

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie

XXVII ciclo

**Ruolo dei fattori trascrizionali Abf1 e Fhl1
nella regolazione dei geni per proteine ribosomiali
in *Saccharomyces cerevisiae***

Beatrice Fermi

Dipartimento di Bioscienze

Coordinatore:

Prof. Nelson Marmioli

Tutor:

Prof. Giorgio Dieci

2012-2014

***Ad Ave e Giovanni, che mi sostengono sempre;
ad Angela e Faustino, che sempre vegliano su di me.***

INDICE

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. Il ribosoma: il macchinario cellulare responsabile della sintesi proteica	5
1.1.1. La biogenesi del ribosoma in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : uno sguardo d'insieme	8
1.1.2. Risvolti energetici e principi di regolazione della biogenesi del ribosoma.....	12
1.2. In <i>S. cerevisiae</i> la sintesi del ribosoma è regolata a livello trascrizionale.....	14
1.2.1. L'RNA polimerasi I e la trascrizione dell'rDNA.....	15
La regolazione dell'espressione dell'rDNA prevede differenti strategie.....	20
1.2.2. L'RNA polimerasi III trascrive il 5S rRNA e lo snoRNA snR52	24
Meccanismi di regolazione dell'RNA Polimerasi III.....	27
1.2.3. L'RNA polimerasi II: meccanismi generali di regolazione della trascrizione.....	29
La regolazione trascrizionale dei geni codificanti per snoRNA.....	34
Principi di regolazione e co-regolazione dei geni <i>ribi</i>	37
Il quadro regolativo dei geni codificanti per proteine ribosomiali	43
2. SCOPO DELLA RICERCA	55
3. RISULTATI.....	59
3.1. I promotori dei geni <i>RPL3</i> , <i>RPL4B</i> , <i>RPP1A</i> , <i>RPS22B</i> , <i>RPS28A</i> e <i>RPS28B</i> contengono un sito di legame per Fhl1.....	61
3.1.1. Il gene <i>RPL3</i>	62
3.1.2. Il gene <i>RPL4B</i>	63
3.1.3. Il gene <i>RPP1A</i>	65
3.1.4. Il gene <i>RPS22B</i>	66
3.1.5. I geni <i>RPS28A</i> e <i>RPS28B</i>	68
3.2. Analisi <i>in vivo</i> dell'associazione di Abf1 e Fhl1 ai promotori dei geni RP	70

3.2.1. Abf1 è associato ai promotori dei geni <i>RPL3</i> , <i>RPP1A</i> , <i>RPS22B</i> , <i>RPS28A</i> e <i>RPS28B</i>	71
3.2.2. Costruzione e analisi mediante ChIP-qPCR del ceppo Fhl1-13myc.....	73
3.3. Studio <i>in vivo</i> degli effetti della mutagenesi dei promotori sull'espressione genica ..	76
3.3.1. Costruzione dei mutanti genomici del promotore	76
3.3.2. Analisi dei livelli di espressione genica nei mutanti genomici del promotore....	78
L'espressione di <i>RPL4B</i> e <i>RPP1A</i> risente in maniera simile delle diverse mutazioni del promotore.....	80
L'espressione di <i>RPS28B</i> è influenzata dalla mutazione del sito di legame di Abf1, ma non da quella del sito di legame per Fhl1	84
Effetti di espressione inattesi nei mutanti del promotore di <i>RPS22B</i>	86
3.4. Analisi <i>in vitro</i> dell'interazione tra i promotori dei geni RP e le proteine Abf1 e Fhl1	91
3.4.1. Clonaggio, espressione e purificazione di Fhl1 e dei suoi frammenti.....	92
3.4.2. Clonaggio, espressione e purificazione della proteina Abf1.....	97
3.4.3. Saggi di mobilità elettroforetica (EMSA).....	98
Il dominio FH di Fhl1 lega in maniera sequenza-specifica i promotori di <i>RPL4B</i> , <i>RPP1A</i> , <i>RPS22B</i> e <i>RPS28B</i>	99
Saggi preliminari dell'interazione tra Fhl1, Abf1 e i promotori dei geni RP	100
4. DISCUSSIONE.....	105
5. MATERIALI E METODI.....	117
5.1. Ceppi di lievito	119
5.2. Analisi <i>in silico</i> dei promotori dei geni RP.....	120
5.3. Costruzione del ceppo Fhl1-13myc.....	120
5.4. Immunoprecipitazione cromatinica e PCR quantitativa.....	122
5.4.1. Immunoprecipitazione cromatinica.....	122
5.4.2. PCR quantitativa	123
5.5. Costruzione e analisi di espressione dei mutanti genomici.....	125
5.5.1. <i>Gene disruption</i>	125

5.5.2. <i>Gene replacement</i>	127
5.5.3. Analisi dei livelli di espressione nei mutanti genomici del promotore.....	130
5.6. Clonaggio, espressione e purificazione di Abf1, Fhl1 e delle proteine “FH”, “FHA-FH” e “FHA-734”	132
Clonaggio, espressione e purificazione della proteina Fhl1 con doppio tag.....	134
5.7. Saggi di mobilità elettroforetica (EMSA)	136
5.7.1. Preparazione delle sonde di DNA radiomarcate.....	136
5.7.2. Reazioni di legame.....	138
5.7.3. Gel elettroforesi in condizioni native.....	138
6. BIBLIOGRAFIA.....	141
APPENDICE	169

RIASSUNTO

La costruzione di nuovi ribosomi costituisce per ogni cellula un importante investimento energetico, necessario per assicurare l'elevata capacità di sintesi proteica richiesta quando le condizioni di crescita sono in grado di sostenere un'intensa attività metabolica. Dato il notevole dispendio di energia che comporta, la biogenesi del ribosoma deve essere invece tempestivamente repressa in caso di stress o di carenza di nutrienti, in modo da permettere la sopravvivenza delle cellule grazie all'indirizzamento delle scarse risorse disponibili verso le esigenze metaboliche imposte dal cambiamento delle condizioni di crescita.

In *Saccharomyces cerevisiae*, diversamente dalla maggior parte degli altri eucarioti, i meccanismi che consentono la modulazione della biogenesi dei ribosomi agiscono prevalentemente attraverso il controllo trascrizionale coordinato degli oltre 750 geni i cui prodotti sono coinvolti, con funzioni strutturali e non, in questo processo biosintetico. Le strategie regolative richiedono l'intervento di numerosi fattori specifici per ogni classe di geni e permettono il controllo concertato dell'attività di tutte e tre le RNA Polimerasi nucleari. Differenti vie di segnalazione cellulare esercitano un preciso controllo sui diversi regolatori trascrizionali in modo che ogni singolo gene risulti finemente regolato in base alle esigenze della cellula e in maniera coordinata rispetto a tutti gli altri che partecipano alla biogenesi del ribosoma.

Numerosi studi hanno finora contribuito alla comprensione degli aspetti regolativi che assicurano il controllo della maggior parte dei 138 geni codificanti per le 79 proteine ribosomiali, i cui promotori presentano siti di legame per il *General Regulatory Factor* Rap1. Il presente lavoro di tesi si propone invece di contribuire alla individuazione e caratterizzazione degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi della classe decisamente meno numerosa di geni Rap1-indipendenti, il cui promotore contiene la sequenza riconosciuta da un altro GRF, la proteina Abf1.

Grazie ad un iniziale approccio *in silico* basato sull'analisi filogenetica delle regioni a monte di questi geni, è stato possibile identificare gli elementi che accomunano l'architettura dei promotori di *RPL3*, *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B*: il sito di legame per Abf1, un tratto poli(dT) e una sequenza corrispondente al sito di legame per Fhl1, regolatore chiave dei geni RP, situata tra i due elementi precedentemente citati. Attraverso successivi esperimenti *in vivo* ed *in vitro* sono state ottenute conferme dell'associazione dei regolatori

Abf1 e Fhl1 ad alcuni di questi promotori. Un primo passo verso l'approfondimento dei meccanismi di regolazione trascrizionale dei geni considerati è stato compiuto grazie alla costruzione e all'analisi di espressione di mutanti genomici del promotore: i risultati ottenuti evidenziano il ruolo svolto da Abf1 nell'attivazione trascrizionale di questi geni in condizioni di crescita ottimali e suggeriscono anche un suo possibile contributo al reclutamento di Fhl1.

Le analisi condotte hanno inoltre sottolineato la particolarità del gene *RPS22B*, che ospita in uno dei suoi due introni la sequenza codificante per lo snoRNA snR44. A monte di questo gene è stato identificato un sito di legame per il regolatore Tbf1, la cui presenza potrebbe rappresentare il residuo evolutivo di un precedente assetto regolativo dei geni per proteine ribosomiali, o potrebbe essere richiesta per la regolazione del gene *SNR44*.

1. INTRODUZIONE

1.1. Il ribosoma: il macchinario cellulare responsabile della sintesi proteica

La traduzione è il processo biochimico che mediante la conversione della sequenza nucleotidica di ogni RNA messaggero (mRNA) nella corrispondente sequenza polipeptidica permette di decodificare le informazioni contenute nel genoma per generare il proteoma cellulare.

Il ribosoma è il macchinario cellulare specializzato che esegue tale conversione provvedendo alla sintesi proteica, processo fondamentale per la vita di tutti gli organismi. Questo complesso ribonucleoproteico è di fatto un ribozima che svolge la propria funzione generando una piattaforma molecolare ottimale per l'interazione tra aminoacil-tRNA e mRNA e catalizzando la reazione di formazione del legame peptidico (Schmeing and Ramakrishnan, 2009).

Dal punto di vista strutturale, il ribosoma è composto da due subunità asimmetriche di dimensioni differenti: quella maggiore (50S in *Bacteria* e *Archaea*, 60S negli eucarioti) ospita il sito attivo ed è quindi responsabile dell'attività catalitica peptidil-trasferasica (Simonović and Steitz, 2009), quella minore (30S in *Bacteria* e *Archaea*, 40S negli eucarioti) costituisce invece il centro di decodificazione, a livello del quale si verifica l'interazione tra codone dell'mRNA e anticodone del tRNA, e svolge pertanto un ruolo cruciale per la fedeltà del processo di traduzione (Ogle and Ramakrishnan, 2005; Zaher and Green, 2009).

Nei procarioti (si consideri come riferimento *Escherichia coli*), la subunità maggiore è costituita da 2 molecole di rRNA (5S e 23S) e da 34 proteine ribosomiali (r-proteine), mentre la controparte eucariotica (considerando come esempio *Saccharomyces cerevisiae*, poiché esistono differenze interspecifiche tra gli stessi *Eukarya*) comprende 3 molecole di rRNA (5S; 5.8S e 25S) e 46 r-proteine. La subunità minore è composta invece dall'rRNA 16S e da 21 r-proteine nel ribosoma batterico e dall'rRNA 18S associato a 33 r-proteine nel ribosoma di lievito (Lafontaine and Tollervey, 2001).

Come suggerito dalla universalità della funzione svolta e come dimostrato da studi genetici ed evidenze strutturali, i ribosomi batterici ed eucariotici condividono un nucleo comune comprendente 34 r-proteine (15 situate nella subunità minore e 19 appartenenti alla subunità maggiore) e circa 5500 basi di RNA che danno vita ai principali centri funzionali del ribosoma (Melnikov *et al.*, 2012). Essi comprendono il sito A, destinato all'interazione con la molecola di aminoacil-tRNA, il sito P, in cui è alloggiato il tRNA che porta la catena

polipeptidica nascente, e il sito E, a livello del quale i tRNA scarichi si distaccano dal ribosoma. A questi si aggiungono i già citati sito di decifrazione e centro peptidil-trasferasico: queste due regioni sono sepolte nel *core* del ribosoma e comunicano con l'esterno mediante il canale che permette il passaggio dell'mRNA, situato nella subunità minore, e mediante il tunnel che si estende lungo il corpo della subunità maggiore attraverso il quale fuoriesce la catena polipeptidica nascente.

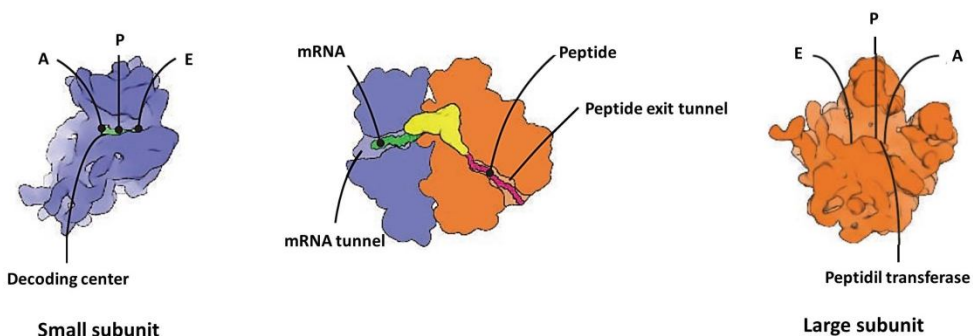


Figura 1.1. Rappresentazione schematica del nucleo evolutivamente conservato del ribosoma. A livello delle subunità minore (in azzurro) e maggiore (in arancione) sono indicati i siti funzionalmente rilevanti: il sito di decifrazione, dove si verifica l'interazione tra codone dell'mRNA e anticodone del tRNA, i siti A, P ed E, destinati ad alloggiare, rispettivamente, l'aminoacil-tRNA, il t-RNA che lega la catena polipeptidica in allungamento e il t-RNA scarico che deve essere rilasciato, il sito catalitico con attività peptidil-trasferasica. Vengono rappresentati anche l'mRNA (in verde) e il corrispondente tunnel, la catena polipeptidica nascente (in fucsia) e il canale attraverso il quale esso fuoriesce dal ribosoma (adattata dal Melnikov *et al.*, 2012).

La forma generale di questo nucleo universalmente conservato del ribosoma è determinata principalmente dalla struttura degli rRNA, che contribuiscono anche alla maggior parte della massa e che, come ormai ampiamente comprovato sia con studi biochimici che con evidenze strutturali (Nissen *et al.*, 2000), sono responsabili dell'attività catalitica che permette la formazione del legame peptidico. Se a ciò si aggiunge il fatto che anche il processo di decifrazione e la sua accuratezza dipendono in larga misura dalla capacità dell'rRNA della subunità minore di riconoscere il corretto appaiamento codone-anticodone (Ogle *et al.*, 2001) si può facilmente intuire come la funzione principale delle r-proteine sia quella di stabilizzare la compatta struttura in cui si organizzano gli rRNA: estendendosi dalla superficie a contatto con il solvente fino alla regione più interna del ribosoma, dove sono localizzate le molecole di RNA, le proteine ribosomiali formano estese interazioni con queste ultime, riducendo le forti repulsioni tra le cariche negative dei fosfati grazie alla

frequente presenza di estesi prolungamenti ricchi in aminoacidi basici che si avvolgono attorno agli rRNA (Lafontaine and Tollervey, 2001). Numerosi studi evidenziano inoltre un ruolo specifico e spesso essenziale di numerose proteine ribosomiali nell'ambito del processo di maturazione e assemblaggio del ribosoma (Woolford and Baserga, 2013). È da considerare infine l'idea che, creando un collegamento fisico tra le regioni superficiali e centrali del ribosoma, le r-proteine possono contribuire alla formazione di siti di legame per fattori implicati nella biogenesi del ribosoma e nella traduzione.

Dal confronto tra la struttura del ribosoma batterico, già ampiamente caratterizzata, con i più recenti dettagli strutturali relativi al ribosoma eucariotico, ottenuti sia da studi di *cryo-EM* (Armache *et al.*, 2010 a; Armache *et al.*, 2010 b) che da analisi cristallografiche (Ben-Shem *et al.*, 2011) è possibile apprezzare come il ribosoma, a partire dal *core* comune fin qui considerato, si sia accresciuto nel corso dell'evoluzione in dimensioni e complessità, sia per effetto dell'aggiunta di proteine ribosomiali specifiche degli eucarioti, sia in virtù della comparsa dei cosiddetti *expansion segments* (ES) negli rRNA e di estensioni ed inserzioni aggiuntive nelle r-proteine facenti parte del *core* (Melnikov *et al.*, 2012).

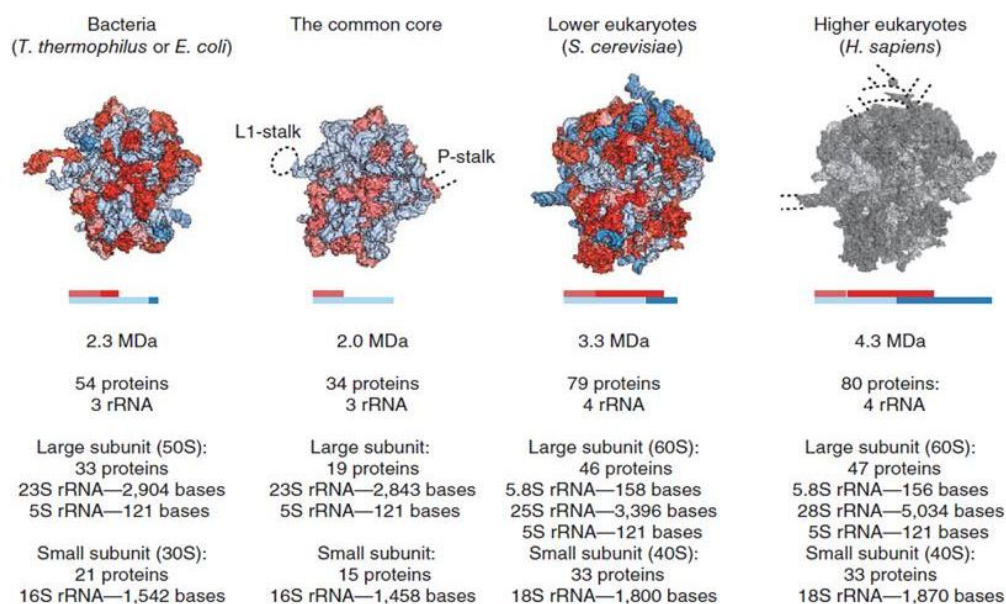


Figura 1.2. Rappresentazione grafica del core evolutivamente conservato del ribosoma, messo a confronto con il ribosoma batterico e con quelli eucariotici. Per la rappresentazione degli RNA, è stato utilizzato l'azzurro chiaro per le porzioni conservate e l'azzurro scuro per quelle specifiche dei diversi organismi. Similmente, sono state rappresentate in rosso chiaro le componenti proteiche comuni e in rosso intenso quelle specifiche dei diversi ribosomi (adattato da Melnikov *et al.*, 2012).

La maggior parte di queste porzioni specifiche degli eucarioti (aventi nel complesso una massa di circa 1,35 MDa) sono localizzate a livello della superficie del ribosoma, formando una sorta di involucro attorno al *core*, e all'interfaccia tra le due subunità, dove contribuiscono alla formazione di ponti intersubunità aggiuntivi rispetto a quelli presenti nel ribosoma batterico.

Il più elevato grado di complessità del ribosoma eucariotico è chiaramente correlato alla maggiore complessità della sua biogenesi e della regolazione della sua attività: per questo motivo si ritiene che gli elementi specifici del ribosoma 80S possano essere necessari per alcune fasi dell'assemblaggio del ribosoma e/o per il trasporto nucleo-citoplasmatico o possano servire per l'interazione con specifici attori e regolatori delle fasi di inizio, allungamento, terminazione e reinizio della traduzione (Dresios *et al.*, 2006; Melnikov *et al.*, 2012).

1.1.1. La biogenesi del ribosoma in *Saccharomyces cerevisiae*: uno sguardo d'insieme

Una cellula di lievito possiede mediamente 200000 ribosomi: se si considera che il suo tempo di replicazione è di circa 100 minuti, si può facilmente calcolare che la velocità di produzione di ribosomi necessaria per assicurare alla cellula figlia un adeguato corredo di macchinari per la sintesi proteica è dell'ordine di 2000 ribosomi al minuto (Warner, 1999). Questa notevole processività risulta ancora più sorprendente quando si considera l'elevata complessità del processo di biogenesi del ribosoma, un evento a cui prendono parte numerosi fattori, articolato in diversi passaggi che si snodano secondo una sequenza temporale non ancora del tutto chiarita e lungo una distribuzione spaziale che coinvolge differenti compartimenti cellulari (Woolford and Baserga, 2013).

Scenario principale della biogenesi del ribosoma è il sottocompartimento nucleare noto come nucleolo (Gerbi *et al.*, 2003), che prende forma attorno alle unità trascrizionali ripetute dell'rDNA localizzate sul cromosoma XII, definendosi ed accrescendosi proprio come conseguenza della progressiva trascrizione e maturazione dell'rRNA (Mélèse and Xue, 1995; Thiry and Lafontaine, 2005).

Comune è l'evento da cui ha inizio la costruzione di entrambe le subunità del ribosoma: la RNA Polimerasi I (Pol I) trascrive il precursore 35S pre-rRNA, da cui si originano gli rRNA 18S, 5.8S e 25S; l'rRNA 5S viene invece trascritto in maniera indipendente, ad opera della RNA Polimerasi III (Pol III).

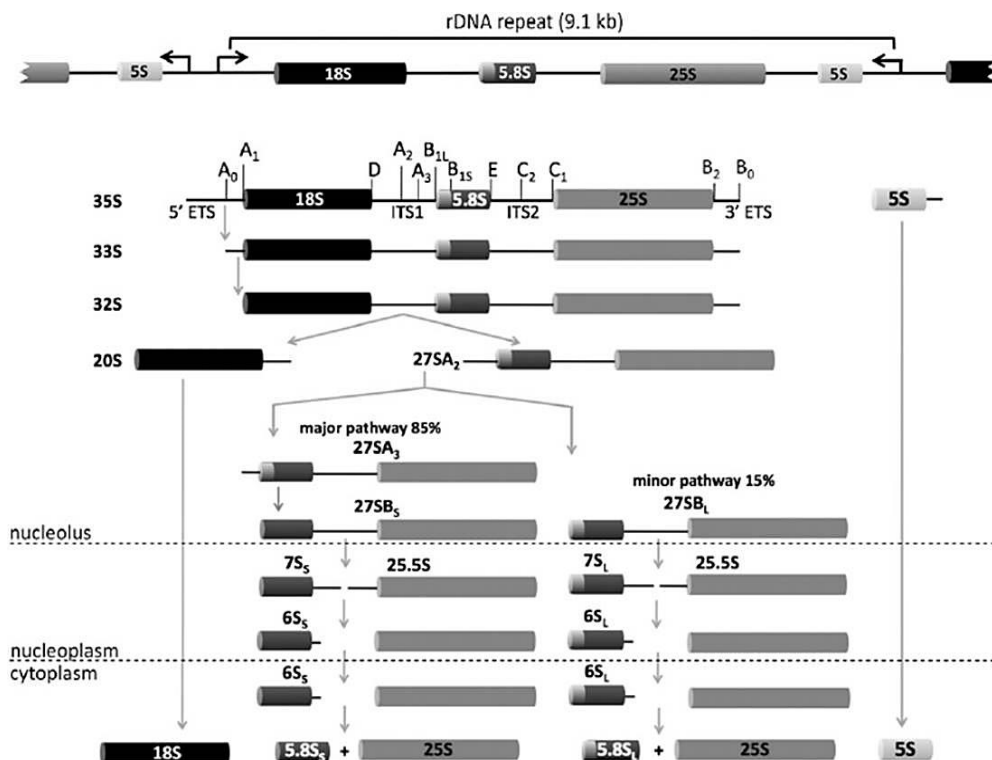


Figura 1.3. Fasi del processamento del pre-rRNA in lievito. Il precursore 35S pre-rRNA è trascritto dalla RNA Polimerasi I e contiene le sequenze corrispondenti agli rRNA 18S (in nero), 5.8S (in grigio scuro) e 25S (in grigio chiaro), fiancheggiate e separate dagli *spacers* esterni (ETS) ed interni (ITS). Il pre-rRNA 5S (in bianco) è trascritto dalla RNA Polimerasi III (adattato da Woolford and Baserga, 2013).

Come messo in evidenza per la prima volta nel 1969 con immagini di microscopia elettronica (Miller and Beatty, 1969), all'estremità 5' del nascente 35S pre-rRNA è possibile distinguere una struttura tondeggiante, probabilmente corrispondente al complesso noto come *90S-small subunit processome*, composto da una serie di proteine ribosomiali e fattori di assemblaggio che si legano precocemente all'rRNA già durante le fasi iniziali della sua trascrizione (Kressler *et al.*, 2010).

Queste osservazioni concordano con l'idea ormai consolidata che per la maggior parte delle molecole di pre-rRNA il processo di maturazione e la conseguente costruzione delle particelle ribonucleoproteiche (RNP) avvengano in larga misura in modo co-trascrizionale (Kos and Tollervey, 2010; Turowski and Tollervey, 2014).

Contemporanea alla trascrizione è, ad esempio, la modificazione chimica del pre-rRNA operata dai piccoli complessi ribonucleoproteici nucleolari (snoRNP), che catalizzano la 2'-

O-ribosio metilazione e la pseudouridilazione di sequenze aventi una specifica importanza funzionale nell'rRNA del ribosoma maturo (Decatur and Fournier, 2002). Le snoRNP sono classificate come H/ACA box o C/D box sulla base di specifici elementi di sequenza dello snoRNA che contengono, il quale è necessario per l'interazione con il pre-rRNA che guida l'enzima e il resto della snoRNP nel riconoscimento del sito da pseudouridilare o metilare. Prevalentemente co-trascrizionale sembra essere anche l'evento di taglio endonucleolitico che separa temporaneamente il destino delle due subunità (Osheim *et al.*, 2004): il taglio che avviene a livello di una delle regioni *spacers* interne (ITS1) del 35S pre-rRNA divide infatti il 20S pre-rRNA (precursore dell'rRNA 18S) dal 27SA₂ pre-rRNA, precursore degli rRNA 5.8S e 25S. In generale, il processamento del primo e l'assemblaggio del corrispondente complesso pre-40S è più semplice e meglio definito nelle sue fasi, mentre il processamento dell'altro si articola in vari passaggi, comprendenti peraltro due pathways alternativi, cosicché anche l'assemblaggio del corrispondente complesso pre-60S prevede più step, alcuni dei quali ancora non del tutto elucidati (Woolford and Baserga, 2013). Ciò che accumuna i distinti pathway di assemblaggio delle due subunità è il progressivo legame con la maggior parte delle rispettive r-proteine, spesso necessarie per la corretta successione dei passaggi di processamento, e con i numerosi altri fattori specifici coinvolti nelle varie fasi di maturazione.

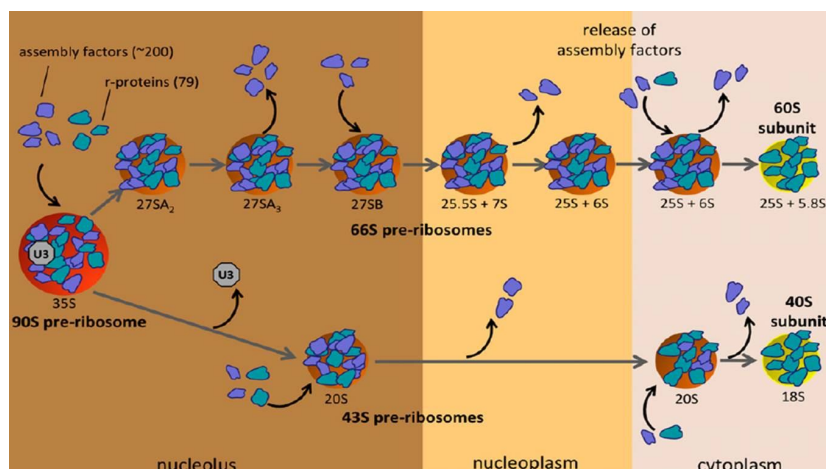


Figura 1.4. Pathway di maturazione dei pre-ribosomi che porta alla formazione delle subunità 40S e 60S. La maggior parte delle r-proteine (in turchese) e molti dei fattori di assemblaggio (in lilla) si associano precocemente con i precursori delle due subunità a livello nucleolare. Alcuni fattori di assemblaggio si associano invece in seguito, a livello nucleoplasmatico o citoplasmatico. Il rilascio dei vari fattori avviene a diversi livelli nel corso della maturazione (adattato da Woolford and Baserga, 2013).

Nel complesso, le proteine non ribosomiali che partecipano alla biogenesi del ribosoma in qualità di fattori assemblaggio sono più di 200 e comprendono, oltre ad endo- ed esonucleasi essenziali per il processamento degli rRNA, anche vari enzimi che modificano chimicamente l'rRNA, RNA elicasi/ATPasi, AAA ATPasi, GTPasi, chinasi e fosfatasi, proteine leganti l'rRNA, proteine "scaffold" e alcune proteine omologhe a proteine ribosomiali (Fatica and Tollervey, 2002; Kressler *et al.*, 2010).

L'intervento delle RNA elicasi è richiesto per permettere il rimodellamento delle RNP attraverso la destabilizzazione di particolari interazioni RNA:RNA o RNA:proteine, per imporre al pre-rRNA una disposizione ottimale per l'azione di endo- ed esonucleasi e per favorire il rilascio delle snoRNP. In generale, quindi, esse promuovono riarrangiamenti strutturali che, essendo accoppiati all'idrolisi di ATP, conferiscono una precisa direzionalità al processo di assemblaggio (Staley and Woolford, 2009).

Analoga è la funzione svolta dalle AAA ATPasi, che permettono il rilascio dai pre-ribosomi dei fattori agenti nel corso della biogenesi, permettendo così i cambiamenti necessari alle fasi di maturazione successive: è noto infatti che la composizione dei complessi di assemblaggio varia in maniera significativa nel corso del processo, generalmente andando verso particelle pre-ribosomiali con un numero sempre minore di componenti.

Come accennato inizialmente, la biogenesi del ribosoma non si esaurisce a livello di nucleolo e nucleoplasma: un passaggio cruciale di questo processo è l'esportazione nel citoplasma (Tschochner and Hurt, 2003), dove avvengono le ultime fasi dell'assemblaggio. Questo processo deve permettere il transito selettivo attraverso i pori nucleari di complessi pre-40S e pre-60S completi e correttamente assemblati. Il macchinario di esportazione comprende un recettore nucleare, una Ran-GTPasi e numerose nucleoporine (Stage-Zimmermann *et al.*, 2000; Moy and Silver, 2002), che rendono possibile il passaggio dei preribosomi, la cui superficie è fortemente idrofilica, attraverso la fitta trama di *FG-repeats* che riveste il canale del poro nucleare. Il contestuale controllo del corretto assemblaggio dei due complessi pre-ribosomiali è assicurato dal fatto che il legame dei fattori necessari all'esportazione dipende strettamente dall'acquisizione della specifica architettura da parte delle RNP (Sengupta *et al.*, 2010; Greber *et al.*, 2012).

Una volta esportate nel citoplasma, le nascenti subunità 40S e 60S concludono il loro processo di maturazione con le fasi finali di processamento dei pre-rRNA (Mitchell *et al.*, 1996; Pertschy *et al.*, 2009), l'associazione delle ultime r-proteine e il rilascio e riciclo dei

fattori di assemblaggio ancora associati, favorito dall'intervento di varie NTPasi (Woolford and Baserga, 2013). Il processo è orchestrato in maniera tale che nel corso di questi passaggi conclusivi di maturazione del ribosoma siano impediti l'associazione con subunità neo-esportate ancora inattive e il prematuro avvio di eventi di traduzione: ciò è garantito dal posizionamento di alcuni dei fattori di assemblaggio tardivi a livello di regioni delle subunità pre-40S e pre-60S situate all'interfaccia tra le due nel ribosoma maturo (Gartmann *et al.*, 2010) e in corrispondenza di siti funzionali coinvolti nelle fasi di inizio del processo di traduzione (Strunk *et al.*, 2011).

