenuti su RNA totali estratti da embrioni di riccio di mare *P. lividus* allo stadio di morula, utilizzando diverse coppie di oligonucleotidi (colorazione con bromuro di etidio). Corsie: M) marker; 1) PL5-PL2; 2): PL5-PL6; 3): PL5-PL4; 4): PL1-PL6; 5): PL5-PL8; 6): PL1-PL8; 7): PL1-PL2.

Procedure sperimentali

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

3'Race

Allo scopo di amplificare la lunga 3'UTR del cDNA per PLAUF, sono stati utilizzati 2 µg di RNA totali da embrioni di riccio di mare allo stadio di morula nella reazione di retrotrascrizione utilizzando come oligonucleotide antisenso UAP (5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') (Invitrogen) e la retrotrascrittasi AMV (10 U) (Promega). La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando come oligonucleotide antisenso AUAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') e PL9 (5'-GGTATGATGGGCGGAAGAGG-3') o PL7 (5'-CAATCAGGGACTGCAAAGCC-3') come oligonucleotidi senso e come stampo 5 µl della reazione di retrotrascrizione. La reazione di PCR è stata eseguita come riportato nel paragrafo 'Amplificazione mediante reazione di PCR'. Due dei prodotti di 3'Race sono stati clonati nel vettore pBlueScript SK(-), già digerito con l'enzima HindII (Takara) e sequenziati automaticamente.

Analisi di una library di cDNA mediante plaque-hybridization

Preparazione di cellule

La *library* di cDNA è stata gentilmente fornita dalla Dott.ssa Branno della Stazione zoologica "Anton Dohrn" di Napoli.

1 ml di batteri XL1-Blue-MRF' vengono fatti crescere a 37°C per 4 ore in una soluzione contenente: LB 50 ml, Maltosio 0,2%, MgSO₄ 1 mM.

Al termine delle 4 ore le cellule vengono centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm a temperatura ambiente, in centrifuga ALC 4226 con rotore ALC 5531. Il pellet ottenuto viene risospeso in un volume di MgSO_4 10 mM in modo che la soluzione abbia una lettura allo spettrofotometro di 1 OD a λ_{600} . Le cellule vengono conservate a 4°C.

Infezione con i fagi

L'infezione viene eseguita utilizzando 3×10^5 fagi per 4×10^6 cellule MRF'. I fagi e le cellule vengono incubati per 10 minuti a temperatura ambiente; vengono successivamente aggiunti 3 ml del mezzo di coltura LB top-agar (Tryptone 10 gr, NaCl 10 gr, Estratto di lievito 5 gr, Agar 7 gr in 1 litro) e si versa la sospensione in piastre contenenti il mezzo di coltura LB agar (Tryptone 10 gr, NaCl 10 gr, Estratto di lievito 5 gr, Agar 14 gr in 1 litro) che vengono lasciate per tutta la notte a 37°C.

Trasferimento delle placche fagiche sui filtri e preibridazione

Il giorno successivo prima di passare al trasferimento, le piastre vengono poste per 2 ore a 4°C affinché il top agar diventi sufficientemente compatto e resistente. Il trasferimento del DNA fagico presente nelle aree di lisi è stato eseguito appoggiando filtri di nitrocellulosa (Schleicher e Schuell BA85), opportunamente numerati ed in duplicato, sulla superficie delle piastre e marcandoli asimmetricamente con l'ago di una siringa. Il primo filtro è stato tenuto a contatto con la piastra per 2 minuti, il secondo per 4 minuti. Trascorso questo tempo, sono stati posti per 5 minuti su carta Whatman 3MM imbevuta di una soluzione denaturante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) e successivamente per altri 5 minuti su di un foglio di carta Whatman 3MM imbevuto di una soluzione neutralizzante (Tris-HCl pH 8 0.5 M, NaCl 1.5 M). Infine sono stati posti per 5 minuti su un foglio

imbevuto di una soluzione SSPE 2x e lasciati asciugare su carta Whatman 3MM. Una volta asciutti, i filtri sono stati posti in stufa sotto vuoto a 80°C per 2 ore per fissare il DNA denaturato. Dopo tale trattamento, i filtri sono stati posti in buste e sono stati aggiunti 3 ml per filtro di una soluzione di preibridazione (soluzione Denhardt's 5x, SSPE 5x, SDS 0.5%, EDTA 5 mM, DNA denaturato di sperma di salmone (SS) 100 µg/ml). La preibridazione è stata condotta per 2 ore a 65°C.

Marcatura delle sonde mediante la reazione di "random primer"

La sonda viene marcata radioattivamente utilizzando il kit "Multiprimer DNA labelling system" (Amersham). Circa 30 ng della sonda sono denaturati tramite riscaldamento a 100°C per 10 minuti e poi raffreddati immediatamente in ghiaccio. Vengono aggiunti al DNA, in un volume finale di 50 µl: 4 µl di dATP, 4 µl di dGTP, 4 µl di dTTP, 5 µl di *primer*, 5 µl di tampone di reazione, 50 µCi di [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) e 2 µl del frammento Klenow della DNA polimerasi (1 U/µl).

La miscela di reazione così composta è incubata per la notte a temperatura ambiente. Successivamente, si separa il DNA marcato dai nucleotidi liberi per cromatografia su una colonnina di Sephadex G-50 medium (Pharmacia) impaccata in una siringa da 1 ml. L'eluizione viene eseguita con una soluzione TE, NaCl 100 mM per centrifugazione a 2800 rpm per 2 minuti in centrifuga ALC 4226, con rotore ALC 5531.

Ibridazione

Al termine della preibridazione alla miscela è stata aggiunta la sonda, marcata radioattivamente mediante la reazione di "random priming"; la sonda è stata ottenuta per

PCR amplificando, con oligonucleotidi specifici, un tratto della regione codificante del cDNA della proteina PLAUF di *P. lividus*.

Dopo una notte di incubazione i filtri sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi per allontanare la sonda radioattiva non legata. Il primo lavaggio di 20 minuti a 65°C in SSPE 2x e SDS 0.1% è stato seguito da uno o due lavaggi di 20 minuti, sempre a 65°C, in SSPE 0.2x e SDS 0.1%.

I filtri sono stati lasciati asciugare ed esposti ad una lastra autoradiografica Fuji RX in una cassetta provvista di schermi intensificatori a -80°C per una notte. Sulla base dei dati autoradiografici, le placche di lisi risultate positive, sono state prelevate (*plug*) e messe a eluire per tutta la notte a temperatura ambiente in 500 µl di SM “phage buffer” (NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5 e gelatina 0.01%) a cui sono stati aggiunti 50 µl di cloroformio.

Identificazione su piastra di singole placche fagiche

Il *plug* prelevato contiene una popolazione eterogenea di cloni fagici ricombinanti. E' necessario quindi diluire la “miscela” di fagi fino ad ottenere placche singole che, trasferite su filtro ed ibridate con la stessa sonda della I analisi, permetteranno di individuare la progenie del fago positivo.

A tale scopo è stato calcolato il titolo dei *plugs* ottenuti dopo la prima analisi e sono state preparate piastre con 100-200 placche di lisi singole. Il DNA fagico è stato trasferito su filtri di nitrocellulosa come per la prima analisi ed è stata ripetuta l'ibridazione con la stessa sonda. Dopo autoradiografia le placche singole sono state prelevate e conservate come già descritto.

Preparazione dei lisati fagici

Al fine di amplificare i singoli fagi prelevati dalla seconda selezione sono stati preparati dei lisati a confluenza infettando batteri XL1-Blue-MRF' (1 O.D. $\lambda=600$ nm) con 50-100 μ l di miscela fagica proveniente da ciascuno dei *plugs* positivi.

Dopo preadsorbimento, piastratura su piastre LB Agar ed incubazione a 37°C per la notte, le piastre dove si era verificata lisi a confluenza sono state ricoperte con 5 ml di SM e lasciate ad agitare a temperatura ambiente per 5-6 ore per eluire i fagi ricombinanti dall'agarosio.

La sospensione contenente i fagi ricombinanti è stata raccolta da ciascuna piastra; ad essa è stata aggiunta un'aliquota di cloroformio al fine di distruggere le cellule batteriche presenti. Dopo centrifugazione di 15 minuti a 3500 rpm in centrifuga Beckman per rimuovere i detriti batterici, il lisato è stato trasferito in tubi sterili e conservato in cloroformio a 4°C.

Escissione *in vitro*

Il vettore Lambda Zap II, per sua costituzione, offre la possibilità di escindere *in vivo* e circolarizzare qualsiasi frammento contenuto tra le braccia del fago Lambda, producendo un plasmide ricombinante composto dal vettore pBK-CMV e dall'inserito di DNA di interesse.

L'escissione è stata eseguita in accordo con il protocollo fornito dalla ditta Stratagene.

Il lisato fagico, preparato come descritto nel paragrafo precedente, è stato usato per infettare cellule XL-1 Blue MRF' che sono state coinfectate con un fago *helper*

filamentoso. All'interno delle cellule ospiti, le proteine prodotte dal fago *helper* agiscono *in trans* riconoscendo due domini separati, Inziatore e Terminatore, posizionati tra le braccia del vettore Lambda Zap II. Entrambi questi segnali sono riconosciuti dalla proteina del gene II del fago *helper* che comincia la sintesi di un nuovo filamento di DNA copiando la regione compresa tra i due domini I e T.

Il plasmide pBK-CMV viene recuperato infettando con questi fagi cellule XLORL, piastrando su terreno contenente ampicillina e recuperando da queste le colonie batteriche resistenti.

Di seguito sono riportate le tappe ed i componenti utilizzati per l'escissione *in vivo*. I fagi positivi all'analisi della *library* di cDNA sono stati utilizzati per infettare le cellule XL-Blue MRF' nella miscela composta da:

200 µl di cellule XL1-Blue MRF' (O.D. λ_{600} =1, come in precedenza)

250 µl di fagi

1 µl di fago *helper* ExAssist

Il tutto è stato incubato a 37°C per 15 minuti.

Dopo aver aggiunto 3 ml di LB le cellule sono state incubate per 3 h a 37 °C con una leggera agitazione, quindi portate a 70°C per 20 minuti e centrifugate a 1000 g per 15 minuti.

Il supernatante, rappresentato da particelle fagiche contenenti il fagemide pBK-CMV come genoma, è stato conservato a 4°C.

Per piastrare i fagemidi sono stati aggiunti 200 µl di cellule XLORL (O.D. λ_{600} =1) a 100 µl di fagi ed incubati a 37°C per 15 minuti per permettere l'assorbimento.

Le cellule sono state quindi piastrate su piastre contenenti LB e ampicillina (50 µg/ml) e tenute per la notte a 37°C.

Le colonie che appaiono sulle piastre contengono il plasmide pBK-CMV con l'inserto di cDNA clonato. Il fago *helper* non può crescere perché non può replicarsi nelle cellule XLORL utilizzate.

Le colonie singole prelevate con un'ansa sterile sono state messe a crescere in 5 ml di LB addizionato con 5 µl di ampicillina (50 µg/ml) per la notte a 37°C, per poter preparare una minipreparazione di DNA plasmidico.

Analisi di una *library* genomica

È stata eseguita l'analisi di una *library* genomica nel vettore λ-DASHII (Stratagene) per *plaque-hybridization*; la *library* è stata gentilmente fornita dalla Dott.ssa Branno della Stazione zoologica "Anton Dohrn" di Napoli. Per l'analisi della *library* è stata usata come sonda un frammento di 739 bp del cDNA di PLAUF marcato con ³²P attraverso la tecnica del *random primer*. Tale frammento è stato prodotto mediante PCR utilizzando come stampo il cDNA di PLAUF e come oligonucleotide senso PL5 (5'-CCTTGACGAACATCCCGGAGGAA-3') e come oligonucleotide antisenso PL6 (5'-CCTCTTCCGCCCATCATACC-3'). In questo modo sono stati identificati alcuni cloni positivi, alcuni dei quali (fagi 4a, 4b e 5a) sono stati analizzati mediante esperimenti di *Southern blotting*. I tre fagi contengono lo stesso inserto per cui gli esperimenti successivi sono stati condotti solo sul DNA del fago 4a.

Subclonaggio

200 ng di DNA del fago 4a sono stati digeriti con l'enzima di restrizione EcoRI, dializzati e utilizzati in una reazione di ligasi con il vettore pBlueScript SK(-) precedentemente digerito con l'enzima EcoRI e defosforilato. Il prodotto di ligasi è stato utilizzato per elettroporare cellule TG1; aliquote di questa sospensione sono state piastrate su LB-Agar contenente 50 µg/ml e le piastre incubate a 37°C per circa 14 ore. Le colonie sono state analizzate mediante la tecnica della *colony hybridization*.

Colony hybridization

Sulle piastre sono stati appoggiati filtri di nylon, che sono stati posti a 100°C per 3 minuti per denaturare e fissare il DNA. La preibridazione e l'ibridazione sono state eseguite come per il *Southern blotting*. Sono stati identificati alcuni cloni positivi e i cloni PLAUF4 e PLAUF10, contenenti frammenti di 5000 bp e 7000 bp, sono stati caratterizzati e sequenziati. L'insero del fago 4a manca della regione che corrisponde all'esone 1.

Completamento della caratterizzazione del gene *PLAUF*

La regione di DNA del fago 4a che intercorre tra i frammenti di 5000 bp e 7000 bp, è stata ottenuta mediante PCR, utilizzando direttamente come stampo il DNA del fago 4a e due coppie di oligonucleotidi: l'oligonucleotide senso PL37 (5'-GCACAGAAGGCTCAGAATAGTAG-3') con l'oligonucleotide antisenso PL28 (5'-GTTGCTGTCTCTCTTCCCTCG-3') e l'oligonucleotide senso PL9 (5'-GGTATGATGGGCGGAAGAGG-3') con l'oligonucleotide antisenso PL34 (5'-CCATATCCACCCCTATAACCCG-3'). I due frammenti di circa 800 bp e 1200 bp ottenuti

per PCR sono stati clonati nel vettore pBlueScript SK(-) digerito con HindII e defosforilato, ottenendo il clone PLAUF37-28 e il clone PL9-34.