È infine interessante notare che le ultime fasi della maturazione prevedono un controllo della "competenza" del ribosoma per lo svolgimento della sua funzione, grazie ad una serie di passaggi che "mimano" alcune fasi essenziali del ciclo di traduzione, come l'assemblaggio e la dissociazione delle due subunità e il legame con alcuni fattori della traduzione, e che verifica l'integrità di siti fondamentali quali il sito P e il sito di attivazione GTPasico (Bussiere *et al.*, 2012).

1.1.2. Risvolti energetici e principi di regolazione della biogenesi del ribosoma

La sintesi di nuovi ribosomi, condizione necessaria per assicurare un'adeguata produzione di proteine, è un requisito essenziale per l'accrescimento e lo sviluppo della cellula: per questo, sebbene classicamente considerata come funzione "*house keeping*", la biogenesi del ribosoma trova una più efficace definizione nel concetto di processo "*house building*" (Leimpiäinen and Shore, 2009).

Sintetizzare ribosomi, d'altro canto, rappresenta per la cellula un notevole impegno di energie, poiché richiede il consumo della maggior parte delle risorse metaboliche: questo processo quindi risulta fortemente rappresentativo della capacità di crescita della cellula, che deve scegliere di fare un investimento così oneroso per il proprio bilancio energetico solo quando le condizioni di crescita siano tali da giustificarlo.

Per comprendere l'entità dei costi connessi alla biogenesi del ribosoma è sufficiente considerare alcune cifre particolarmente significative (Warner, 1999). In una cellula di lievito in rapida crescita, gli rRNA rappresentano l'80% dell'acido nucleico totale, e la loro trascrizione ad opera della Pol I corrisponde al 60% della trascrizione cellulare complessiva. A ciò si aggiunge che circa il 50% degli eventi di inizio della trascrizione che coinvolgono la Pol II avviene a livello dei geni codificanti per le proteine ribosomiali: 20 degli mRNA

prodotti nel corso di questi eventi di trascrizione sono compresi tra i 30 mRNA più abbondanti nella cellula (Velculescu *et al.*, 1997). Se si considera che i geni codificanti per le r-proteine contengono 101 (Spingola *et al.*, 1999) dei quasi 300 introni presenti nell'intero genoma (Juneau *et al.*, 2007), se ne può poi dedurre che più del 30% degli RNA messaggeri di lievito viene sottoposto a splicing e che il 90% dei processi di splicing coinvolgono proprio mRNA codificanti per proteine ribosomiali.

A pesare sul bilancio energetico è anche l'espressione di quella coorte di fattori composta da oltre 250 elementi tra proteine ed RNA, necessari per i vari passaggi di assemblaggio del ribosoma, molti dei quali prevedono il consumo di molecole ad alto contenuto energetico al fine di conferire direzionalità al processo (Fatica and Tollervey, 2002).

Se si considera quindi nel complesso l'entità della biogenesi del ribosoma in termini metabolici, sicuramente non stupisce il fatto che essa risulti sottoposta a meccanismi di controllo che ne garantiscono una fine regolazione.

Un primo livello di regolazione assicura la produzione di adeguate quantità di ciascuno degli elementi richiesti per la sintesi del ribosoma, specialmente per quanto riguarda le componenti strutturali: se è vero che un numero insufficiente di anche una sola delle proteine ribosomiali può causare aberrazioni nel processo di assemblaggio, è altrettanto certo che un eccesso di queste proteine fortemente basiche e con elevata affinità per gli acidi nucleici potrebbe rappresentare per la cellula un pericolo, oltre che un dispendio energetico non necessario.

Un ulteriore e più complesso livello di regolazione è quello responsabile della modulazione della sintesi dei ribosomi in risposta alla disponibilità di nutrienti, a differenti stress ambientali e a scompensi in alcuni processi metabolici cellulari (Warner, 1999), nonché della sua coordinazione con il processo di accrescimento e con la progressione del ciclo cellulare (Rudra and Warner, 2004).

Ruolo chiave in questi meccanismi regolativi è svolto da due importanti vie di segnalazione: il pathway chinasi noto come TOR (Target Of Rapamycin) e la via della proteina chinasi A c-AMP dipendente (PKA). Queste due vie di segnalazione, da cui dipende la capacità della cellula di rispondere allo stress e alla disponibilità di fonti di carbonio e azoto, intervengono su aspetti cruciali della sua sopravvivenza, generando complessi network regolativi che assicurano il mantenimento di un dialogo tra la sintesi dei ribosomi, il monitoraggio della

dimensioni della cellula ed il controllo del ciclo cellulare (Jorgensen *et al.*, 2004; Chen and Powers, 2006).

L'importanza del processo di biogenesi del ribosoma giustifica l'universalità dei basilari principi di controllo dai cui è regolata, complessivamente conservati dagli eubatteri ai vertebrati, pur con alcune differenze nelle specifiche strategie adottate per metterli in atto. Una delle più interessanti differenze riguarda proprio *Saccharomyces cerevisiae* che, contrariamente a batteri e vertebrati, ha evoluto un programma di regolazione della sintesi dei ribosomi che si concretizza prevalentemente a livello trascrizionale (Leimpiäinen and Shore, 2009).

1.2. In *S. cerevisiae* la sintesi del ribosoma è regolata a livello trascrizionale

Regolare a livello trascrizionale la biogenesi del ribosoma significa controllare in modo coordinato l'espressione degli oltre 750 geni coinvolti in questo processo, orchestrando l'attività di tutte e tre le RNA polimerasi: la Pol I, che provvede alla trascrizione del 35S pre-rRNA da cui derivano gli rRNA 18S, 5.8S e 25S, la Pol III, che sintetizza il 5S rRNA e lo snoRNA snR52, e la Pol II (Bosio *et al.* 2011), responsabile della trascrizione dei 138 geni per proteine ribosomiali, dei restanti 76 codificanti per snoRNA e degli oltre 200 che codificano per le proteine non strutturali necessarie all'assemblaggio dei ribosomi e che costituiscono, assieme ad altre implicate a più livelli nella sintesi proteica (tra cui subunità delle Pol I e Pol III, tRNA sintetasi, fattori di traduzione), il cosiddetto *ribosome biogenesis (ribi) regulon*.

Ad assicurare per tutti questi geni un elevato livello di espressione in condizioni di crescita ottimale e una fine modulazione trascrizionale in risposta a cambiamenti repentini delle esigenze cellulari dettate da fattori endogeni ed ambientali, concorrono specifici elementi di sequenza *cis*-regolativi, differenti fattori proteici agenti in *trans* che si associano direttamente o indirettamente ai promotori, influenzandone in maniera positiva o negativa l'attività, e l'organizzazione locale della cromatina che, regolando l'accessibilità di diverse regioni del DNA, fornisce un ulteriore livello di controllo della trascrizione.

Pur prendendo parte ad un comune programma di espressione genica ed essendo quindi trascritte in maniera fortemente coordinata, le diverse classi di unità trascrizionali coinvolte nella biogenesi del ribosoma presentano ciascuna un caratteristico assortimento di elementi regolativi.

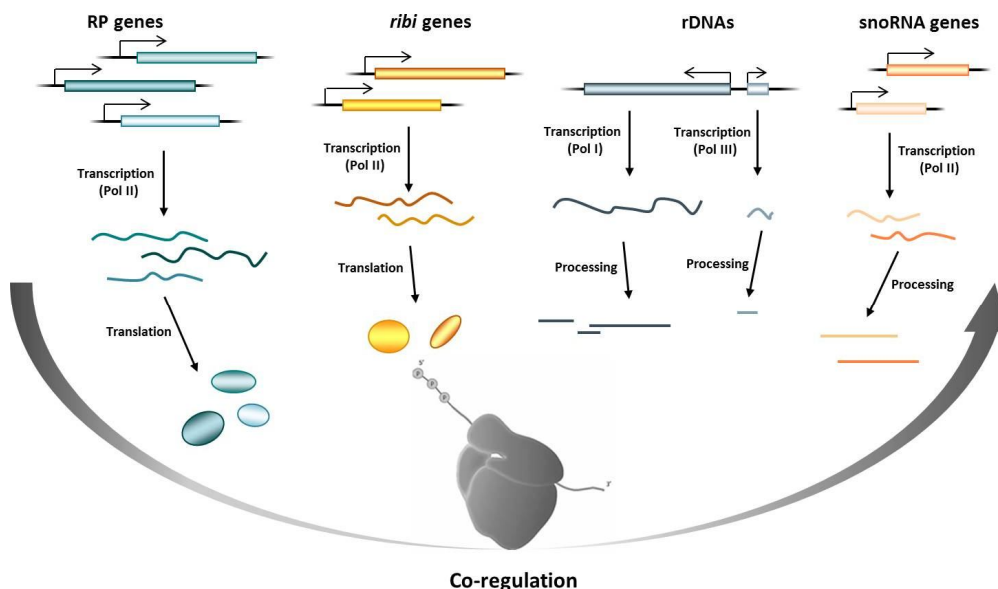


Figura 1.5. Rappresentazione schematica delle diverse classi di geni trascritti dalle RNA Polimerasi I, II e III codificanti per proteine e RNA che partecipano all'assemblaggio di un ribosoma funzionale. Tutte queste unità trascrizionali devono essere co-regolate per assicurare la produzione di quantità adeguate di tutte le proteine e le molecole di RNA richieste.

1.2.1. L'RNA polimerasi I e la trascrizione dell'rDNA

In *S. cerevisiae*, il DNA codificante per l'RNA ribosomiale è organizzato in un unico cluster, presente al *locus* RDN1, una regione di 1-2 Mb appartenente al braccio lungo del cromosoma XII (Petes, 1979). L'unità di base, ripetuta in tandem 150-200 volte, è lunga 9,1 kb ed è composta dall'operone codificante per il pre-rRNA 35S e da due regioni spaziatrici non trascritte (NTS1 e NTS2), tra le quali è situato il gene codificante per l'rRNA 5S, trascritto nella direzione opposta dalla Pol III.

Nell'operone codificante per il pre-rRNA 35S, le sequenze corrispondenti agli rRNA 18S, 5.8S e 25S sono separate le une dalle altre da due regioni interne di DNA spaziatore trascritto (ITS1 e ITS2) e fiancheggiate esternamente da due tratti di DNA *spacer*, anch'essi trascritti (5'-ETS e 3'-ETS).

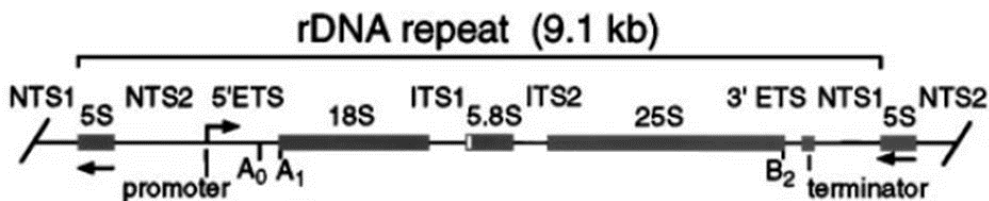


Figura 1.6. Organizzazione dell'unità trascrizionale che, ripetuta in tandem 150-200 volte, costituisce la regione lunga 1-2 Mb nota come *locus* RDN1 (adattato da Venema and Tollervey, 1999).

Il promotore che guida la trascrizione dell'rDNA ad opera della RNA Polimerasi I coincide con una regione di circa 150 bp (Kempers-Veenstra *et al.*, 1986; Musters *et al.*, 1989, Marzouki *et al.*, 1991) localizzata a livello del tratto NTS2, ed è composto da due elementi *cis*-regolativi distinti: l'elemento centrale del promotore (CPE), situato tra le posizioni -28 e +8 rispetto al sito di inizio della trascrizione (TSS), e il cosiddetto *upstream control element* (UCE), una sequenza regolativa bipartita localizzata tra le posizioni -146 e -50. È interessante notare come nel corso dell'evoluzione di questo promotore, pur essendosi verificata una forte divergenza nelle sequenze nucleotidiche, sia stata tuttavia conservata questa organizzazione modulare a due elementi, presente anche negli eucarioti superiori (Grummt, 2003). Sembra infatti che, al di là della specificità di sequenza, esista una sorta di codice strutturale comune estremamente importante nel determinare la corretta disposizione tridimensionale del promotore, essenziale per l'assemblaggio e il funzionamento delle numerose proteine necessarie per la trascrizione e per la sua regolazione.

In lievito, il reclutamento della RNA Polimerasi I a livello del promotore dell'rDNA richiede l'intervento di quattro fattori generali di trascrizione: l'*Upstream Activating Factor* (UAF), un complesso esamerico composto dalle proteine Rrn5, Rrn9, Rn10 (Keys *et al.*, 1996) e Uaf30 (Siddiqi *et al.*, 2001-a) e dagli istoni H3 e H4 (Keener *et al.*, 1997); il *Core Factor* (CF), che comprende le proteine Rrn6, Rrn7 (Keys *et al.*, 1994) e Rrn11 (Lalo *et al.*, 1996); la *TATA-box Binding Protein* (TBP), coinvolta nel processo di trascrizione di tutte e tre le RNA polimerasi (Cormack and Struhl, 1992) e il fattore Rrn3 (Yamamoto *et al.*, 1996).

L'UAF lega il promotore dell'rDNA a livello dell'UCE, instaurando un'interazione molto stabile e dando vita al primo nucleo di formazione del complesso di preinizio (PIC). La subunità Uaf30 sembra avere un ruolo fondamentale per guidare il reclutamento dell'UAF a livello del promotore e per assicurare una stabile associazione *in vivo* (Hontz *et al.*, 2008),

come testimoniato dal ridotto numero di copie di rDNA che risultano attive in cellule che mancano di questa proteina. Meno chiara è invece la funzione delle subunità Rrn5, Rrn9 e Rrn10, sebbene esistano evidenze di un loro coinvolgimento nella rete di interazioni proteina-proteina che si instaurano con altri fattori implicati nell'assemblaggio del complesso di preinizio (Steffan *et al.*, 1996). Piuttosto sfuggente è anche il ruolo degli istoni H3 e H4: sebbene fosse stato originariamente ipotizzato che essi potessero mediare la formazione di una struttura *nucleosome-like*, favorendo l'avvolgimento dell'UCE attorno all'UAF (Planta, 1997), al momento tale idea resta ancora priva di conferme sperimentali e le evidenze ottenute finora sembrano semplicemente evidenziare la loro importanza per la stabilità dell'UAF (Tongaonkar *et al.*, 2005), senza fare chiarezza sulla loro specifica funzione.

È interessante notare che, oltre ad essere necessario per un efficiente reclutamento della Pol I, il complesso UAF risulta fondamentale per impedire eventi di trascrizione da parte della Pol II, a partire da promotori criptici presenti nel *locus* rDNA (Vu *et al.*, 1999). Questo processo richiede la formazione di una particolare architettura della cromatina: sembra che UAF sia implicato negli eventi che danno avvio a questo processo e che possa essere coinvolto direttamente nell'interazione con alcuni fattori di rimodellamento che rendono possibile questo silenziamento "selettivo" dell'rDNA (Cioci *et al.*, 2003; Goetze *et al.*, 2010). Tale fenomeno giustifica peraltro il fatto che i geni codificanti per i componenti dell'UAF non siano essenziali: in mancanza di questo complesso la sopravvivenza della cellula è assicurata dall'attività della Pol II che, in combinazione con un processo di espansione delle ripetizioni di rDNA, assicura un livello basale, seppur molto ridotto, di trascrizione del pre-rRNA 35S (Oakes *et al.*, 1999).

Essenziali sono invece i geni *RRN6*, *RRN7* e *RRN11*, che codificano per le tre componenti del *Core Factor*: il legame di questo complesso all'elemento centrale del promotore è infatti necessario, sia *in vitro* che *in vivo*, per garantire una trascrizione basale da parte della Pol I, mentre il raggiungimento di elevati livelli trascrizionali richiede l'intervento sia del complesso UAF che della TBP (Keener *et al.*, 1998). Quest'ultima, in particolare, interagisce sia con Rrn9 che con Rrn6 (Steffan *et al.*, 1996) ed è quindi necessaria per permettere al complesso UAF di stimolare la trascrizione, coadiuvandolo nell'efficace reclutamento del CF.

Recenti studi biochimici e strutturali hanno fatto luce sull'architettura del CF, mettendo in evidenza il network di interazioni che permettono alle sue subunità di interagire tra loro e con gli altri componenti necessari per l'inizio della trascrizione da parte della Pol I (Knutson *et al.*, 2014). Centrale sembra essere, nell'ambito di questa rete di interazioni, la posizione occupata dalla subunità Rrn6, che contatta simultaneamente la TBP, le proteine Rrn7 e Rrn11, e il regolatore Rrn3, il quarto fattore generale di trascrizione della Pol I.

Questo regolatore, codificato da un gene essenziale, è necessario per mediare il reclutamento della RNA Polimerasi I a livello del promotore dell'rDNA, essendo capace di interagire sia con la subunità A43 dell'enzima che con la subunità Rrn6 del CF (Peyroche *et al.*, 2000). L'identificazione di un'omologia tra Rrn7 e il fattore generale della Pol II TFIIB ha gettato le basi per alcuni esperimenti che hanno evidenziato come il CF interagisca anche in maniera diretta con il *core* della RNA Polimerasi I (Knutson *et al.*, 2011; Blattner *et al.*, 2011).

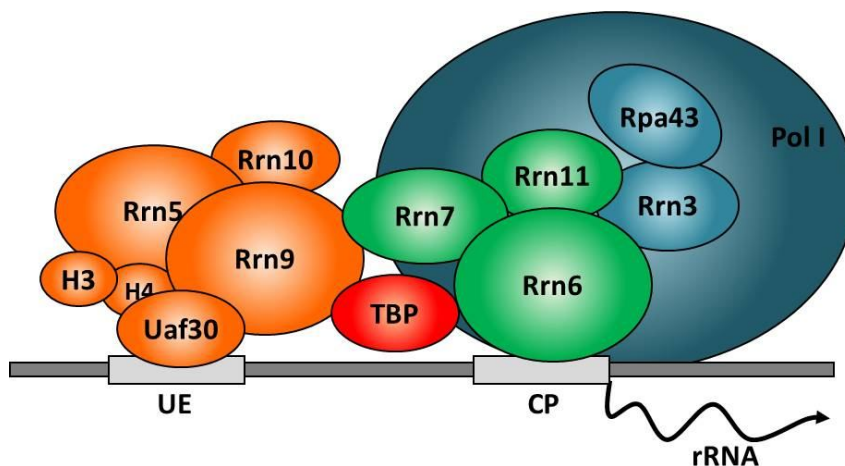


Figura 1.7. Illustrazione della RNA Polimerasi I e dei fattori *cis*- e *trans*-regolativi richiesti per l'inizio della trascrizione dell'rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*.

Nonostante i numerosi dettagli strutturali relativi alle interazioni dei diversi attori coinvolti, la dinamica delle ultime fasi di assemblaggio del complesso di preinizio non è ancora stata definita in modo univoco e può essere pertanto descritta secondo due modelli alternativi: uno propone che all'associazione del complesso UAF a livello dell'UCE faccia seguito il reclutamento della TBP e del CF che, una volta legatosi al *core promoter*, può ingaggiare il complesso Rrn3-Pol I (Steffan *et al.*, 1996); l'altro invece descrive uno scenario in cui il legame dell'UAF al promotore è seguito dal reclutamento in un unico step del CF e del

complesso Rrn3-Pol I (Bordi *et al.*, 2001), in accordo con l'osservazione secondo cui la presenza della Pol I è richiesta per una stabile associazione del CF al promotore (Aprikian *et al.*, 2001).

Una volta reclutata, la Pol I inizia la trascrizione, abbandona il promotore ed entra nella fase di allungamento: questo passaggio è segnato da un rimodellamento del complesso trascrizionale, nel quale non risultano più presenti le subunità del CF e il regolatore Rrn3, che vengono rilasciati probabilmente nelle fasi iniziali della trascrizione (Bier *et al.*, 2004). Il fattore UAF, invece, rimane associato saldamente al promotore, presumibilmente fungendo da *scaffold* per successivi eventi di reinizio della trascrizione.

In origine si pensava che un terzo elemento di sequenza, l'*enhancer*, contribuisse a promuovere la trascrizione da parte della Pol I (Elion and Warner, 1986): esperimenti *in vitro* e analisi condotte *in vivo* su sistemi ectopici avevano identificato una regione di circa 170-180 bp, posta circa 2,2 kb a monte del sito di inizio della trascrizione, ovvero 100 bp a valle dell'estremità 3' dell'operone precedente, del quale comprende il terminatore, in grado di stimolare fortemente l'attività trascrizionale della Pol I (Planta, 1997). L'identificazione all'interno di questo elemento di una sequenza simile al consenso riconosciuto dalla proteina Reb1, che sembrava inoltre legarsi ad un secondo sito posto a livello del promotore (Morrow *et al.*, 1989), aveva portato ad ipotizzare che questa proteina non solo fosse coinvolta nel processo di terminazione (Reeder *et al.*, 1999), ma che avesse anche un ruolo strutturale in grado di spiegare l'effetto dell'*enhancer*: l'oligomerizzazione di Reb1 sembrava poter disporre le unità di rDNA in una configurazione spaziale ottimale per la trascrizione, ancorando elementi *enhancer* e promotori di copie di rDNA consecutive alla matrice nucleolare (Kulkens *et al.*, 1992).

Gli studi condotti successivamente hanno permesso di fare luce su queste ipotesi, mettendo in evidenza la notevole complessità del quadro relativo alla natura dell'*enhancer*, ai meccanismi di terminazione e al ruolo di Reb1. È stato innanzitutto dimostrato che l'*enhancer* non ha in realtà alcun effetto sulla trascrizione dell'rDNA nel suo normale contesto cromosomico e che la sua funzione sembra piuttosto connessa agli eventi di ricombinazione che determinano l'espansione o contrazione delle ripetizioni di rDNA (Wai *et al.*, 2001).

È stato inoltre dimostrato che il processo di terminazione effettivamente coinvolge, oltre all'endonucleasi Rnt1 e la esonucleasi Rat1 (Braglia *et al.*, 2011), una proteina che legandosi

al terminatore blocca la RNA polimerasi I e ne favorisce la dissociazione dal DNA templato: questa funzione tuttavia non è svolta da Reb1, bensì dall'omologa Nsi1 (Reiter *et al.*, 2012), anch'essa dotata di un dominio di legame al DNA di tipo *Myb-like*, e direttamente implicata non solo nel processo di terminazione della trascrizione, ma anche nel meccanismo di silenziamento dell'rDNA (Ha *et al.*, 2012). Il ruolo di Reb1 rimane quindi piuttosto sfuggente, sebbene non si possa escludere che la sua funzione sia legata all'organizzazione strutturale dell'rDNA, come suggerito da recenti evidenze sperimentali che ne propongono l'implicazione in un processo di gene looping (Mayán and Aragón, 2010) piuttosto complesso in cui sembrano coinvolti anche la Pol II e due *non coding* RNA trascritti dalla stessa in corrispondenza del promotore e del terminatore della Pol I (Mayán, 2013).

La regolazione dell'espressione dell'rDNA prevede differenti strategie

Il fatto che l'rDNA sia presente nel genoma in copie multiple assicura la possibilità di esercitare un fine controllo sull'espressione degli RNA ribosomiali, rendendo possibili due distinti livelli d'azione: il controllo del numero di copie attive, esercitato attraverso una regolazione dello stato cromatinico, e la modulazione della trascrizione di ogni singola copia attiva.

Quest'ultimo meccanismo, che sembra essere determinante per il controllo della produzione dell'rRNA durante la fase esponenziale della crescita cellulare (French *et al.*, 2003), interviene in primo luogo nelle fasi iniziali del processo di trascrizione e ha come bersaglio principale l'interazione della RNA polimerasi I con il regolatore Rrn3 ed il reclutamento del complesso Pol I-Rrn3 a livello del promotore. Da tempo è noto che solo una modesta frazione della Pol I presente in estratti cellulari risulta trascrizionalmente competente: tale frazione corrisponde alle molecole associate al regolatore Rrn3 e può variare in modo significativo in base alla fase di crescita cellulare (Milkereit and Tschochner, 1998). Più recentemente, analisi *in vivo* hanno dimostrato come l'interazione tra RNA Polimerasi I e Rrn3 sia fortemente influenzata dallo stato di fosforilazione di entrambe (Fath *et al.*, 2001): la formazione del complesso si verifica solo quando la regione *serine patch* di Rrn3 si trova in uno stato defosforilato che le permette di interagire con la subunità A43 della Pol I. La fosforilazione di tale regione converte Rrn3 in una forma inattiva (forse promuovendone la dimerizzazione) e impedisce quindi il reclutamento della Pol I a livello del promotore dell'rDNA (Blattner *et al.*, 2011). Anche lo stato di fosforilazione della

subunità A43 della RNA Polimerasi I sembra essere fondamentale per la formazione del complesso: la risoluzione della struttura della Pol I ha permesso di dedurre che la fosforilazione di questa subunità contrasta la dimerizzazione dell'enzima e rende la subunità stessa accessibile per l'interazione con Rrn3 (Engel *et al.*, 2013). Oltre a permettere il reclutamento della RNA polimerasi I a livello del promotore, sembra che Rrn3 sia necessaria anche in una fase successiva: è possibile che essa funga da regolatore allosterico che favorendo la conversione della polimerasi nello stato "contratto", dotato di un sito attivo cataliticamente competente e capace di legare stabilmente l'ibrido RNA:DNA, promuove il processo di *promoter escape*.

Diverse evidenze sperimentali dimostrano il coinvolgimento della via di segnalazione TOR nel controllo dell'interazione tra Rrn3 e Pol I. Il trattamento con rapamicina, ad esempio, induce una riduzione dell'espressione dell'rRNA dovuta ad un decremento del numero di complessi Pol I associati alle copie trascrizionalmente attive di rDNA, probabilmente causato da un'alterazione dello stato di fosforilazione dell'enzima e del suo regolatore (Claypool *et al.*, 2004). Anche la riduzione dell'espressione di *RRN3* e la degradazione del suo prodotto genico ad opera del proteasoma che si osservano a seguito dell'inibizione della via di segnalazione TOR determinano una riduzione del numero di complessi Pol I-Rnr3 e possono quindi contribuire, almeno in parte, alla riduzione dei livelli di sintesi dell'rDNA (Philippi *et al.*, 2010).

È stato inoltre dimostrato che la chinasi Tor1 interagisce direttamente con l'rDNA, grazie ad un motivo di legame al DNA di tipo *helix-turn-helix* (Li *et al.*, 2006). Tale associazione, che viene meno in caso di carenza di nutrienti o di trattamento con rapamicina, è fondamentale per la sintesi del 35S rRNA e probabilmente è coinvolta nel processo di fosforilazione del macchinario Pol I.

Esistono tuttavia anche prove di un'azione indiretta che coinvolge uno degli effettori a valle di TORC1, ossia la chinasi Sch9, che regola la sintesi degli rRNA trascritti dalla Pol I sia promuovendone il processamento, sia favorendo il reclutamento della polimerasi a livello dell'rDNA, attraverso un meccanismo sconosciuto che sembra non coinvolgere l'interazione con il regolatore Rrn3 (Huber *et al.*, 2009).

Sebbene la regolazione delle fasi iniziali della trascrizione sia fondamentale per il controllo della attività della Pol I e sia stata per questo oggetto di numerosi studi, alcuni recenti filoni di ricerca si sono concentrati sulla possibile esistenza di meccanismi di controllo agenti sulla

fase di allungamento e hanno effettivamente portato all'individuazione di vari fattori regolativi coinvolti a questo livello (Schneider, 2012). Un esempio è fornito da Paf1C (Polymerase-associated Factor 1 Complex), un fattore di allungamento originariamente identificato per il suo ruolo nella trascrizione da parte della Pol II, che sembra avere una funzione anche nella fase di allungamento della trascrizione Pol I: studi *in vitro* hanno dimostrato la sua capacità di aumentare la velocità di questa fase e analisi *in vivo* hanno evidenziato un suo coinvolgimento nel controllo della sintesi dell'rRNA in risposta al trattamento con rapamicina o alla carenza di aminoacidi (Zhang *et al.*, 2010).

Ai meccanismi di modulazione della trascrizione sin qui descritti si aggiunge l'altro importante livello di regolazione della sintesi degli rRNA, corrispondente al controllo del numero di copie di rDNA trascrizionalmente attive: è stato infatti dimostrato che in cellule di lievito in fase esponenziale di crescita circa metà delle copie di rDNA vengono attivamente trascritte e che tale numero si riduce al raggiungimento della fase stazionaria (Dammann *et al.*, 1993). Fin da subito è emerso chiaramente come questo meccanismo di regolazione prevedesse l'esistenza di differenti stati di organizzazione della cromatina: come inizialmente dimostrato su cellule murine (Conconi *et al.*, 1989), le copie trascrizionalmente attive si trovano in uno stato cromatinico sensibile al trattamento con l'intercalante psoralene, che si lega preferenzialmente a regioni prive o povere di nucleosomi, mentre quelle inattive sono organizzate in una struttura cromatinica compatta (Dammann *et al.*, 1993).

Più recentemente è stata dimostrata l'associazione della proteina HMG (High Mobility Group) Hmo1 con le copie di rDNA attivamente trascritte (Hall *et al.*, 2006): sembra che il suo reclutamento sia dipendente dalla attività della Pol I e che, in analogia con quanto dimostrato per la sua controparte in mammifero (UBF), Hmo1 possa contribuire al mantenimento dello stato cromatinico "aperto" (Kasahara *et al.*, 2007). Effettivamente la presenza di Hmo1, contrastando la deposizione replicazione-indipendente dei nucleosomi, risulta fondamentale per conservare l'accessibilità delle copie attive dell'rDNA, inizialmente determinata dall'attività della Pol I (Wittner *et al.*, 2011). È possibile che Hmo1 funga da organizzatore cromatinico alternativo per la stabilizzazione del promotore e della sequenza codificante delle copie attive, che risultano essere *histone-free* (Merz *et al.*, 2008). Quest'ipotesi trova conferma nei risultati ottenuti con approcci sperimentali su singola

molecola, che dimostrano l'esistenza di una organizzazione gerarchica di interazioni promosse da Hmo1 (Murugesapillai *et al.*, 2014).

Il controllo dello stato cromatinico "chiuso" associato alle copie di rDNA non attivamente trascritte prevede invece il coinvolgimento della istone deacetilasi Rpd3: agendo con un meccanismo e su bersagli molecolari non ancora individuati, Rpd3 risulta necessaria per la riduzione del numero di copie trascrizionalmente attive che si osserva a seguito dell'ingresso nella fase stazionaria di crescita (Sandmeier *et al.*, 2002). Successive evidenze sperimentali hanno evidenziato che l'attività della deacetilasi si inserisce in un pathway di regolazione indipendente da TOR (Oakes *et al.*, 2006), confermando il mancato coinvolgimento di quest'ultimo nel controllo del numero di copie di rDNA attive (Claypool *et al.*, 2004).

Alcune evidenze sperimentali suggeriscono inoltre un possibile ruolo di Rpd3 nel processo di inibizione della trascrizione dell'rDNA da parte della RNA Polimerasi II, promosso dal complesso UAF (Oakes *et al.*, 2006).