La regione mancante all'estremità 5' è stata ottenuta mediante PCR, utilizzando direttamente come stampo il DNA genomico e l'oligonucleotide senso PL5 (5'-CCTTGACGAACATCCCGGAGGAA-3') con l'oligonucleotide antisenso PL42 (5'-CTTCTTGTCATCTTCTTGCTC-3'); il frammento di circa 200 bp ottenuto è stato clonato nel vettore pBlueScript SK(-) e sequenziato.

Gli inserti sono stati completamente sequenziati eccetto la regione corrispondente agli introni 1, 4, 5, 6 e 8.

Southern blotting

Circa 2 µg di DNA fagico sono digeriti a 37°C per 4 ore con 30 U di EcoRI in una soluzione a concentrazione salina appropriata fornita dallo specifico tampone di reazione.

I prodotti di digestione sono separati per elettroforesi su gel di agarosio all'1%, applicando una differenza di potenziale costante pari a 100 V. Dopo essere stato fotografato, il gel è sottoposto ai trattamenti di depurinazione, denaturazione e neutralizzazione (Sambrook et al., 1989).

Il DNA è trasferito su filtro di nylon (Hybond-N, Amersham) e il filtro di nylon è preibridato per circa 12 ore a 60°C, ibridato per circa 18 ore a 60°C e infine lavato.

A questo punto, il filtro è avvolto in saran wrap e viene eseguita l'autoradiografia tramite esposizione con lastre Fuji RX a -80°C per tempi diversi di esposizione.

Sintesi di cDNA mediante trascrizione inversa

I cDNA vengono sintetizzati a partire da 1 µg di RNA totali precedentemente trattati con 1 U di DNasi RQ1 priva di RNasi (Promega) a 37°C per 15 minuti in presenza del tampone di reazione fornito dalla casa produttrice. Gli RNA sono denaturati per 10 minuti a 70°C e poi bloccati in ghiaccio. Ad essi sono aggiunti, in un volume finale di 25 µl, 25 pmol dell'oligonucleotide di innesco, i quattro deossinucleotidi trifosfati ciascuno in concentrazione finale pari a 1 mM e l'apposito tampone di reazione. La reazione è catalizzata da 10 U di trascrittasi inversa AMV-RT (Promega) a 42°C per 1 ora, infine l'enzima viene inattivato a 70°C per 5 minuti. Aliquote di 2 o 5 µl della miscela di reazione saranno poi utilizzate in successive reazioni di PCR.

Amplificazione mediante reazione di PCR

Le reazioni di amplificazione sono effettuate su aliquote di 2 o 5 µl della reazione di RT (per le amplificazioni su cDNA), su 1 µg di DNA genomico, oppure su 150 ng di DNA fagico a cui sono aggiunte 25 pmol di ciascuno dei due oligonucleotidi specifici, i quattro deossinucleosidi trifosfati (ciascuno 100 µM), 1,5 mM MgCl₂ e 1 U di Taq DNA Polimerasi, in presenza dello specifico *buffer* di reazione fornito dalla casa produttrice, ad una concentrazione finale pari a 1x. Il volume finale della miscela di reazione è 50 µl.

Il primo ciclo della reazione di amplificazione prevede la denaturazione del DNA a 94°C per 5 minuti, al termine dei quali viene aggiunto l'enzima alla miscela di reazione (*hot start*); ad esso seguono 35 cicli di PCR così costituiti:

Denaturazione 94°C 30 secondi

Appaiamento 55-57°C 30 secondi

Allungamento 72°C 30 secondi

Per l'amplificazione effettuata utilizzando come stampo il DNA genomico e il DNA fagico, i tempi della denaturazione e dell'allungamento sono stati portati a 1 minuto. In ciascun esperimento di PCR vengono preparati campioni di controllo negativo, in cui sono presenti tutti i componenti escluso il DNA, allo scopo di verificare che non vi sia contaminazione di DNA estraneo.

Il 10% della miscela di reazione di PCR è successivamente analizzato su gel di agarosio in presenza di opportuni marcatori di peso molecolare.

I prodotti di PCR che dovevano essere successivamente utilizzati per il clonaggio sono purificati mediante l'utilizzo del kit di purificazione da gel di agarosio (Qiagen). Il blocco di agarosio contenente il frammento di DNA è tagliato dal gel e riscaldato in tampone QG, contenente agenti caotropici, a 50°C per 10 minuti per sciogliere l'agarosio. La soluzione ottenuta viene applicata su colonnine fornite dalla casa produttrice e centrifugata per 1 minuto. Successivamente, sono effettuati dei lavaggi della colonna con un apposito tampone di lavaggio ed infine il DNA legato alla resina viene eluito con un buffer Tris-HCl 10 mM a pH 8,5. Una aliquota del campione è analizzata su gel di agarosio per valutare la resa della procedura e la purezza dell'eluato.

Estrazione di DNA plasmidico (miniprep, midiprep e maxiprep)

Le singole colonie batteriche contenenti il plasmide con l'inserito di interesse sono incubate in terreno LB in presenza di ampicillina 50 µg/ml a 37°C per una notte sotto

agitazione. I batteri sono quindi raccolti per centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente in centrifuga ALC 4226.

L'estrazione del DNA plasmidico è effettuata utilizzando l'apposito kit della Qiagen.

Clonaggio nel vettore di espressione pGEX-2T

Preparazione di cellule competenti

Una singola colonia di batteri *E. coli* ceppo BL21 è prelevata da una piastra di 1,2% Agar in LB ed inoculata in 10 ml di LB in tubo Falcon sterile da 50 ml. L'inoculo è incubato a 37°C sotto agitazione costante (200 rpm) per la notte. 1 ml di questa coltura batterica è trasferita in 100 ml di LB ed incubata a 37°C su agitatore fino a quando l'assorbanza a 550 nm risulta essere uguale a circa 0.5 O.D., valore corrispondente alla fase logaritmica di crescita. Questa è, quindi, bloccata raffreddando la sospensione in ghiaccio per circa 10 minuti; i batteri sono raccolti mediante centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C in centrifuga Beckman modello J2-21 con rotore JA-20, risospesi in 50 ml di CaCl₂ 0.1 M ed incubati in ghiaccio per 30 minuti. Al termine dell'incubazione la sospensione è centrifugata a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C ed il precipitato risospeso in 5 ml di una soluzione CaCl₂ 0.1 M. La sospensione, dopo una incubazione a 4°C per 14 ore, è suddivisa in aliquote di 200 μ l ciascuno. Alle aliquote si aggiunge glicerolo al 15% e si conserva a -80°C. Questi campioni si usano per le trasformazioni. Il controllo dell'efficienza di trasformazione è, in genere, effettuato subito utilizzando 20 ng e 30 ng del plasmide pBlueScript SK(-) superavvolto. Con questo protocollo l'efficienza di trasformazione risulta essere di 8×10^5 cellule trasformate/ μ g di pBluescript SK (-).

Preparazione di piastre

Le piastre sono preparate sterilmente sciogliendo 1.2% o 1.4% di Agar DIFCO in LB e, all'occorrenza, aggiungendo ampicillina ad una concentrazione di 50 mg/ml ed incubandole a 37°C per la notte prima di utilizzarle, allo scopo di visualizzare eventuali contaminanti.

Trasformazione

Un'aliquota di batteri competenti viene scongelata in ghiaccio, viene incubata con 20-100 ng di DNA per 45 minuti in ghiaccio, viene poi provocato lo *shock* termico per 5 minuti a 37°C, viene poi aggiunto 1 ml di LB e si incuba per 1 ora a 37°C; questa incubazione consente ai batteri trasformati di esprimere la resistenza all'ampicillina. Aliquote di 100 µl e 200 µl di questa sospensione vengono piastrate su Agar contenente ampicillina 50 µg/ml e le piastre incubate a 37°C per circa 14 ore.

Preparazione del vettore di clonaggio

5 µg di plasmide pGEX-2T sono stati idrolizzati con l'enzima di restrizione SmaI (Boehringer) a 37°C per 2 ore (3 U/µg di DNA), in presenza dell'opportuno tampone fornito dalla casa produttrice. L'esito dell'idrolisi viene controllato su gel di agarosio all'1% e il DNA viene fatto precipitare tutta la notte a -20°C per aggiunta di NaCl 0.3 M finale e di 2.5 v di etanolo 99% freddo.

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

Per evitare che il plasmide potesse richiudersi su se stesso, quest'ultimo è stato defosforilato aggiungendo 0.6 U di C.I.P. (Fosfatasi alcalina intestinale di vitello, Boeringher) in presenza dello specifico tampone di reazione in un volume complessivo di 20 µl. La reazione viene fatta procedere a 37°C per 45 minuti, dopo i quali vengono aggiunte altre 0.6 U di enzima e si prosegue l'incubazione per altri 45 minuti a 37°C.

A questo punto il plasmide viene purificato dalla fosfatasi tramite elettroforesi su gel di agarosio ed estrazione da gel.

Preparazione dell'inserto

L'inserto da clonare è stato preparato per amplificazione tramite PCR della regione codificante di PLAUF utilizzando come oligonucleotide senso PL11 (5'-GGATCACTCAGAAGAATCAAAGG-3') ed antisenso PL2 (5'-ACACGTCTTTAGCGAGTG-3') e come stampo il cDNA di PLAUF.

Il prodotto di PCR è stato estratto da gel d'agarosio e sottoposto a reazione di chinasi per la fosforilazione delle estremità 5' usando ATP come donatore. Alla reazione vengono aggiunti 1 µl di chinasi (1 U/µl), 1 µl di tampone di reazione 10x e 1 µl di ATP 100 mM per un volume finale di 10 µl.

La miscela di reazione è mantenuta a 37°C per 1 ora, dopodiché la chinasi è inattivata per riscaldamento a 95°C per 2 minuti e il DNA denaturato è lasciato rinaturare a temperatura ambiente per 30 minuti.

Reazione di ligasi

Il plasmide defosforilato e l'inserto fosforilato sono stati utilizzati in una reazione di ligasi rispettando un rapporto molecolare di circa 1:5. 100 ng di DNA del plasmide più l'inserto vengono incubati con 1 U della ligasi T4 (Boeringher) in presenza dello specifico

tampone di reazione. La reazione viene fatta procedere a 16°C per tutta la notte. Al termine la DNA ligasi è stata inattivata a 65°C per 15 minuti, la miscela è stata raffreddata in ghiaccio e microdializzata, utilizzando filtri Millipore 0.25 µm, contro H₂O sterile per 1 ora.

La miscela è stata utilizzata per la trasformazione di cellule batteriche mediante elettroporazione.

Espressione ed estrazione proteica

A crescita avvenuta è stata prelevata con un'ansa sterile una colonia dalla piastra ed è stata inoculata in 100 ml di terreno liquido LB a cui sono stati aggiunti 50 µg/ml di ampicillina. Il tutto è stato messo a crescere a 37°C tutta la notte sotto agitazione costante (280 rpm).

Il giorno dopo l'inoculo è stato diluito 1:10 ed è stato posto a 37°C sotto agitazione costante (280 rpm) fino al raggiungimento di 0.6-0.8 O.D. a $\lambda=600$ nm; quindi sono stati prelevati circa 50 ml da utilizzare come controllo non indotto.

L'espressione della proteina di fusione è stata indotta dall'aggiunta di IPTG ad una concentrazione finale di 0.1 mM. Dopo circa 15 ore di induzione, sia il campione non indotto che quello indotto sono stati centrifugati a 3000 rpm in centrifuga Beckman per 10 minuti per rimuovere il terreno di coltura. Il precipitato è stato risospeso in PBS 1x (10 ml/gr di cellule). I campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 20 minuti e il precipitato è stato risospeso nel tampone di lisi (10 ml/gr di cellule) (PBS 1x, EDTA 0.5 mM, DTT 5 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 2 µg/ml, Leupeptina 0.5 µg/ml, Pepstatina 0.7 µg/ml).

Successivamente i campioni sono stati sonicati 6 volte per 20 secondi con un sonicatore Labsonic della Braun (40 Watt). È stato prelevato il supernatante dopo centrifugazione a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C in centrifuga Microfuge Eppendorf. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il kit “Protein Assay” della BioRad.

Purificazione della proteina di fusione mediante colonna glutatione-sepharosio

La proteina PLAUF è stata ottenuta come proteina di fusione costituita da GST (glutatione-S-trasferasi) all’N-terminale seguita da una porzione della proteina di interesse (dall’aminoacido 25 all’aminoacido 361). La purificazione consiste nell’applicare la miscela proteica su una colonna Glutatione-Sepharosio 4B caratterizzata dalla presenza di glutatione legato alla resina impaccata.

1 ml di soluzione contenente la resina viene equilibrata con 10 volumi di PBS 1x facendo 3 cambi consecutivi. A questo punto si lascia sedimentare la resina, e dopo aver rimosso il supernatante, si aggiunge alla resina 20 ml di lisato (36 mg di proteine totali) contenente la proteina di fusione. Si lascia interagire il tutto per 1 ora a temperatura ambiente, dopo di che si impacca la colonna e contemporaneamente si raccoglie la frazione di proteine non legata. Il diametro della colonna utilizzata è 0.5 cm e una volta impaccata la colonna, la resina raggiunge un’altezza di 3 cm. Quindi si lava la colonna per due volte con 10 volumi di PBS 1x. A questo punto si procede all’eluizione della proteina di fusione con 5 ml di glutatione ridotto (15 mM) in Tris-HCl 50 mM pH 8, lo si lascia interagire per 10 minuti e successivamente si recuperano le frazioni eluite (10 ml). 20 µl di ciascuna frazione sono stati analizzati mediante SDS-PAGE.

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

È stato preparato un gel alla concentrazione del 10% di Acrilammide/Bisacrilammide, secondo la metodica di Laemmli delle dimensioni di 83 x 58 x 0,75 mm.

Il rapporto Acrilammide/Bisacrilammide è nel "Separating gel" di 12%:0.32% e nello "Stacking gel" di 5%:0.13%.

I campioni vengono bolliti per 5 minuti prima di essere caricati su gel. L'elettroforesi è condotta a 100 V costanti per circa 1 ora. Il gel è poi fissato per almeno 30 minuti, in tal modo le proteine precipitano e l'SDS viene allontanato. Il gel viene colorato con Blue Coomassie per circa 30 minuti e successivamente decolorato con vari cambi nella soluzione decolorante.