Il silenziamento dell'rDNA prevede l'intervento di un'altra istone deacetilasi, la proteina Sir2, che costituisce, assieme a Net1 e a Cdc14, il complesso noto come RENT -Regulator of Nuclear silencing and Telophase exit (Shou *et al.*, 1999). Oltre a favorire la corretta localizzazione nucleolare di Nop1, fattore coinvolto nel processamento e nella maturazione dell'rRNA, e ad interagire con la Pol I attraverso un meccanismo ancora sconosciuto (Shou *et al.*, 2001), Net1 è responsabile del reclutamento a livello dell'rDNA di Sir2 (Straight *et al.*, 1999), che contribuisce al silenziamento dell'rDNA grazie al mantenimento di una ipoacetilazione degli istoni (Huang *et al.*, 2003). Le evidenze a favore di un'interazione del complesso RENT con la proteina Fob1, coinvolta nel processo di ricombinazione che regola l'espansione e contrazione del numero di ripetizioni dell'unità di rDNA (Kobayashi *et al.*, 1998), suggeriscono che l'architettura cromatinica promossa dall'attività di Sir2 possa inoltre sfavorire gli eventi di ricombinazione che portano alla formazione dei cosiddetti *extrachromosomal rDNA circles* (Huang *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004), piccole molecole circolari costituite da una o più ripetizioni di rDNA che segregano in maniera asimmetrica durante la divisione cellulare, accumulandosi nella cellula madre (Sinclair and Guarente, 1999), e che, inducendo una generale instabilità dell'rDNA, sembrano essere connessi al fenomeno di invecchiamento cellulare (Ganley *et al.*, 2009).

1.2.2. L'RNA polimerasi III trascrive il 5S rRNA e lo snoRNA snR52

La RNA polimerasi III è dedicata alla sintesi di una gamma piuttosto varia di molecole di RNA non codificanti per proteine e generalmente di piccole dimensioni (Willis *et al.*, 1993; Harismendy *et al.*, 2003; Moqtaderi and Struhl, 2004; Dieci *et al.*, 2007). Il suo ruolo nella biogenesi del ribosoma in *S. cerevisiae* è legato alla sintesi del 5S rRNA e dello snoRNA snR52.

Diversamente da quanto osservato negli altri eucarioti, in *S. cerevisiae* il gene codificante per il più piccolo degli RNA ribosomiali appartiene all'unità di base che compone il locus *RDN1* ed è posizionato tra le regioni NTS1 e NTS2 che separano due unità consecutive dell'operone codificante per il 35S pre-rRNA (Philippesen *et al.*, 1978; Planta, 1997).

A differenza della RNA Polimerasi I, la Pol III è in grado di riconoscere promotori con differenti architetture, classificabili in tre categorie (Schramm and Hernandez, 2002; Orioli *et al.*, 2012): quello del gene per il 5S rRNA è l'unico esempio di promotore di tipo I. Questa sequenza regolativa è stata individuata per la prima volta in *Xenopus laevis*: anche nota come *Internal Control Region* (ICR), in quanto localizzata all'interno della regione trascritta, è composta da tre elementi regolativi, ossia la box A, situata tra le posizioni +50 e +61, l'elemento intermedio (IE), coincidente con la sequenza compresa tra i siti + 67 e +72 e la box C, situata tra le posizioni +80 e +97. Quest'ultimo risulta essere l'unico elemento strettamente necessario per la trascrizione *in vitro* del gene per il 5S rRNA di *S. cerevisiae* (Chalice and Segall, 1989), sebbene studi *in vivo* sembrino non solo sottolineare l'importanza di tutti e tre gli elementi che compongono l'ICR (Lee *et al.*, 1995), ma anche suggerire l'esistenza di un'ulteriore sequenza regolativa, posta a monte del sito di inizio della trascrizione (Lee *et al.*, 1997).

Il reclutamento della RNA Polimerasi III su questo tipo di promotore richiede l'intervento di tre fattori generali di trascrizione (Acker *et al.*, 2013): la proteina TFIIA (Wang and Weil, 1989), il complesso esamerico TFIIC (Gabrielsen *et al.*, 1989) e il trimero TFIIB (Klekamp and Weil, 1986).

TFIIA è una proteina codificata da un gene essenziale dotata di nove motivi strutturali *zinc finger* del tipo C₂H₂ (Archambault *et al.*, 1992). Il corrispondente fattore isolato da *Xenopus laevis* viene considerato il capostipite della famiglia di proteine C₂H₂ *zinc finger*, in quanto è stata la prima con questo tipo di struttura ad essere identificata : oltre a legare il promotore

del gene per il 5S rRNA, essa è in grado di associarsi alla molecola di rRNA e di contribuire alla sua esportazione citoplasmatica (Pelham and Brown, 1980). In lievito sembra invece che l'unica funzione di TFIIA, essenziale per la sopravvivenza della cellula, sia proprio il legame all'ICR del gene per il 5S rRNA (Camier *et al.*, 1995): la stabile associazione della proteina al promotore rappresenta il primo passaggio di formazione del complesso trascrizionale (Braun *et al.*, 1989), a cui fa seguito il reclutamento di TFIIC, che probabilmente TFIIA contatta attraverso un segmento idrofobico localizzato tra le dita di zinco 8 e 9 (Rowland and Segall, 1998).

TFIIC è un grande complesso multisubunità costituito dalle proteine Tfc1, Tfc3, Tfc4, Tfc6, Tfc7 e Tfc8 (Schramm and Hernandez, 2002) organizzate in una struttura quaternaria costituita da due domini globulari leganti il DNA, τ_A e τ_B , separati da una regione *linker* flessibile (Marzouki *et al.*, 1986): questo consente a TFIIC di adattarsi alle differenti architetture dei promotori riconosciuti dalla Pol III. I meccanismi molecolari sottesi al ruolo svolto da TFIIC nell'ambito della trascrizione non sono stati ancora del tutto chiariti, anche a causa del limitato numero di dettagli strutturali relativi a questo complesso attualmente disponibili. Analisi cristallografiche hanno rivelato che entrambe le subunità Tfc6 e Tfc8 possiedono un dominio *beta propeller* composto da sette foglietti beta, coinvolto nella formazione dell'eterodimero Tfc8-Tfc6 (Mylona *et al.*, 2006). Lo stesso studio ha individuato nella struttura di Tfc8 un dominio α/β , che sembra in grado di interagire *in vitro* con la TBP. Sebbene esistano evidenze di un'interazione tra la subunità Tfc4 di TFIIC e le subunità C53 e ABC10 α della Pol III (Flores *et al.*, 1999), la funzione principale di TFIIC è legata al reclutamento ed al corretto posizionamento a monte del sito di inizio della trascrizione del terzo fattore generale, il complesso TFIIB. Quest'ultimo è costituito da tre subunità: la TBP media il legame stabile del complesso al DNA ed interagisce con la subunità Brf1 (Kassavetis *et al.*, 1992), caratterizzata da una struttura modulare composta da una porzione ammino-terminale strutturalmente e funzionalmente correlata al fattore TFIIB che svolge un ruolo fondamentale nel reclutamento della RNA Polimerasi III, e da una regione C-terminale che costituendo uno *scaffold* per l'associazione delle tre subunità è coinvolta nell'assemblaggio del complesso trimerico (Kassavetis *et al.*, 1998-a). Il terzo componente del complesso è la proteina Bdp1, dotata di un dominio SANT che, diversamente da quanto ipotizzato all'inizio, sembra essere coinvolto non nel legame al DNA, bensì nell'interazione con Brf1 (Saïda, 2008). Il fattore TFIIB viene reclutato sul promotore grazie ad una iniziale interazione tra

Brf1 e la subunità Tfc4 di TFIIC, che successivamente contatta anche Bdp1 (Dumay-Odelot *et al.*, 2002). Una volta associato stabilmente al DNA il solo TFIIB è grado, in virtù dell'interazione di Brf1 con le subunità C17 (Ferri *et al.*, 2000) e C34 (Andrau *et al.*, 1999) dell'enzima, di assicurare il reclutamento della RNA Polimerasi III: per questo motivo esso viene considerato l'unico vero fattore di inizio della trascrizione, mentre TFIIA e TFIIC, necessari per il suo reclutamento, sono definiti più propriamente fattori di assemblaggio (Kassavetis *et al.*, 1990). Evidenze sperimentali dimostrano l'indispensabilità di TFIIB anche per le successive fasi di inizio della trascrizione (Kassavetis *et al.*, 1998-b), in particolare per la formazione del cosiddetto "complesso aperto", che rappresenta probabilmente il *rate limiting step* dell'intero processo (Costanzo *et al.*, 2001): sembra che alcune specifiche porzioni di Bdp1 e Brf1 siano necessarie per la denaturazione del DNA richiesta per l'apertura e propagazione della bolla di trascrizione (Kassavetis *et al.*, 2001).

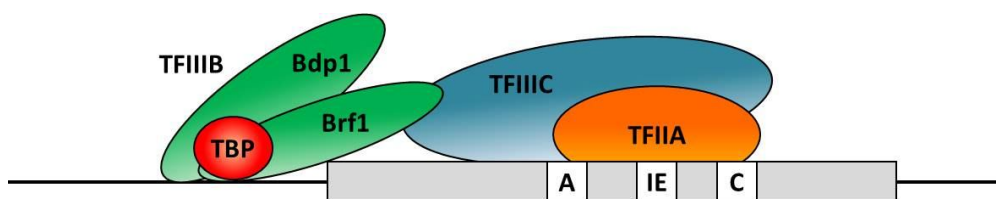


Figura 1.8. Rappresentazione schematica degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi richiesti per l'inizio della trascrizione Pol III dipendente a livello del *locus* codificante per il 5S rRNA.

Molto caratteristica è l'architettura del promotore del gene *SNR52*, codificante per l'unico snoRNA trascritto dalla RNA Polimerasi III: l'analisi della sequenza di questo locus ha evidenziato la presenza di due elementi regolativi appartenenti ad una porzione della regione trascritta che risulta assente nella molecola di snoRNA matura. A queste due sequenze, indicate come box A e box B e localizzati rispettivamente 26 bp e 87 bp a valle rispetto al sito di inizio della trascrizione, si aggiunge un elemento TATA-like, situato 33 bp a monte rispetto alla posizione +1 (Harismendy *et al.*, 2003). Evidente risulta la somiglianza tra questo promotore e quello di un altro gene target della Pol III caratterizzato in precedenza, ossia *RPR1*, che codifica per la componente ad RNA della RNasi P (Lee *et al.*, 1991). Analogamente a quanto osservato relativamente a *RPR1*, studi *in vivo* hanno dimostrato che la presenza delle box A e B è necessaria per il normale accumulo dello snoRNA maturo, probabilmente in virtù del ruolo fondamentale che rivestono nel

promuoverne la trascrizione, attraverso il reclutamento del fattore TFIIC. Inaspettata è stata quindi l'osservazione che pur essendo essenziale per una forte interazione con TFIIC, la box B non risulta necessaria per la trascrizione di *SNR52 in vitro*, mentre la box A, pur avendo una minore affinità per il fattore, è indispensabile per un'efficiente trascrizione TFIIC-dipendente ed è sufficiente per assicurare il reclutamento ed il corretto posizionamento di TFIIB (Guffanti *et al.*, 2006).

Meccanismi di regolazione dell'RNA Polimerasi III

La regolazione dell'attività della RNA Polimerasi III in risposta a differenti stimoli intra ed extracellulari e la sua coordinazione con gli altri processi coinvolti nella biogenesi dei ribosomi è affidata ad un numero relativamente limitato di fattori.

Un ruolo fondamentale è svolto dalla proteina Maf1 (Boguta, 2013), un regolatore negativo codificato da un gene non essenziale originariamente scoperto nell'ambito di studi in lievito (Murawski *et al.*, 1994; Boguta *et al.*, 1997) e del quale sono stati individuati omologhi in numerosi eucarioti superiori (Pluta *et al.*, 2001). In lievito, Maf1 è in grado di assicurare una rapida repressione dell'attività della Pol III in risposta alla scarsità di nutrienti, ad eventi di *DNA damage*, a stress ossidativo, al blocco della via secretoria, al trattamento con rapamicina, al raggiungimento della fase stazionaria della crescita cellulare e, più in generale, a varie condizioni sfavorevoli (Upadhya *et al.*, 2002; Willis *et al.*, 2004). L'attività di Maf1 è strettamente correlata al suo stato di fosforilazione e alla sua conseguente localizzazione subcellulare: quando le condizioni sono favorevoli alla crescita cellulare, Maf1 è fosforilata, inattiva e localizzata prevalentemente nel citoplasma; in risposta a differenti tipi di stress, Maf1 viene defosforilata e trasportata nel nucleo (Oficjalska-Pham *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006) grazie al riconoscimento delle due sequenze di localizzazione nucleare (NLS) di cui è dotata (Moir *et al.*, 2006). Considerata la posizione di queste ultime nella struttura della proteina, è stato suggerito che la defosforilazione possa determinare un cambiamento conformazionale che rende accessibili le sequenze di localizzazione nucleare, altrimenti mascherate da una regione mobile della catena polipeptidica (Vannini *et al.*, 2010).

Nel nucleo, Maf1 è in grado di legare la Pol III impedendone l'associazione con complessi TFIIB-promotore preassemblati (Desai *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2006). Analisi strutturali dimostrano che il legame di Maf1 è in grado di indurre una modificazione conformazionale

della Pol III che le impedisce di interagire con Brf1 (Vannini *et al.*, 2010). Poiché l'associazione di Maf1 ai loci trascritti dalla Pol III sembra aumentare in condizioni di repressione (Roberts *et al.*, 2006) e la sua interazione con la Pol III già ingaggiata in eventi trascrizionali non sembra interferire né con la capacità di legare gli acidi nucleici, né con la sintesi dell'RNA, è stato proposto che Maf1 si leghi alla Pol III durante la fase di allungamento e ne impedisca il reclutamento per successivi cicli di trascrizione. Un ulteriore meccanismo d'azione sembra prevedere l'interazione di Maf1 con la subunità Brf1 di TFIIB che ne impedisce l'associazione con i complessi TFIIC-DNA e giustifica la riduzione di complessi TFIIB-promotore che si osserva a seguito di una repressione prolungata (Upadhy *et al.*, 2002; Desai *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2006).

I meccanismi molecolari che controllano l'attività di Maf1 in risposta a differenti pathway di regolazione coinvolgono vari attori e sono stati caratterizzati solo parzialmente. Principale responsabile dell'attivazione di Maf1 è la proteina fosfatasi 4, che agisce direttamente su Maf1, defosforilandolo e mediando una rapida repressione della Pol III in risposta a differenti condizioni di stress (Oler and Cairns, 2012). Anche la proteina fosfatasi di tipo 2A sembra essere richiesta per la defosforilazione di Maf1 e la conseguente repressione della trascrizione dei geni Pol III dipendenti (Oficjalska-Pham *et al.*, 2006). Varie chinasi partecipano al meccanismo opposto, che prevede la fosforilazione e conseguente inattivazione di Maf1: PKA e Sch9 agiscono sugli stessi siti bersaglio nella sequenza della proteina (Huber *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009); TORC1, oltre a controllare Maf1 mediante Sch9, sembra legarsi direttamente a livello dei geni per il 5S rRNA e fosforilare il regolatore negativo per promuoverne l'allontanamento dal nucleolo (Wei *et al.*, 2009); anche la caseina chinasi II (CKII) si associa direttamente ai geni trascritti dalla Pol III, ma preferenzialmente a quelli codificanti per tRNA, e fosforilando Maf1 ne promuove la dissociazione dall'enzima (Graczyk *et al.*, 2011). Evidenze sperimentali suggeriscono che l'effetto della CKII sulla attività della Pol III preveda altri meccanismi, in aggiunta all'inattivazione di Maf1: sia in lievito che in uomo, ad esempio, è stato dimostrato che questa chinasi interagisce direttamente con le subunità di TFIIB e fosforilandole ne regola l'attività (Ghavidel and Schultz, 2001; Johnston *et al.*, 2002).

Sebbene Maf1 rivesta indubbiamente il ruolo di *master regulator* della Pol III, altri fattori contribuiscono a modularne l'attività nell'ambito della biogenesi del ribosoma, esercitando in questi casi un'azione positiva: un esempio è costituito da Sub1, il prodotto di un gene

non essenziale che risulta associato *in vivo* ai loci trascritti dalla Pol III e la cui presenza in sistemi *in vitro* sembra favorire fortemente le fasi di inizio e reinizio della trascrizione, suggerendo che il suo intervento possa essere richiesto per un'espressione ottimale dei geni Pol III nelle cellule in rapida crescita (Tavenet *et al.*, 2009). Piuttosto interessante è un altro regolatore positivo della Pol III, denominato TFIIE: originariamente scoperto nel corso di studi biochimici come frazione dell'estratto cellulare in grado di favorire fortemente la trascrizione dei geni per il 5S rRNA e per i tRNA in sistemi *in vitro* (Dieci *et al.*, 1993), questo regolatore sembra co-purificare con uno specifico set di proteine ribosomiali, che secondo analisi di immunoprecipitazione cromatinica risultano associate *in vivo* ai geni per 5S rRNA e tRNA. I geni codificanti per alcune di queste proteine inoltre agiscono, più o meno efficacemente, da soppressori multicopia di mutazioni condizionali del fattore TFIIC. Queste osservazioni suggeriscono una funzione extra-ribosomiale per alcune delle r-proteine, che sembrano avere un ruolo nella regolazione dei pathway coinvolti nella biogenesi e nella attività del ribosoma (Dieci *et al.*, 2009).

1.2.3. L'RNA polimerasi II: meccanismi generali di regolazione della trascrizione

L'RNA Polimerasi II, dedicata alla trascrizione di tutti i geni codificanti per proteine e per diverse classi di RNA non codificanti, è coinvolta nella biogenesi del ribosoma perché responsabile dell'espressione dei geni per le proteine ribosomiali e per gli snoRNA e dei geni *ribi*. Sebbene i principi regolativi delle fasi iniziali di trascrizione che coinvolgono questa RNA Polimerasi siano sostanzialmente gli stessi su cui si fonda la modulazione delle altre due RNA Polimerasi, peculiare è in questo caso l'elevato numero di unità trascrizionali riconosciute, cui corrisponde una notevole eterogeneità di elementi *cis*- e *trans*-regolativi specifici che assicurano una fine modulazione del livello di espressione di ogni singolo gene. Nonostante la complessità e variabilità legate ai singoli geni, è tuttavia possibile individuare un comune meccanismo regolativo (Hahn and Young, 2011): in risposta a precise condizioni cellulari e ambientali, fattori sequenza-specifici si associano ai corrispondenti siti sul genoma e, attraverso l'intervento di co-attivatori, sono in grado di promuovere mediante reclutamento diretto o indirettamente, grazie ad eventi di rimodellamento della cromatina, l'assemblaggio in prossimità del sito di inizio della trascrizione del cosiddetto complesso di preinizio, costituito dai fattori generali di trascrizione e dalla RNA Polimerasi II.

L'evento che dà avvio alla formazione del complesso di preinizio è il legame della TBP al promotore: interagendo con il DNA attraverso il solco minore, questa proteina è in grado di indurre un piegamento di circa 90° del DNA stesso e di formare un complesso stabile alla cui formazione contribuiscono anche i *TBP associated factors* (TAFs), appartenenti ai co-attivatori TFIID o SAGA. Successivo è il reclutamento di TFIIA, che contribuisce a stabilizzare il nascente complesso di preinizio assieme al fattore TFIIB: quest'ultimo partecipa alla formazione di numerose interazioni tra diverse componenti del complesso, contattando direttamente la TBP, il DNA a monte e a valle rispetto al sito dove è posizionata la TBP e la stessa RNA Polimerasi II, la cui stabile associazione nel PIC richiede la presenza del fattore TFIIF. Il passaggio dal complesso di preinizio al cosiddetto complesso aperto avviene grazie ad una serie di profondi cambiamenti conformazionali che richiedono l'intervento di altri due fattori generali di trascrizione, TFIIE e TFIIH: quest'ultimo è dotato di una attività elicastica che favorisce la denaturazione ATP-dipendente del DNA richiesta per la formazione della bolla trascrizionale, mentre TFIIE è necessario per la stabilizzazione del DNA a singolo filamento. A questo punto, la Pol II assistita da TFIIB e TFIIF può eseguire una scansione della sequenza di DNA che le permette l'individuazione del sito di inizio della trascrizione.

L'assemblaggio del complesso di preinizio avviene a livello della sequenza regolativa nota come *core promoter*, termine con cui viene indicato l'elemento minimo di DNA richiesto per la trascrizione basale da parte della Pol II (Butler and Kadonaga, 2002), generalmente localizzato entro le prime 100 bp a monte del sito di inizio della trascrizione.

Nei metazoi, il *core promoter* fornisce un importante contributo alla natura combinatoriale della regolazione dei geni trascritti dalla Pol II (Smale, 2001), come dimostrato dall'esistenza di numerosi elementi di sequenza variamente assortiti nei diversi promotori: oltre alla nota TATA box, sito di legame della TBP e primo componente del *core promoter* ad essere stato individuato, sono stati caratterizzati tra gli altri l'*initiator* (INR), comprendente il sito di inizio della trascrizione, il *downstream promoter element* (DPE), il *motif 10 element* (MTE), che assieme a INR e DPE funge da sito di legame per i *TBP associated factors* (TAFs) del fattore generale TFIID, e il *TFIIB recognition element* (BRE), sequenza riconosciuta dal fattore TFIIB (Smale and Kadonaga, 2003; Juven-Gershon and Kadonaga, 2010).

In *S. cerevisiae*, invece, l'unico elemento del *core promoter* chiaramente riconoscibile è la TATA box, la sequenza con consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G) presente in poco meno del 20% dei promotori dei geni trascritti dalla RNA Polimerasi II. Questi geni sono frequentemente

localizzati in regioni subtelomeriche, espressi alternativamente a livelli molto bassi o estremamente elevati in quanto coinvolti in meccanismi di risposta a stress di varia natura (Basehoar *et al.*, 2004). Ancora da chiarire è la natura delle sequenze regolative del *core promoter* dei geni classificati come *TATA-less*, che sembrano essere prevalentemente coinvolti in funzioni cellulari quali la sintesi proteica o le attività metaboliche di base, classicamente considerate come “*housekeeping*”, e quindi espressi in maniera più costante rispetto ai geni dotati di una TATA box. Recenti studi volti alla ricerca di sequenze conservate nel *core promoter* dei geni *TATA-less*, hanno individuato potenziali siti di assemblaggio del PIC, come l’elemento “GA”, presente in un terzo dei promotori appartenenti a questa classe (Seizl *et al.*, 2011), o come la sequenza *TATA-like*, che differisce di uno o due basi rispetto al consenso della TATA box e che sembra co-localizzare con il PIC della quasi totalità dei promotori *TATA-less* (Rhee and Pugh, 2012).

È interessante notare che la natura del promotore, caratterizzata dalla presenza o dall’assenza della TATA box, sembra correlare con l’identità del co-attivatore che prende parte alla regolazione trascrizionale del gene corrispondente. I co-attivatori noti con TFIID e SAGA sono complessi dotati di subunità in grado di indurre rimodellamenti della cromatina e di interagire con la TBP (TAFs). Alcuni di questi TAFs, peraltro, sono condivisi dai due co-attivatori, che pur risultando in generale funzionalmente ridondanti (Lee *et al.*, 2000), sembrano essere reclutati in maniera preferenziale su diverse categorie di geni: SAGA è prevalentemente richiesto per la regolazione dei geni il cui promotore è dotato di una TATA box e la cui espressione è indotta in condizioni di stress, in assenza delle quali viene fortemente repressa dall’azione di regolatori che inibiscono la TBP e la pol II, nonché da complessi che contribuiscono al compattamento della cromatina; al contrario, TFIID sembra partecipare preferenzialmente alla regolazione di geni *TATA-less* espressi in maniera più costante (Huisinga and Pugh, 2002; Basehoar *et al.*, 2004).

Fondamentale nel reclutamento dei co-attivatori è il ruolo svolto dalle sequenze regolative poste a monte del *core promoter* e classificate come *upstream activating sequences* (UASs) o *upstream repressing sequences* (URSs) a seconda che la loro influenza abbia un effetto positivo o negativo sulla trascrizione da parte della Pol II. Queste sequenze sono localizzate 100- 500 bp a monte dell’estremità 5’ della sequenza codificante (Harbison *et al.*, 2004): la loro posizione, il numero e la natura dei vari elementi regolativi presenti a monte di un gene influenza il livello di espressione del gene stesso (Swamy *et al.*, 2009).

A livello di queste sequenze *cis*-regolative si legano specifici fattori di trascrizione (TFs), essenziali per modulare l'espressione dei geni Pol II: con i suoi oltre 160 membri, quella dei TF è una delle classi di proteine più numerose presenti nel lievito (Hahn and Young, 2011). Ciò che caratterizza e accomuna queste proteine è una struttura modulare composta da differenti domini funzionalmente indipendenti. Sebbene alcuni di questi fattori vengano reclutati attraverso l'interazione con altre proteine, la maggior parte dei TF è dotata di un dominio di legame al DNA (DBD), prevalentemente caratterizzato da motivi strutturali classificabili come zinco-dipendenti, elica-giro-elica, a cerniera e *forkhead* (Luscombe *et al.*, 2000). Oltre al DBD, la struttura dei fattori di trascrizione comprende un segnale di localizzazione nucleare (Hahn *et al.*, 2008), che ne regola l'importazione nel nucleo, eventuali domini regolativi e, naturalmente, il dominio di attivazione (o repressione), che consente al fattore di svolgere la propria funzione nella regolazione della trascrizione.

In generale, l'azione dei fattori trascrizionali prevede il reclutamento di co-attivatori, quali i già citati TFIID e SAGA, o come il Mediatore (Hahn and Young, 2011). Questo enorme complesso è costituito da 25 subunità organizzate in quattro moduli strutturali ed è in grado di favorire il reclutamento attivatore-dipendente della Pol II (Biddick and Young, 2005). La sua funzione è in realtà piuttosto complessa e non ancora del tutto chiarita: sembra che, oltre a fornire una connessione fisica tra l'attivatore e la Pol II, il Mediatore sia in grado di stimolare la trascrizione basale, contribuendo alla stabilizzazione del PIC e favorendo la fosforilazione TFIIH-dipendente della estremità C-terminale della subunità Rpb1 (CTD) della Pol II, di cui è ampiamente noto il ruolo fondamentale nella regolazione delle differenti fasi del ciclo trascrizionale. Evidenze sperimentali suggeriscono inoltre un'interazione del Mediatore con altri co-attivatori e lo individuano, data la sua importanza nel processo di regolazione trascrizionale, come potenziale bersaglio diretto di differenti vie di segnalazione (Poss *et al.*, 2013).

La funzione dei fattori di trascrizione risulta inoltre connessa al reclutamento diretto o indiretto di specifici complessi di rimodellamento della cromatina: la distribuzione spaziale dei nucleosomi a livello delle sequenze regolative e codificanti rappresenta infatti un punto cruciale nella modulazione dell'espressione genica: l'avvolgimento del DNA attorno all'ottamero istonico può influenzare fortemente il legame dei fattori trascrizionali ai corrispondenti siti di legame.

Sin dai primi studi condotti su scala genomica è emerso chiaramente che i nucleosomi fossero distribuiti in maniera eterogenea lungo la cromatina: in particolare, la regione regolativa a monte dei geni attivamente trascritti risultava particolarmente povera di nucleosomi tanto che pareva esistere una proporzionalità inversa tra la *nucleosome occupancy* osservata a livello di un promotore e la frequenza di eventi di inizio della trascrizione a partire dal promotore stesso (Lee *et al.*, 2004). Studi successivi hanno confermato queste osservazioni ed evidenziato l'esistenza di una particolare architettura locale della cromatina a livello dei promotori Pol II, consistente in una *nucleosome free region* (NFR) situata circa 200 bp a monte dell'estremità 5' della sequenza codificante e delimitata da due nucleosomi ben posizionati, definiti come -1 e +1. Quest'ultimo, peraltro, oltre a delimitare la *nucleosome free region*, è in grado di fungere da barriera ed influenzare la distribuzione dei nucleosomi a valle: per questo motivo i nucleosomi risultano disposti ordinatamente lungo la sequenza codificante, sebbene tale ordine diminuisca progressivamente all'aumentare della distanza dal nucleosoma +1 (Mavrich *et al.*, 2008).

La sequenza nucleotidica della NFR che caratterizza il promotore comprende blocchi evolutivamente conservati, corrispondenti non solo ai siti di legame per i fattori trascrizionali, ma anche a tratti poli(dA) o poli(dT) (Yuan *et al.*, 2005). Sequenze di questo tipo sono caratterizzate da una notevole rigidità che sfavorisce l'avvolgimento attorno al core istonico e contribuisce quindi a mantenere accessibile il promotore (Anderson and Widom, 2001). Questi elementi sono solo uno dei tanti esempi di come il posizionamento e la stabilità dei nucleosomi siano, almeno in parte, codificati a livello genomico: la sequenza nucleotidica è intrinsecamente in grado di influenzare l'organizzazione assunta localmente dalla cromatina. Ciò fornisce un contributo alla localizzazione dei fattori trascrizionali a livello di specifici siti di legame funzionalmente rilevanti, favorendo una selezione tra tutti quelli presenti nel genoma, e all'indirizzamento del macchinario trascrizionale verso i siti da cui deve iniziare la trascrizione, caratterizzati da una maggiore accessibilità (Segal *et al.*, 2006).

Un'analisi più accurata della distribuzione dei nucleosomi a livello delle sequenze regolative ha portato alla luce una differenza significativa nell'architettura cromatinica delle due classi di promotori definite in base alla presenza o assenza della TATA box: se confrontati con i promotori contenenti questo elemento, i promotori *TATA-less* di *S. cerevisiae* e di altri lieviti risultano particolarmente arricchiti in sequenze che conferiscono rigidità e sfavoriscono

l'assemblaggio dei nucleosomi (Tirosh *et al.*, 2007). Sembrano quindi essersi evolute due architetture cromatiniche alternative adatte ad assicurare due diversi livelli di plasticità trascrizionale: la prima architettura, caratteristica dei promotori *TATA-less*, è più statica, presenta nucleosomi ben posizionati, arricchiti della variante istonica H2A.Z, e una NFR definita comprendente i siti di legame per i fattori di trascrizione, la cui accessibilità non richiede quindi l'intervento di fattori di rimodellamento della cromatina. Ciò si riflette perfettamente nella ridotta variabilità di espressione dei geni *TATA-less*. Al contrario, i promotori contenenti la TATA-box, caratteristici di geni il cui livello di trascrizione deve essere fortemente regolato in risposta a differenti condizioni di stress, presentano una architettura dinamica, che ben si adatta alla elevata plasticità di espressione richiesta: in questo caso, i nucleosomi sono disposti in maniera più omogenea e dinamica e i siti di legame per i fattori di trascrizione sono spesso non accessibili. In un contesto simile, l'espressione del gene dipende dalla competizione tra nucleosomi e fattori di trascrizione, risultando pertanto fortemente influenzata dall'intervento di complessi di rimodellamento della cromatina (Tirosh and Barkai, 2008).

La differente organizzazione cromatinica del promotore inoltre sembra essere correlata con la probabilità che una mutazione casuale a livello del promotore stesso possa indurre un cambiamento consistente dell'espressione genica, situazione che sembra verificarsi con maggiore frequenza nel caso di geni il cui promotore è caratterizzato da una architettura dinamica (Hornung *et al.*, 2012). Questo fenomeno, di cui non è stato ancora chiarito il meccanismo molecolare, potrebbe essere in qualche modo connesso con l'osservazione che i siti regolativi presenti a livello dei promotori contenenti nucleosomi sembrano essere sottoposti ad una pressione selettiva minore rispetto a quelli situati in promotori caratterizzati da *nucleosome free region*, aspetto che potrebbe aver favorito nel corso dell'evoluzione la formazione di siti di legame alternativi in virtù di una maggiore frequenza di mutazioni casuali (Swamy *et al.*, 2011).

La regolazione trascrizionale dei geni codificanti per snoRNA

In lievito così come negli altri eucarioti, le unità trascrizionali codificanti per snoRNA, prevalentemente trascritte ad opera della RNA Polimerasi II, presentano una notevole variabilità di strategie di organizzazione genomica e conseguente regolazione trascrizionale.

I geni che codificano per questi piccoli RNA implicati nella maturazione degli rRNA possono essere presenti a livello genomico come unità dotate di un proprio promotore, trascritte quindi in maniera indipendente, oppure possono trovarsi all'interno delle sequenze introniche di altri geni e mancare di un promotore dedicato. Sia nel caso delle unità trascrizionalmente indipendenti, sia in quello delle unità introniche, un ulteriore elemento di variabilità è dato dal fatto che questi geni possono essere presenti singolarmente o essere organizzati in cluster (Dieci *et al.*, 2009-b).

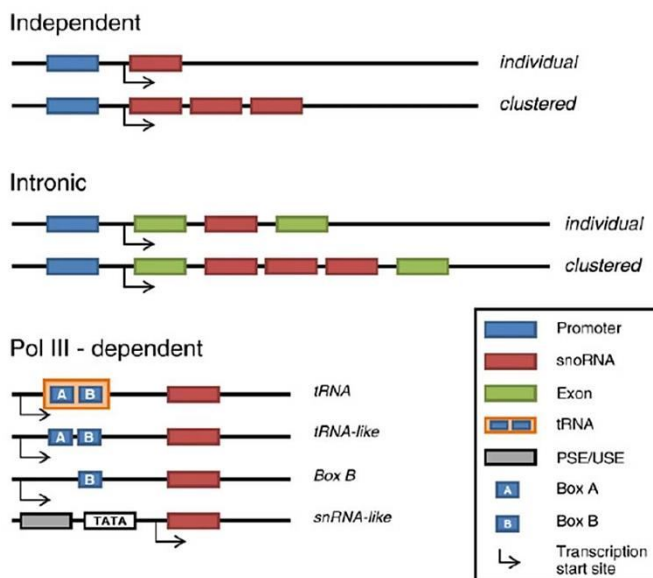


Figura 1.9. Rappresentazione schematica delle diverse tipologie di organizzazione genomica dei geni codificanti per snoRNA. Le unità trascrizionali possono essere dotate di un promotore indipendente o essere situate negli introni di altri geni e possono essere presenti come unità singole o organizzate in cluster (adattato da Dieci *et al.*, 2009-b).

L'organizzazione intronica è piuttosto frequente negli eucarioti superiori (Huang *et al.*, 2005), dove si osservano alternativamente situazioni del tipo “un gene per introne” o clusterizzazioni di più sequenze omologhe o eterologhe codificanti per snoRNA all'interno di un solo elemento intronico. Sebbene la maggior parte dei geni ospiti codifichino per proteine coinvolte nella biogenesi del ribosoma o nella sintesi proteica (Maxwell and Fournier, 1995), esistono anche casi in cui l'introne ospitante appartiene ad un gene non codificante per proteine, la cui sola funzione sembra legata alla produzione dello snoRNA (Pelczar and Filipowicz, 1999; Tycowski and Steitz, 2001). Caratteristica che accomuna i geni ospiti è l'appartenenza alla famiglia TOP (Terminal OligoPyrimidine): i membri di questa

famiglia sono espressi in maniera generalmente costitutiva e a livelli elevati e il tratto oligopirimidinico presente al 5' del loro trascritto, oltre a contribuire alla regolazione della traduzione del messaggero in risposta alle condizioni di crescita (Yamashita *et al.*, 2008), sembra essere coinvolto in un processo post-trascrizionale che controlla il rapporto relativo tra snoRNA e mRNA (de Turris *et al.*, 2004).

In *S. cerevisiae*, contrariamente a quanto osservato negli eucarioti superiori, solo 8 dei 76 geni codificanti per snoRNA si trovano all'interno delle sequenze introniche di altri geni (Piekna-Przybylska *et al.*, 2007) codificanti per proteine ribosomiali o per fattori coinvolti nella biogenesi del ribosoma e nella sintesi proteica (Dieci *et al.*, 2009-b); i restanti geni sono organizzati come unità trascrizionalmente indipendenti, o monocistroniche (50 geni), o di/policistroniche (17 geni).

Sebbene i geni per snoRNA trascrizionalmente indipendenti siano tra i loci più intensamente trascritti dalla RNA Polimerasi II, le conoscenze relative alla organizzazione dei loro promotori e ai meccanismi della loro regolazione trascrizionale sono stati, finora, solo parzialmente caratterizzati.

Un primo studio condotto sull'unità policistronica codificante per gli snoRNA snR72, snR73, snR74, snR75, snR76, snR77 e snR78 aveva dimostrato la presenza, a monte del sito di inizio della trascrizione, di due siti di legame per il regolatore Rap1, già noto per il coinvolgimento nella trascrizione dei geni codificanti per proteine ribosomiali, di un tratto poli(dA:dT), e di una TATA-box, necessari per un pieno livello di espressione della sequenza policistronica. La presenza di un analogo assortimento di elementi regolativi nel promotore di altri geni codificanti per snoRNA, unita alla più elevata espressione di snR78 osservata in cellule cresciute in glucosio anziché in glicerolo, aveva fatto ipotizzare l'esistenza di una possibile co-regolazione di questi geni con quelli codificanti per proteine ribosomiali (Qu *et al.*, 1999). Più di dieci anni dopo, grazie ad un approccio sistematico di analisi degli elementi evolutivamente conservati presenti nel promotore dei geni per snoRNA è stato possibile definire in maniera più completa l'organizzazione generale di questi promotori (Preti *et al.*, 2010): quasi l'80% dei geni è dotato di una TATA-box e circa la metà presenta un tratto poli (dA:dT) situato mediamente 50 bp a monte della TATA-box. Altri elementi regolativi piuttosto frequenti sono il sito di legame per il regolatore Reb1 e l'elemento noto come RRPE (*Ribosomal RNA Processing Element*), specifico di geni richiesti per il processamento dell'rRNA (Hughes *et al.*, 2000). Tuttavia, la sequenza conservata più rappresentata,

seconda solo alla TATA-box, corrisponde al sito di legame per la proteina Tbf1, originariamente identificata per la sua capacità di associarsi alla sequenza ripetuta TTAGGG presente a livello dei telomeri (Brigati *et al.*, 1993).

Analisi di espressione condotte su alcuni dei geni per snoRNA nell'ambito dello stesso studio hanno evidenziato che Tbf1, analogamente a Reb1 e al tratto poli (dA:dT), risulta necessario per il pieno livello di espressione, mentre la sua presenza non è coinvolta nel mantenimento della *nucleosome free region* presente a livello di questi promotori (Preti *et al.*, 2010), diversamente da quanto suggerito dalla posizione del suo sito di legame, localizzato proprio all'estremità 5' del tratto di DNA privo di nucleosomi, e da quanto osservato per i promotori di altri geni regolati da Tbf1 (Badis *et al.*, 2008).

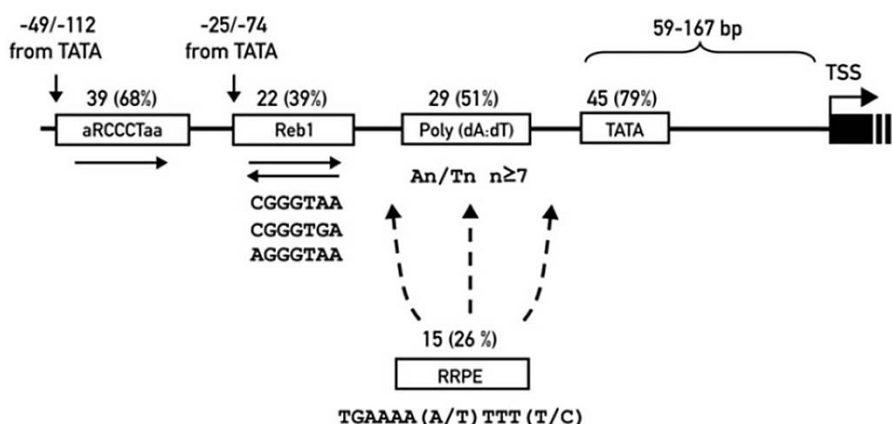


Figura 1.10. Architettura generale del promotore dei geni per snoRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Sono state indicate le sequenze, la frequenza assoluta e percentuale e la posizione rispetto al sito di inizio della trascrizione per tutti gli elementi *cis*-regolativi. Le frecce sotto alle sequenze ne indicano l'orientamento, mentre quelle tratteggiate indicano le differenti possibili posizioni occupate dall'elemento RRPE (adattato da Preti *et al.*, 2010).

Principi di regolazione e co-regolazione dei geni *ribi*

L'insieme dei geni trascritti dalla RNA Polimerasi II coinvolti con funzioni non strutturali nella biogenesi del ribosoma, noto con il nome di *ribi regulon*, è stato individuato nel corso di esperimenti volti alla caratterizzazione di specifici programmi di espressione genica attivati in risposta a particolari condizioni cellulari e alla conseguente definizione di classi di geni che risultano sottoposti a co-regolazione nell'ambito di tali programmi.

Analisi del trascrittoma mediante microarray hanno permesso di individuare una classe di geni la cui espressione risultava rispondere in modo molto simile a diverse condizioni di

stress, quali carenza di fonti di azoto, limitata disponibilità di aminoacidi, ingresso nella fase di crescita stazionaria, shock termico, shock ipo- ed iperosmotico, esposizione a DTT, perossido di idrogeno e menadione. Il profilo di espressione in risposta agli stress manifestato da questa classe di geni risultava inoltre particolarmente somigliante, anche se distinguibile, a quello caratteristico dei geni codificanti per le proteine ribosomiali; non a caso, tale classe di geni risultava arricchita in sequenze codificanti per altri fattori implicati nella biogenesi del ribosoma e nella sintesi proteica, quali subunità della RNA Polimerasi I e III, proteine richieste per il processamento e la maturazione degli rRNA, tRNA sintetasi e fattori di traduzione (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). Analogamente, il trattamento con tunicamicina o con il fattore α sembrava indurre una risposta coordinata nell'espressione di 65 di questi geni che, dato il massiccio coinvolgimento dei corrispondenti prodotti nella biogenesi dell'rRNA e del ribosoma, sono stati ribattezzati come *Ribosome and rRNA Biogenesis (RRB) regulon* (Wade *et al.*, 2001).

Studi successivi hanno portato a rivalutare le dimensioni di questa eterogenea classe di geni co-regolati, ampliandola ulteriormente: attualmente, si stima che il *ribi regulon* sia composto da 236 geni (Jorgensen *et al.*, 2004). Questo set comprende solo una parte della classe ancora più numerosa corrispondente al cosiddetto "*expanded RRB regulon*". Peraltro, data l'importanza metabolica dei geni che risultano coinvolti, non stupisce che questa coordinazione trascrizionale sia stata conservata nel corso dell'evoluzione e che un simile programma di espressione genica sia stato individuato anche in *C. albicans* (Wade *et al.*, 2006).

L'appartenenza ad un comune programma di espressione suggerisce che questi geni possano condividere anche una generale architettura del promotore. In effetti, i promotori di queste unità trascrizionali sono accomunati dalla assenza di una TATA-box, caratteristica condivisa con i geni codificanti per proteine ribosomiali, e risultano arricchiti di due motivi di sequenza individuati mediante analisi bioinformatiche basate sul software MEME: l'elemento PAC (*Polymerase A and C*) e il *Ribosomal RNA Processing Element*, anche noto con l'acronimo RRPE (Hughes *et al.*, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 2001, Jorgensen *et al.*, 2004; Wade *et al.*, 2006).

Il PAC, che deve il proprio nome al fatto di essere stato originariamente individuato a monte delle sequenze codificanti per subunità delle RNA Polimerasi I e III (Dequard-Chablat *et al.*, 1991) è caratterizzato dal motivo GCGATGAGA/CT ed è situato generalmente 50-125 bp a

monte rispetto al sito di inizio della trascrizione. L'RRPE corrisponde al motivo di sequenza TGAAAAA/TTTTT/C localizzato circa 100-150 bp a monte del TSS. La posizione che occupano, più simile a quella caratteristica della TATA-box che a quella di una UAS, ha portato ad ipotizzare che PAC ed RRPE possano costituire il *core promoter* di questi geni *TATA-less* (Boorsma *et al.*, 2009).

Questi due elementi sono presenti, rispettivamente, a livello del 47% e del 55% dei promotori dei geni *ribi* (Jorgensen *et al.*, 2004). Nel 25% dei promotori sono presenti entrambe le sequenze *cis*-regolative: nella maggior parte di questi casi, la posizione occupata dal PAC risulta più vicina all'ATG rispetto a quella dell'RRPE e i due siti, separati da circa 12-35 bp, hanno entrambi un orientamento preferenziale di tipo 5'→3' (Wade *et al.*, 2006). A questo proposito, è interessante considerare che i geni *ribi* sono stati utilizzati come esempio in uno studio che mirava a dimostrare la possibilità di prevedere la probabilità di co-regolazione di più geni sulla base della sequenza del loro promotore: come confermato da varie evidenze sperimentali, nel caso dei geni *ribi* tale probabilità risulta molto più marcata proprio per geni che presentano sia PAC che RRPE e sembra influenzata dall'orientamento dei due elementi e dalla loro distanza rispetto ATG (Beer and Tavazoie, 2004).

Il motivo RRPE viene riconosciuto dalla proteina Stb3 che, pur non possedendo alcuno dei domini di legame al DNA noti, sembra essere in grado di legare direttamente questo elemento regolativo sia *in vitro* che *in vivo* (Liko *et al.*, 2007). In risposta a carenza di nutrienti, questa proteina si sposta dal citoplasma al nucleo, dove contribuisce alla repressione di questi geni legati alla crescita cellulare. Al contrario, a seguito di un aumento dei livelli di glucosio, Stb3 viene prontamente allontanata dalla cromatina e rilocalizzata a livello citoplasmatico (Liko *et al.*, 2010). Il meccanismo molecolare sotteso al ruolo di repressore di questa proteina non è stato ancora chiarito in maniera univoca: essendo stata originariamente scoperta come *Sin-Three-Binding protein* (Kasten and Stillman, 1997), è possibile che la repressione trascrizionale mediata da Stb3 preveda il reclutamento del complesso con attività istone deacetilasi Sin3/Rpd3, per il quale era già stato ipotizzato in precedenza un coinvolgimento nella regolazione di questi geni. Evidenze sperimentali sembrano tuttavia suggerire che l'attività di Stb3 sia legata piuttosto all'azione della istone deacetilasi Hos2, componente del complesso Set3 (Liko *et al.*, 2010).

È interessante notare che la sequenza caratteristica dell'RRPE comprende un tratto poli(dA:dT), perciò è possibile ipotizzare che, oltre a fungere da sito di legame per il repressore Stb3, questo elemento regolativo possa avere un effetto diretto sulla trascrizione dei geni *ribi*, in virtù di proprietà strutturali intrinseche che potrebbero permettergli di contribuire al mantenimento di una regione priva di nucleosomi (Field *et al.*, 2008). Coerente con questa ipotesi è l'osservazione che i siti PAC ed RRPE presenti nei promotori di geni che mostrano una rapida risposta a variazioni nella disponibilità di glucosio, siti che hanno quindi una precisa funzione fisiologica, risultano ben accessibili perché localizzati in una regione *nucleosome-free* (Zawadzki *et al.*, 2009).

L'individuazione degli elementi *trans*-regolativi che riconoscono il PAC e contribuiscono alla repressione trascrizionale dei geni *ribi* è avvenuta in seguito, nell'ambito di approcci *high-throughput* basati sulla tecnica di *protein binding microarray* (Badis *et al.*, 2008; Freckleton *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009): si tratta di Dot6/Pbf2 e Tod6/Pbf1, due proteine omologhe entrambe dotate di un dominio di legame al DNA di tipo *myb-like*, che in risposta a differenti condizioni di stress, si legano ai promotori e promuovono una riduzione dei livelli di espressione, probabilmente in virtù del reclutamento del complesso con attività deacetilasi Rpd3L (Lippman and Broach, 2009; Huber *et al.*, 2011).

Lo stato di fosforilazione di tutti e tre i repressori svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della loro attività e viene controllato in modo parallelo dalle due vie di segnalazione TORC1 e PKA, il cui intervento nella regolazione dei geni *ribi* era già stato dimostrato in precedenza (Chen and Powers, 2006). La via di TOR regola, prevalentemente ma non esclusivamente attraverso Sch9 (Huber *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2011), lo stato di fosforilazione di Stb3, Dot6 e Tod6, mentre la PKA sembra agire principalmente sugli ultimi due (Lippman and Broach, 2009; Liko *et al.*, 2010): il modello proposto prevede che in condizioni di crescita favorevoli, le chinasi mantengano fosforilati su diversi residui i repressori, che restano localizzati a livello del citoplasma; come conseguenza a differenti stress o alla carenza di nutrienti, una o più fosfatasi non ancora individuate potrebbero contribuire alla defosforilazione dei repressori, favorendone il trasferimento nel nucleo, dove, associandosi ai promotori bersaglio, promuovono il reclutamento di istone deacetilasi e la conseguente repressione trascrizionale.

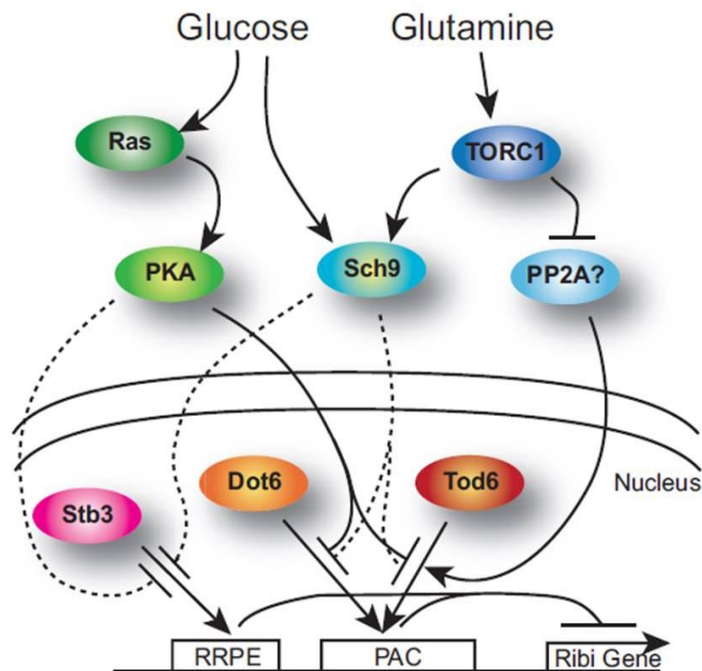


Figura 1.11. Rappresentazione schematica degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi che contribuiscono alla regolazione trascrizionale dei geni *ribi*. Le vie di segnalazione TOR e PKA intervengono per modulare questi meccanismi di controllo dell'espressione genica in risposta alle condizioni di crescita cellulare (adattato da Lippman and Broach, 2009)

Un altro regolatore dei geni *ribi* la cui attività è sottoposta al controllo delle vie di segnalazione TOR e PKA è la proteina Sfp1 (Jorgensen *et al.*, 2004): sembra che la sua funzione sia legata all'attivazione trascrizionale di questa classe di geni (Fingerman *et al.*, 2003), nonché di quelli codificanti per proteine ribosomiali (Jorgensen *et al.*, 2004), e che il suo coinvolgimento in questi processi possa costituire un link tra la biogenesi dei ribosomi e il controllo della crescita e delle divisioni cellulari (Jorgensen *et al.*, 2002; Lempiainen and Shore, 2009). Nonostante l'intervento di Sfp1 nella regolazione dei geni *ribi* sia noto ormai da tempo, numerosi sono ancora gli interrogativi non risolti, come la questione della sua modalità di interazione con i promotori di questi geni: pur essendo stata dimostrata nella sequenza di Sfp1 la presenza di domini di legame al DNA di tipo *zinc-finger* (Fingerman *et al.*, 2003), non è stato possibile individuare in maniera certa un motivo riconosciuto in modo specifico dalla proteina e la sua associazione diretta con i promotori bersaglio non è mai stata confermata.

I circuiti regolativi finora descritti rappresentano solo in parte la complessità della regolazione di questi geni e l'esistenza di numerosi elementi di connessione con il controllo delle altre unità trascrizionali coinvolte nella biogenesi del ribosoma. Tali caratteristiche sono emerse in maniera ancora più evidente negli esiti di un recente studio condotto nel nostro laboratorio e basato sull'analisi filogenetica dei promotori dei geni *ribi*. Un approccio computazionale ci ha permesso di comprendere meglio l'architettura di questi promotori, confermando la localizzazione di PAC ed RRPE e portando alla luce la massiccia e caratterizzante presenza di nuovi elementi *cis*-regolativi evolutivamente conservati (Bosio, 2012): a monte del 76% dei 228 geni *ribi* analizzati si trova infatti il sito di legame per almeno una delle proteine note come *General Regulatory Factors* (GRFs), proteine essenziali e abbondanti che legano sequenze specifiche presenti in differenti regioni genomiche, quali promotori, origini di replicazione e telomeri, intervenendo in numerosi processi nucleari fondamentali per la vita della cellula. In particolare, il sito per Abf1 è il più frequente: 95 dei promotori analizzati presentano questa sequenza, situata 125-150 bp a monte del TSS; 79 sono invece i promotori in cui è stato individuato il motivo riconosciuto da Reb1, posto solitamente 125-175 bp a monte del sito di inizio della trascrizione. Un sito di legame per Rap1 è presente in 21 dei promotori considerati e la sua posizione rispetto al TSS è mediamente più distante e variabile (150-500 bp). Infine, 15 promotori sono caratterizzati dalla presenza del sito per Tbf1, posto circa 150-200 bp a monte del sito di inizio della trascrizione. Il risultato degli esperimenti di ChIP-seq condotti per le proteine Abf1 e Reb1 nell'ambito di questo stesso lavoro, unito ai già noti profili di distribuzione genomica di Tbf1 (Preti *et al.*, 2010) e di Rap1 (Rhee and Pugh, 2011) ha complessivamente confermato l'associazione dei GRF ai corrispondenti siti di legame individuati *in silico* a livello dei promotori dei geni *ribi*.

Analisi di espressione condotte su alcuni mutanti genomici del promotore hanno dimostrato che la presenza dei GRF è necessaria per un pieno livello di espressione genica in condizioni di crescita ottimali. Altri esperimenti, i cui risultati sono tuttora in fase di analisi, mirano a chiarire il possibile coinvolgimento dei GRF anche nella repressione coordinata in risposta a specifiche condizioni di stress, quali la carenza di fonti di carbonio, nonché a determinare eventuali azioni sinergiche o antagoniste dei siti di legame per i GRF e dei già noti PAC ed RRPE nell'ambito della co-regolazione (Bosio *et al.*, 2015. In preparazione).

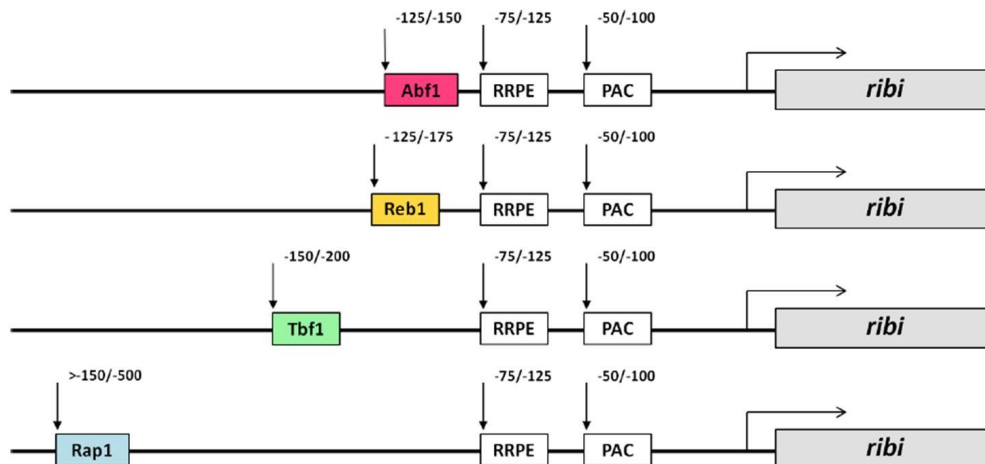


Figura 1.12. Rappresentazione schematica delle possibili architetture dei promotori dei geni *ribi*. Per ciascuno degli elementi *cis*-regolativi riportati è stata indicata la distanza rispetto al sito di inizio della trascrizione (adattato da Bosio, 2012).

Il quadro regolativo dei geni codificanti per proteine ribosomiali

Le 79 proteine che compongono il ribosoma di *S. cerevisiae* sono codificate da 138 geni trascritti dalla RNA Polimerasi II. La presenza di 59 coppie di paraloghi si deve ad un evento di duplicazione dell'intero genoma, avvenuta successivamente alla divergenza evolutiva tra i generi *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* (Kellis *et al.*, 2004). Poiché le sequenze codificanti differiscono per pochi nucleotidi, le proteine che ne derivano risultano identiche o quasi e vengono generalmente considerate indistinguibili dal punto di vista funzionale (Planta and Mager, 1998). Tuttavia, le differenze osservate nei livelli di espressione dei due paraloghi (Holstege *et al.*, 1998), nonché i diversi fenotipi manifestati in risposta alla delezione degli stessi, che si distinguono anche per la sequenza delle 5'- e 3'-UTR e, in alcuni casi, per la presenza di regioni introniche (Planta, 1997), hanno suggerito l'ipotesi che i due geni e i corrispondenti prodotti non siano funzionalmente ridondanti e che, al contrario, contribuiscano all'assemblaggio di ribosomi specializzati (Komili *et al.*, 2007). Ciò potrebbe essere indicativo dell'esistenza di un vero e proprio "*ribosomal code*", che darebbe vita ad un ulteriore livello di controllo dell'espressione genica, particolarmente significativo nell'ambito dello sviluppo e della fisiologia degli eucarioti superiori (Xue and Barna, 2012). In condizioni di crescita ottimali i geni per proteine ribosomiali sono tra i più attivamente trascritti di tutto il genoma (Velculescu *et al.*, 1997): un consistente impegno da parte della RNA Polimerasi II è richiesto per assicurare il raggiungimento di elevati livelli di questi

mRNA, che risultano peraltro caratterizzati da una emivita decisamente più breve rispetto a quella della maggior parte degli altri RNA messaggeri (Li *et al.*, 1999). Gli elementi regolativi che contribuiscono alla modulazione dell'espressione devono promuovere questa intensa trascrizione quando la richiesta di ribosomi è elevata, ma devono anche contribuire alla tempestiva e marcata riduzione trascrizionale che si verifica in risposta a numerose condizioni di stress (Gasch *et al.*, 2000). La regolazione inoltre deve avvenire in maniera coordinata con quella di tutte le altre unità trascrizionali che prendono parte alla biogenesi del ribosoma, specialmente per quanto riguarda l'rDNA, che codifica per gli altri elementi strutturali. È fondamentale infatti che tutte le componenti del ribosoma siano disponibili in quantità stechiometriche, obiettivo che nel caso delle RP presenta come ulteriore punto critico il fatto che la maggior parte di queste proteine è codificata da una coppia di paraloghi anziché da un gene singolo (Warner, 1999). Sembra che un effetto compensatorio sia in parte da imputare agli introni, che risultano più abbondanti nei geni presenti in duplice copia. In questi casi, la delezione di sequenze introniche di un gene determina alterazioni dei livelli di espressione anche del paralogo, suggerendo che il processo di splicing possa contribuire alla regolazione genica e alla modulazione del livello di espressione delle coppie di paraloghi (Parenteau *et al.*, 2011). Evidenze sperimentali suggeriscono che la differenza nel numero di geni sia per buona parte compensata dalle caratteristiche delle sequenze dei promotori: sembra che, in generale, i promotori dei geni presenti in singola copia abbiano un'attività maggiore, dovuta alla presenza di un maggior numero di sequenze che sfavoriscono l'assemblaggio dei nucleosomi e alla particolare organizzazione spaziale di queste sequenze e dei siti di legame per i regolatori trascrizionali (Zeevi *et al.*, 2011).

Come prevedibile sulla base del loro profilo di espressione, i promotori dei geni per proteine ribosomiali sono prevalentemente *TATA-less* (Baseohar *et al.*, 2004), presentano una regione libera da nucleosomi a monte del TSS, pur mancando nella maggior parte dei casi del canonico nucleosoma -1 (Mavrich *et al.*, 2008) e sono arricchiti di tratti poli(dA-dT) che contribuiscono all'organizzazione locale della cromatina (Segal and Widom, 2009), favorendo l'attivazione della trascrizione (Gonçalves *et al.*, 1995).

Altra caratteristica di questi promotori è la presenza di siti di legame per Rap1, localizzati a monte di 127 dei 138 geni RP (Planta, 1997; Lascaris *et al.*, 1999). Rap1 è un fattore generale di regolazione che lega il DNA in maniera diretta e sequenza specifica attraverso

due motivi *helix-turn-helix* strutturalmente correlati all'omeodominio del proto-oncogene c-Myc (König et al., 1996). Rap1 riconosce siti di legame sparsi in diverse regioni del genoma ed interviene in numerosi processi nucleari (Shore, 1994; Morse, 2000; Piña et al., 2003): prende parte insieme ad Abf1 al silenziamento dei loci HMR e HML, contribuendo al reclutamento delle proteine Sir; sempre mediante l'intervento delle proteine Sir, determina il silenziamento genico a livello dei telomeri, dei quali contribuisce inoltre a regolare la lunghezza di concerto con le proteine Rif1 e Rif2; agisce come organizzatore della cromatina, fungendo da *nucleosome boundary* e da reclutatore dei complessi di rimodellamento; svolge un ruolo chiave nella attivazione o repressione di numerose unità trascrizionali fondamentali per la crescita cellulare, come i geni RP e i geni codificanti per enzimi della via glicolitica.

A livello dei promotori dei geni RP, Rap1 riconosce siti corrispondenti al consenso WACAYCCRTACATY (dove W corrisponde ad A o T, R ad A o G, Y a C o T), molto frequentemente presenti in tandem: in questi casi, tutti e due i siti hanno prevalentemente un orientamento di tipo 5'→3', sono separati l'uno dall'altro da un tratto di 5-15 bp e si localizzano 200-450 bp a monte del sito di inizio della trascrizione (Lascaris et al., 1999; Zhang et al., 2008; Knight et al., 2014). Secondo quanto suggerito da un modello di predizione del profilo di espressione basato sulla sequenze dei promotori, sembra che la presenza di due siti per Rap1 sia strettamente legata alla possibilità di co-regolazione dei geni RP (Beer and Tavazoie, 2004).

L'associazione di Rap1 a questi promotori è stata confermata da numerosi esperimenti di immunoprecipitazione cromatinica (Lieb et al., 2001; Harbison et al., 2004; Rhee and Pugh, 2011; Knight et al., 2014); tale interazione sembra inoltre essere costitutiva: Rap1 rimane infatti associato ai promotori di questi geni anche in condizioni nelle quali la loro espressione viene fortemente repressa, come in caso di carenza di aminoacidi, di shock osmotico o termico e a seguito del trattamento con rapamicina (Reid et al., 2000; Rohde and Cardenas, 2003; Wade et al., 2004).

Questo suggerisce che il ruolo svolto da Rap1 nel controllo dell'espressione di questi geni preveda il reclutamento di altri fattori. Evidenze sperimentali dimostrano il coinvolgimento di Rap1 nel reclutamento della istone acetilasi Esa1, promosso dalla via di segnalazione TOR in condizioni di crescita ottimali: Esa1 determina l'acetilazione dell'istone H4, contribuendo al mantenimento di una struttura cromatinica rilassata (Reid et al., 2000). L'inibizione della

via TOR che si verifica in risposta al trattamento con rapamicina o in caso di carenza di nutrienti determina la dissociazione di Esa1 da questi loci e la concomitante attivazione del complesso istone deacetilasi Rpd3-Sin3, la cui presenza a livello dei geni RP non sembra dipendere invece dall'intervento di Rap1. La deacetilazione degli istoni riduce l'espressione genica favorendo una struttura cromatinica più compatta e quindi meno accessibile (Rohde and Cardenas, 2003). È stato inoltre suggerito che Rap1 possa influenzare anche in maniera diretta l'architettura locale della cromatina: l'associazione di Rap1 ai propri siti di legame a livello dei promotori dei geni RP sembra infatti favorire l'esclusione dei nucleosomi dalla circostante regione del promotore (Zhao *et al.*, 2006).