Western blotting

Le proteine separate in SDS-PAGE, come riportato nel paragrafo precedente, vengono trasferite su di un filtro di nitrocellulosa Hybond-C (Amersham) e analizzate per la loro capacità di essere riconosciute dal siero anti-PLAUF parzialmente purificato o per la loro capacità di interazione con RNA marcato.

Le proteine a cui sono legate molecole di SDS, sono cariche negativamente e quindi, sotto l'effetto di un campo elettrico, si spostano verso l'anodo e si trasferiscono in tal modo sul filtro di nitrocellulosa dal quale vengono trattenute. Il tampone utilizzato per il trasferimento è Tris-Glicina 10% e Metanolo 20%. Il *Western blotting* viene effettuato ad una temperatura di 4°C per circa 2 ore, mantenendo un voltaggio costante di 100 V sotto agitazione magnetica costante. Il filtro viene colorato con Rosso Ponceau (Ponceau 2%,

TCA 3%, Acido Sulfosalicilico 30%) per circa 3 minuti per controllare il trasferimento e decolorato con vari cambi in dH₂O.

Preparazione del filtro e rivelazione con ECL

Il filtro viene preincubato per 1 ora a temperatura ambiente all'interno di una vaschetta contenente 50 ml di una *blocking solution* (0.05% di latte liofilizzato, 0.1% Tween-20 in PBS 1x). Il filtro viene lavato con circa 50 ml di PBS-T (0.1% Tween-20 in PBS 1x) per circa 30 minuti e successivamente incubato con il siero immune anti-PLAUF parzialmente purificato in diluizione 1:10000 o con il siero non immune per 1 ora a temperatura ambiente. A questo punto il filtro viene lavato come prima per allontanare l'eccesso di anticorpi e incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano in diluizione 1:5000 (Sigma-Aldrich). La rivelazione delle proteine presenti sul filtro è effettuata mediante il kit ECL PLUS dell'Amersham. Il filtro è asciugato con carta Whatman 3MM ed incubato con le soluzioni A e B in un rapporto 40:1 (0.1 ml/cm²) per 5 minuti a temperatura ambiente in modo che avvenga la reazione chemiluminescente. La soluzione A contiene: Tris Buffer; la soluzione B, invece, è costituita da: Diossano ed Etanolo. Il filtro viene tamponato per eliminare il reagente in eccesso ed è poi posizionato in una cassetta di esposizione al di sopra di un supporto di carta assorbente; infine il filtro viene esposto alla lastra. La durata dell'esposizione può variare da pochi minuti ad un'ora.

Saggio di legame (RNA electrophoretic mobility shift assay, REMSA)

Il trascritto 11C11 PCR1 marcato con α UTP- 32 P ($1-5 \times 10^5$ cpm) viene incubato in assenza o in presenza di 0.1 μ g di GST-PLAUF purificata in 20 μ l di una soluzione Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, tRNA 0.5 mg/ml. La reazione di legame è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti, successivamente i campioni sono stati trattati con 10 U di RNasi T1 (Boehringer Mannheim) a 37°C per 15 minuti per degradare la sonda non legata. 10 μ l di *loading buffer* 3x (glicerolo 21%, TEB 1.5x e blu di bromofenolo 0.003%) sono stati aggiunti ad ogni campione. Infine i campioni sono stati analizzati per elettroforesi su un gel (20 x 15 cm) (5%; 30:0.8 Acrilammide:Bisacrilammide) per circa 3 ore a 9 mA costanti e rivelati per autoradiografia. Per i saggi di competizione, il trascritto specifico o aspecifico non marcato in eccesso molare 10x, 50x e 100x viene aggiunto al campione prima dell'aggiunta della sonda marcata radioattivamente e incubato in ghiaccio per 20 minuti. Per il saggio di *Supershift*, dopo interazione della sonda PCR1 marcata con GST-PLAUF vengono aggiunti (300 ng o 500 ng) di siero immune parzialmente purificato o di siero non immune (600 ng), dopo l'aggiunta della RNasi T1, e la reazione viene incubata in ghiaccio per 30 minuti.

Saggio di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio

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

in vitro in lisati di reticolociti di coniglio (Promega). 3 µl di trascritto PCR1 marcato con ³²P e 2 µg di proteine sono stati aggiunti a 17.5 µl di lisati di reticolociti e ddH₂O per raggiungere un volume di 25 µl; la miscela è stata incubata a 30°C. Sono state prelevate aliquote di 4 µl a tempi diversi e sono stati purificati gli RNA totali mediante estrazione con fenolo/cloroformio e precipitazione con etanolo. I campioni sono stati analizzati su gel d'agarosio denaturante all'1.2%, trasferiti su membrana di nylon Hybond-N (Amersham) e il filtro è stato sottoposto ad autoradiografia. La quantità del segnale autoradiografico è stato analizzato per densitometria.

Preparazione del trascritto marcato

Subcloni utilizzati per la preparazione dei trascritti

I trascritti utilizzati nei saggi di legame e nei saggi di stabilità sono stati preparati a partire da subcloni già disponibili in laboratorio.

- Subclone 11C11 PCR1: è costituito dal vettore pCR-ScriptTM Amp SK(+) e da un inserto contenente parte della 3'UTR del cDNA per l'istone H3.3 (nucleotidi 779-1006).
- Subclone INX: è costituito dal vettore pBluescript SK(+) e da un inserto di 730 bp contenente parte della sequenza codificante e della 3'UTR di un gene per una proteina di membrana di *C. variopedatus*.

Preparazione del DNA plasmidico lineare

Il trascritto H3.3 PCR1 è stato preparato a partire da 10 µg del plasmide 11C11 PCR1 dopo linearizzazione con 40 U dell'enzima XhoI che ha un unico sito di taglio nel

polilinker al 3' dell'inserto. Il trascritto INX è stato preparato a partire da 10 µg del plasmide INX linearizzato con 40 U dell'enzima HindII, che ha un sito di taglio nella posizione 275 dell'inserto.

Il DNA plasmidico viene precipitato mediante aggiunta di 2,5 v di etanolo assoluto in presenza di NaCl alla concentrazione finale di 0.3 M. La precipitazione viene effettuata lasciando il campione a -80°C per 30 minuti. Successivamente la soluzione viene centrifugata per 30 minuti a 14000 rpm in centrifuga Microfuge della Eppendorf ed il pellet ottenuto viene lavato con etanolo 70%. Dopo centrifugazione per 15 minuti a 14000 rpm, il supernatante viene allontanato e i residui di alcool vengono fatti evaporare in concentratore sotto vuoto. Il DNA viene infine risospeso in dH₂O e la sua concentrazione determinata per assorbanza a $\lambda = 260$ nm.

Trascrizione *in vitro*

1 µg di DNA plasmidico linearizzato é riscaldato a 70°C per 10 minuti e poi incubato per 2 ore a 37°C in presenza dello specifico tampone fornito dalla casa produttrice, DTT 10 mM, CTP 1 mM, GTP 1 mM, ATP 1 mM, UTP 0,06 mM, 60 µCi di [α -³²P]UTP (400Ci/mmol), 40 U di T3 RNA Polimerasi (Promega) per la trascrizione dell'mRNA PCR1 o di T7 RNA Polimerasi (Promega) per la trascrizione dell'mRNA INX. Per la preparazione di trascritti non marcati si utilizzano le stesse condizioni, sostituendo il precursore marcato con UTP 1 mM. La reazione è bloccata con l'aggiunta di 5 U di DNasi priva di RNasi (Boehringer) mediante incubazione per 15 minuti a 37°C. Il prodotto della reazione di trascrizione viene purificato mediante estrazione con 1 v di fenolo acido (AppliChem), precipitato con etanolo assoluto, lavato con etanolo 70% e

quindi risospeso in 15 μ l di ddH₂O trattata con DEPC. Per la sintesi delle sonde utilizzate negli esperimenti di ibridazioni *in situ*, la trascrizione *in vitro* viene eseguita in presenza di 0.35 mM di UTP-digossigenina e di 0.65 mM di UTP.

Ibridazioni in situ su embrioni *whole-mount*

Gli embrioni sono stati fissati utilizzando una soluzione contenente formaldeide al 4%, MOPS 0.1 M pH 7 e NaCl 0.5 M per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi in 10 volumi di MOPS 0.1 M, NaCl 0.5 M e Tween-20 0.1% (MOPS *buffer*), i campioni sono stati conservati in etanolo al 70% a -20°C . Per reidratare gli embrioni, sono stati eseguiti 3 lavaggi di 15 minuti in almeno 10 volumi di MOPS *buffer*; successivamente è stata avviata la preibridazione per 3 ore a 50°C in una soluzione contenente formammide al 70%, NaCl 0.5 M, MOPS (pH 7) 0.1 M, 1 mg/ml di BSA e Tween-20 0.1%. L'ibridazione è stata eseguita a 50°C per una settimana utilizzando 0.1 ng/ μ l di sonda (cDNA di PLAUF e H3.3, senso e antisenso), sintetizzata in presenza di precursori UTP-digossigenina. Dopo l'ibridazione i campioni sono stati lavati con MOPS *buffer* a temperatura ambiente per rimuovere la sonda, incubati per altre 3 ore a 50°C e lavati per 3 volte con MOPS *buffer*. La reazione di "blocking" è avvenuta in MOPS *buffer* con 10 mg/ml di BSA per 20 minuti a temperatura ambiente e poi in MOPS *buffer* con siero di capra 10% e BSA 1 mg/ml a 37°C per 30 minuti. I campioni sono stati incubati con anticorpi anti-digossigenina coniugati con la fosfatasi alcalina (Amersham) in diluizione 1:5000 per tutta la notte a temperatura ambiente; l'eccesso di anticorpi è stato allontanato con 5 lavaggi in MOPS *buffer* per circa 12 ore. La reazione è stata sviluppata utilizzando

NBT/BCIP (6.5 μ l di NBT 50 mg/ml e 4.5 μ l di BCIP 50 mg/ml) (Promega) in 1 ml di AP *buffer* (0.1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂); la reazione è stata seguita nel tempo e infine bloccata diluendo i campioni con MOPS buffer.

Risultati

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI cDNA CODIFICANTI PLAUF

Allo scopo di caratterizzare i cDNA di peso molecolare superiore al cDNA già identificato, rivelati mediante il saggio *Northern blotting*, è stata concentrata l'attenzione sull'estremità 3' del trascritto in quanto esperimenti di *Primer extension* avevano indicato la presenza di un unico sito per l'inizio della trascrizione. Sono stati quindi effettuati esperimenti di *3'Race* ed è stata eseguita l'analisi di una nuova *library* di espressione. L'esperimento di *3'Race* è stato condotto su preparazioni di RNA totali da embrioni di riccio di mare allo stadio di morula; nella reazione di RT è stato utilizzato l'oligonucleotide antisenso UAP, mentre nella reazione di polimerizzazione l'oligonucleotide senso PL7 o PL9 e l'oligonucleotide antisenso AUAP. Si sono ottenuti tre frammenti, di cui solo due sono stati clonati e sequenziati (Figura 14). Il primo frammento di 202 bp corrisponde alla 3'UTR del cDNA (*PLAUF1*) già identificato. Il secondo clone *PLAUF2* contiene un inserto di 517 bp che corrisponde ad una 3'UTR più lunga, che si sovrappone perfettamente alla già nota 3'UTR di *PLAUF1* fino alla posizione 1235, ma presenta un tratto aggiuntivo di 332 nucleotidi che termina con una coda di poli(A) (Genbank accession no. AY609061). Tale 3'UTR più lunga potrebbe caratterizzare il trascritto a mobilità intermedia rivelato per *Northern blotting*.

Per poter isolare il cDNA corrispondente al trascritto a più alto peso molecolare è stata eseguita l'analisi di una nuova *library* di espressione in λ -ZapII, utilizzando come sonda la 3'UTR più lunga ottenuta per *3'Race* e selezionando i cloni contenenti un inserto superiore a 2 kb. Sono stati isolati due cloni (*PLAUF3* e *PLAUF33*) ed è stata controllata la lunghezza degli inserti dopo digestione enzimatica; è stata effettuata una singola digestione con l'enzima di restrizione BamHI al fine di linearizzare il plasmide (Figura 15,

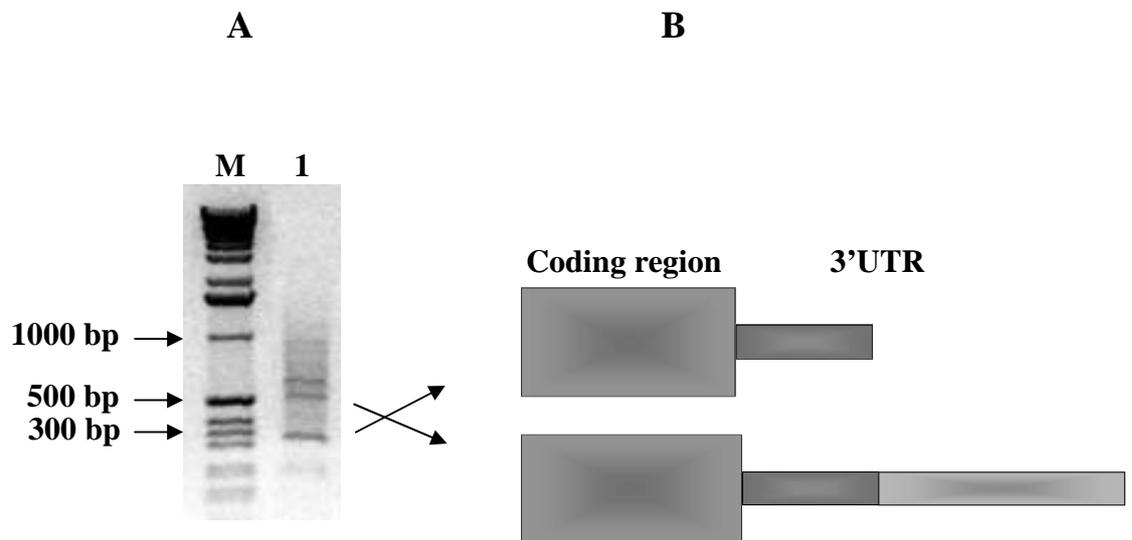


Figura 14: Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% (A) e rappresentazione schematica dei prodotti dell'esperimento di *3'Race* eseguito su RNA totali da embrioni allo stadio di morula utilizzando l'oligonucleotide senso PL9 e l'oligonucleotide antisenso AUAP (B). In fucsia è rappresentata la regione codificante, in blu la breve 3'UTR e in azzurro la 3'UTR più lunga identificata mediante l'esperimento di *3'Race*.

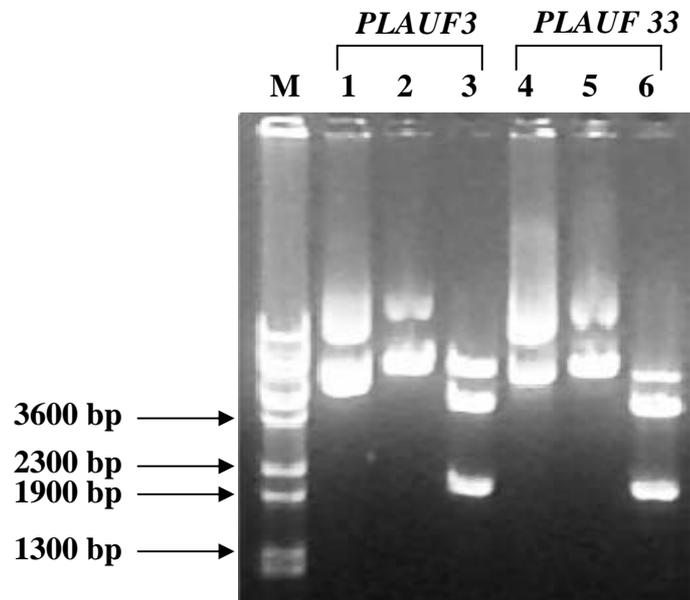


Figura 15: Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti di digestione del DNA plasmidico dei cloni *PLAUF3* e *PLAUF33*.

M: marcatore di peso molecolare (Lambda DNA BstEII digest, SIGMA)

Corsie 1-3: non digerito, singola digestione (BamHI), doppia digestione (EcoRI e XhoI) del DNA plasmidico del clone *PLAUF3*

Corsie 4-6: non digerito, singola digestione (BamHI), doppia digestione (EcoRI e XhoI) del DNA del plasmide *PLAUF33*.

corsie 2 e 5) e una doppia digestione con gli enzimi di restrizione EcoRI e XhoI per isolare l'inserto dal vettore (Figura 15, corsie 3 e 6). I due cloni contengono inserti di identica lunghezza per cui è stato sequenziato solo *PLAUF3* (GenBank accession no. AY 682309). L'inserto del clone *PLAUF3* corrisponde ad un cDNA parziale codificante la proteina PLAUF, che contiene la regione codificante nota a partire dalla posizione 231, la 3'UTR più lunga e un ulteriore tratto aggiuntivo di 846 bp. Tale 3'UTR aggiuntiva potrebbe caratterizzare il trascritto a mobilità minore rivelato per *Northern blotting*.

È stata successivamente dimostrata la presenza di mRNA completi che contengono la nuova 3'UTR nelle preparazioni di RNA totali; ciò è stato ottenuto mediante la tecnica di RT-PCR utilizzando nella reazione di RT l'oligonucleotide PL20 specifico della nuova 3'UTR, e nella reazione di PCR coppie di oligonucleotidi PL1 e PL8, PL5 e PL8. Dalla reazione si ottengono frammenti della lunghezza attesa (Figura 16, corsia 1 e 2); inoltre si può notare la presenza di bande doppie che possono essere spiegate sulla base del meccanismo di *splicing* alternativo dimostrato in precedenza.

In conclusione, i trascritti rivelati mediante *Northern blotting* differiscono per la lunghezza delle 3'UTR (Figura 17) che potrebbero essere generate mediante l'utilizzo di diversi siti di poliadenilazione.

IDENTIFICAZIONE E DEFINIZIONE DELLA STRUTTURA DEL GENE *PLAUF*

Allo scopo di conoscere l'intera sequenza genica di PLAUF e per definire il meccanismo molecolare alla base del processo di *splicing* alternativo, è stata eseguita l'analisi di una *library* genomica in λ -DashII, utilizzando come sonda un frammento di

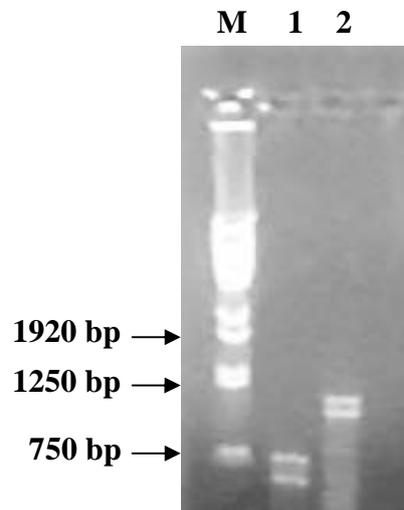


Figura 16: Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% di prodotti di RT-PCR ottenuti su RNA totali estratti da embrioni allo stadio di morula. Corsie: M) Marker Lambda DNA BstEII digest (Sigma); 1) Prodotto di amplificazione con gli oligo specifici PL1 e PL8; 2) Prodotto di amplificazione con gli oligo PL5 e PL8.

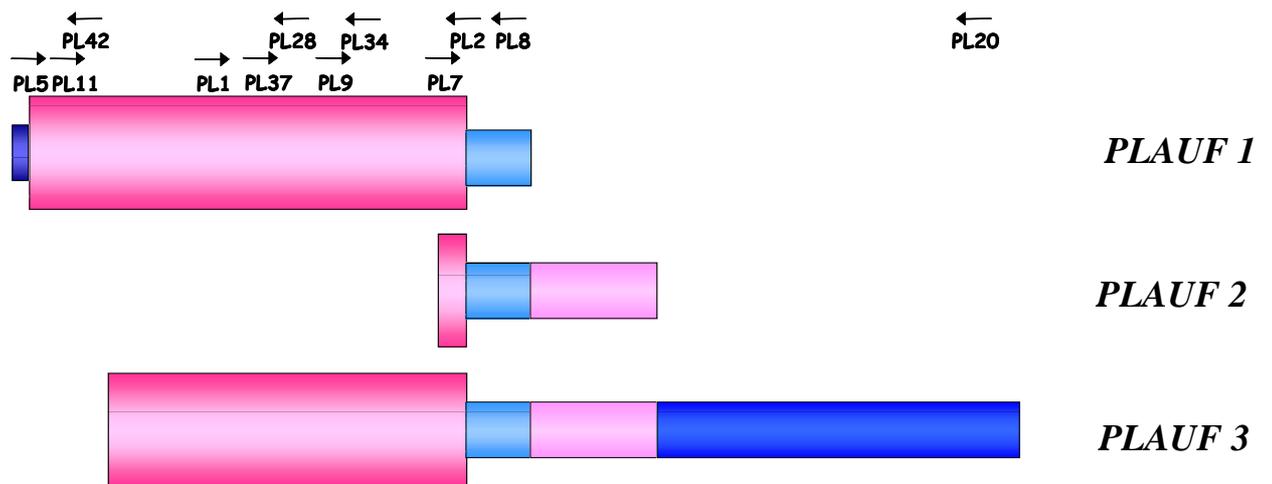


Figura 17: Rappresentazione schematica dei cDNA codificanti la proteina PLAUF: *PLAUF1* (GenBank accession no. AY590189) identificato mediante analisi della prima *library* di cDNA; *PLAUF2* (GenBank accession no. AY609061) identificato mediante *3'Race*; *PLAUF3* (GenBank accession no. AY682309) identificato mediante analisi di una seconda *library* di cDNA.

739 bp che corrisponde alla 5'UTR e a parte della regione codificante del cDNA per PLAUF. Sono stati identificati diversi cloni positivi, alcuni dei quali sono stati analizzati mediante esperimenti di *Southern blotting* con tre sonde diverse che coprono la totale lunghezza del cDNA per PLAUF. In figura 18A è mostrato un esperimento di *Southern blotting* eseguito sul DNA dei fagi 4a, 4b e 5a digeriti con l'enzima EcoRI, utilizzando come sonda la stessa sonda dell'analisi della *library* (corsie 1, 2 e 3). Dall'immagine autoradiografica risulta chiaro che la sonda ibrida con un frammento di circa 5000 bp e con uno di circa 700 bp; inoltre i tre fagi contengono lo stesso inserto per cui gli esperimenti successivi sono stati condotti solo sul DNA del fago 4a. Il DNA del fago 4a digerito sempre con l'enzima è stato analizzato con una sonda corrispondente alla regione al 3' del cDNA per PLAUF, che corrisponde a parte della regione codificante e a parte della 3'UTR. L'immagine autoradiografica in figura 18B (corsia 1) mostra che la sonda ibrida con un altro frammento di circa 7000 bp; l'altro segnale ad alto peso molecolare potrebbe corrispondere all'ibridazione della sonda con del DNA fagico parzialmente digerito.

Allo scopo di localizzare il frammento da 700 bp all'estremità 5' o nella regione centrale del gene per PLAUF, è stato eseguito un altro esperimento di *Southern blotting* utilizzando come sonda un frammento corrispondente alla sola regione centrale del tratto codificante di PLAUF. Questa sonda ha dato lo stesso risultato della sonda corrispondente all'estremità 5' del cDNA codificante PLAUF (Figura 19A); da questo risultato si evince che il frammento da 700 bp generato dopo digestione con EcoRI è localizzato tra i due frammenti di 5000 bp e 7000 bp (Figura 19A).

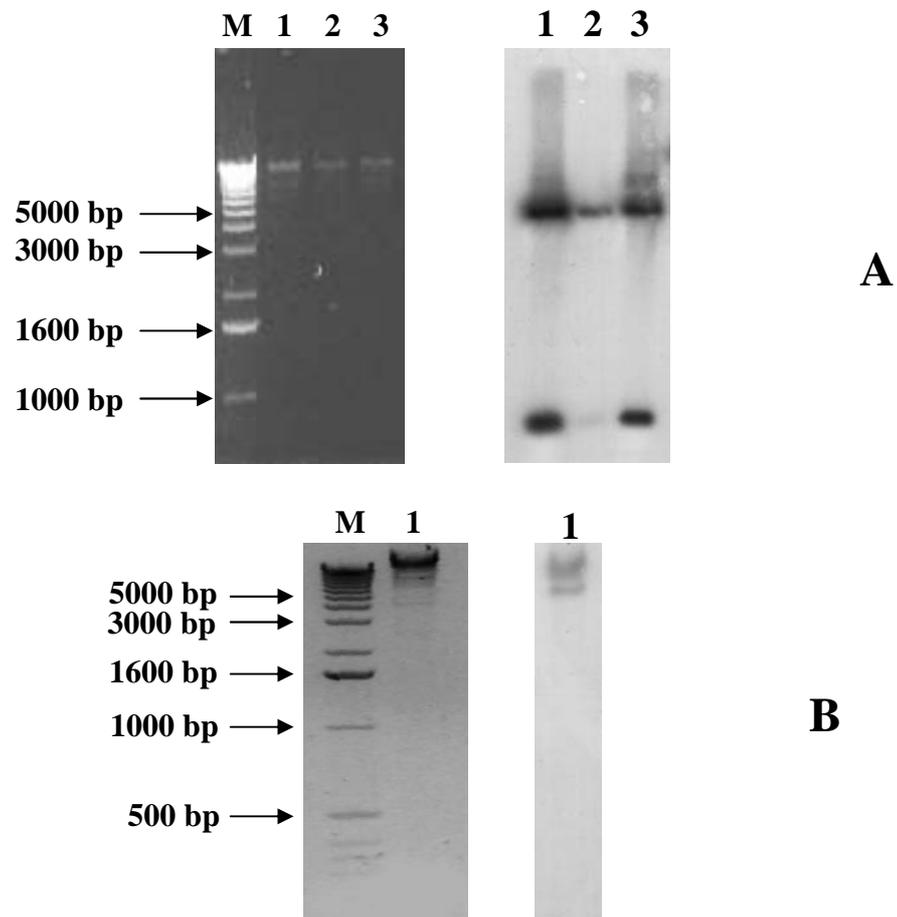


Figura 18: Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% dei prodotti di digestione di DNA fagico con l'enzima EcoRI e autoradiografia di un esperimento di *Southern blotting*.

A) Ibridazione eseguita utilizzando come sonda un frammento al 5' del cDNA di PLAUF; a sinistra è riportato il gel corrispondente colorato con bromuro d'etidio. Corsie: M) marcatori di peso molecolare; 1) DNA fagico 4a; 2) DNA fagico 4b; 3) DNA fagico 5a; B) Ibridazione eseguita utilizzando come sonda un frammento al 3' del cDNA di PLAUF; a sinistra è riportato il gel corrispondente colorato con bromuro d'etidio: M) marcatori di peso molecolare; 1) DNA fagico 4a.