Studi *in vivo* ed *in vitro* sottolineano il ruolo fondamentale svolto da Rap1 nel reclutamento del complesso TFIID, fondamentale per l'espressione dei geni RP (Mencía *et al.*, 2002): il GRF contatta direttamente l'eterodimero Taf4-Taf12 del coattivatore e questo sembrerebbe migliorare, secondo un meccanismo non ancora chiarito, l'efficienza di formazione o di funzionamento del complesso di preinizio (Garbett *et al.*, 2007).

Rap1 è coinvolto inoltre nel meccanismo che permette l'associazione del Mediatore ai promotori dei geni per proteine ribosomiali: esistono infatti evidenze di una interazione, diretta o indiretta, di Rap1 con alcune componenti del dominio "coda" del complesso multisubunità (Ansari *et al.*, 2009).

Infine, fondamentali per la modulazione della trascrizione sono anche le interazioni che Rap1 instaura con Hmo1, Fhl1, Ifh1 e Sfp1, gli altri regolatori specifici che intervengono nel controllo dei geni per proteine ribosomiali.

La proteina Hmo1 rappresenta un importante punto di collegamento nella coordinazione trascrizionale di rDNA e geni RP: oltre a risultare associata alle copie di DNA codificante per gli RNA ribosomiali attivamente trascritte, Hmo1 interagisce con circa la metà dei geni codificanti per proteine ribosomiali regolati da Rap1 (Hall *et al.*, 2006; Kasahara *et al.*, 2007; Knight *et al.*, 2014).

Controversa risulta la modalità di reclutamento di Hmo1 a livello di questi promotori: in accordo con la generale aspecificità di legame al DNA che caratterizza i membri della famiglia HMG-box di cui Hmo1 fa parte, fin da subito è stato chiaro che un ruolo fondamentale nel suo reclutamento spettasse proprio a Rap1 (Hall *et al.*, 2006). Un ulteriore contributo sembrava derivare dall'interazione con Fhl1: l'associazione fisica delle due proteine era già stata suggerita in precedenza dall'esito di un saggio del doppio ibrido

(Ito *et al.*, 2001). Tuttavia, dal momento che il legame di Hmo1 su alcuni promotori si riduceva fortemente in assenza di Fhl1 e viceversa, il preciso ruolo di ciascuna delle due proteine nel reclutamento dell'altra risultava difficile da stabilire, ragione per cui si era ipotizzato che il legame dei due regolatori con il promotore dei geni RP potesse avvenire in maniera cooperativa (Hall *et al.*, 2006). Le osservazioni presentate in un lavoro successivo sembravano invece suggerire maggiormente la possibilità che fosse Hmo1 a svolgere un ruolo fondamentale nel reclutamento di Fhl1 a livello dei promotori a cui è associato (Kasahara *et al.*, 2007). Recentemente, quest'ipotesi è stata confermata nell'ambito dello stesso studio in cui, attraverso approcci differenti, sono state fornite alcune evidenze a favore dell'idea che Hmo1 sia in grado di riconoscere sequenze specifiche di DNA, spesso presenti come unità ripetute nella regione del promotore dei geni RP (Knight *et al.*, 2014). Questa sequenza sembrerebbe corrispondere ad una versione piuttosto degenerata dell'elemento IFHL. Questo elemento era stato precedentemente proposto come sito coinvolto nel reclutamento di Hmo1 (Hall *et al.*, 2006; Lavoie *et al.*, 2010), sebbene fosse stato dimostrato che la sua mutazione non determinava cambiamenti significativi nell'interazione tra la proteina e i promotori dei geni RP (Hall *et al.*, 2006).

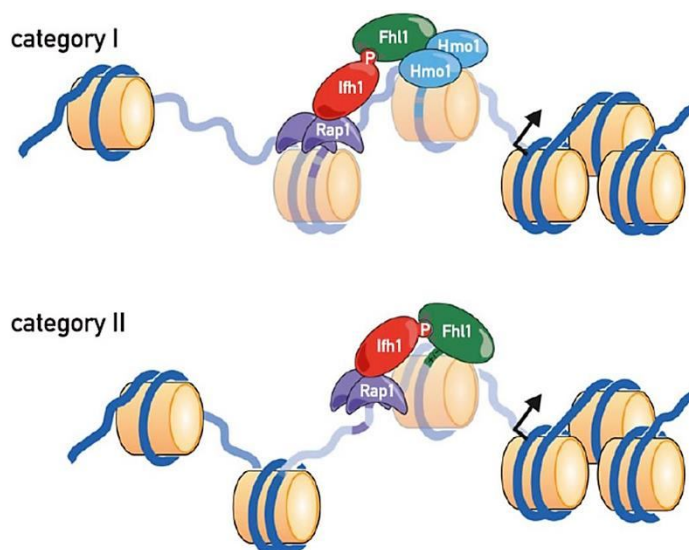


Figura 1.13. Rappresentazione schematica degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi dei geni RP regolati da Rap1, che vengono classificati in base alla presenza (category I) o assenza (category II) di Hmo1. Sono stati indicati anche il regolatore Fhl1, l'attivatore Ifh1 e l'organizzazione locale dei nucleosomi (adattato da Knight *et al.*, 2014)

Anche quella relativa alla funzione di Hmo1 è una questione ancora aperta: in generale la sua presenza non sembra strettamente necessaria per l'espressione di questi geni (Hall *et al.*, 2006), come dimostrato dal fatto che i livelli di mRNA misurati in assenza di Hmo1 non sembrano variare in maniera significativa. Oltre a contribuire al reclutamento di Fhl1 (Kasahara *et al.*, 2007), sembra che, interagendo direttamente con TFIID, Hmo1 possa svolgere un ruolo chiave nella determinazione del sito di inizio della trascrizione (Kasahara *et al.*, 2008), guidando il corretto posizionamento del complesso di preinizio (Kasahara *et al.*, 2011).

Certo è invece il fatto che Hmo1 rappresenta un importante punto della regolazione coordinata che la via TOR esercita su geni RP e rDNA: è stato dimostrato infatti che a seguito del trattamento con rapamicina Hmo1 si dissocia da entrambi questi *loci* e che la repressione della trascrizione dei geni RP solitamente indotta da questo trattamento risulta decisamente attenuata in assenza di Hmo1 (Berger *et al.*, 2007).

Come già accennato, un altro importante regolatore dei geni codificanti per proteine ribosomiali è Fhl1, il prodotto di un gene originariamente identificato come soppressore multicopia di diverse mutazioni della Pol III, importante per la crescita ottimale delle cellule, seppur non essenziale, che sembrava in qualche modo coinvolto nel processamento dell'rRNA (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994). Alcuni anni più tardi uno studio volto alla caratterizzazione di network di regolazione trascrizionale ha messo in evidenza il coinvolgimento di Fhl1 nel controllo dei geni codificanti per proteine ribosomiali (Lee *et al.*, 2002) e successive analisi della sua distribuzione su scala genomica hanno confermato il legame estremamente specifico di Fhl1 a quest'unica classe di geni (Wade *et al.*, 2004; Schawarlder *et al.*, 2004; Rudra *et al.*, 2005).

Come per Hmo1, anche nel caso di Fhl1 risulta piuttosto complesso comprendere a fondo il meccanismo di reclutamento a livello dei promotori bersaglio: sebbene fosse stata identificata da subito come proteina dotata di un dominio di legame al DNA *fork head-like* (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994), la delezione di questo dominio, contrariamente a quella dell'intera proteina, non sembra causare una significativa riduzione della velocità di crescita (Rudra *et al.*, 2005). Numerose osservazioni hanno suggerito che il suo reclutamento dipendesse in larga misura da Rap1 (Wade *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2014) e che Fhl1, analogamente a Rap1, rimanesse legato ai promotori anche in condizioni in cui la trascrizione dei geni RP viene repressa, come a seguito del trattamento con

rapamicina o dello shift diauxico (Schwarlder *et al.*, 2004; Rudra *et al.*, 2005). Successivamente è stato dimostrato che anche Hmo1, laddove presente, contribuisce al reclutamento di Fhl1 (Kasahara *et al.*, 2007; Knight *et al.*, 2014).

Relativamente all'ipotesi di un legame diretto con il DNA, era stato proposto che Fhl1 potesse riconoscere un tratto di sequenza denominato IFHL, presente a livello di alcuni promotori dei geni RP, benché mutazioni di questo elemento non sembrassero influenzare in maniera drastica l'associazione di Fhl1 con i promotori (Wade *et al.*, 2004).

Successivamente, diversi studi basati su approcci *in vitro* condotti per l'individuazione degli elementi *cis*-regolativi corrispondenti ai fattori trascrizionali di lievito hanno riscontrato la capacità del dominio di legame al DNA di Fhl1 di riconoscere in maniera specifica sequenze corrispondenti al consenso "SACGCAM", dove S rappresenta G o C e M può indicare A o C (Badis *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2013). Solo l'anno scorso, un'analisi di ChIP-seq ha permesso di confermare che una parte dei promotori a cui Fhl1 risulta associato *in vivo* presentano la stessa sequenza individuata *in vitro*: la presenza di questa sequenza è più frequente nella classe di promotori che non sono legati anche da Hmo1, ma solo da Rap1. Sembra che per questi promotori il legame diretto con il DNA svolga un ruolo importante nel reclutamento di Fhl1: coerentemente a ciò, l'associazione di Fhl1 con questi promotori sembra essere marcatamente ridotta quando la proteina viene privata del proprio dominio di legame al DNA o quando la sequenza *cis*-regolativa viene mutata (Knight *et al.*, 2014).

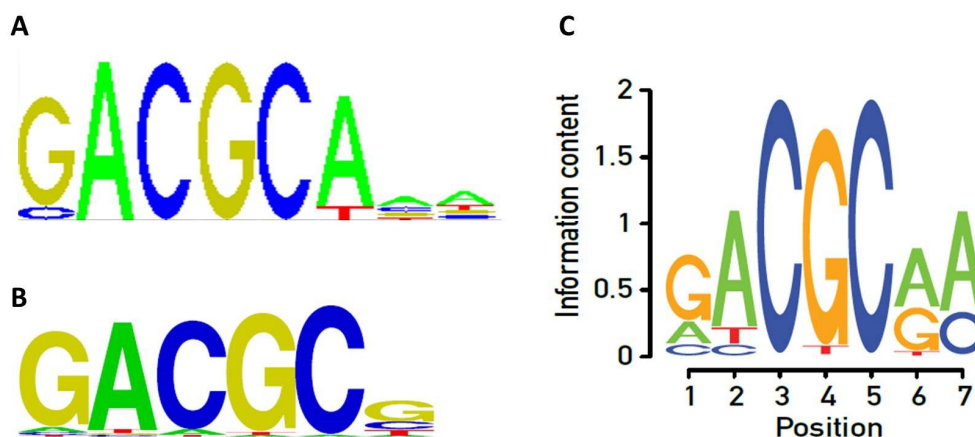


Figura 1.14. Motivo di sequenza del sito di legame di Fhl1 ottenuto da esperimenti di *protein binding microarray* condotti con il suo dominio di legame al DNA (A, adattato da Zhu *et al.*, 2009. B, adattato da Nakagawa *et al.*, 2013) e da un'analisi ChIP-seq (C, adattato da Knight *et al.*, 2014).

Più chiaro invece è l'aspetto relativo alla funzione svolta da Fhl1 nella regolazione dei geni per proteine ribosomiali: promuovere il reclutamento alternativo dell'attivatore Ifh1 o del repressore Crf1 (Martin *et al.*, 2004). Ifh1 è il prodotto di un gene identificato in un studio genetico come soppressore dosaggio dipendente che corregge, almeno in parte, il fenotipo di crescita del mutante *Δfhl1* (Cherel and Thuriaux, 1995). Fhl1 interagisce con Ifh1 grazie al proprio dominio *forkhead-associated* (Wade *et al.*, 2004; Schawarlder *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004; Rudra *et al.*, 2005), motivo strutturale che media il reclutamento di fosfoproteine (Durocher and Jackson, 2002). Contrariamente a quello di Rap1 e Fhl1, il legame di Ifh1 ai promotori non è costitutivo e rappresenta, al contrario, un evento chiave dell'attivazione trascrizionale a cui è strettamente correlato: la proteina risulta associata a questi promotori solo in condizioni di crescita ottimali, le stesse in cui i geni RP sono espressi a livelli elevati. In risposta a diverse condizioni di stress, la proteina si dissocia dai promotori e la trascrizione viene rapidamente repressa (Wade *et al.*, 2004; Schawarlder *et al.*, 2004). Peraltro, il fatto che il dominio FHA di Fhl1 promuova l'interazione specifica con proteine fosforilate suggerisce che il reclutamento di Ifh1 a livello dei promotori dei geni RP possa essere promosso da una fosforilazione reversibile del suo dominio di interazione con Fhl1. In effetti, è stato dimostrato che TOR e PKA regolano l'espressione dei geni per proteine ribosomiali controllando la fosforilazione di Ifh1 e Crf1: in condizioni di crescita ottimali TOR promuove il reclutamento di Ifh1 e, attraverso la PKA, regola negativamente la chinasi YAK1 in modo da mantenere Crf1 in una forma inattiva defosforilata, localizzata a livello del citoplasma.

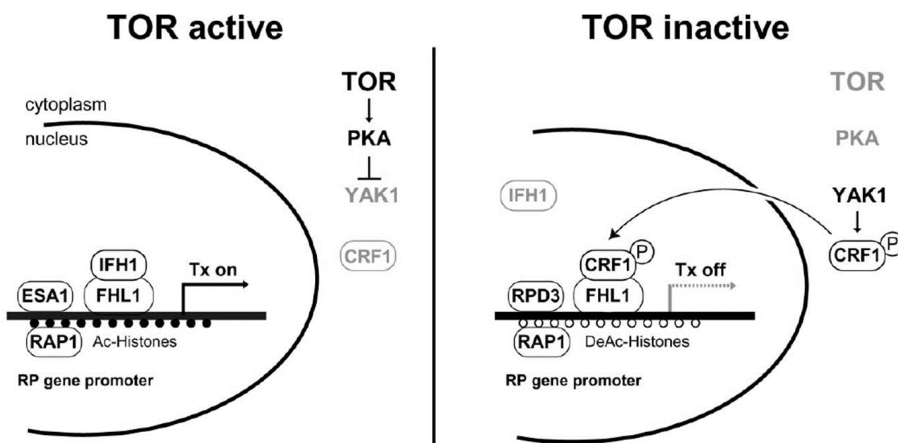


Figura 1.15. Rappresentazione schematica della regolazione TOR-dipendente dei geni codificanti per proteine ribosomiali (adattato da Martin *et al.*, 2004).

A seguito dell'inibizione della via TOR, YAK1 fosforila Crf1, attivandolo. Quest'ultimo si rilocalizza nel nucleo, dove compete con Ifh1 per il legame con Fhl1, determinando la conseguente dissociazione dell'attivatore e la repressione della trascrizione (Martin *et al.*, 2004).

Recentemente sono state ottenute evidenze del fatto che Ifh1 rappresenta un bersaglio diretto della PKA e che la fosforilazione non sembra essere tuttavia l'unica modificazione post-traduzionale che permette la modulazione della sua attività: è stato proposto che anche l'acetilazione possa contribuire a controllare Ifh1 (Cai *et al.*, 2013). L'attivatore infatti sembra essere un bersaglio della istone acetiltransferasi Gcn5, che modifica residui appartenenti alla regione N-terminale della proteina. È stato proposto che l'acetilazione inibisca l'attività di Ifh1 in condizioni di crescita non ottimali e che la proteina possa essere convertita in un stato ipoacetilato grazie all'intervento di Hst1 e Sir2 quando le condizioni di crescita sono favorevoli e richiedono una piena espressione dei geni RP (Downey *et al.*, 2013).

È bene precisare infine che è stata dimostrata la presenza di Ifh1 in un complesso noto come CUR1, di cui fanno parte anche la caseina chinasi II (CK2) e le proteine Utp22 e Rrp7, due fattori coinvolti nel processo di maturazione dell'rRNA. Anche Fhl1 sembrerebbe interagire, sebbene più debolmente, con questo complesso (Rudra *et al.*, 2007). È stato proposto che in condizioni di crescita sfavorevoli la riduzione della trascrizione dei geni RP e dell'rDNA, con conseguente riduzione del processamento dell'rRNA, rendano Utp22 e Rrp7 disponibili per la formazione del complesso CUR1, insieme a CK2 e Ifh1, contribuendo alla dissociazione di quest'ultimo dai promotori dei geni RP: ciò potrebbe costituire un punto di controllo comune della regolazione dell'espressione dei geni per proteine ribosomiali e della maturazione dell'rRNA. Quest'ipotesi potrebbe inoltre giustificare la rilocalizzazione nucleolare di Ifh1 e Fhl1 che si osserva in condizioni di crescita sfavorevoli (Jorgensen *et al.*, 2004).

Un altro fattore che contribuisce alla regolazione dei geni RP è Sfp1, una proteina dotata di un dominio Cys₂His₂ in cui i due motivi a dita di zinco sono insolitamente distanti uno dall'altro. La delezione del gene da cui è codificata causa una notevole riduzione della crescita (Blumberg and Silver, 1991). Studi successivi hanno suggerito che questo difetto di crescita fosse dovuto alla ridotta espressione dei geni per proteine ribosomiali e dei geni *ribi* che si osserva in assenza della proteina (Jorgensen *et al.*, 2002; Jorgensen *et al.*, 2004)

Pur risultando associata a numerosi promotori dei geni RP (Marion *et al.*, 2004) e nonostante sia dotata di un dominio di legame al DNA, Sfp1 non sembra interagire direttamente con i suoi promotori bersaglio: è stato proposto che il suo reclutamento avvenga in maniera prevalentemente indiretta, probabilmente grazie all'interazione con Rap1 (Gordân *et al.*, 2009).

Sconosciuto resta anche il suo meccanismo d'azione, mentre è stato più volte dimostrato che l'associazione di Sfp1 ai promotori dei geni RP è controllata dalla sua fosforilazione, promossa dalle vie TOR e PKA. In condizioni di crescita ottimali, Sfp1 viene mantenuta in uno stato fosforilato: in questa forma, la proteina è attiva e localizzata a livello nucleare, dove può prendere parte all'attivazione dei geni RP (Jorgensen *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2004). In risposta a stress e carenza di nutrienti, Sfp1 si dissocia dai promotori, abbandona il nucleo e viene sequestrata nel citoplasma attraverso l'interazione con la proteina Mrs6 (Singh and Tyers, 2009). È stato proposto che in aggiunta a questo meccanismo di rilocalizzazione cellulare anche la degradazione di Sfp1 ad opera del proteasoma possa contribuire alla repressione trascrizionale dei geni RP in condizioni di carenza di nutrienti (Lopez *et al.*, 2011).

Sembra che la ridotta espressione di questi geni che si verifica a seguito dell'inibizione della via TOR possa in parte dipendere anche dall'intervento del repressore Stb3, già citato per il suo ruolo nel controllo dei geni *ribi*, e del complesso istone deacetilasi Rpd3L.

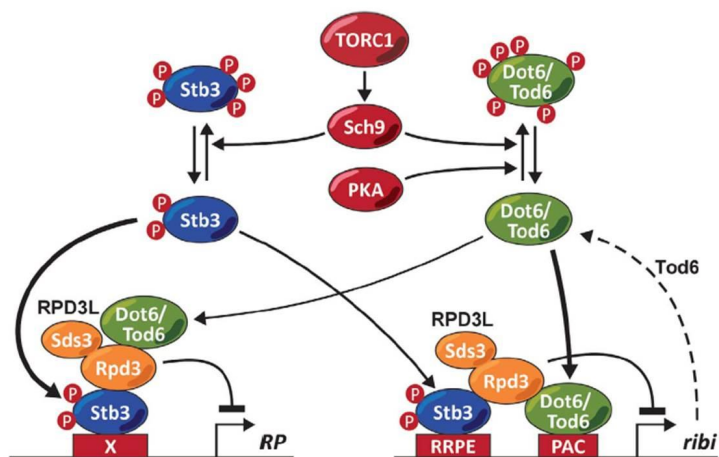


Figura 1.16. Rappresentazione grafica del coinvolgimento di Stb3 e della istone deacetilasi Rpd3 nella repressione dei geni per proteine ribosomiali. Gli stessi fattori sono implicati nella repressione dei geni *ribi* e rappresentano quindi un elemento di regolazione comune attraverso cui la via TOR controlla queste due classi di geni (adattato da Huber *et al.*, 2011).

In risposta a condizioni di crescita sfavorevoli la chinasi Sch9, che mantiene Stb3 inattiva nel citoplasma, viene inibita; di conseguenza il repressore si rilocalizza a livello del nucleo e recluta Rpd3L sui promotori dei geni RP, promuovendo un rimodellamento della cromatina che contribuisce alla repressione della trascrizione (Huber *et al.*, 2011).

È bene precisare che la maggior parte delle osservazioni descritte sono derivate principalmente da studi riguardanti la classe maggioritaria dei geni per RP per quali Rap1 svolge la funzione di *master regulator*; non va tuttavia dimenticata l'esistenza, messa in evidenza fin dai primi studi, del gruppo minoritario di geni i cui promotori presentano, anziché i siti di legame per Rap1, quelli riconosciuti da un altro GRF, la proteina Abf1 (Mager and Planta, 1990; Planta, 1997; Lascaris *et al.*, 1999). A livello di questi promotori, Abf1 riconosce una sequenza corrispondente al consenso bipartito RTCRYNNNNNACGR, dove R indica A o G, Y rappresenta C o T e N indica una base qualsiasi, localizzato entro le prime 200 bp a monte del sito di inizio della trascrizione (Yarragudi *et al.*, 2007).

In accordo con la somiglianza funzionale riscontrata tra i domini C-terminali dei due GRF (Gonçalves *et al.*, 1996), è stato dimostrato che Abf1 condivide con Rap1 alcune delle funzioni che quest'ultimo svolge in qualità di regolatore a livello dei geni per proteine ribosomiali: Abf1, similmente a Rap1, contribuisce al reclutamento della istone acetilasi Esa1 che promuove il mantenimento di un stato cromatinico rilassato, favorevole ad una attiva trascrizione dei geni RP in condizioni di crescita ottimali (Reid *et al.*, 2000) e partecipa al reclutamento di TFIID (Mencía *et al.*, 2002). Altre evidenze suggeriscono che sia Rap1 che Abf1 siano in grado di influenzare fortemente lo stato di organizzazione della cromatina, contribuendo al posizionamento dei nucleosomi (Ganapathi *et al.*, 2011).

A tal proposito, il gene *RPS28B* è stato oggetto di uno studio in cui sono stati caratterizzati i differenti ruoli svolti nell'organizzazione della cromatina da Abf1 e del tratto poli(dT) presente a livello del promotore. Questo promotore presenta una regione di circa 50-60 bp priva di nucleosomi immediatamente a valle del sito di legame per Abf1, seguita da una serie di nucleosomi disposti in maniera ordinata. È stato dimostrato che la mutazione del sito di legame per il GRF provoca una drammatica alterazione della disposizione dei nucleosomi, che assumono una distribuzione disordinata e disorganizzata, mentre la mutazione del tratto poli(dT) provoca la perdita della *nucleosome free region* a causa dello scivolamento dei nucleosomi (Lascaris *et al.*, 2000).

Contrariamente a quelli regolati da Rap1, i geni controllati da Abf1 non sono mai stati oggetto di uno studio sistematico, perciò riguardo alla loro regolazione esistono ancora diversi punti interrogativi. Non è chiaro, ad esempio, quale sia la ragione per cui, diversamente da tutti gli altri geni per RP, essi siano stati posti sotto il controllo di Abf1; non è noto se anche in questi casi, come a livello dei geni regolati da Rap1, la modulazione dell'espressione genica richieda l'intervento di Fhl1 e come quest'ultimo venga eventualmente reclutato; sfuggenti sono poi alcuni aspetti del meccanismo di regolazione di questi geni in risposta alle condizioni di crescita: non è noto se Abf1, come Rap1, rimanga legato a questi promotori in maniera costitutiva e se altri fattori fungano da bersaglio per i pathway di segnalazione che assicurano la modulazione dell'espressione genica.

2. SCOPO DELLA RICERCA

La biogenesi del ribosoma è un evento complesso, sia dal punto di vista biochimico che da quello metabolico. È fortemente rappresentativo delle capacità di crescita della cellula poiché costituisce il processo energeticamente più dispendioso a cui essa deve provvedere. La possibilità di esercitare una fine regolazione risulta quindi cruciale per la sopravvivenza e la crescita cellulare: una elevata produzione di ribosomi è necessaria solo quando le condizioni di crescita sono ottimali, mentre in risposta a differenti stress, il processo deve essere prontamente represso per evitare un consumo energetico non necessario. In *Saccharomyces cerevisiae*, diversamente dalla maggior parte degli altri eucarioti, la modulazione della sintesi di nuovi ribosomi avviene prevalentemente a livello trascrizionale: oltre 750 geni, la cui trascrizione impegna tutte e tre le RNA Polimerasi nucleari, devono essere espressi in maniera concertata, in modo tale che ogni singola unità trascrizionale risulti finemente modulata a seconda delle esigenze cellulari e che il controllo di ciascun componente venga precisamente coordinato con quello di tutti gli altri. L'elevato grado di complessità del meccanismo regolativo giustifica gli sforzi che da decenni vengono profusi nel tentativo di ottenere un quadro chiaro ed esaustivo degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi coinvolti in questo articolato programma di espressione genica.

Se si considerano i 138 geni che codificano per le 79 proteine ribosomiali, ampiamente caratterizzata risulta la classe maggioritaria costituita dalle unità trascrizionali i cui promotori presentano siti di legame per il *General Regulatory Factor* Rap1. Il presente lavoro di tesi si propone invece di fornire un contributo alla comprensione dei meccanismi di regolazione di quella classe decisamente meno numerosa di geni il cui promotore contiene la sequenza riconosciuta da un altro GRF, la proteina Abf1. Attraverso uno studio sistematico che si è avvalso di approcci *in silico*, *in vivo* ed *in vitro*, si è cercato dapprima di definire i tratti funzionalmente significativi dell'architettura di questi promotori eseguendo un'analisi filogenetica delle loro sequenze; è stato quindi investigato mediante diverse tecniche il legame a queste regioni promotoriali non solo di Abf1, ma anche di Fhl1, altro regolatore chiave coinvolto nel controllo dei geni RP, che pur essendo noto da circa vent'anni presenta ancora diversi punti irrisolti: primo fra tutti la sua modalità, diretta o indiretta, di associazione a questi promotori; la costruzione e l'analisi di mutanti genomici del promotore ha permesso poi un primo passo verso l'approfondimento degli aspetti regolativi, consentendo una valutazione del contributo fornito dai singoli elementi di controllo in *cis*- alla attivazione trascrizionale dei geni considerati.

3. RISULTATI

3.1. I promotori dei geni *RPL3*, *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B* contengono un sito di legame per Fhl1

La maggior parte dei promotori che regolano l'espressione dei geni per proteine ribosomiali presentano siti di legame per Rap1; i promotori dei geni *RPL3*, *RPL4A*, *RPL4B*, *RPP1A*, *RPP2B*, *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B* sono caratterizzati invece dalla presenza di un sito di legame per la proteina Abf1 (Lascaris *et al.*, 1999). Al fine di valutare la presenza in questi promotori di altri potenziali elementi *cis*-regolativi è stata eseguita un'analisi di *footprinting* filogenetico delle loro sequenze. Tale analisi si basa sul principio secondo cui sequenze genomiche funzionalmente rilevanti, quali ad esempio gli elementi che compongono un promotore, sono riconoscibili per l'elevato grado di conservazione evolutiva che le contraddistingue (Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003): esse risultano infatti soggette ad una pressione selettiva nettamente maggiore rispetto a tratti di sequenza privi di una funzione specifica.

Per ciascuno dei geni di *S. cerevisiae* in analisi è stato quindi dapprima cercato l'ortologo nei genomi di *S. mikatae*, *S. paradoxus*, e *S. kudriavzevii*, tre specie di emiascomiceti evolutivamente correlate a *S. cerevisiae*. Le sequenze dei promotori di ciascun gruppo di ortologhi sono state allineate utilizzando il programma CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) e sugli allineamenti ottenuti è stata eseguita la ricerca di blocchi di sequenza evolutivamente conservati: per sei dei geni considerati, questa analisi ha evidenziato la presenza di alcuni elementi comuni. Circa 120 bp a monte del sito di inizio della trascrizione, è presente un tratto poli(dT), di lunghezza variabile tra 10 e 17 bp; tipico dei promotori *TATA-less* questo elemento di sequenza è caratterizzato da una rigidità intrinseca che impedisce l'assemblaggio dei nucleosomi e assicura l'accessibilità dei siti di legame per i fattori trascrizionali (Field *et al.*, 2008). Il sito di legame per Abf1 è posizionato mediamente 160 bp a monte del sito di inizio della trascrizione e presenta la caratteristica struttura bipartita, nella quale solo alcune basi in prossimità delle estremità 5' e 3' risultano conservate. Fortemente conservato in tutti i promotori considerati è inoltre un tratto di sequenza posto a valle del sito di legame per Abf1, caratterizzato dal consenso "SACGCAM", dove S rappresenta G o C e M può indicare A o C. Questa sequenza corrisponde al motivo proposto da differenti studi basati su *protein binding microarray* come sito riconosciuto in maniera specifica dal *DNA binding domain* di Fhl1 (Badis *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2013). Recentemente questa specificità di legame è stata confermata

grazie ad una innovativa tecnica per lo studio delle interazioni DNA:proteina (Knight *et al.*, 2014), nota come *Mechanically Induced Trapping Of Molecular Interactions* o MITOMI (Rockel *et al.*, 2012). Il risultato ottenuto da Knight e collaboratori mediante questo approccio *in vitro* ha trovato riscontro, nell'ambito dello stesso lavoro, anche nell'esito di un'analisi di ChIP-seq eseguita su Fhl1 e del successivo confronto della sequenza di tutti i loci genomici a cui la proteina risulta associata.

L'analisi filogenetica ha evidenziato che i promotori dei geni *RPL3*, *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B* sono accomunati dalla presenza di un sito di legame per Abf1, da un sito di legame per Fhl1 e da un tratto politimidinico. Se si considera l'orientamento della sequenza riconosciuta da Abf1 e la distanza tra quest'ultima e il sito di legame per Fhl1, si possono riconoscere in realtà due differenti architetture del promotore: nella prima, che si osserva a monte dei geni *RPL3*, *RPL4B* e *RPP1A*, il sito per Abf1 ha un orientamento di tipo 5'→3' e il sito di legame per Fhl1 è più distante; nella seconda, che accomuna i promotori dei geni *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B*, il sito di legame per Abf1 ha un orientamento di tipo 3'→5' e il sito di Fhl1 è immediatamente adiacente a quest'ultimo.