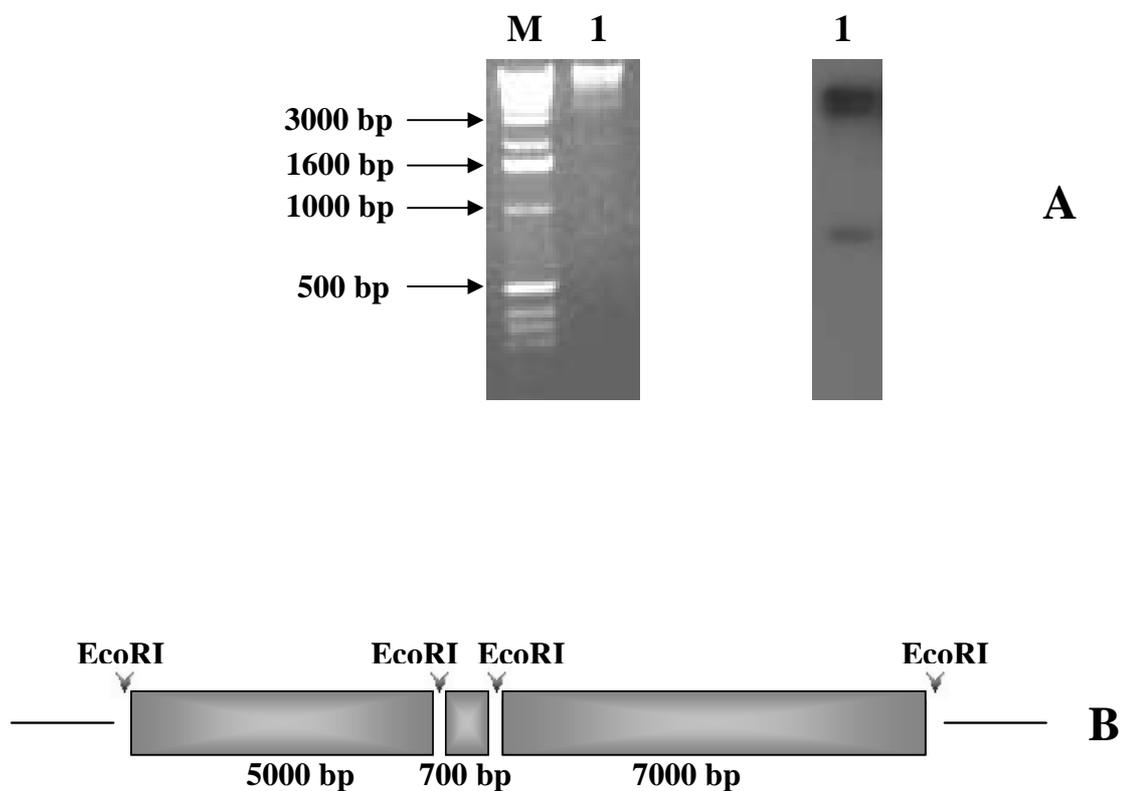


Figura 19: Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% dei prodotti di digestione di DNA fagico con l'enzima EcoRI e autoradiografia di un esperimento di *Southern blotting*.

A) Ibridazione eseguita utilizzando come sonda un frammento centrale del cDNA di PLAUF. Corsie: M) marcatori di peso molecolare; 1) DNA fagico 4a.

B) Rappresentazione schematica dell'inserto del fago 4a dopo digestione con l'enzima di restrizione EcoRI; con le frecce sono segnalati i siti di taglio dell'enzima.

Si è tentato di subclonare i prodotti di digestione dell'inserto del fago 4a nel vettore pBlueScript SK(-). Si è riusciti a subclonare soltanto i frammenti di 7000 bp e 5000 bp, producendo due subcloni (*PLAUF4* e *PLAUF 10*), i cui inserti sono stati quindi sequenziati utilizzando oligonucleotidi specifici.

La regione genica mancante tra i due subcloni *PLAUF4* e *PLAUF 10*, è stata ottenuta mediante PCR utilizzando come stampo il DNA del fago 4a e come oligonucleotidi PL37 e PL28, e PL9 con PL34. Questi frammenti sono stati clonati in pBlueScript SK(-) e sequenziati (subcloni *PLAUF37-28* e *PLAUF 9-34*).

Il clone genomico 4a non contiene l'intera sequenza genica di *PLAUF* perchè manca della 5'UTR, del primo codone di inizio e di 148 bp della regione codificante. La regione assente nel clone 4a è stata ottenuta mediante PCR direttamente su DNA genomico di riccio di mare e come oligonucleotidi PL5 e PL42; il frammento ottenuto è stato quindi clonato e sequenziato (subclone 5-42).

Gli inserti sono stati interamente sequenziati, eccetto quelli contenenti gli introni 1, 4, 5, 6 e 8. La lunghezza degli introni è stata calcolata in base alla sequenza, laddove possibile, o mediante elettroforesi dei prodotti di PCR ottenuti utilizzando oligonucleotidi posizionati all'estremità 5' e 3' degli esoni. Il risultato di questa strategia dimostra che il gene per *PLAUF* è di almeno 10 kb ed è organizzato in 10 esoni e 9 introni di differente lunghezza (Figura 20 e 21). I 10 esoni hanno grandezza variabile, che va da 41 bp dell'esone 2 a 1228 bp dell'esone 10; la grandezza dei 9 introni va da 333 bp dell'introne 2 a più di 1250 bp dell'introne 4. Tutti i siti accettori e donatori di *splicing* osservano la regola del GT... AG (Figura 21). Paragonando la sequenza del cDNA a quella degli esoni, viene confermata l'ipotesi di fenomeni di *splicing* alternativi alla base di parte della molteplicità

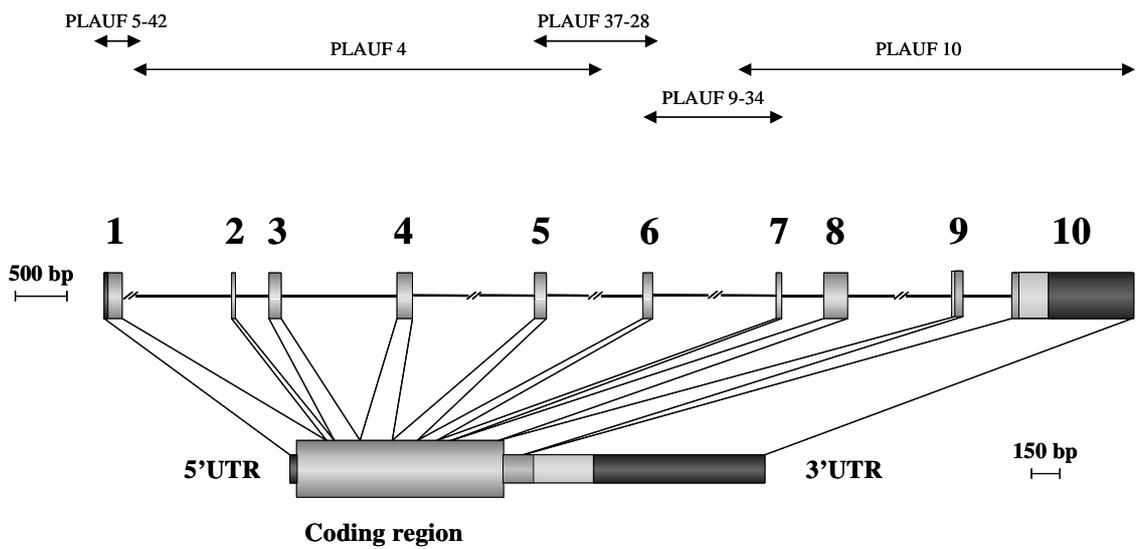


Figura 20: Rappresentazione schematica della struttura del gene che codifica la proteina PLAUF.

Esone				Introne			
#	Lunghezza	Sito donatore al 5'		Lunghezza	Fase	Amminoacido interrotto	Sito acc
1	186	..TGACAA	n. d.	>990	2	Lys 50	..ttgcag
2	41	..CACCCAG	gtaagt..	333	3	Glu 64	..ttacag
3	128	..ACAAAA	gtaggt..	1210	1	Lys 106- Val 107	..gtacag
4	162	..GGAACG	gtgagc..	>1250	1	Thr 160-Val 161	..tactag
5	129	..AATAAG	gtaagt..	>930	1	Lys 203- Lys 204	..tctcag
6	100	..GAGGAG	gtaaga..	>1200	3	Gly 237	..cgntag
7	57	..ACCCAG	gtaagc..	433	3	Gly 256	..ttgtag
8	246	..GATATG	gtaaat..	>990	3	Glu 338	..ctacag
9	113	..GAACAG	gtattt..	505			..cctcag
		Fino al sito					

Figura 21: Tabella che riporta per il gene *PLAUF* la lunghezza degli introni e degli esoni, le sequenze dei siti accettori e donatori di *splicing*, le fasi di traduzione negli esoni e l'amminoacido interrotto dagli introni.

degli mRNA; risulta infatti evidente che l'esone 9 è coinvolto nel meccanismo di *splicing* alternativo durante il processamento dell'mRNA.

ESPRESSIONE *IN VITRO* E PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE

Allo scopo di ottenere la proteina PLAUF per studi funzionali si è passati al clonaggio della regione codificante del cDNA in un vettore di espressione. Inizialmente è stato utilizzato il vettore pET-15b, ma senza successo perché non si evidenziava l'espressione della proteina PLAUF.

Successivamente si è utilizzato il vettore di espressione pGEX-2T sotto un promotore inducibile con IPTG: in questo sistema le proteine vengono espresse come proteine di fusione con la GST. In tale vettore è stata clonata parte della regione codificante della proteina dalla posizione 109 alla 1130, ottenuta mediante PCR con oligonucleotidi PL11 e PL2 su stampo del cDNA di PLAUF. Dopo trasformazione chimica dei batteri *E. coli* BL21, è stata verificata mediante PCR la presenza dell'inserto. L'espressione della proteina ricombinante è stata indotta nei batteri mediante IPTG. Dopo alcuni tentativi per la messa a punto dell'esperimento, si è ottenuta la proteina ricombinante da 60 kDa che è visibile nel lisato di batteri indotti con IPTG (Figura 22A, corsia 4) a differenza del lisato da batteri non indotti (Figura 22A, corsia 2). Nella corsia 3 è evidente la proteina GST di controllo espressa in batteri trasformati con il solo vettore pGEX-2T.

La proteina ricombinante GST-PLAUF è stata purificata mediante cromatografia di affinità su una colonna impaccata con la resina Glutathione-Sepharosio e analizzata per

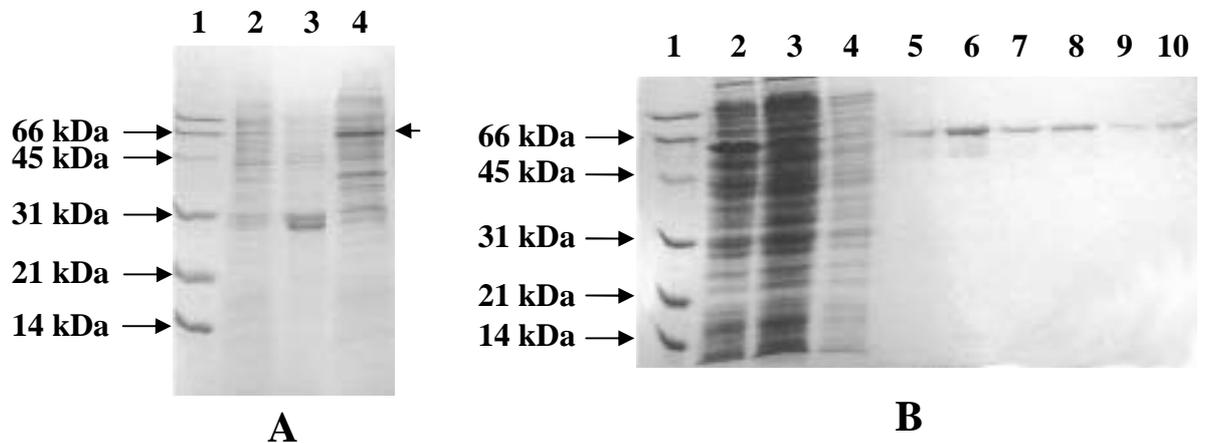


Figura 22: A) Elettroforesi su gel di poliacrilammide e colorazione con Coomassie Blue di estratti proteici da batteri prima e dopo induzione.

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

B) Elettroforesi su gel di poliacrilammide e colorazione con Coomassie Blue dell'estratto proteico applicato su colonna Glutathione-Sepharosio e delle frazioni eluite.

Corsie: 1) marcatori di peso molecolare; 2) lisato totale di batteri trasformati con pGEX-2T contenente il cDNA di PLAUF, dopo induzione; 3) e 4) frazione del lisato non legata alla resina Glutathione-Sepharosio; 5-10) frazioni eluite dalla colonna contenenti la proteina di fusione.

SDS-PAGE. Una banda maggioritaria del peso molecolare atteso è stata eluita dalla colonna dopo l'aggiunta del glutatione (Figura 22B, corsie 5-10).

SAGGI FUNZIONALI SULLA PROTEINA RICOMBINANTE GST-PLAUF

In letteratura le proteine AUF1 sono note come proteine capaci di legare RNA caratterizzati da sequenze ARE; quindi si è verificata la capacità della proteina GST-PLAUF purificata di legare una regione della 3'UTR (il frammento PCR1) dell'mRNA dell'istone H3.3 mediante il saggio REMSA. Come mostrato in figura 23 una banda a mobilità ritardata è evidente quando la sonda è incubata in presenza della proteina purificata (corsia 2). Lo stesso trascritto specifico non marcato, in eccesso molare 10x, 50x e 100x, compete per il legame già in eccesso molare 10x (corsie 3-5), mentre un trascritto non specifico inizia ad inibire la formazione della banda a mobilità ritardata solo a partire da 100x (corsie 6-8). Questo risultato suggerisce che la proteina GST-PLAUF purificata lega specificamente il frammento PCR1 dell'mRNA del trascritto istonico H3.3.

Le lunghe 3'UTR dei trascritti ricchi in AU sono spesso coinvolte nella regolazione dell'emivita degli mRNA ed inoltre le proteine AUF1 in altri organismi sono implicate nella modulazione dell'emivita degli mRNA a cui si legano. Allo scopo di verificare la possibile implicazione di PLAUF nella regolazione dell'emivita del trascritto istonico H3.3, sono stati effettuati saggi di stabilità sul trascritto PCR1 in lisati di reticolociti di coniglio, in presenza della proteina GST-PLAUF o della sola GST come controllo (Figura 24). Come è mostrato in figura 24B almeno l'80% del trascritto PCR1 è degradato dopo 60 minuti. In presenza della proteina GST-PLAUF, la stabilità del trascritto PCR1 aumenta almeno di tre volte, mentre la proteina GST purificata non ha

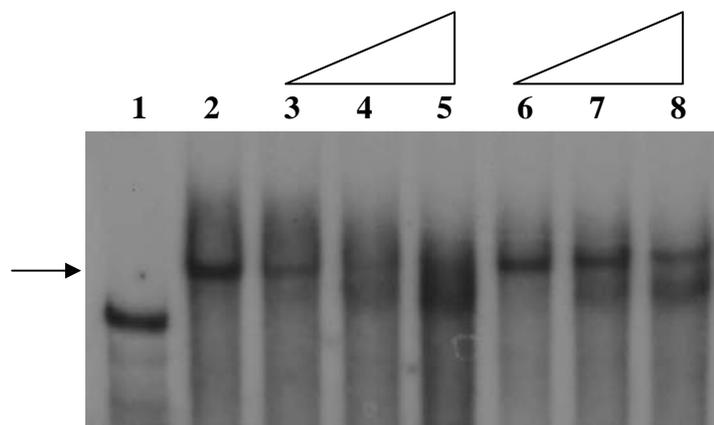


Figura 23: Autoradiografia del REMSA eseguito utilizzando la proteina ricombinante GST-PLAUF e il frammento PCR1 della 3'UTR del trascritto istonico H3.3.

Corsie: 1) trascritto non incubato con proteine; 2) trascritto incubato con GST-PLAUF; 3) 4) e 5) in presenza del competitori specifico in eccesso molare 10x, 50x e 100x; 6) 7) e 8) in presenza del competitori aspecifico in eccesso molare 10x, 50x e 100x.

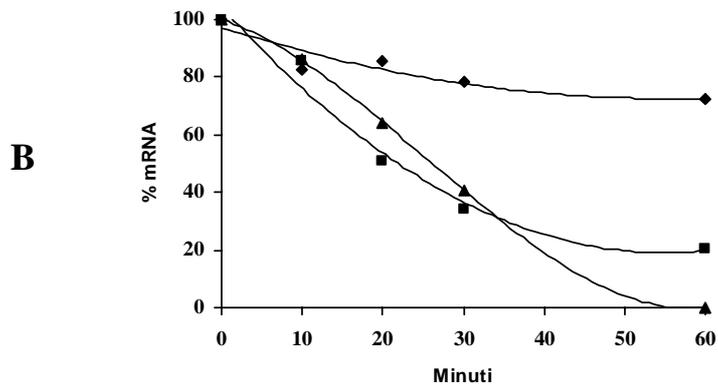
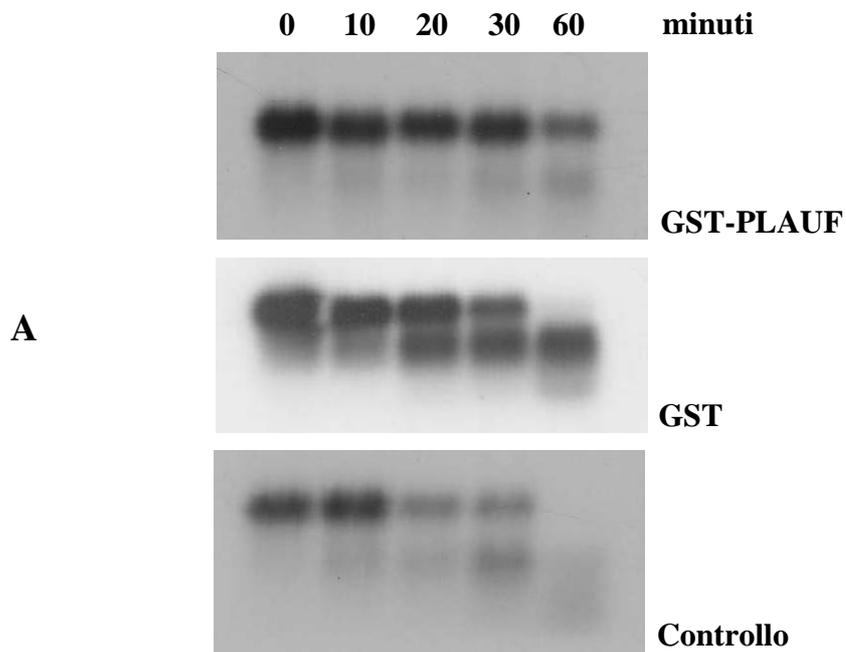


Figura 24: A) Autoradiografia di esperimenti di *Northern blotting* eseguiti su RNA totali estratti da reticolociti di coniglio; B) Grafico dell'andamento della stabilità del trascritto in presenza di GST-PLAUF (◆), in presenza di GST (▲) o in assenza di proteine (■); i dati riportati nel grafico rappresentano la media di tre esperimenti.

nessun effetto protettivo. Questi dati indicano che il legame di PLAUF alla 3'UTR influenza la velocità di degradazione del trascritto per l'istone H3.3.

PREPARAZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI CONTRO PLAUF E PARZIALE

PURIFICAZIONE

È stato preparato un antisiero contro PLAUF, tramite immunizzazione di un coniglio allo scopo di individuare PLAUF in un estratto proteico da riccio mediante esperimenti di *Western blotting* e nel complesso di legame alla 3'UTR dell'istone H3.3 mediante esperimenti di *Supershift*.

La regione di cDNA codificante PLAUF è stata ottenuta mediante PCR utilizzando come oligonucleotidi specifici PL5 e PL2 e come stampo il cDNA di PLAUF; successivamente è stata clonata in un vettore pRSV sotto il promotore forte eucariotico RSV. Il plasmide preparato mediante maxipreparazioni è stato iniettato nella sottocute di un coniglio, con un richiamo settimanale, per un totale di 4 iniezioni seguendo lo schema di La Cava e Albani (2000). Dopo 7 giorni dall'ultima iniezione è stato effettuato un prelievo di sangue, da cui dopo coagulazione è stato prelevato il siero; il siero è stato sottoposto a precipitazione differenziale con ammonio solfato al 40% per favorire la purificazione delle immunoglobuline; il supernatante è stato sottoposto a nuova precipitazione con ammonio solfato al 50% e il precipitato risospeso in tampone imidazolo e dializzato. Le varie frazioni sono state analizzate per SDS-PAGE al 10%; come è evidente dalla figura 25 i precipitati al 40% di saturazione di ammonio solfato non dializzati e dializzati (corsie 2, 4, 8 e 9) si arricchiscono delle catene leggere e pesanti

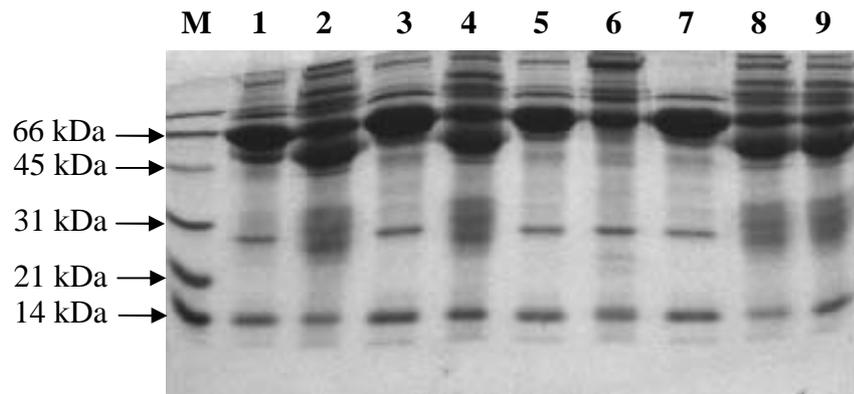


Figura 25: Elettroforesi su gel di poliacrilammide e colorazione con Coomassie Blue di frazioni ottenute dalla precipitazione con ammonio solfato al 40% e 50% del siero di coniglio immunizzato.

Corsie: M) marcatori di peso molecolare; 1) proteine totali del siero non purificato; 2 e 4) precipitato al 40% di saturazione di ammonio solfato; 3 e 5) supernatante al 40% di saturazione di ammonio solfato; 6 e 7) precipitato e supernatante al 50% di saturazione di ammonio solfato; 8) campione del punto 2 dializzato; 9) campione del punto 4 dializzato.

delle immunoglobuline (circa 25-30 e 50 kDa) mentre perde di intensità la banda corrispondente all'albumina (66 kDa) rispetto al siero non purificato (corsia 1). Ciò non accade né nei supernatanti al 40% di saturazione di ammonio solfato, né nei supernatanti e precipitati al 50% di saturazione di ammonio solfato (Figura 25).

L'antisiero contro PLAUF è stato saggiato per la sua capacità di legare PLAUF, eseguendo un esperimento di *Western blotting* su lisato di batteri trasformati con il vettore pGEX-2T contenente la regione codificante di PLAUF ed indotti con IPTG. È stato utilizzato l'antisiero parzialmente purificato a due diverse diluizioni 1:10000 e 1:5000. (Figura 26, corsie 1 e 2), e il siero non immune non purificato come controllo negativo (Figura 26, corsia 3). L'antisiero contro PLAUF, al contrario del siero non immune, riconosce la proteina di fusione GST-PLAUF nel lisato di batteri trasformati.

IDENTIFICAZIONE DI PLAUF IN UN ESTRATTO PROTEICO TOTALE DA *P. LIVIDUS*

Per verificare che una delle proteine presenti nell'estratto proteico totale di riccio di mare rivelate mediante *Northwestern* fosse PLAUF, sono stati eseguiti esperimenti di *Western blotting* e *Supershift*. Nell'estratto proteico di riccio di mare allo stadio di gastrula, gli anticorpi anti-PLAUF riconoscono una proteina da circa 32 kDa, come è evidente dalla figura 27 corsia 2; nella corsia 1 la GST-PLAUF, utilizzata come controllo positivo, viene riconosciuta anch'essa dagli anticorpi anti-PLAUF.

Successivamente è stato analizzato l'effetto dell'aggiunta degli anticorpi anti-PLAUF nel saggio di mobilità ritardata, dove proteine di riccio di mare sono analizzate per la loro capacità di legare la sonda PCR1. Come si osserva dalla figura 28, gli anticorpi anti-PLAUF sono capaci di ritardare ulteriormente uno dei complessi a mobilità ritardata

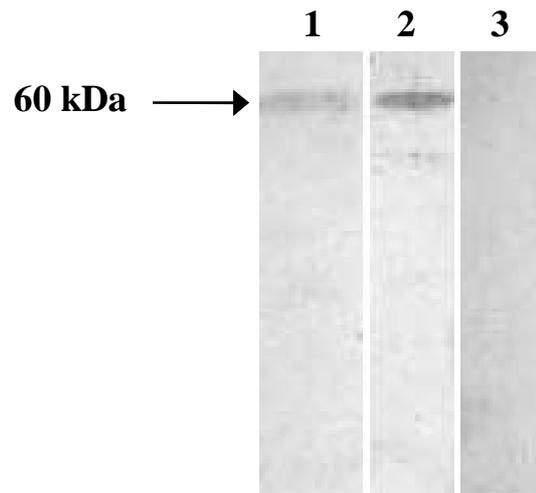


Figura 26: Esperimento di *Western blotting* su lisato di batteri trasformati con il vettore pGEX-2T contenente la regione codificante di PLAUF ed indotti con IPTG; si sono utilizzati anticorpi parzialmente purificati anti-PLAUF in diluizione 1:10000 (corsia 1), e 1:5000 (corsia 2), e siero non immune come controllo (corsia 3).

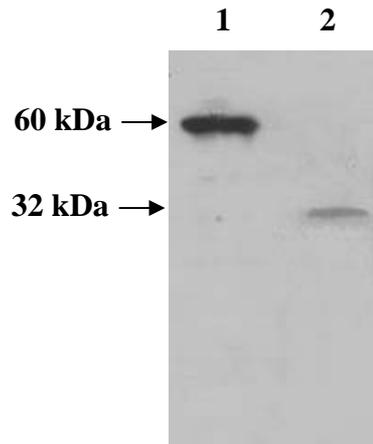


Figura 27: Esperimento di *Western blotting*, utilizzando anticorpi anti-PLAUF.

Corsie: 1) 0.1 μg della proteina di fusione GST-PLAUF; 2) 30 μg di lisato totale degli embrioni di riccio di mare allo stadio di gastrula.

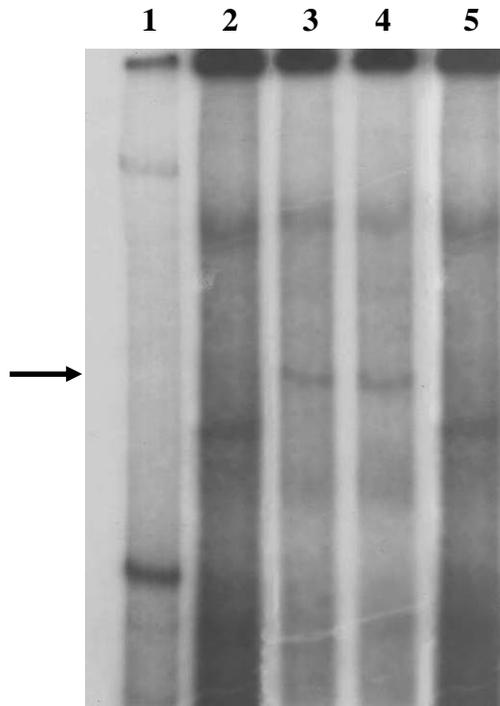


Figura 28: Autoradiografia di un esperimento di *Supershift* utilizzando come sonda marcata PCR1 e 30 µg di lisato proteico totale da embrioni allo stadio di gastrula e anticorpi anti-PLAUF. Corsie: 1) in assenza di proteine; 2) in presenza di proteine; 3 e 4) dopo aggiunta di 300 e 500 ng di anticorpi anti-PLAUF; 5) dopo aggiunta di 600 ng di siero preimmune.

(corsie 3 e 4), a differenza del siero non immune (corsia 5). Questi risultati suggeriscono che PLAUF è presente in uno dei complessi ritardati specifici, generati dall'interazione di proteine di riccio di mare con la sonda PCR1.