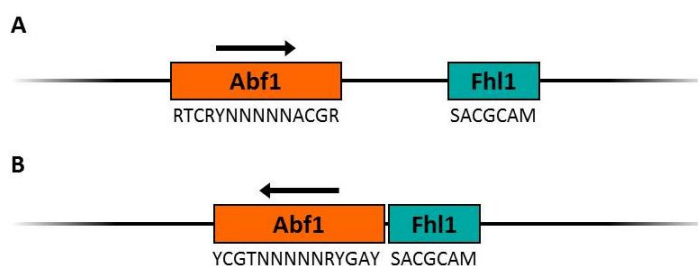


Figura 3.1. Rappresentazione grafica della disposizione dei siti di legame per Abf1 (box in arancione) e per Fhl1 (box in turchese) nei promotori dei geni *RPL3*; *RPL4B* e *RPP1A* (A) e in quelli dei geni *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B* (B). Sono riportate le sequenze consenso dei due elementi *cis*-regolativi e l'orientamento del sito per Abf1 è indicato dalla direzione della freccia.

3.1.1. Il gene *RPL3*

Il gene *RPL3* (YOR063W) è uno dei 20 geni codificanti per proteine ribosomiali privi di un paralogo: è essenziale per la sopravvivenza della cellula (Giaever *et al.*, 2002; Steffen *et al.*, 2012) e codifica per una proteina della subunità maggiore del ribosoma presente sia nei procarioti che negli eucarioti, nei quali è tuttavia dotata di una α -elica addizionale (Ben-Shem *et al.*, 2011). Rpl3, oltre a contribuire alla modulazione della fase di allungamento del processo di traduzione, coordinando il corretto posizionamento dell'aminoacil-tRNA e il

legame del fattore di allungamento eEF2 (Meskauskas and Dinman, 2007; Meskauskas and Dinman, 2010), svolge un ruolo fondamentale nella maturazione sia della subunità 60S, nell'ambito della quale sembra necessaria per la stabilizzazione di complessi intermedi (Rosado *et al.*, 2007) che della subunità 40S, essendo richiesta assieme al fattore eIF5B per il processamento del pre-18S rRNA (García-Gómez *et al.*, 2014).

Il promotore di questo gene è composto da un sito di legame per Abf1 con orientamento 5'→3', posto 210 bp a monte del sito di inizio della trascrizione, un sito di legame per Fhl1 situato 12 bp più a valle e un tratto di sequenza composto da 17 T consecutive, posizionato 165 bp a monte del TSS. Decisamente insolita è la presenza della *TATA-box*, situata a una distanza di -91 bp dal sito di inizio della trascrizione: *RPL3* è uno dei pochissimi geni per proteine ribosomiali ad essere dotato di questo elemento del *core promoter* (Baseohar *et al.*, 2004).

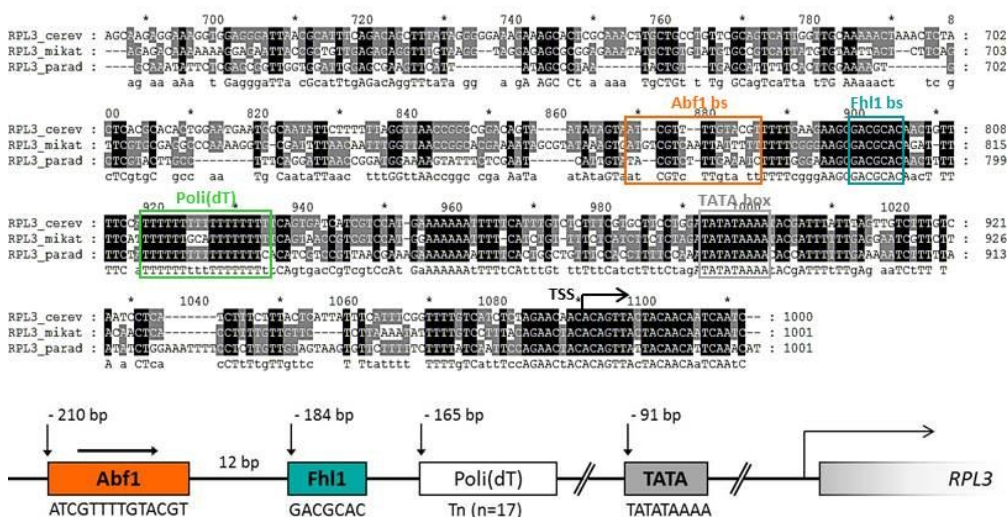


Figura 3.2. In alto: allineamento delle sequenze a monte del gene *RPL3* di *S. cerevisiae* e degli ortologi di *S. mikatae* e *S. paradoxus*. Sono evidenziati i siti di legame per Abf1 e Fhl1, il tratto poli(dT), la TATA box e il sito di inizio della trascrizione (TSS). In basso: rappresentazione grafica del promotore del gene *RPL3* di *S. cerevisiae*. Per ciascun elemento regolativo è riportata la sequenza e la distanza dal TSS.

3.1.2. Il gene *RPL4B*

RPL4B (YDR012W) è un gene non essenziale codificante per una proteina che, come rpl3, pur facendo parte del *core* evolutivamente conservato della subunità maggiore del ribosoma, è dotata di una coda C-terminale presente solo negli eucarioti. Nel ribosoma

maturato, rpL4 contribuisce in larga misura alla costituzione della parete del canale di uscita del polipeptide nascente e la sua struttura piuttosto allungata le consente di estendersi dal nucleo centrale del ribosoma fino alla periferia (Ben-Shem *et al.*, 2011). Nel corso della maturazione del ribosoma, l'assemblaggio di L4 e di altre r-proteine è necessario per un efficiente processamento del 27A pre-rRNA in 27B pre-rRNA (Pöll *et al.*, 2009). Recentemente è stato dimostrato inoltre che l'assenza di questa proteina e la presenza di una sua variante tronca determinano un blocco dell'assemblaggio del ribosoma in due fasi diverse del processo, suggerendo che rpL4 possa intervenire con due ruoli distinti nella biogenesi del ribosoma (Gamalinda and Woolford, 2014). La proteina sembra avere un'ulteriore funzione extra-ribosomiale legata, nel contesto di un meccanismo regolativo a *feedback*, al controllo della stabilità del proprio messaggero (Presutti *et al.*, 1991).

Il gene *RPL4B* ha un paralogo, *RPL4A*, codificante per un prodotto genico che differisce solo per pochi aminoacidi da quello della copia B. I due geni, tuttavia, non contribuiscono equamente al pool cellulare complessivo di mRNA: la trascrizione di *RPL4B* produce solo il 28% delle molecole di messaggero e la copia A provvede al restante 72% (Lucioli *et al.*, 1988). La differente attività dei promotori dei due paraloghi è stata più di recente confermata nell'ambito di un lavoro sistematico volto a caratterizzare eventuali fenomeni di compensazione del dosaggio genico per le coppie di paraloghi codificanti per proteine ribosomiali: mentre quello della copia A risulta essere tra i 10 promotori con maggiore attività, quello della copia B è tra i promotori che manifestano l'attività minore (Zeevi *et al.*, 2011).

Il promotore di *RPL4B* comprende un sito di legame per Abf1 con orientamento 5'→3', posto a -157 bp dal sito di inizio della trascrizione, un sito di legame per Fhl1 situato 12 bp più a valle e un tratto omopolimerico composto da 12 T consecutive.

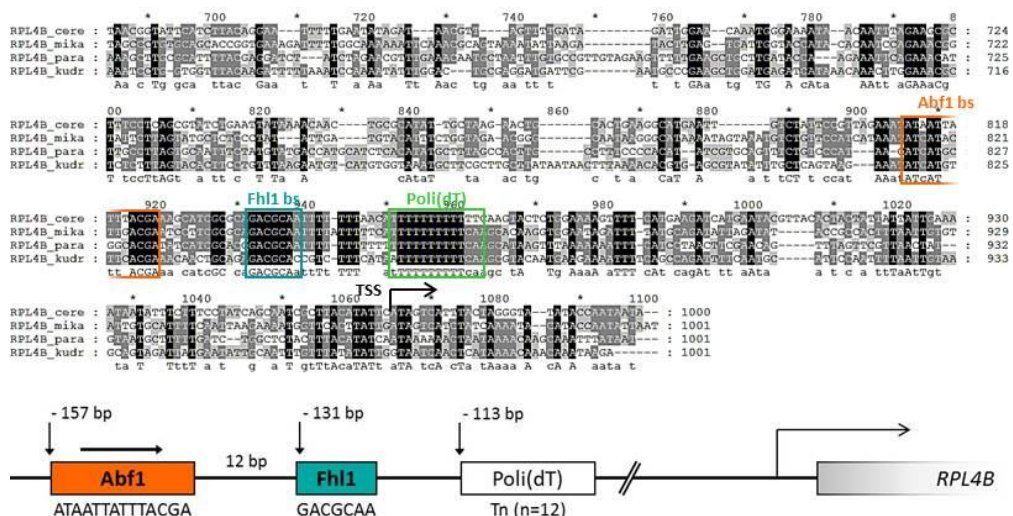


Figura 3.3. In alto: allineamento delle sequenze a monte del gene *RPL4B* di *S. cerevisiae* e degli ortologhi di *S. mikatae* e *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii*. Sono evidenziati i siti di legame per Abf1 e Fhl1, il tratto poli(dT) e il sito di inizio della trascrizione (TSS). In basso: rappresentazione grafica del promotore del gene *RPL4B* di *S. cerevisiae*. Per ciascun elemento regolativo è specificata la sequenza e la distanza dal TSS.

3.1.3. Il gene *RPP1A*

RPP1A (YDL081C) codifica per la proteina P1 α , una componente della protuberanza laterale del ribosoma che interagisce con i fattori di allungamento, nota come stalk (Santos and Ballesta, 2005). P1 α forma con P2 β un eterodimero che risulta connesso al ribosoma assieme all'eterodimero P1 β -P2 α attraverso la proteina P0. Sembra che la cellula possieda un abbondante pool di proteine P1/P2 libere nel citoplasma, che possono essere scambiate con quelle associate ai ribosomi per modularne la funzione e regolare la traduzione. Inoltre, le proteine libere partecipano al controllo della fosforilazione della subunità α di eIF2 da parte della chinasi Gcn2 in risposta a condizioni di stress (Jiménez-Díaz *et al.*, 2013).

Sebbene *RPP1A*, così come gli altri geni codificanti per le componenti dello stalk non sia essenziale (Remacha *et al.*, 1995; Giaever *et al.*, 2002), la sua delezione causa un aumento del tempo di replicazione (Steffen *et al.*, 2012).

Il promotore di questo gene presenta un sito di legame per Abf1 situato 166 bp a monte del sito di inizio della trascrizione e disposto con un orientamento 5'→3'. Più a valle, a 17 bp di distanza dal sito di legame per Abf1, si trova il sito per Fhl1. Anche in questo caso si riscontra inoltre la presenza di una sequenza composta da 12 T.

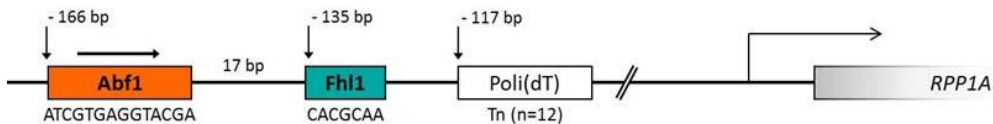
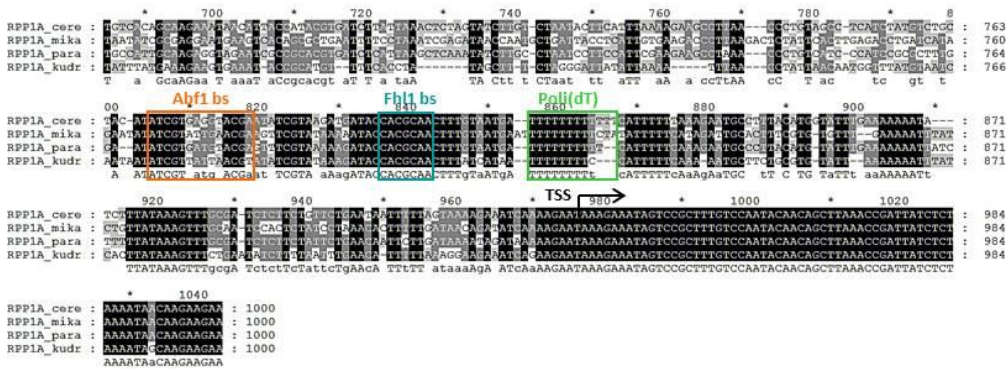


Fig. 3.4. In alto: allineamento delle sequenze a monte del gene *RPP1A* di *S. cerevisiae* e degli ortologi di *S. mikatae* e *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii*. Sono evidenziati i siti di legame per Abf1 e Fhl1, il tratto poli(dT) e il sito di inizio della trascrizione (TSS). In basso: rappresentazione grafica del promotore del gene *RPP1A* di *S. cerevisiae*. Per ciascun elemento regolativo è indicata la sequenza e la distanza dal TSS.

3.1.4. Il gene *RPS22B*

RPS22B (YLR367W) è un gene non essenziale che codifica per una proteina della subunità minore del ribosoma, universalmente conservata dai procarioti agli eucarioti. Questa proteina, che lega direttamente la porzione centrale del 18S rRNA, è tra le prime che si associano alla nascente subunità minore nel corso dell’assemblaggio del ribosoma (Jakob *et al.*, 2012).

RPS22B ha un paralog, *RPS22A*: sebbene le sequenze codificanti dei due geni differiscano solo per pochi nucleotidi e corrispondano alla stessa sequenza aminoacidica, l’unità trascrizionale della copia B presenta alcune caratteristiche peculiari. Diversamente dalla copia A, *RPS22B* contiene due introni: il primo, lungo 556 bp, è localizzato nella estesa 5’UTR e la occupa per la quasi totalità, giustificandone quindi la notevole lunghezza, decisamente inconsueta per un gene di lievito; il secondo ha una lunghezza di 482 bp ed è situato invece nella regione intronica che separa i due esoni codificanti per la proteina. A rendere ancora più insolito questo gene contribuisce il fatto che la sequenza dell’introne 2 ospita il gene *SNR44*, codificante per uno snoRNA della classe H/ACA box. *RPS22B* è,

insieme a *RPL7A*, l'unico gene codificante per una proteina ribosomiale ad ospitare la sequenza codificante per uno snoRNA (Dieci *et al.*, 2009-b).

Evidenze sperimentali suggeriscono che il processo di splicing del trascritto primario, in cui sono coinvolte le nucleasi Rnt1, Rat1 e Xrn1, sia connesso al fenomeno di *non-sense mediated decay* e rappresenti un importante punto di regolazione dei livelli intracellulari dell'mRNA (Danin-Kreiselman *et al.*, 2003; Sayani *et al.*, 2008).

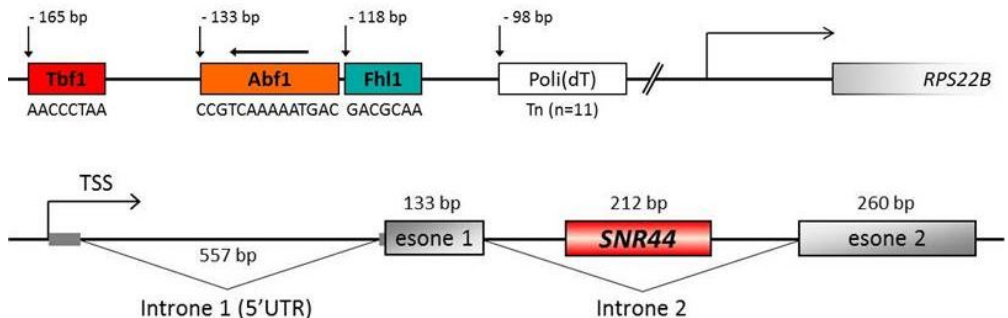
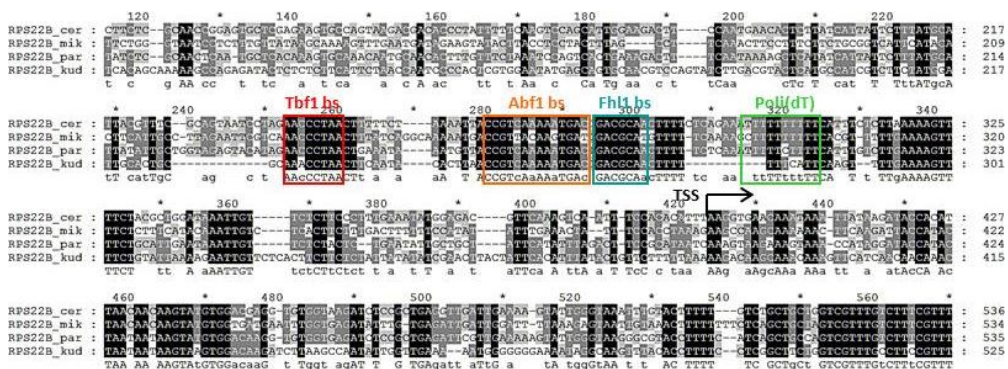


Figura. 3.5. In alto: allineamento delle sequenze a monte del gene *RPS22B* di *S. cerevisiae* e degli ortologhi di *S. mikatae* e *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii*. Sono evidenziati i siti di legame per Tbf1, Abf1 e Fhl1, il tratto poli(dT) e il sito di inizio della trascrizione (TSS). In mezzo: rappresentazione grafica del promotore del gene *RPS22B* di *S. cerevisiae*. Per ciascun elemento regolativo è indicata la sequenza e la distanza dal TSS. In basso: architettura del gene *RPS22B*.

Come emerso dall'analisi filogenetica, il promotore di questo gene presenta un sito di legame per la proteina Abf1 con orientamento 3'→5', situato 165 bp a monte del sito di inizio della trascrizione e separato da una sola coppia di basi rispetto al sito di legame per Fhl1. Più a valle, ad una distanza di -98 bp dal TSS è presente un tratto poli(dT) comprendente 11 T. Decisamente inusuale per un gene codificante per proteine ribosomiali è un ulteriore elemento presente nel promotore di *RPS22B*, individuato nel corso delle analisi bioinformatiche come sequenza fortemente conservata dal punto di vista evolutivo:

un sito di legame per Tbf1, il cui ruolo nella regolazione della biogenesi del ribosoma è legato al controllo della trascrizione dei geni codificanti per snoRNA (Preti *et al.*, 2010).

3.1.5. I geni *RPS28A* e *RPS28B*

La coppia di paraloghi formata da *RPS28A* (YOR167C) e *RPS28B* (YLR264W) codifica per una proteina della subunità minore presente esclusivamente nei ribosomi eucariotici che contribuisce alla formazione del canale di uscita dell'mRNA (Melnikov *et al.*, 2012) e che risulta coinvolta nel processo di decodificazione, svolgendo un ruolo fondamentale per l'accuratezza della traduzione (Synetos *et al.*, 1996). Nell'ambito della fase di maturazione del ribosoma, rpS28 risulta necessaria per il processamento del 20S pre-rRNA a 18S rRNA (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). La proteina svolge inoltre una funzione fondamentale legata ad un meccanismo di regolazione a feedback negativo: quando a livello citoplasmatico si verifica un accumulo di rpS28, la proteina stessa è in grado di legare specificamente e promuovere la degradazione selettiva delle molecole del suo messaggero derivanti esclusivamente dalla copia genica B, grazie al riconoscimento di una specifica struttura a secondaria assunta dalla 3'UTR (Badis *et al.*, 2004). Questa struttura viene riconosciuta grazie all'intervento di Edc3, fattore di attivazione coinvolto nel processo di *decapping* che contribuisce al processo di mRNA *decay* (Kolesnivoka *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014).

Sebbene i due paraloghi codifichino per lo stesso prodotto genico, differenti sono gli effetti fenotipici che si osservano in conseguenza alla delezione delle due copie. *RPS28B* non è essenziale per la sopravvivenza della cellula (Giaever *et al.*, 2002), mentre le osservazioni fatte riguardo a *RPS28A* risultano discordanti: nel lavoro di Giaever e collaboratori, anche la copia A viene annotata come non essenziale, mentre uno studio successivo sembra dimostrare che questo gene, al contrario del paralogo, sia necessario per la sopravvivenza della cellula, forse in virtù di un ruolo extra-ribosomiale non ancora caratterizzato specifico del suo prodotto genico (Steffen *et al.*, 2012).

I promotori di entrambi i geni, che secondo studi differenti risultano in grado di promuovere livelli di trascrizione del tutto simili (Zeevi *et al.*, 2011; Knight *et al.*, 2014), presentano una comune architettura del promotore: il sito per Abf1 ha un orientamento di tipo 3'→5 ed è situato 153 bp a monte del sito di inizio della trascrizione, nel caso di *RPS28A* e a - 160 bp dal TSS nel caso di *RPS28B*. In entrambi i promotori, il sito di legame per Fhl1 occupa una posizione immediatamente adiacente a quello di Abf1 ed è seguito 12

3.2. Analisi *in vivo* dell'associazione di Abf1 e Fhl1 ai promotori dei geni RP

Al fine di verificare se gli elementi *cis*-regolativi individuati a livello dei promotori grazie all'analisi *in silico* fossero effettivamente legati dai corrispondenti regolatori in *trans*- sono stati eseguiti esperimenti di immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) e PCR quantitativa (qPCR) che permettono di valutare *in vivo* l'associazione delle proteine Abf1 e Fhl1 ai loci genomici di interesse.

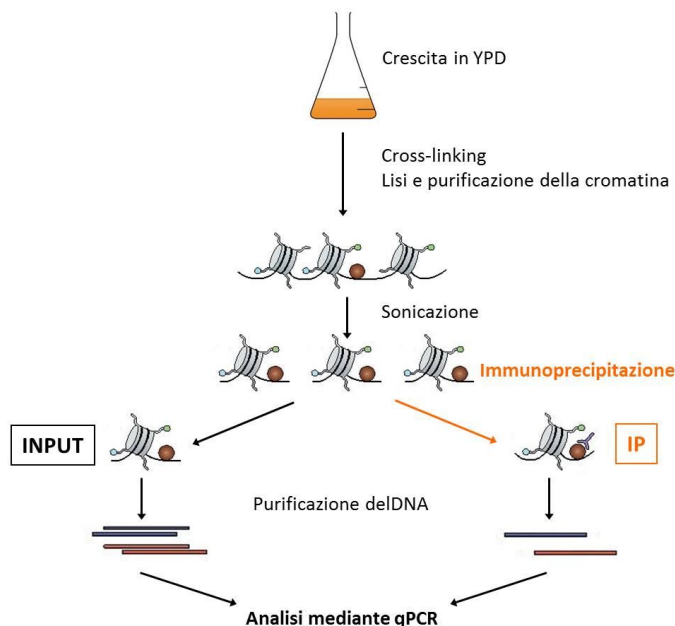


Fig. 3.7. Illustrazione grafica dei passaggi che caratterizzano la procedura di immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) e PCR quantitativa utilizzata per l'analisi dell'associazione di Abf1 e Fhl1 ai promotori dei geni RP.

Per queste analisi sono stati utilizzati due ceppi appartenenti alla collezione "Yeast TAP Fusion" (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), in cui Abf1, in un caso, e Fhl1, nell'altro, risultano addizionate all'estremità C-terminale del tag molecolare TAP (*Tandem Affinity Purification*): questo tag permette di eseguire l'immunoprecipitazione grazie all'impiego di IgG perché contiene due siti della proteina A di *Staphylococcus aureus* che presentano alta affinità per la porzione costante delle IgG.

Le cellule dei due ceppi sono state cresciute in terreno ricco (YPD) fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita, quindi trattate con formaldeide così da determinare la formazione di legami covalenti tra proteine e regioni del DNA a cui queste sono legate. Su

queste cellule è stata eseguita una procedura di estrazione della cromatina, successivamente frammentata con una strategia di tipo meccanico (sonicazione). Una parte del campione (IP) viene sottoposta a immunoprecipitazione con gli anticorpi specifici: ciò permette di recuperare selettivamente i complessi cromatinici composti dalla proteina dotata del tag riconosciuto dagli anticorpi e dai frammenti di DNA genomico a cui essa è associata. Eseguendo successivamente una PCR quantitativa Real Time con primers specifici per le regioni genomiche di interesse, è stato possibile valutare l'abbondanza relativa di questi loci del genoma nella parte di campione non sottoposta ad immunoprecipitazione (INPUT) e nel campione IP, che risulta arricchito rispetto all'INPUT di quei frammenti di DNA contenenti siti a cui le proteine risultavano legate al momento del trattamento con formaldeide.

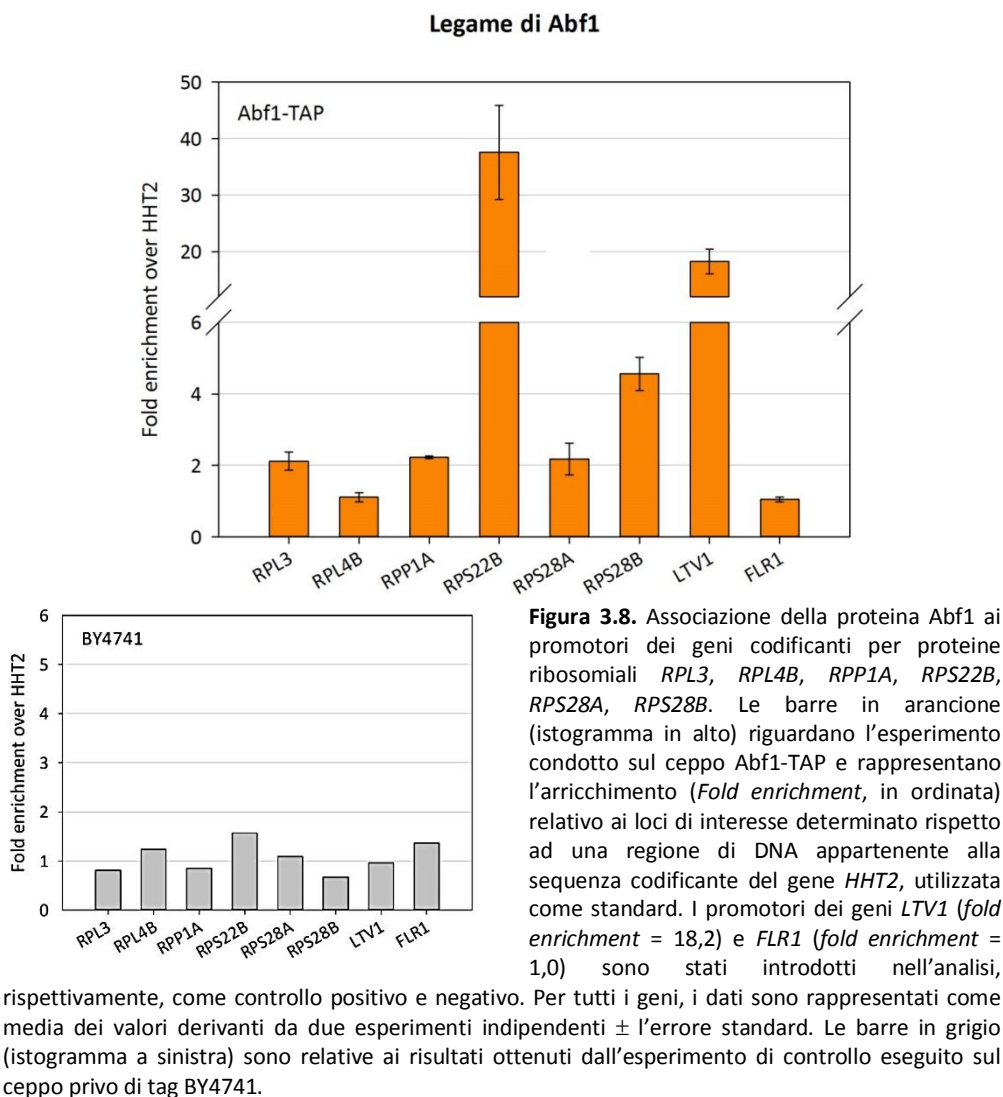
3.2.1. Abf1 è associato ai promotori dei geni *RPL3*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B*

Come mostrato nell'istogramma in figura 3.8, l'analisi ha confermato l'associazione di Abf1 a livello dei promotori dei geni *RPL3* (*fold enrichment* = 2,1), *RPP1A* (*fold enrichment* = 2,2), *RPS28A* (*fold enrichment* = 2,2) e *RPS28B* (*fold enrichment* = 4,6), sebbene specialmente per i primi tre loci il fattore di arricchimento sia piuttosto modesto. Questi risultati sono in accordo con le evidenze ottenute di recente da un simile esperimento di ChIP-qPCR (Knight *et al.*, 2014). Decisamente più netto rispetto ai casi precedenti è l'arricchimento misurato per il promotore del gene *RPS22B* (*fold enrichment* = 37,6); al contrario, per il promotore del gene *RPL4B* non è stato osservato un arricchimento significativo (*fold enrichment* = 1,1). Va considerato che, se confrontata con quella degli altri promotori considerati, l'abbondanza di questa regione risulta piuttosto limitata anche nel campione INPUT: non è pertanto da escludere che tale *locus* genomico sia particolarmente fragile e quindi più sensibile degli altri allo stress di natura meccanica che viene esercitato per frammentare la cromatina.

I dati derivanti da queste analisi di ChIP-qPCR hanno trovato piena conferma nei risultati ottenuti da un esperimento di ChIP-seq eseguito nell'ambito di un altro progetto sviluppato dal nostro gruppo di ricerca (Bosio, 2012).

I risultati emersi dall'esperimento condotto secondo la stessa strategia a partire dal ceppo Fhl1-TAP sembravano invece suggerire la mancata associazione della proteina a tutti i *loci* considerati, anche a livello del promotore del gene *RPS11B*, incluso nell'analisi come

controllo positivo. L'interazione del regolatore con questa sequenza infatti era già stata dimostrata in precedenza (Wade *et al.*, 2004), utilizzando tuttavia una variante di Fhl1 addizionata di un tag molecolare differente, costituito da varie ripetizioni dell'epitopo della proteina c-Myc. Ipotizzando che i risultati ottenuti potessero essere influenzati dal tipo di tag utilizzato, si è deciso di costruire e analizzare un ceppo che esprimesse la variante Fhl1-13myc, in cui la sequenza del regolatore risultasse fusa, all'estremità C-terminale, con 13 unità dell'epitopo myc.



3.2.2. Costruzione e analisi mediante ChIP-qPCR del ceppo Fhl1-13myc

In *Saccharomyces cerevisiae* la realizzazione di ceppi che presentino modificazioni dei geni cromosomici sfrutta il processo di ricombinazione omologa che risulta particolarmente efficiente in questo organismo.

Nel caso specifico, l'aggiunta della sequenza codificante per il *tag 13myc* all'estremità 3' del gene *FHL1* è stata eseguita trasformando cellule del ceppo BY4741 con una cassetta di *tagging* amplificata dal vettore pFA6a-13Myc-kanMX6 (Longtine *et al.*, 1999): come rappresentato in figura 3.9, la cassetta comprende, oltre alla sequenza codificante per il *tag*, un marcatore per la selezione dei cloni trasformanti derivato dal gene *kan^r* di *Escherichia coli*, che conferisce alle cellule di lievito resistenza all'antibiotico aminoglicosidico G418 (Jimenez and Davies, 1980). Le estremità 5' e 3' della cassetta corrispondono, rispettivamente, all'ultimo tratto della sequenza codificante del gene *FHL1* e ad una regione situata pochi nucleotidi a valle del codone di stop della stessa, all'interno della 3'UTR. La presenza di questi due elementi è un requisito fondamentale affinché si possa verificare ricombinazione omologa tra il cromosoma e la cassetta, così da determinare l'integrazione di quest'ultima a livello genomico. In questo modo, il messaggero trascritto da questo locus codifica per una variante di Fhl1 dotata all'estremità C-terminale del *tag 13myc*.