ESPERIMENTI DI IBRIDAZIONE *IN SITU* SU EMBRIONI DI RICCIO DI MARE A VARI STADI DI SVILUPPO

Allo scopo di correlare *in vivo* la funzione della proteina PLAUF e il trascritto istonico H3.3, sono stati condotti esperimenti di ibridazioni *in situ* che identificassero la localizzazione degli RNA messaggeri per PLAUF e per l'istone H3.3. Questi esperimenti sono stati condotti in embrioni di riccio di mare *P. lividus* allo stadio di blastula, gastrula e prisma, utilizzando come sonda i due trascritti antisense marcati con digossigenina. Come riportato nella figura 29, i due mRNA hanno la stessa localizzazione spaziale negli embrioni allo stadio di blastula, gastrula e prisma. Negli embrioni allo stadio di blastula, entrambi gli mRNA sono presenti nelle cellule del polo vegetativo e nelle cellule del mesenchima primario. Segnali positivi sono presenti anche nelle cellule dell'archenteron e nelle cellule del mesenchima in embrioni allo stadio di gastrula; allo stadio di prisma entrambi i trascritti sono localizzati nelle cellule dell'intestino e delle braccia orali. Non si notano segnali positivi quando si utilizzano come sonda i due trascritti senso in embrioni a tutti gli stadi di sviluppo. Da tali risultati si evince che i due trascritti hanno la stessa distribuzione spaziale durante lo sviluppo del riccio di mare.

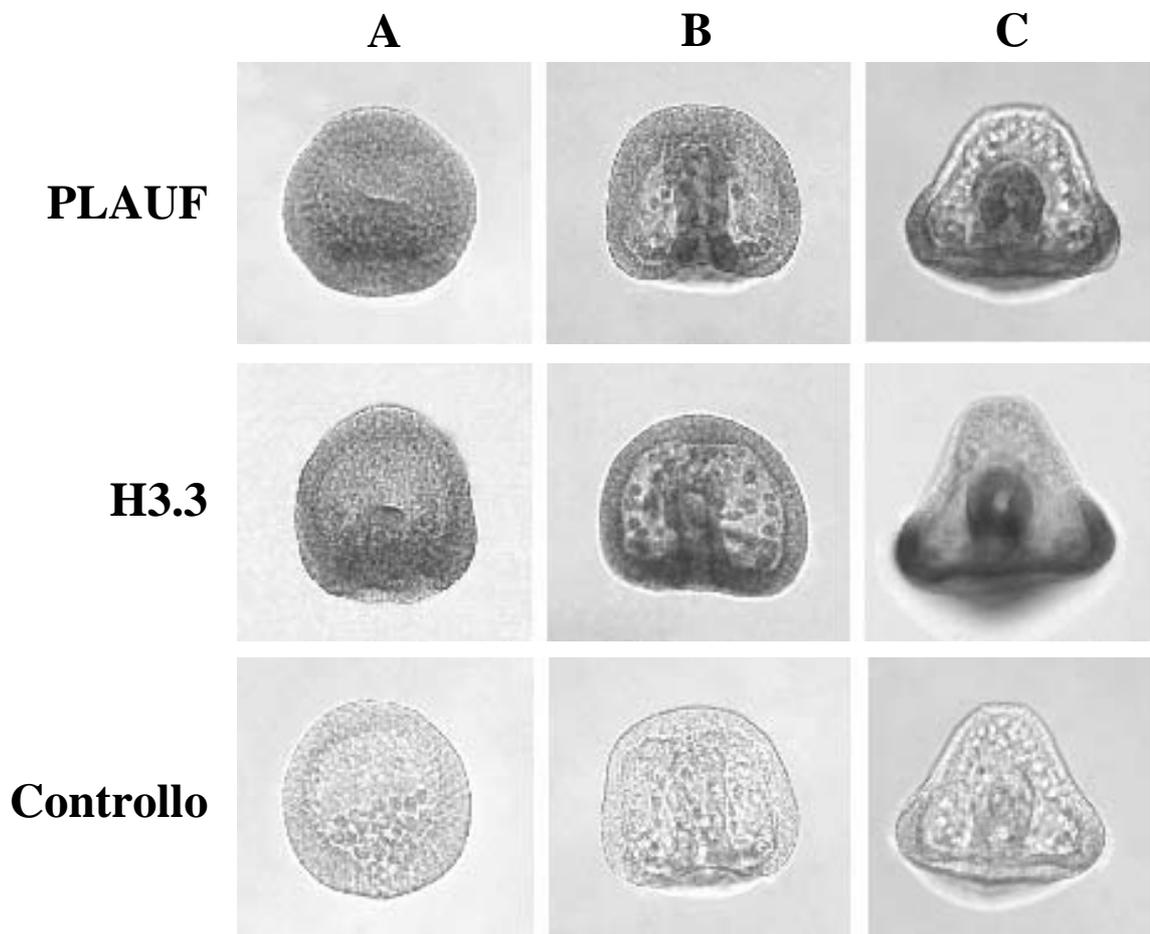


Figura 29: Esperimenti di ibridazioni *in situ* condotti su embrioni di riccio di mare allo stadio di blastula (A), gastrula (B) e prisma (C) utilizzando come sonda il trascritto antisenso per H3.3 e per PLAUF marcato con digossigenina. L'esperimento controllo è stato condotto utilizzando come sonda il trascritto senso per PLAUF.

Discussione e Conclusioni

La proteina PLAUF, identificata nel riccio di mare *P. lividus* (Pulcrano et al., 2005), presenta diversi punti di omologia con le proteine della famiglia AUF1 identificate nel topo e nell'uomo. Di queste proteine sono state isolate e caratterizzate quattro isoforme (p37, p40, p42 e p45) che sono codificate da mRNA diversi generati per *splicing* alternativo. Esse si distinguono per la presenza o assenza di un tratto di 19 aminoacidi (codificato dall'esone 2) e di un tratto di 49 aminoacidi (codificato dall'esone 7). La p37 manca di entrambi gli inserti e la p40 contiene solo quello da 19 aminoacidi; la p42 è caratterizzata solo dall'inserto di 49 aminoacidi, mentre la p45 li contiene entrambi (Wagner et al., 1998).

Anche PLAUF è codificata da trascritti multipli, come dimostrato dagli esperimenti di *Northern blotting*, dove si rivelano almeno tre trascritti di 1.4, 1.8 e 2.6 kb in preparazioni di RNA totali estratti da embrioni di riccio di mare a vari stadi di sviluppo. Il trascritto da 1.4 kb potrebbe corrispondere al cDNA già isolato contenente un tratto di poli(A) di circa 150-200 nucleotidi. I trascritti non si differenziano all'estremità 5', come dimostrato attraverso esperimenti di *Primer extension* su RNA totali allo stadio di morula, in quanto si evidenzia un unico sito principale di inizio della trascrizione che corrisponde al primo nucleotide del cDNA già identificato (Figura 12). Attraverso esperimenti di *3'Race* ed analisi di una seconda *library* di espressione si è arrivati all'identificazione di due cloni di cDNA parziali per PLAUF, che differiscono tra loro e rispetto al clone già isolato per la lunghezza della 3'UTR. Questi trascritti possono essere generati mediante l'utilizzo di siti diversi di poliadenilazione e potrebbero subire una differente regolazione in quanto presentano 3'UTR diverse. Un meccanismo di questo tipo è stato già dimostrato per le AUF1, dove trascritti generati per *splicing* alternativo dell'esone 9 che presentano

3'UTR diverse possono essere regolati in modo differente; la presenza dell'esone 9 e dell'introne 9 regola negativamente l'espressione del gene *reporter* della luciferasi (Wilson et al., 1999).

Mediante esperimenti di RT-PCR è stato identificato e localizzato anche un sito di *splicing* alternativo nella regione che comprende la fine del tratto codificante e l'inizio della 3'UTR di PLAUF; in questo modo può essere sintetizzata una proteina più corta di 23 aminoacidi all'estremità C-terminale. La funzione di questa proteina non è ancora nota e sono necessari ulteriori esperimenti per comprendere se la perdita di questi 23 aminoacidi possa compromettere l'interazione di PLAUF con i *partner* proteici o se la proteina deleta possa svolgere un qualche ruolo nella regolazione dell'attività della proteina *wild-type*.

Wagner e collaboratori (1998) avevano identificato e caratterizzato il gene che codifica per le proteine AUF1 nell'uomo, localizzato sul cromosoma 4 e caratterizzato da 10 esoni e 9 introni. Il gene per PLAUF è di almeno 10 kb ed è anch'esso organizzato in 10 esoni e 9 introni di differente lunghezza (Figura 20). Per gli esoni 1, 4, 5 e 6 la lunghezza e la posizione è esattamente conservata se ci si riferisce alla sequenza aminoacidica codificata. Invece gli esoni 2 e 3 di PLAUF costituiscono un unico esone nel caso delle AUF1, mentre la fine della regione codificante delle AUF1 umane deriva da 3 esoni invece che da due. Nel gene umano gli esoni 2, 7 e 9 possono essere eliminati mediante lo *splicing* alternativo, mentre invece in *P. lividus* abbiamo dimostrato che solo l'esone 9 che contiene il codone di stop può essere soggetto a *splicing* alternativo.

AUF1 nell'uomo è un fattore di regolazione chiave nell'espressione genica *in vivo*, per il ruolo che gioca nella regolazione dell'emivita dei trascritti; questa regolazione è

basata sull'interazione di proteine che legano mRNA con 3'UTR ricche in ARE, quali quelli codificanti per c-myc, c-jun, c-fos, GM-CSF e TNF α . Nel caso della regolazione del TNF α è stato dimostrato che, oltre la sequenza, anche la struttura secondaria a *stem-loop* assunta dalla 3'UTR del trascritto assume un ruolo di fondamentale importanza nel riconoscimento delle ARE-BPs (Fialcowitz et al., 2005).

Le isoforme p42 e p45 delle AUF1 sembrano inoltre avere una funzione di *shuttle* tra nucleo e citoplasma, con conseguente trasferimento al citoplasma degli mRNA ad esse legate (Suzuki et al., 2005). Nel caso del riccio di mare esperimenti precedenti avevano dimostrato che la proteina da 32 kDa, capace di legare la 3'UTR dell'istone H3.3, è presente nella frazione nucleare dell'estratto proteico da embrioni allo stadio di blastula e gastrula. Inoltre esperimenti preliminari di immunolocalizzazione su embrioni di riccio di mare *whole-mount* suggeriscono che la proteina PLAUF è presente anche nel citoplasma, ma che la sua localizzazione sia essenzialmente nucleare. Questi dati farebbero ipotizzare anche per PLAUF una funzione di *shuttle* tra nucleo e citoplasma.

AUF1 sembra essere in grado di promuovere o reprimere la tumorigenesi e questi dati rispecchiano la capacità di AUF1 di stabilizzare o destabilizzare gli mRNA (Wilson et al., 2003). Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che l'iperespressione di una delle isoforme di AUF1 con affinità maggiore per le ARE, p37 AUF1, modifica i livelli di molti mRNA contenenti ARE. L'aumento o la diminuzione dei livelli di espressione di tale proteina possono essere correlati con morte prematura, con l'insorgenza di tumori o con condizioni di *stress*; ciò avviene per limitazioni di aminoacidi nel caso della regolazione dell'emivita dell'mRNA per l'ATF3 (Activating Transcription Factor) (Pan et al., 2005) o

per pH acidi nel caso della regolazione del trascritto per la glutamminasi (Schroeder et al., 2005).

Per poter indagare sulla funzione biologica di PLAUF è stato necessario esprimere la proteina in un sistema batterico, clonando il cDNA di PLAUF nel vettore di espressione procariotico pGEX-2T sotto un promotore inducibile con IPTG: in questo sistema le proteine vengono espresse come proteine di fusione con la GST. La proteina di fusione GST-PLAUF di circa 60 kDa è stata purificata mediante cromatografia di affinità ed utilizzata nei saggi funzionali di legame e di stabilità.

Saggi di legame REMSA hanno dimostrato la capacità della proteina di fusione GST-PLAUF di legare specificamente una regione della 3'UTR dell'mRNA dell'istone H3.3 (Figura 23). Diversi esperimenti di legame hanno dimostrato che la proteina di fusione lega con affinità diversa tutti e tre i tratti della 3'UTR (PCR1, PCR2 e PCR3), anche se si lega alla regione PCR1 con più elevata efficienza. In base a questi esperimenti noi ipotizziamo che il legame sia influenzato oltre che dalla sequenza anche da eventuali strutture secondarie che l'mRNA può assumere, così come è stato dimostrato per il legame della p37 AUF1 umana al trascritto del TNF- α (Fialcowitz et al., 2005).

Sono stati eseguiti saggi di stabilità in lisati di reticolociti di coniglio, che hanno dimostrato che la proteina di fusione aumenta l'emivita *in vitro* del trascritto codificante l'istone H3.3, legando la 3'UTR (Figura 24). Ulteriori esperimenti sono necessari per conoscere *in vivo* la funzione biologica di PLAUF, in quanto in letteratura viene riportato che l'effetto delle proteine AUF1 è principalmente destabilizzante sui trascritti a cui esse si legano; l'effetto però dipende dai rapporti tra le diverse isoforme delle AUF1 e dall'interazione con i *partner* proteici.

Questi risultati dimostrano che PLAUF conserva con le proteine AUF1 parte della sequenza aminoacidica, l'organizzazione del gene e anche la funzione biologica. Tuttavia così come per le AUF1 vengono proposti numerosi mRNA *target* (Linguist et al., 2004; Hajarnis et al., 2005), ipotizziamo che anche PLAUF possa legare diversi trascritti. Inoltre non possiamo escludere che PLAUF sia coinvolta anche in altri meccanismi: nella localizzazione dei trascritti come è stato dimostrato per la proteina omologa alle AUF1 identificata in *Xenopus tropicalis* (Czaplinski et al., 2005); nel meccanismo di protezione dei telomeri (Enokizono et al., 2005) e nel trasporto degli mRNA maturi dal nucleo al citoplasma (Suzuki et al., 2005).

Mediante l'utilizzo del siero anti-PLAUF in esperimenti di *Western blotting* e di *Supershift*, è stato dimostrato che PLAUF corrisponde ad un fattore proteico di 32 kDa presente nell'estratto proteico totale di embrioni di riccio di mare allo stadio di gastrula (Figura 27) e nel complesso che lega *in vitro* il trascritto per l'istone H3.3 (Figura 28). Il peso molecolare della proteina PLAUF è ancora oggetto di studi, in quanto in base alla sequenza aminoacidica il suo peso molecolare può variare da 34 a 38 kDa; tale variazione è correlata al processo di *splicing* alternativo dell'esone 9 e all'utilizzo del primo o del secondo codone di inizio, nonostante la sequenza Kozak identifichi la prima metionina come quella di inizio. Inoltre la mobilità elettroforetica della proteina potrebbe essere alterata in quanto la composizione aminoacidica è certamente non casuale.