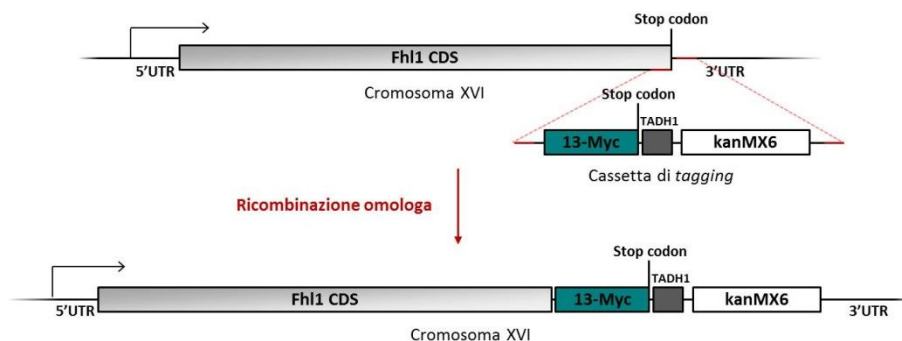


Figura 3.9. Rappresentazione grafica della modificazione del gene *FHL1*: la cassetta di *tagging* è composta dalla sequenza codificante per le 13 ripetizioni dell'epitopo myc (box in turchese), seguita dal terminatore forte del gene *ADH1* (box in grigio scuro) e dal modulo *kanMX6* (box in bianco), che contiene il marcatore di selezione. Le linee in rosso indicano invece i tratti di sequenza omologhi alle regioni bersaglio presenti sul cromosoma XVI che rendono possibile la ricombinazione (linee rosse tratteggiate) e l'integrazione della cassetta di *tagging* immediatamente a valle dell'ultima tripletta della sequenza codificante del gene *FHL1* (box in grigio chiaro).

Le cellule del ceppo Fhl1-13myc sono state cresciute e trattate come descritto per i ceppi della collezione “Yeast TAP Fusion”. In questo caso, però, l’immunoprecipitazione è stata eseguita con anticorpi monoclonali di topo 9E10, specifici per *tag* contenenti epitopi c-Myc multipli. I campioni INPUT e IP sono stati quindi analizzati mediante PCR quantitativa utilizzando coppie di primers specifiche per i promotori dei geni di interesse, per un controllo negativo (*FLR1*) e per il promotore del gene *RPL28*. Quest’ultimo è sembrato infatti per diverse ragioni un controllo positivo adatto per fornire una conferma della bontà della procedura di immunoprecipitazione cromatinica utilizzata e quindi dell’affidabilità dei risultati ottenuti: nell’ambito di esperimenti di ChIP-seq relativi a Fhl1, condotti su una variante della proteina dotata dello stesso tipo di *tag* utilizzato nel presente lavoro, il regolatore era risultato fortemente associato al promotore del gene *RPL28* (Knight *et al.*, 2014). L’analisi della regione a monte di questo gene ha messo in evidenza la presenza della stessa sequenza specifica per il legame di Fhl1 individuata nei promotori dei geni regolati da Abf1 considerati in questo progetto. La posizione di questo sito, coincidente con il picco di associazione della proteina definito sulla base del numero di reads derivanti dal sequenziamento, ha fornito inoltre un utile punto di riferimento nella progettazione dei primers da utilizzare per la PCR quantitativa.

I risultati ottenuti (fig. 3.10) permettono di confermare l’associazione di Fhl1 al promotore del gene *RPS22B*, sebbene il livello di arricchimento misurato sia più ridotto rispetto a quello ottenuto per il controllo positivo *RPL28*: i valori *fold enrichment* sono rispettivamente pari a 4,5, per *RPS22B*, e 17, per *RPL28*.

Non permettono invece di confermare l’associazione di Fhl1 i risultati ottenuti per i promotori degli altri geni considerati: solo per *RPL3* è stato misurato un modesto arricchimento, di poco inferiore ad un fattore 2, mentre per *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS28A* ed *RPS28B* i valori di *fold enrichment* sono prossimi ad 1, perciò del tutto confrontabili con quello relativo al promotore del gene *FLR1*, considerato come controllo negativo.

In generale, i risultati ottenuti sono in linea con quanto riportato in letteratura e alcuni dei casi considerati trovano in parte conferma nei risultati di esperimenti basati su strategie sperimentali differenti. In particolare, l’associazione di Fhl1 a livello del promotore di *RPL3* trova riscontro nell’esito di un analogo esperimento di ChIP-qPCR, che aveva mostrato un modesto arricchimento relativo a questo *locus* genomico (Rudra *et al.*, 2005). Una prova a favore dell’interazione tra il regolatore e il promotore di questo gene era già stata fornita

anche in precedenza, nell'ambito di uno studio su scala genomica basato su un approccio di *ChIP on chip* (Harbison *et al.*, 2004). Anche il legame di Fhl1 al sito presente nel promotore del gene *RPS22B* era già stato dimostrato grazie ad un'analoga strategia di *ChIP on chip*, che aveva evidenziato un *fold enrichment* di poco superiore a 5, valore fissato come soglia (Wade *et al.*, 2004). Ulteriore conferma dell'associazione di Fhl1 con il promotore di *RPS22B* (ma non con gli altri promotori oggetto del presente studio) è stata fornita di recente nell'ambito della determinazione *genome-wide* del profilo di associazione di questa proteina, ottenuto in questo caso con una strategia di ChIP-seq (Knight *et al.*, 2014).

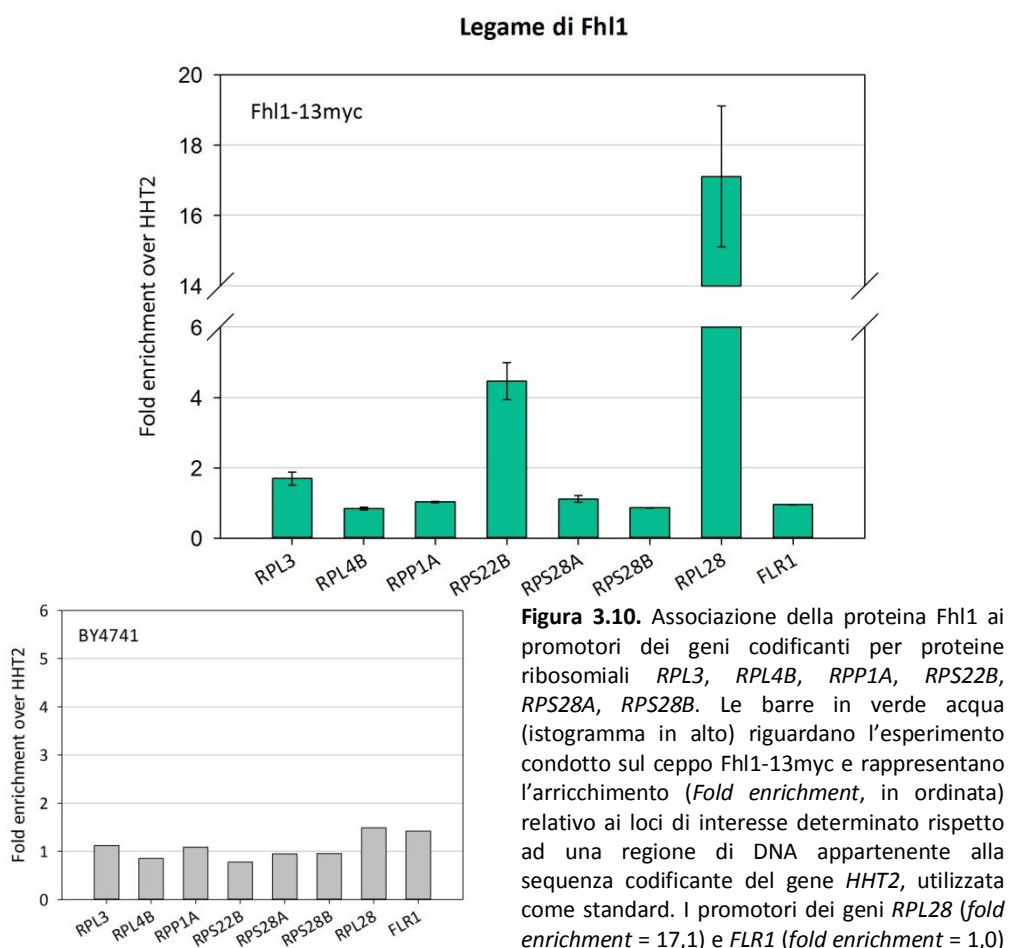


Figura 3.10. Associazione della proteina Fhl1 ai promotori dei geni codificanti per proteine ribosomiali *RPL3*, *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A*, *RPS28B*. Le barre in verde acqua (istogramma in alto) riguardano l'esperimento condotto sul ceppo Fhl1-13myc e rappresentano l'arricchimento (*Fold enrichment*, in ordinata) relativo ai loci di interesse determinato rispetto ad una regione di DNA appartenente alla sequenza codificante del gene *HHT2*, utilizzata come standard. I promotori dei geni *RPL28* (*fold enrichment* = 17,1) e *FLR1* (*fold enrichment* = 1,0) sono stati introdotti nell'analisi, rispettivamente,

come controllo positivo e negativo. Per tutti i geni, i dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da due esperimenti indipendenti \pm l'errore standard. Le barre in grigio (istogramma a sinistra) sono relative ai risultati ottenuti dall'esperimento di controllo condotto sul ceppo privo di *tag* BY4741.

3.3. Studio *in vivo* degli effetti della mutagenesi dei promotori sull'espressione genica

Le analisi di ChIP-qPCR hanno permesso di confermare l'associazione di Abf1 al corrispondente sito di legame individuato nella sequenza dei promotori dei geni per proteine ribosomiali, mentre non hanno fornito prove consistenti del legame di Fhl1 agli stessi promotori, fatta eccezione per quelli dei geni *RPL3* ed *RPS22B*.

L'elevato grado di conservazione evolutiva dell'elemento del promotore la cui sequenza corrisponde perfettamente al consenso riconosciuto in maniera specifica da Fhl1 sembra tuttavia deporre a favore dell'idea secondo cui questi siti possano essere in realtà legati dalla proteina, magari in maniera labile o transitoria.

Al fine di valutare il contributo fornito da Abf1, da Fhl1 e dai corrispondenti elementi di controllo in *cis* alla regolazione trascrizionale dei geni considerati, si è deciso di analizzare gli effetti indotti dalla mutagenesi dei siti di legame per i due regolatori sull'espressione genica in condizioni di crescita ottimali.

Tenendo conto della notevole importanza rivestita dall'architettura locale della cromatina e dal contesto genomico sulla modulazione trascrizionale, è stata scelta una strategia basata sulla costruzione di mutanti genomici, in cui le mutazioni vengono introdotte a livello del promotore della copia cromosomica del gene.

3.3.1. Costruzione dei mutanti genomici del promotore

La strategia che ha permesso la realizzazione dei mutanti genomici si è articolata in due passaggi, entrambi mediati da un evento di ricombinazione omologa e rappresentati schematicamente in figura 3.11.

La prima fase, detta *gene disruption*, ha previsto la delezione dell'intera regione del promotore e di buona parte della sequenza codificante di ogni gene di interesse. Ciò è avvenuto per sostituzione di questo tratto genomico con una cassetta di delezione ottenuta per PCR in cui il marcatore di selezione *URA3* di *Kluyveromyces lactis* risulta fiancheggiato da due regioni di 50 bp ciascuna corrispondenti alle estremità 5' e 3' della porzione di cromosoma da eliminare. La presenza di queste due regioni promuove l'evento di ricombinazione omologa da cui si originano i cloni deleti per il gene target, selezionati in virtù dell'auxotrofia per l'uracile del ceppo di partenza (Abf1-TAP). La scelta di questo

approccio ha imposto l'esclusione dall'analisi del gene *RPL3*, annotato come essenziale (Giaever *et al.*, 2002); un tentativo di delezione è stato fatto invece per *RPS28A*, rispetto al quale la letteratura riporta indicazioni discordanti (Giaever *et al.*, 2002; Steffen *et al.*, 2012). Tuttavia, nel corso delle varie prove di trasformazione eseguite non sono mai state ottenute colonie: un simile risultato può rappresentare una prova a favore dell'essenzialità di questo gene. Come atteso, non sono stati riscontrati invece particolari difetti di crescita per i ceppi $\Delta RPL4B$, $\Delta RPS22B$ e $\Delta RPS28B$ mentre, in accordo con quanto dimostrato in precedenza (Steffen *et al.*, 2012), la delezione di *RPP1A* ha determinato un rallentamento della crescita cellulare: il tempo di replicazione misurato per il ceppo $\Delta RPP1A$ è di circa 180 minuti e risulta quindi quasi raddoppiato rispetto a quello delle corrispondenti cellule *wild type* (wt), pari a 100 minuti.

I ceppi deleti sono stati quindi utilizzati come riceventi nella trasformazione prevista dal secondo passaggio di costruzione dei mutanti genomici, definito *gene replacement*. Questa fase ha permesso di sostituire la cassetta di delezione con un costrutto realizzato mediante PCR mutagenica secondo la strategia di *overlap extension* (Ho *et al.*, 1989); il costrutto corrisponde a tutta la regione cromosomica rimossa nella fase di *gene disruption*, rispetto alla quale differisce solo per le specifiche mutazioni introdotte a livello degli elementi *cis*-regolativi del promotore.

Per ciascuno dei geni considerati, sono stati realizzati mediante questo passaggio di *gene replacement* tre differenti mutanti: in quelli indicati come "Amut" è stato alterato il sito di legame per Abf1; nei ceppi denominati "Fmut" è stata mutata la sequenza riconosciuta da Fhl1; la dicitura "AFmut" contraddistingue invece i ceppi in cui sono state introdotte mutazioni a livello di entrambi gli elementi del promotore.

Per ognuno dei siti di legame, le basi presenti nelle posizioni evolutivamente più conservate sono state rimpiazzate tenendo conto delle eventuali sostituzioni previste dalla sequenza consenso, in modo da alterare quanto più possibile il profilo di gruppi chimici esposti attraverso il solco maggiore del DNA e sfavorire fortemente il legame della proteina.

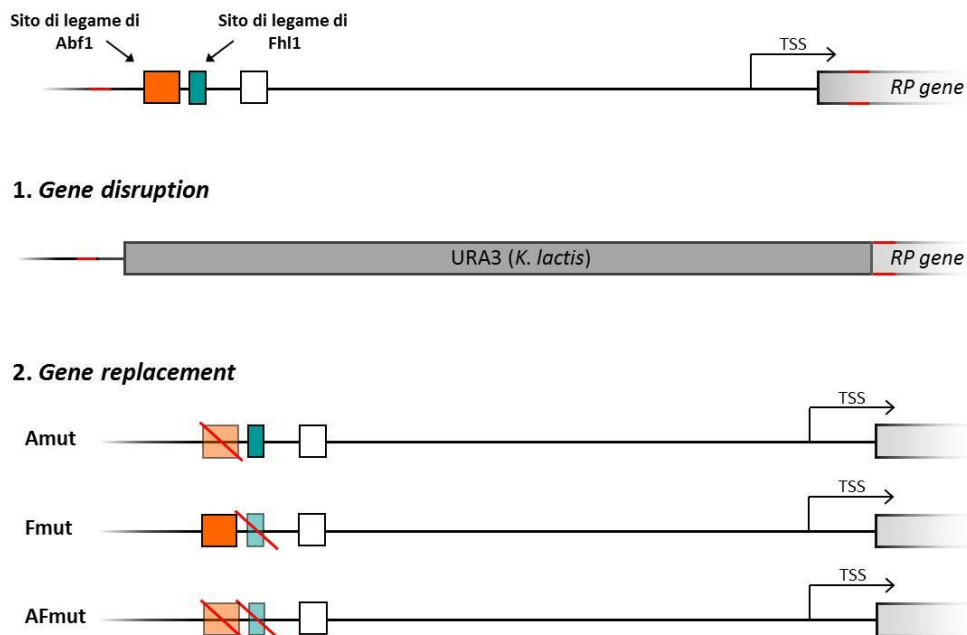


Figura 3.11. Rappresentazione grafica della costruzione dei mutanti genomici del promotore. Attraverso la ricombinazione omologa che avviene nel passaggio di *gene disruption*, la cassetta di delezione contenente il marcatore di selezione *URA3* di *K. lactis* (box in grigio scuro) si sostituisce alla regione genomica comprendente il promotore (la box in arancione rappresenta il sito di legame per Abf1, quella in turchese il sito di legame per Fhl1 e quella in bianco il tratto politimidinico) e parte della regione codificante (box in grigio chiaro) del gene di interesse. Nella successiva fase di *gene replacement*, la cassetta di delezione viene rimpiazzata con un costrutto che differisce dalla porzione cromosomica originariamente eliminata solo per alcune mutazioni a livello del sito per Abf1 (Amut), in quello per Fhl1 (Fmut) o in entrambi (AFmut).

3.3.2. Analisi dei livelli di espressione genica nei mutanti genomici del promotore

Per valutare gli effetti delle mutazioni introdotte a livello dei siti di legame per Abf1 e Fhl1 nei promotori dei geni *RPL4*, *RPP1A*, *RPS22B* e *RPS28B*, le cellule del ceppo wt (Abf1-TAP) e di ciascuno dei ceppi mutanti sono state cresciute in condizioni di crescita ottimali fino al raggiungimento della fase esponenziale. Queste cellule sono state quindi sottoposte ad una procedura di estrazione dell'RNA totale, convertito in seguito nel corrispondente cDNA mediante retrotrascrizione. L'analisi quantitativa è stata eseguita utilizzando il cDNA totale come template in reazioni di qPCR condotte con primers specifici per le molecole di cDNA derivanti dagli RNA di interesse. In proposito, è necessario precisare che per quanto riguarda i geni per RP presenti in duplice copia, il disegno sperimentale doveva assicurare la capacità di discriminare tra i messaggeri derivanti dai due paraloghi. Poiché le sequenze codificanti di *RPL4B* e *RPL4A*, *RPS22B* e *RPS22A*, *RPS28B* e *RPS28A* differiscono per

pochissimi nucleotidi non sarebbe stato possibile progettare un coppia di primers complementari alla CDS e che risultassero specifici per i trascritti di un solo paralogo. Per questo motivo, sono state disegnate coppie di primers (fig. 3.12) composte da un oligonucleotide complementare ad un tratto della sequenza codificante e da uno complementare ad una sequenza appartenente ad una delle due regioni trascritte ma non tradotte, 5'UTR e 3'UTR, che non presentano alcuna somiglianza con quelle del gene paralogo.

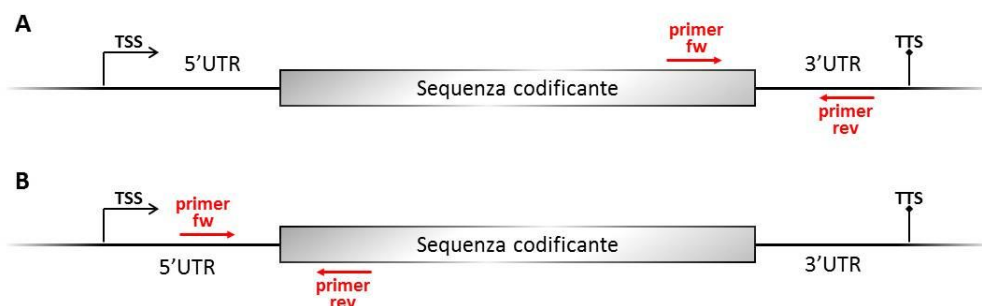


Figura 3.12. Rappresentazione grafica della progettazione dei primers per l'analisi di espressione. A) Per i geni *RPL4B* e *RPS28B* sono state progettate coppie di primers composte da un *forward* (fw) complementare alla sequenza codificante e un *reverse* (rev) complementare ad una parte della 3'UTR, la regione di sequenza non tradotta compresa tra il codone di stop e il sito di terminazione della trascrizione (TTS). B) Per i geni *RPS22B* e *RPP1A* sono state progettate coppie di primers comprendenti un *forward* complementare ad una parte della regione non tradotta compresa tra il sito di inizio della trascrizione (TSS) e il codone di inizio e un *reverse* complementare alla sequenza codificante.

Per verificare l'effettiva specificità delle coppie di primers per i cDNA derivanti dai messaggeri trascritti dal paralogo di interesse è stato valutato mediante qPCR il livello di espressione dei geni *RPL4B*, *RPS22B* e *RPS28B* rispettivamente nei ceppi $\Delta RPL4B$, $\Delta RPS22B$ e $\Delta RPS28B$. L'analisi eseguita permette una quantificazione relativa del livello di espressione del gene di interesse, derivante dal confronto tra il ceppo *wild type* e il corrispondente delecto: i valori di espressione del gene bersaglio misurati nei due ceppi sono stati dapprima normalizzati rispetto al livello del gene *HHT2*, scelto come standard. Successivamente per valutare il rapporto tra i due valori normalizzati, questi ultimi sono stati espressi entrambi relativamente al livello del wt. Come atteso, il livello di espressione misurato nei ceppi delecti risulta quasi nullo; il ridotto segnale residuo, più evidente nel caso di *RPL4B*, potrebbe derivare dall'amplificazione di una piccola quantità di DNA genomico contaminante presente nel cDNA usato come template per la reazione di qPCR. Questi risultati

confermano quindi che i primers progettati permettono un efficace e specifico riconoscimento delle molecole di cDNA bersaglio.

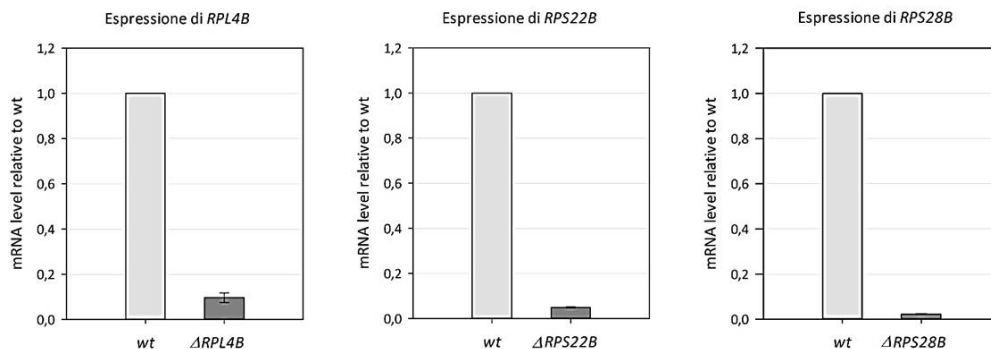


Figura 3.13. Analisi del livello di espressione dei geni *RPL4B*, *RPS22B* e *RPS28B* nei ceppi $\Delta RPL4B$ (istogramma a sinistra), $\Delta RPS22B$ (istogramma al centro) e $\Delta RPS28B$ (istogramma a destra). I valori di espressione del gene di interesse misurati nel ceppo *wild type* (wt, barre in grigio chiaro) e nel corrispondente deletato (barre in grigio scuro) sono stati dapprima normalizzati rispetto al livello del gene *HHT2*, scelto come standard. Il livello di espressione del mutante è stato quindi espresso come frazione relativa del livello di espressione del wt (1). I dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da due esperimenti indipendenti \pm l'errore standard.

L'espressione di *RPL4B* e *RPP1A* risente in maniera simile delle diverse mutazioni del promotore

Nei promotori dei geni *RPL4B* e *RPP1A* i siti di legame per Abf1 e Fhl1 sono disposti secondo la stessa architettura: il sito per Abf1 presenta un orientamento di tipo 5'→3' e il sito per Fhl1 è localizzato più di 10 bp a valle del primo. Analizzando i livelli di espressione dei mutanti di questi geni è stato interessante riscontrare come la loro trascrizione risente in maniera simile delle mutazioni introdotte nei siti di legame per Abf1 e Fhl1.

Si consideri dapprima il gene *RPL4B*. Come illustrato nella figura 3.14, il suo promotore presenta un sito di legame per Abf1 con sequenza ATAATTATTACGA che è stata convertita in CGACTTATTTCTA in modo da alterare le due regioni che risultano maggiormente conservate nel consenso RTCRYNNNNACGR. Analogamente, la sequenza GACGCAA del sito di legame di Fhl1 è stata mutata in GCCTCGA, in modo da sostituire alcune basi del blocco centrale più conservato.

Per valutare gli effetti della distruzione dei siti di legame per Abf1 e Fhl1 sull'espressione di *RPL4B*, cellule del ceppo *wild type* e di ciascuno dei tre mutanti sono state cresciute in terreno ricco fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita. Su queste cellule è

stata quindi eseguita l'estrazione degli RNA totali, che sono stati in seguito retrotrascritti. I cDNA ottenuti sono stati analizzati mediante PCR quantitativa: i valori di *RPL4B* misurati nel ceppo *wild type* e nei mutanti sono stati innanzitutto normalizzati rispetto al livello dell'endogeno *HHT2*. Successivamente, tutti i valori normalizzati sono stati espressi in funzione del livello misurato nel ceppo *wild type*. Per ciascuno dei ceppi considerati, l'intero esperimento è stato ripetuto a partire da tre cloni indipendenti.

Il confronto del ceppo wt con il ceppo "Amut" mette in evidenza che la mutazione del sito di legame per Abf1 determina un dimezzamento del livello di espressione di *RPL4B* (*fold change* = -2,2). Una variazione di questa entità è in linea con il calo di espressione riportato a seguito della mutazione del sito di legame per Abf1 relativamente a *LTV1* e *NOP12*, due geni *ribi* la cui regolazione coinvolge Abf1 (Bosio, 2012): mutando il sito di legame per il GRF nei promotori di questi due geni secondo gli stessi criteri seguiti nel presente lavoro per alterare i promotori dei geni RP, è stata osservata una riduzione dell'associazione della proteina e un concomitante calo dell'espressione genica.

Sebbene la mancanza di un esperimento di immunoprecipitazione cromatinica non permetta di affermare con certezza che anche nel caso di *RPL4B* le mutazioni introdotte abbiano effettivamente interferito con il legame di Abf1 sul promotore, il dato relativo all'espressione anche da solo suggerisce che questo regolatore contribuisca all'attivazione trascrizionale, dal momento che l'integrità del suo sito di legame risulta necessaria per un pieno livello di espressione del gene in condizioni di crescita ottimali.

Considerando invece il mutante "Fmut", è possibile notare che la distruzione del sito di legame per Fhl1 influisce in maniera minore sull'espressione di *RPL4B*; anche in questo caso, comunque, il livello di mRNA nel mutante è significativamente inferiore rispetto a quello riscontrato in cellule *wild type*.

La presenza di mutazioni in entrambi gli elementi *cis*-regolativi non sembra avere effetti additivi: il livello di espressione misurato nel doppio mutante "AFmut" è pari al 42% di quello misurato nel *wild type* (*fold change* = -2,4), ma la differenza tra l'abbondanza dell'mRNA nei mutanti "Amut" e "AFmut" non risulta statisticamente significativa.

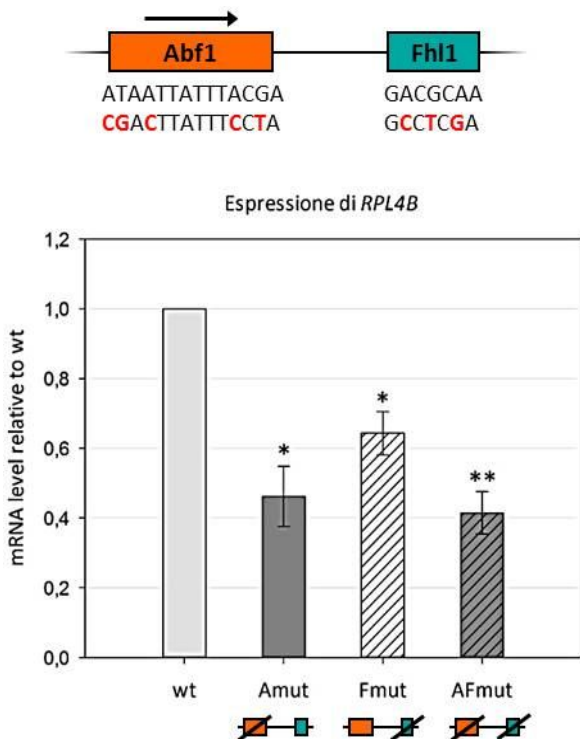


Figura 3.14. In alto: rappresentazione schematica di parte del promotore del gene *RPL4B*: le sequenze dei siti di legame per Abf1 (box in arancione) e per Fhl1 (box in turchese) sono indicate nella versione *wild type* (sopra) e mutata (sotto): le basi in rosso indicano le mutazioni introdotte. In basso: rappresentazione grafica dell'effetto delle mutazioni sull'espressione di *RPL4B*. Per ogni ceppo, i valori dell'mRNA target sono stati normalizzati rispetto al livello del gene standard *HHT2*, e vengono espressi come abbondanza relativa rispetto al wt (in ordinata). I valori riscontrati nei mutanti "Amut", "Fmut" e "AFmut" sono rispettivamente pari a 0,46, 0,64 e 0,42 di quello misurato nel wt. I dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da tre esperimenti indipendenti \pm il corrispondente errore standard. Il test t di Student è stato utilizzato per confrontare i valori di ciascun mutante rispetto a quello del *wild type*. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0,01$.

La mutagenesi del promotore di *RPP1A* è stata eseguita in maniera analoga a quanto descritto per *RPL4B*, modificando nei siti di legame per Abf1 e Fhl1 le basi più fortemente conservate: la sequenza ATCGTGAGGTACGA riconosciuta da Abf1 è stata convertita in **CGCCTGAGGTCTA**, mentre il sito CACGCAA è stato modificato in **CTCTCGA**, in modo da non corrispondere più al consenso specifico per Fhl1.

Le cellule del ceppo wt e dei tre ceppi mutanti sono state cresciute e trattate come illustrato a proposito dell'analisi di espressione di *RPL4B*. I cDNA ottenuti da questi ceppi sono stati analizzati mediante qPCR come descritto in precedenza. Anche in questo caso, l'intero esperimento è stato ripetuto a partire da tre cloni indipendenti per ciascun ceppo.

Come si evince dall'istogramma riportato in fig. 3.15, la mutazione del sito di legame per Abf1 induce un marcato calo del livello di espressione di *RPP1A* (*fold change* = -5,3). Anche in questo caso, quindi, la proteina sembra agire come regolatore positivo dell'espressione genica in condizioni di crescita ottimali. Una riduzione così marcata dell'espressione di

questo gene potrebbe giustificare il leggero aumento del tempo di replicazione riscontrato per il ceppo "Amut". Come riportato in letteratura e come confermato dal fenotipo del ceppo $\Delta RPP1A$, la delezione di questo gene, pur non essendo letale, provoca una riduzione della capacità di crescita cellulare.

Un analogo effetto sia sul tempo di replicazione che sul livello di espressione di *RPP1A* è stato riscontrato per il ceppo "AFmut": l'introduzione di mutazioni nei siti di legame per Abf1 e Fhl1 fa sì che la quantità di mRNA prodotto in presenza di questa variante del promotore sia solo il 15% (*fold change* = -6,7) di quella prodotta in presenza di un promotore wt. Anche in questo caso però, la differenza di espressione riscontrata nei ceppi "Amut" e "AFmut", per quanto riproducibile, non può essere considerata statisticamente significativa.