Esperimenti di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che i trascritti codificanti la proteina PLAUF e l'istone H3.3 colocalizzano in embrioni di riccio di mare allo stadio di blastula, gastrula e prisma (Figura 29), suggerendo che anche *in vivo* la proteina possa legare la 3'UTR del trascritto istonico influenzandone l'emivita. La localizzazione in

determinati tessuti dell'istone H3.3 è stata già dimostrata nell'uomo dove l'istone H3.3 è più espresso rispetto all'istone H3 nel rene adulto mentre nel cuore e fegato adulto avviene il contrario (Frank et al., 2003).

Sono necessari ulteriori esperimenti per approfondire attraverso quale meccanismo PLAUF possa regolare l'emivita del trascritto per l'istone H3.3; a questo scopo sarà importante conoscere quali sono i *partner* proteici di PLAUF, magari tra le *RNA-binding protein* di riccio di mare recentemente identificate (Rodriguez et al., 2005; Salaun et al., 2005). A questo proposito è importante sottolineare che precedenti esperimenti di gel-filtrazione dell'estratto proteico totale di embrioni di riccio di mare hanno dimostrato che la proteina da 32 kDa viene eluita nelle frazioni corrispondenti ad un peso molecolare superiore a 66 kDa, suggerendo che PLAUF faccia parte di un complesso.

I meccanismi più accettati in cui le ARE-BPs svolgono un ruolo fondamentale prevedono una degradazione dipendente dalla deadenilazione, come per il meccanismo proposto per la regolazione dell'emivita del GM-CSF (Carballo et al., 2000), o per il complesso dell'esosoma (Raijmakers et al., 2004); inoltre sono stati recentemente proposti in lievito meccanismi alternativi di degradazione indipendenti dalla deadenilazione (Badis et al., 2004).

Bibliografia

- Allain F.H., Bouvet P., Dieckmann T. and Feigon J.
“Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin”
EMBO J. (2000) **19**, 6870-81
- Arao Y., Kuriyama R., Kayama F. and Kato S.
“A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D”
Arch. Biochem. Biophys. (2000) **380**, 228-36
- Badis G., Saveanu C., Fromont-Racine M. and Jacquier A.
“Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping”
Mol. Cell. (2004) **15**, 1-2
- Bevilacqua A., Ceriani M.C., Capaccioli S. and Nicolini A.
“Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs”
J. Cell. Physiol. (2003) **195**, 356-72
- Blum J.L., Samarel A.M. and Mestral R.
“Phosphorylation and Binding of AUF1 to the 3' Untranslated Region of Cardiomyocyte SERCA2a mRNA”
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2005) **289**, 2543-50
- Brennan C.M. and Steitz J.A.
“HuR and mRNA stability”
Cell. Mol. Life Sci. (2001) **58**, 266-77
- Burd C.G. and Dreyfuss G.
“Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins”
Science (1994) **265**, 615-21
- Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S. and Cerami A.
“Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators”
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. (1986) **83**, 1670-4
- Carballo E., Lai W.S. and Blackshear P.J.
“Evidence that tristetrin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability”
Blood. (2000) **15**, 1891-9
- Chappell S.A., LeQuesne J.P., Paulin F.E., deSchoolmeester M.L., Stoneley M., Soutar R.L., Ralston S.H., Helfrich M.H. and Willis A.E.

“A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation”
Oncogene (2000) **19**, 4437-40

Chen C.Y. and Shyu A.B.
“AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation”
Trends Biochem. Sci. (1995) **20**, 465-70

Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L., Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M. and Karin M.
“AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs”
Cell (2001) **107**, 451-64

Chung S., Jiang L., Cheng S. and Furneaux H.
“Purification and properties of HuD, a neuronal RNA-binding protein”
J. Biol. Chem. (1996) **271**, 11518–24

Czaplinski K., Kocher T., Schelder M., Segref A., Wilm M. and Mattaj I.W.
“Identification of 40LoVe, a Xenopus hnRNP D family protein involved in localizing a TGF-beta-related mRNA during oogenesis”
Dev. Cell. (2005) **8**, 505-15

Dreyfuss G., Kim V.N. and Kataoka N.
“Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry”
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2002) **3**, 195-205

Enokizono Y., Konishi Y., Nagata K., Ouhashi K., Uesugi S., Ishikawa F. and Katahira M.
“Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D”
J. Biol. Chem. (2005) **280**, 18862-70

Fialcowitz E.J., Brewer B.Y., Keenan B.P. and Wilson G.M.
“A hairpin-like structure within an AU-rich mRNA-destabilizing element regulates trans-factor binding selectivity and mRNA decay kinetics”
J. Biol. Chem. (2005) **280**, 22406-17

Frank D., Doenecke D. and Albig W.
“Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes”
Gene (2003) **312**, 135-43

Fucci L., Aniello F., Branno M., Biffali E. and Geraci G.
“Isolation of a new histone variant cDNA of *P. lividus* sea urchin: sequence and embryonic expression”
Biochim. Biophys. Acta (1994) **1219**, 539– 42

Gallouzi I.E., Brennan C.M., Stenberg M.G., Swanson M.S., Eversole A., Maizels N., Steitz J.A.

“HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock”
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. (2000) **97**, 3073-8

Gao M., Wilusz C.J., Peltz S.W. and Wilusz J.

“A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements”
EMBO J. (2001) **20**, 1134-43

Graumann P. and Marahiel M.A.

“A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain”
Trends Biochem. Sci. (1998) **23**, 286-90

Grosset C., Chen C.Y., Xu N., Sonenberg N., Jacquemin-Sablon H. and Shyu A.B.

“A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex”
Cell (2000) **103**, 29-40

Hajarnis S., Schroeder J.M. and Curthoys N.P.

“3'-Untranslated region of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA contains multiple instability elements that bind AUF1”
J. Biol. Chem. (2005) **280**, 28272-80

Hall B.K.

“RNA-protein interactions”
Curr. Opin. Struct. Biol. (2002) **12**, 283-88

Kedersha N., Cho M.R., Li W., Yacono P.W., Chen S., Gilks N., Golan D.E. and Anderson P.

“Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules”
J. Cell Biol. (2000) **151**, 1257-68

Kiledjian M. and Dreyfuss G.

“Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box”
EMBO J. (1992) **11**, 2655-64

Kim C.Y., Paek S.H., Seo B.G., Kim J.H. and Han D.H.

“Changes in vascular responses of the basilar artery to acetylcholine and endothelin-1 in an experimental rabbit vasospasm model”
Acta Neurochir. (2003) **145**, 571-7

- La Cava A. and Albani S.
“Genetic immunization for the recovery and purification of recombinant proteins”
Protein Expr. Purif. (2000) **18**, 361-5
- Lagnado C.A., Brown C.Y. and Goodall G.J.
“AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A)”
Mol. Cell. Biol. (1994) **14**, 7984-95
- Lal A., Mazan-Mamczarz K., Kawai T., Yang X., Martindale J.L. and Gorospe M.
“Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs”
EMBO J. (2004) **23**, 3092-102
- Larويا G., Cuesta R., Brewer G., Schneider R.J.
“Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway”
Science (1999) **284**, 499-502
- Larويا G. and Schneider R.J.
“Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms”
Nucleic Acids Res. (2002) **30**, 3052-8
- Lee J.H., Jeon M.H., Seo Y.J., Lee Y.J., Ko J.H., Tsujimoto Y. and Lee J.H.
“CA repeats in the 3'-untranslated region of bcl-2 mRNA mediate constitutive decay of bcl-2 mRNA”
J. Biol. Chem. (2004) **279**, 42758-64
- Lindquist J.N., Parsons C.J., Stefanovic B. and Brenner D.A.
“Regulation of alpha1(I) collagen messenger RNA decay by interactions with alphaCP at the 3'-untranslated region”
J. Biol. Chem. (2004) **279**, 23822-9
- Liu Q. and Dreyfuss G.
“*In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins”
Mol. Cell. Biol. (1995) **15**, 2800-08
- Maruyama K., Sato N., and Otha N.
“Conservation of structure and cold regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins”
Nucleic Acid Res. (1999) **27**, 2029-36
- Muhlrad D. and Parker R.
“Premature translational termination triggers mRNA decapping”
Nature (1994) **370**, 578-81

- Mukherjee D., Gao M., O'Connor J.P., Raijmakers R., Pruijn G., Lutz C.S. and Wilusz J.
“The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements”
EMBO J. (2002) **21**, 165-74
- Okumura N., Saji S., Eguchi H., Nakashima S., Saji S. and Hayashi S.
“Distinct promoter usage of mdm2 gene in human breast cancer”
Oncol. Rep. (2002) **9**, 557-63
- Osborne H.B.
“An insight into the post-transcriptional control of gene expression in cell function”
Biol. Cell. (2003) **95**, 125-7
- Ostareck-Lederer A., Ostareck D.H. and Hentze M.W.
“Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2”
Trends Biochem. Sci. (1998) **23**, 409-11
- Pan Y.X., Chen H. and Kilberg M.S.
“Interaction of RNA-binding proteins HuR and AUF1 with the human ATF3 mRNA 3'-untranslated region regulates its amino acid limitation-induced stabilization”
J. Biol. Chem. (2005) **280**, 34609-16
- Park S., Myszka D.G., Yu M., Littler S.J. and Laird-Offringa I.A.
“HuD RNA recognition motifs play distinct roles in the formation of a stable complex with AU-rich RNA”
Mol. Cell. Biol. (2000) **20**, 4765-72
- Pesole G., Liuni S., Grillo G., Licciulli F., Mignone F., Gissi C. and Saccone C.
“UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002”
Nucleic Acids Res. (2002) **30**, 335-40
- Pulcrano G., Leonardo R., Aniello F., Mancini P., Piscopo M., Branno M. and Fucci L.
“PLAUF is a novel *P. lividus* sea urchin RNA-binding protein”
Gene (2005) **347**, 99-107
- Pulcrano G., Leonardo R., Piscopo M., Nargi E., Locascio A., Aniello F., Branno M. and Fucci L.
“PLAUF binding to the 3'UTR of the H3.3 histone transcript affects mRNA stability”
In preparation
- Raijmakers R., Schilders G. and Pruijn G.J.
“The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm”

Eur. J. Cell. Biol. (2004) **83**, 175-83

Raineri I., Wegmueller D., Gross B., Certa U. and Moroni C.
“Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference”
Nucleic Acids Res. (2004) **32**, 1279-88

Rodriguez A.J., Seipel S.A., Hamill D.R., Romancino D.P., DI Carlo M., Suprenant K. and Bonder E.M.
“Seawi-a sea urchin piwi/argonaute family member is a component of MT-RNP complexes”
RNA (2005) **11**, 646-56

Sagesser R., Martinez E., Tsagris M. and Tabler M.
“Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of cDNA expression library”
Nucleic Acids Res. (1997) **25**, 3816-22

Salaun P., Boulben S., Mulner-Lorillon O., Belle R., Sonenberg N., Morales J. and Cormier P.
“Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos”
J. Cell. Sci. (2005) **118**, 1385-94

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.
“Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition” Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Cold Spring Harbor, NY.

Schiavone N., Rosini P., Quattrone A., Donnini M., Lapucci A., Citti L., Bevilacqua A., Nicolin A. and Capaccioli S.
“A conserved AU-rich element in the 3' untranslated region of bcl-2 mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in bcl-2 down-regulation during apoptosis”
FASEB J. (2000) **14**, 174-84

Schroeder J.M., Ibrahim H., Taylor L. and Curthoys N.P.
“Role of deadenylation and AUF1 binding in the pH-responsive stabilization of glutaminase mRNA”
Am. J. Physiol. Renal. Physiol. (2005) (In press)

Shamoo Y., Abdul-Manan N. and Williams K.R.
“Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up”
Nucleic Acids Res. (1995) **23**, 725-28

Shaw G. and Kamen R.

“A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation”
Cell (1986) **46**, 659-67

Shumperli D.
“Cell-cycle regulation of histone gene expression”
Cell (1986) **45**, 471-72

Sommerville J.
“Activities of cold-shock domain proteins in translation control”
Bioessays (1999) **21**, 319-25

Suzuki M., Iijima M., Nishimura A., Tomozoe Y., Kamei D. and Yamada M.
“Two separate regions essential for nuclear import of the hnRNP D nucleocytoplasmic shuttling sequence”
FEBS J.(2005) **272**, 3975-87

van Hoof A. and Parker R.
“Messenger RNA degradation: beginning at the end”
Curr. Biol. (2002) **12**, 285-7

Vasudevan S. and Peltz S.W.
“Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*”
Mol. Cell. (2001) **7**, 1191-200

Wagner B.J., DeMaria C.T., Sun Y., Wilson G.M. and Brewer G.
“Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms”
Genomics (1998) **48**, 195-202

Wang J., Dong Z. and Bell L.R.
“Sex-lethal interactions with protein and RNA”
J. Biol. Chem. (1997) **272**, 22227-35

Weighardt F., Biamonti G. and Riva S.
“The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism”
Bioessays (1996) **18**, 747-56

Wilson G.M., Sun Y., Sellers J., Lu H., Penkar N., Dillard G. and Brewer G.
“Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region”
Mol. Cell. Biol. (1999) **19**, 4056-64

Wilson G.M., Lu J., Sutphen K., Sun Y., Huynh Y. and Brewer G.

“Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1”

J. Biol. Chem. (2003) **278**, 33029-38

Wilson G.M., Lu J., Sutphen K., Suarez Y., Sinha S., Brewer B., Villanueva-Feliciano E.C., Ysla R.M., Charles S. and Brewer G.

“Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure”

J. Biol. Chem. (2003) **278**, 33039-48

Xu N., Chen C.Y. and Shyu A.B.

“Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay”

Mol. Cell. Biol. (1997) **17**, 4611-21

Yaman I., Fernandez J., Sarkar B., Schneider R.J., Snider M.D., Nagy L.E. and Hatzoglou M.

“Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR”

J. Biol. Chem. (2002) **277**, 41539-46

Zubiaga A.M., Belasco J.G. and Greenberg M.E.

“The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation”

Mol. Cell. Biol. (1995) **15**, 2219-30