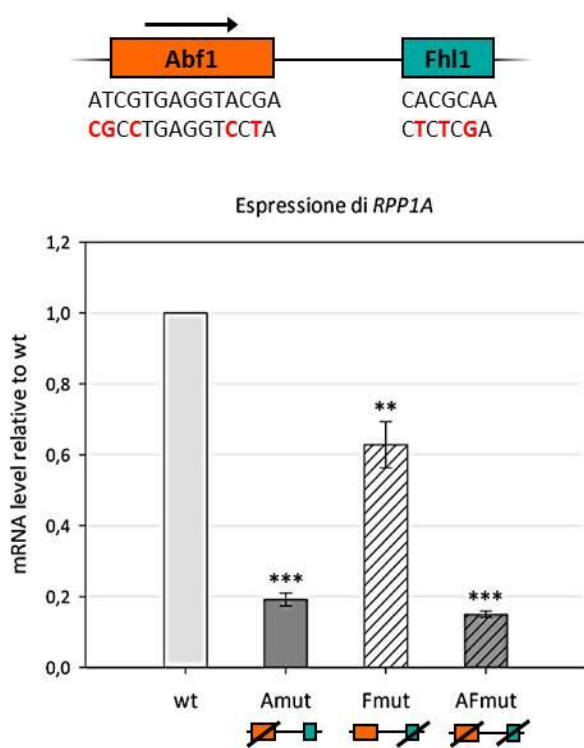


Figura 3.15. In alto: rappresentazione schematica di parte del promotore del gene *RPP1A*: le sequenze dei siti di legame per Abf1 (box in arancione) e per Fhl1 (box in turchese) sono indicate nella versione *wild type* (sopra) e mutata (sotto): le basi in rosso indicano le mutazioni introdotte. In basso: rappresentazione grafica dell'effetto delle mutazioni sull'espressione di *RPP1A*. Per ogni ceppo, i valori dell'mRNA target sono stati normalizzati rispetto al livello del gene standard *HHT2*, e sono stati indicati come abbondanza relativa rispetto al wt (in ordinata). I valori riscontrati nei mutanti "Amut", "Fmut" e "AFmut" sono rispettivamente pari a 0,19, 0,63 e 0,15 di quello misurato nel wt. I dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da tre esperimenti indipendenti \pm il corrispondente errore standard. Il test t di Student è stato utilizzato per confrontare i valori di ciascun mutante rispetto a quello del *wild type*. (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$.

Come osservato anche per il gene *RPL4B*, la mutazione del sito di legame per Fhl1 provoca effetti meno marcati sulla trascrizione: il livello di mRNA misurato nel mutante "Fmut" è pari al 63% di quello che si riscontra nel ceppo wt (*fold change* = -1,6).

Risultati di questo tipo permettono di ipotizzare anche per Fhl1 un ruolo come regolatore positivo della trascrizione dei geni *RPL4B* e *RPP1A*: il minor calo di espressione che si osserva nei mutanti "Fmut" rispetto a quello misurato per i mutanti "Amut" potrebbe essere interpretato riconoscendo ad Abf1 un ruolo di maggiore importanza nell'attivazione trascrizionale di questi geni, oppure ipotizzando che oltre al riconoscimento della sequenza specifica sul DNA altri fattori contribuiscano al reclutamento di Fhl1 su questi promotori.

L'espressione di *RPS28B* è influenzata dalla mutazione del sito di legame di Abf1, ma non da quella del sito di legame per Fhl1

Il promotore del gene *RPS28B* presenta un sito di legame per Abf1 con orientamento 3'→5' e sequenza TCGTACAAAATGAT: la mutazione di questo elemento ha previsto la sua sostituzione con la sequenza TAGGACAAAAGGCA. Analogamente, per la costruzione dei mutanti "Fmut" e "AFmut" l'adiacente sito di legame per Fhl1 con sequenza CACGCAA è stato rimpiazzato dalla sequenza CTCTCGA.

Per valutare gli effetti di queste mutazioni sull'espressione del gene *RPS28B*, le cellule del ceppo wt e dei tre mutanti sono state cresciute in terreno ricco fino al raggiungimento della fase esponenziale di crescita, quindi sottoposte all'estrazione dell'RNA totale e il cDNA ottenuto per retrotrascrizione è stato analizzato mediante qPCR secondo l'approccio già descritto in precedenza. Come per i due geni precedenti, l'esperimento è stato condotto a partire da tre cloni indipendenti per ognuno dei ceppi considerati.

Se si confronta il livello di mRNA presente nel ceppo *wild type* con quello riscontrato nel mutante "Amut", si nota che la mutazione del sito di legame per Abf1 determina un dimezzamento dell'espressione del gene *RPS28B*. In linea con quanto osservato a proposito di *RPL4B* e *RPP1A*, questo risultato suggerisce che Abf1 agisca da regolatore positivo dell'espressione di questo gene, dal momento che la mutazione del suo sito di legame interferisce con la piena funzionalità del promotore e con il raggiungimento del livello trascrizionale normalmente riscontrato in condizioni di crescita ottimali. La costruzione di questi mutanti "Amut" a partire dal ceppo Abf1-TAP permetterà di verificare, mediante un'analisi di ChIP-qPCR, che l'effetto delle mutazioni sull'espressione dei geni sia effettivamente associato ad una riduzione dell'associazione del regolatore a questi promotori.

Contrastante con quanto riscontrato per i geni *RPL4B* e *RPP1A* è il risultato ottenuto dall'analisi del mutante "Fmut": nel caso di *RPS28B* sembra che la mutazione del sito di legame per Fhl1 non determini una variazione significativa dei livelli di espressione. Se da un lato tale risultato potrebbe suggerire che Fhl1 non contribuisca alla regolazione di questo gene, non è da escludere l'ipotesi che nel corso dell'evoluzione il reclutamento di Fhl1 su questo locus si sia progressivamente affrancato dalla necessità di legare il DNA in maniera diretta e che ad oggi dipenda completamente dall'interazione con altri regolatori in *trans*. Lo stesso Abf1 rappresenta un buon candidato per questo ruolo, tanto più che data la disposizione ravvicinata dei siti di legame per Abf1 e Fhl1 a livello del promotore di *RPS28B*, è possibile che l'associazione del GRF con il DNA rappresenti un impedimento sterico al legame di Fhl1 con il proprio sito.

Perfettamente conciliabile con questa ipotesi è il risultato ottenuto per il mutante "AFmut", in cui si osserva un livello di espressione relativo al ceppo wt (0,49, corrispondente ad un *fold change* pari a - 2) leggermente inferiore rispetto a quello misurato nel mutante "Amut" (0,55): come precisato anche a proposito di questo stesso tipo di mutante dei geni *RPL4B* e *RPP1A*, tale differenza non risulta tuttavia statisticamente significativa.

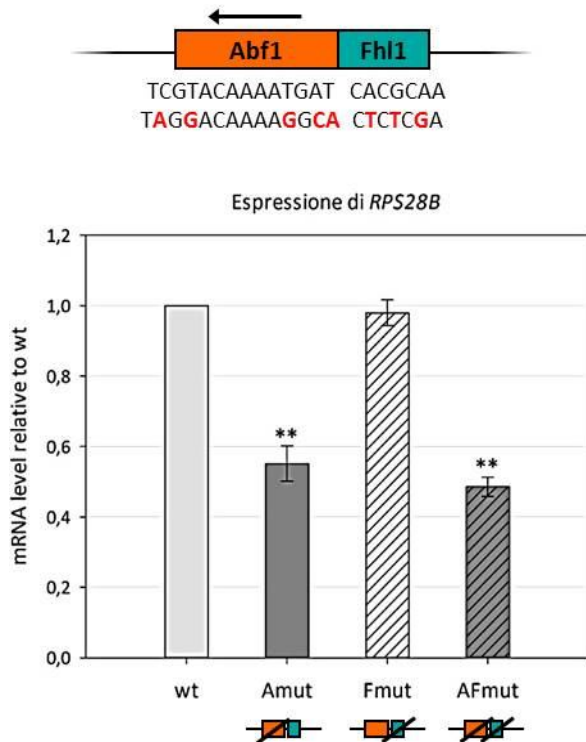


Figura 3.16. In alto: rappresentazione di parte del promotore del gene *RPS28B*: le sequenze dei siti di legame per Abf1 (box in arancione) e per Fhl1 (box in turchese) sono indicate nella versione *wild type* (sopra) e mutata (sotto): le basi in rosso indicano le mutazioni introdotte. In basso: rappresentazione grafica dell'effetto delle mutazioni del promotore sull'espressione di *RPS28B*. Per ogni ceppo, i valori dell'mRNA target sono stati normalizzati rispetto al livello del gene standard *HHT2*, e sono stati indicati come abbondanza relativa rispetto al wt (in ordinata). I valori riscontrati nei mutanti "Amut", "Fmut" e "AFmut" sono rispettivamente pari a 0,55, 0,98 e 0,15 di quello misurato nel wt. I dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da tre esperimenti indipendenti \pm l'errore standard. Il test t di Student è stato utilizzato per confrontare i valori di ciascun mutante rispetto a quello del *wild type*. (**) $P < 0.01$.

Effetti di espressione inattesi nei mutanti del promotore di *RPS22B*

Il gene *RPS22B* presenta un'architettura piuttosto complessa che comprende due introni, uno dei quali ospita il gene *SNR44*, codificante per uno snoRNA della famiglia H/ACA box. I geni per snoRNA intronici sono poco rappresentati e non ben caratterizzati in lievito (Dieci *et al.*, 2009-b), mentre costituiscono la classe maggioritaria nei vertebrati, nei quali è stato investigato più a fondo il processo di maturazione. In questo caso i geni per snoRNA localizzati in sequenze introniche dipendono dalla trascrizione del gene ospite, spesso codificante per proteine coinvolte nella biogenesi del ribosoma o in altre funzione del nucleolo. I successivi passaggi di maturazione dello snoRNA risultano in gran parte dipendenti dal processo di splicing del trascritto primario, dal momento che solitamente lo snoRNA viene ottenuto mediante il taglio esonucleolitico dell'introne exciso e linearizzato (Filipowicz and Pogačić, 2002).

L'analisi dei livelli di espressione nei mutanti del promotore del gene *RPS22B*, oltre a consentire una valutazione del ruolo degli elementi *cis*-regolativi rispetto alla trascrizione del gene codificante per la proteina ribosomiale, ha permesso di provare a chiarire se, come descritto a proposito dei geni per snoRNA intronici dei vertebrati, anche *SNR44* risulti trascrizionalmente dipendente dal gene ospite *RPS22B* e dall'attività del suo promotore.

Il promotore di *RPS22B* presenta un sito per Abf1 con orientamento 3'→5' e sequenza CCGTCAAAAATGAC, rimpiazzata da CACTAAAAATATC nei mutanti "Amut" e "AFmut". A distanza di una sola base, è presente il sito di legame di Fhl1: per impedire il legame della proteina la sua sequenza è stata modificata da GACGCAA a GCCTCGA.

Secondo le stesse modalità descritte in precedenza, sono stati ottenuti a partire da cellule del ceppo *wild type* e dei tre mutanti i cDNA totali, che anche in questo caso sono stati analizzati mediante PCR quantitativa, utilizzando una coppia di primers progettata secondo i criteri già illustrati, specifica per l'mRNA codificante per la proteina ribosomiale, e con una coppia di primers specifica per snR44. Per ognuno dei ceppi analizzati, l'intera procedura è stata eseguita per tre volte, a partire da cloni indipendenti.

Decisamente inaspettato è il profilo di espressione di *RPS22B* osservato nei tre mutanti "Amut", "Fmut" e "AFmut": sembra che le mutazioni introdotte nel promotore non influenzino in alcun modo l'attività trascrizionale, dato che il livello di mRNA misurato nel ceppo *wild type* si ritrova praticamente invariato anche in tutti e tre i mutanti. Questa osservazione sembrerebbe suggerire che il legame di Abf1 e Fhl1 a questo promotore non

sia necessario per il pieno livello di espressione di *RPS22B* in condizioni di crescita ottimali, dal momento che la mutazione dei loro siti di legame non sembra alterare il livello di RNA messaggero che si accumula nelle cellule in rapida crescita. Naturalmente, un'analisi di immunoprecipitazione cromatinica e qPCR permetterebbe di escludere completamente l'ipotesi che quanto osservato possa dipendere invece dall'inefficacia delle mutazioni introdotte nell'impedire il legame tra le proteine e il corrispondente sito di legame.

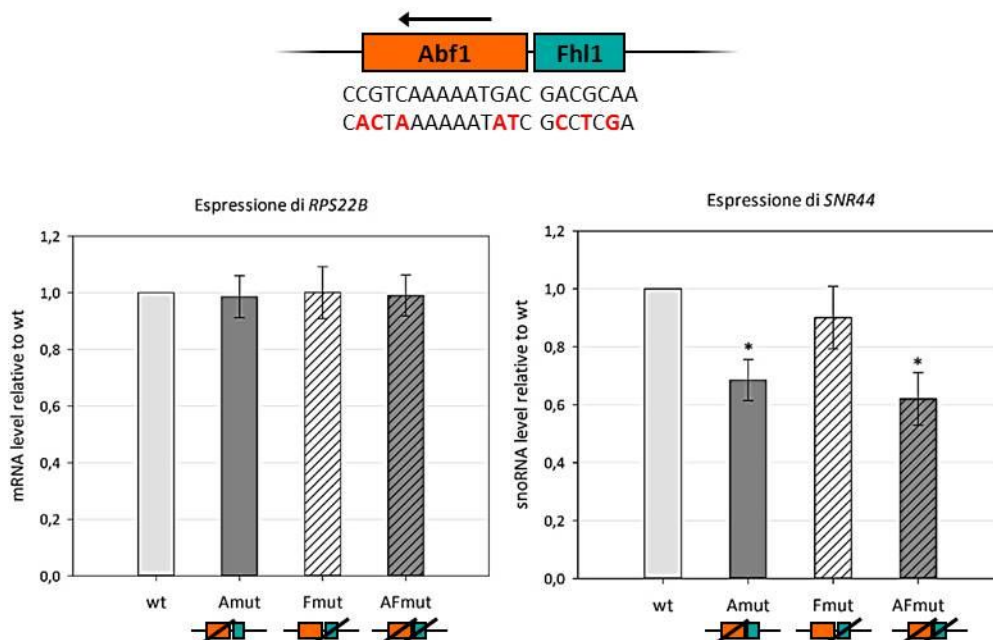


Figura 3.17. In alto: rappresentazione di parte del promotore del gene *RPS22B*: le sequenze dei siti di legame per Abf1 (box in arancione) e per Fhl1 (box in turchese) sono indicate nella versione *wild type* (sopra) e mutata (sotto): le basi in rosso indicano le mutazioni introdotte. In basso: rappresentazione grafica dell'effetto delle mutazioni del promotore sull'espressione di *RPS22B* (grafico a sinistra) e di *SNR44* (grafico a destra). Per ogni ceppo, i valori dell'mRNA target sono stati normalizzati rispetto al livello del gene standard *HHT2*, e sono stati indicati come abbondanza relativa rispetto al wt (in ordinata). I dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da tre esperimenti indipendenti \pm l'errore standard. Il test t di Student è stato utilizzato per confrontare i valori di ciascun mutante rispetto a quello del *wild type*. (*) $P < 0.05$. Per l'mRNA di *RPS22B*, i valori misurati nei mutanti "Amut", "Fmut" e "AFmut" corrispondono a rispettivamente a 0,99, 1 e 0,99 del valore misurato nel wt. Per lo snoRNA snR44, i valori misurati nei mutanti "Amut", "Fmut" e "AFmut" sono rispettivamente pari a 0,69, 0,90 e 0,62 del valore misurato nel wt.

Il profilo di espressione di *RPS22B* nei mutanti del promotore risulta ancora più insolito se confrontato con quello di *SNR44*: se il leggero calo di espressione osservato nel mutante "Fmut" non sembra essere significativo, significativa è invece la riduzione riscontrata nei mutanti "Amut" e "AFmut", nei quali il livello dello snoRNA si riduce rispettivamente del

31% e del 38% rispetto a quello misurato nelle cellule *wild type*. Il profilo di espressione assunto da *SNR44* in risposta alle mutazioni assomiglia a quello osservato nel caso di *RPS28B*, il cui promotore ha la stessa architettura di quello di *RPS22B*: in effetti, in analogia con quanto osservato per la coppia *RPL4B-RPP1A*, si sarebbe potuto ipotizzare che anche l'espressione di *RPS28B* e *RPS22B* risentisse in maniera simile delle mutazioni dei siti di legame per Abf1 e Fhl1.

A tal proposito, è utile ricordare che l'analisi filogenetica del promotore di *RPS22B* ha evidenziato la presenza di un ulteriore elemento *cis*-regolativo fortemente conservato: un sito di legame per il GRF Tbf1. L'associazione della proteina a questo promotore trova conferma in un esperimento di ChIP-seq condotto nell'ambito di uno studio che ha dimostrato il coinvolgimento di Tbf1 nella regolazione trascrizionale dei geni codificanti per snoRNA (Preti *et al.*, 2010).

Considerate queste premesse, si è ritenuto opportuno approfondire il significato funzionale del legame di Tbf1 a questo promotore, aspetto che potrebbe anche contribuire a chiarire gli effetti osservati sull'espressione di *RPS22B* e *SNR44* in risposta alla mutazione dei siti di legame per Abf1 e Fhl1.

Con una strategia del tutto simile a quella già descritta in precedenza, sono stati realizzati a partire dal ceppo Tbf1-TAP altri due mutanti genomici del promotore di *RPS22B*: quello indicato come "Tmut", presenta mutazioni solo nel sito di legame per Tbf1, mentre in quello denominato "TAFmut" sono stati distrutti i siti di legame per Tbf1, Abf1 e Fhl1.

La sequenza riconosciuta da Tbf1 in questo promotore (AACCTAA) è stata convertita in AA**ACAGAT**: le mutazioni introdotte sono state stabilite tenendo conto delle sostituzioni effettuate in studi precedenti, che si sono rivelate efficaci nell'impedire il legame di Tbf1 a promotori contenenti sequenze simili a quella presente in questo caso (Preti *et al.*, 2010; Bosio, 2012).

Per valutare l'effetto sull'espressione di *RPS22B* e *SNR44* della mutazione del sito di legame per Tbf1, da sola o in combinazione con le mutazioni dei siti per Abf1 e Fhl1, è stata seguita la stessa strategia di crescita cellulare, estrazione degli RNA totali e analisi del cDNA mediante PCR quantitativa già descritta in precedenza. Come sempre, l'esito delle analisi è stato confermato da tre esperimenti indipendenti condotti a partire da cloni diversi per ciascuno dei ceppi considerati.

Se si considera il campione “Tmut” del grafico a sinistra in figura 3.18, si nota chiaramente che, in analogia con quanto riscontrato per la mutazione delle sequenze riconosciute da Abf1 e Fhl1, la distruzione del sito di legame per Tbf1 da sola non produce alcuna variazione significativa del livello cellulare dell’ mRNA derivante da *RPS22B*. Solo mutando tutti e tre i siti di legame per i regolatori considerati si ottiene una riduzione dell’espressione di *RPS22B*: il livello riscontrato nel mutante “TAFmut” è pari alla metà di quello osservato in cellule del ceppo *wild type* (*fold change* = -2).

Un simile risultato sembrerebbe suggerire che Tbf1, Abf1 e Fhl1 svolgano ruoli ridondanti nell’attivazione trascrizionale di questo gene RP in condizioni di crescita ottimali: la presenza nel promotore anche di uno solo dei corrispondenti siti di legame sembra sufficiente per mantenere invariato il livello intracellulare dell’ mRNA. Sarebbe interessante valutare se i tre regolatori svolgano ruoli specifici nella modulazione dell’espressione genica in condizioni differenti, ad esempio in risposta a diverse situazioni di stress.

Se si considera invece l’espressione di *SNR44* (fig. 3.18, grafico a destra), si può riscontrare che la sola mutazione del sito di legame per Tbf1 nel promotore di *RPS22B* provoca un dimezzamento del livello dello snoRNA. La riduzione causata dalla mutazione di questo sito è più marcata di quella determinata dalla mutazione del sito per Abf1 (i livelli nei mutanti “Amut” e “Tmut” corrispondono rispettivamente a 0,69 e 0,52 di quello riscontrato nel ceppo *wild type*) ed è simile a quella osservata per il gene *SNR32* in seguito alla mutazione del sito di legame per Tbf1 presente nel suo promotore (Preti *et al.*, 2010). In questo caso, era stato dimostrato che il dimezzamento dell’espressione genica si accompagnava ad un brusco calo del livello di associazione della proteina al promotore.

Combinando la mutazione del sito di Tbf1 con le mutazioni dei siti per Abf1 e Fhl1 sembra verificarsi un effetto additivo rispetto alla riduzione dei livelli di espressione dello snoRNA: il valore misurato nel mutante “TAFmut”, infatti è pari al 16% di quello riscontrato nel *wild type* (*fold change* = -6,25). Questo valore corrisponde approssimativamente alla somma dei singoli contributi derivanti dalla mutazione del sito di Tbf1, che da sola provoca una riduzione dell’espressione del 48%, e dalle mutazioni dei siti di legame per Abf1 e Fhl1, che causano un calo del 38% nel livello intracellulare di snR44.

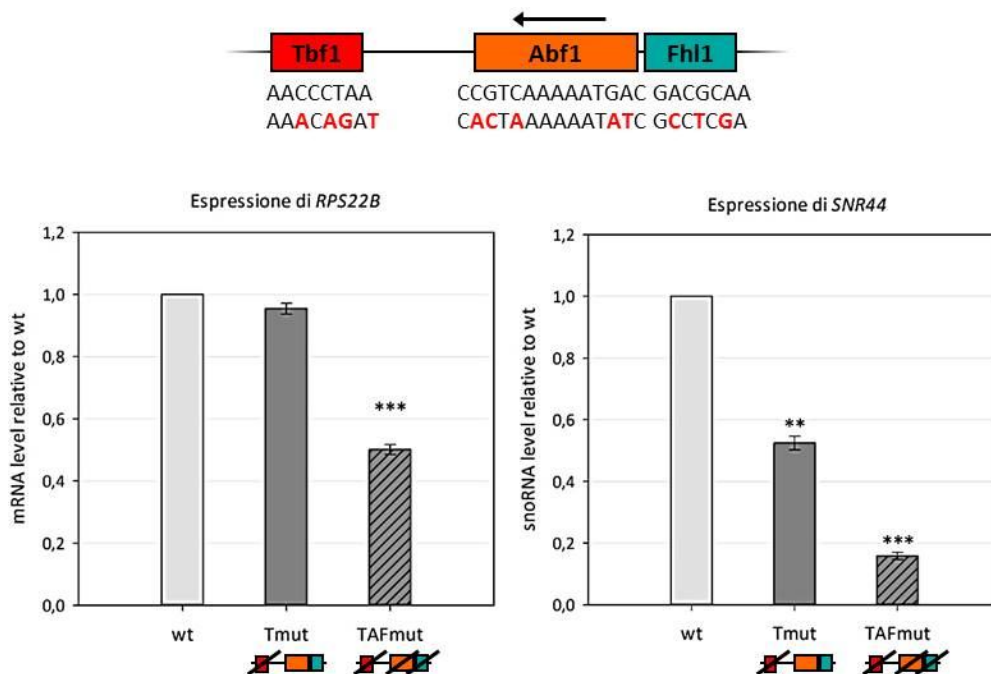


Figura 3.18. In alto: rappresentazione di parte del promotore del gene *RPS22B*: le sequenze dei siti di legame per Tbf1 (box in rosso), per Abf1 (box in arancione) e per Fhl1 (box in turchese) sono indicate nella versione *wild type* (sopra) e mutata (sotto): le basi in rosso corrispondono alle mutazioni introdotte. In basso: rappresentazione grafica dell'effetto delle mutazioni del promotore sull'espressione di *RPS22B* (grafico a sinistra) e di *SNR44* (grafico a destra). Per ogni ceppo, i valori dell'mRNA target sono stati normalizzati rispetto al livello del gene standard *HHT2*, e sono stati indicati come abbondanza relativa rispetto al wt (in ordinata). I dati sono rappresentati come media dei valori derivanti da tre esperimenti indipendenti \pm l'errore standard. Il test t di Student è stato utilizzato per confrontare i valori di ciascun mutante rispetto a quello del *wild type*. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$. Per l'mRNA di *RPS22B*, i valori misurati nei mutanti "Tmut" e "TAFmut" corrispondono a rispettivamente a 0,95 e 0,5 del valore misurato nel wt. Per lo snoRNA snR44, i valori misurati nei mutanti "Tmut" e "TAFmut" sono rispettivamente pari a 0,52, 0,16 del valore misurato nel wt.

Nel complesso, i dati di espressione ottenuti per i vari mutanti del promotore di *RPS22B* sembrano suggerire che la regolazione dei geni per la proteina ribosomiale e per lo snoRNA sia caratterizzata da un elevato grado di complessità: il fatto che i livelli dell'mRNA e di snR44 risentano in maniera differente delle stesse mutazioni del promotore può essere interpretato ipotizzando che i due RNA vengano trascritti da due complessi trascrizionali Pol II differenti, il cui reclutamento è influenzato in maniera diversa dalle mutazioni del promotore, oppure invocando meccanismi di controllo dell'espressione genica che pur agendo ad un livello *post-trascrizionale* possano risultare influenzati dalla sequenza del promotore, determinando destini distinti per le due molecole di RNA derivanti da un unico trascritto primario.

All'interpretazione di questi e degli altri risultati di espressione e alle possibili implicazioni fisiologiche ed evolutive delle osservazioni fatte nel corso degli esperimenti fin qui descritti, verrà dedicato più ampio spazio nel capitolo "Discussione", dopo che saranno stati illustrati anche i risultati relativi all'analisi dell'interazione tra i promotori dei geni RP e i regolatori Abf1 e Fhl1 condotta *in vitro*.

3.4. Analisi *in vitro* dell'interazione tra i promotori dei geni RP e le proteine Abf1 e Fhl1

Gli esiti delle analisi condotte *in vivo* hanno messo in luce le difficoltà legate alla comprensione delle interazioni che intercorrono a livello genomico tra i promotori dei geni per proteine ribosomiali considerati in questo studio e i regolatori Abf1 e Fhl1. Gli aspetti più sfuggenti del network di regolazione sembrano riguardare proprio Fhl1: fatta eccezione per *RPS22B* e in misura minore per *RPL3*, non è stato possibile confermare l'effettiva associazione di questa proteina con il promotore dei geni di interesse, sebbene tutti presentino un elemento fortemente conservato dal punto di vista evolutivo e perfettamente corrispondente, secondo quanto dimostrato dalle ormai numerose evidenze sperimentali disponibili in letteratura, alla sequenza consenso riconosciuta da Fhl1. Solo nel caso di *RPL4B* e *RPP1A* la mutazione del promotore a livello di questa sequenza conservata sembra provocare una riduzione significativa, ma comunque debole, dei livelli dei corrispondenti mRNA. Nessun effetto è stato osservato invece sull'espressione di *RPS22B*, l'unico gene per cui era stata ottenuta una chiara conferma dell'associazione di Fhl1 al promotore.

Gli interrogativi che emergono da questo quadro ricco di punti irrisolti si inseriscono nella ormai quasi trentennale questione relativa al ruolo di un possibile legame diretto con il DNA nel reclutamento di Fhl1 sul promotore dei geni per proteine ribosomiali. Sebbene sia stata evidente fin da subito la presenza nella sequenza di questo regolatore di un dominio *forkhead* o FH (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994), un motivo di legame al DNA identificato per la prima volta nell'omonimo regolatore trascrizionale di *Drosophyla melanogaster* (Weigel *et al.*, 1989), in seguito diverse evidenze sperimentali relative ai geni per proteine ribosomiali regolati da Rap1 hanno suggerito che Fhl1 si associ ai corrispondenti promotori prevalentemente in maniera indiretta (Wade *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Knight *et al.*,

2014), mediante interazioni con lo stesso Rap1 o con Hmo1. Recentemente è stato confermato che il dominio FH contribuisce solo in maniera marginale all'interazione di Fhl1 con la maggior parte di questi promotori e che solo con quelli contenenti un elemento fortemente somigliante alla sua sequenza consenso la proteina forma contatti diretti e sequenza-specifici: solamente in questi casi infatti sia la delezione del *DNA-binding domain* di Fhl1 che la distruzione del suo sito di legame sul DNA riducono fortemente l'associazione della proteina con il promotore (Knight *et al.*, 2014).

Dato che anche i geni regolati da Abf1 considerati in questo studio presentano un sito di legame per Fhl1 perfettamente corrispondente al consenso, si è ritenuto opportuno fare un ulteriore tentativo di indagine dell'interazione tra Fhl1 e i promotori di interesse utilizzando, in alternativa all'immunoprecipitazione cromatinica, la tecnica di *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) diffusamente impiegata per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei complessi proteina-DNA *in vitro*.

La scelta di questo approccio ha richiesto l'espressione eterologa e purificazione della proteina Fhl1. Anche Abf1 è stata analogamente espressa e purificata, in modo da poter includere il GRF nello studio biochimico e valutare la sua eventuale funzione nell'interazione tra Fhl1 e i promotori.

3.4.1. Clonaggio, espressione e purificazione di Fhl1 e dei suoi frammenti

Fhl1 è una proteina composta da 936 aminoacidi (~103,5 kDa), caratterizzata come molti regolatori trascrizionali da una marcata acidità (pI = 5.64). La sua struttura non è ancora stata risolta, ma la combinazione tra analisi bioinformatiche e studi funzionali ha permesso l'individuazione di due domini funzionalmente rilevanti. La regione compresa tra gli aminoacidi 440-567 corrisponde al dominio *fork head* (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994), un motivo di legame al DNA caratteristico di una classe di fattori trascrizionali (proteine Fox) presenti in numerosi eucarioti e particolarmente abbondanti nell'uomo. L'attività di questi regolatori è spesso connessa a funzioni fondamentali, quali la biogenesi dei ribosomi, la progressione del ciclo cellulare, l'omeostasi metabolica e lo sviluppo di organi e sistemi. Dal punto di vista strutturale, questo dominio è composto da un fascio di tre α -eliche connesso a due loop attraverso un foglietto β a due filamenti antiparalleli (Nakagawa *et al.*, 2013). La porzione di catena polipeptidica compresa tra gli aminoacidi 300 e 374 coincide con il dominio *forkhead associated*, presente non solo in molti regolatori Fox, ma anche in

numerose proteine con attività differenti, quali chinasi, fosfatasi ed enzimi metabolici. La funzione che questo dominio svolge in tutti questi casi è la stessa: permettere il legame con interattori proteici grazie al riconoscimento di residui di fosfotreonina (Durocher and Jackson, 2002). La struttura di questo dominio è costituita principalmente da un β -sandwich composto da 11 filamenti antiparalleli che può talvolta contenere brevi α -eliche all'interno dei loop di collegamento.

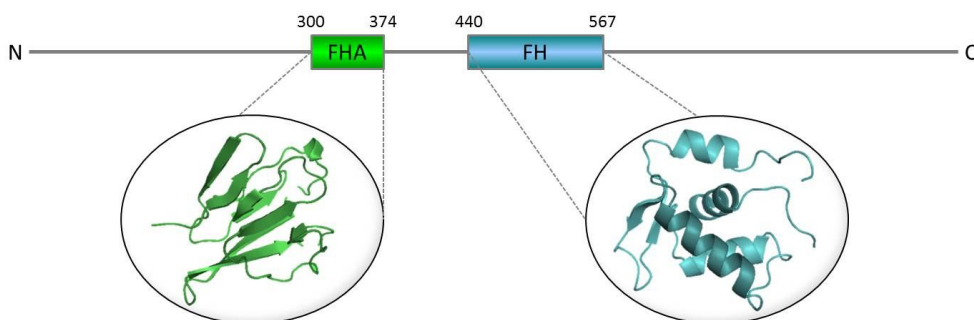


Figura 3.19. Rappresentazione grafica dei domini FH (in azzurro) e FHA (in verde) di Fhl1. La struttura dei due domini è stata modellata utilizzando il server predittivo Phyre (Kelley and Sternberg, 2009).

I domini FH e FHA sono localizzati nella regione centrale della sequenza aminoacidica, le cui estremità N- e C- terminali coincidono con due domini ricchi di residui acidi che non sembrano presentare nessuna struttura nota. In effetti, un'analisi condotta con il server IUPred (Dosztányi *et al.*, 2005-a; <http://iupred.enzim.hu>) ha evidenziato che nella sequenza di Fhl1 sono riconoscibili solo tre porzioni della catena polipeptidica caratterizzate da una intrinseca propensione ad organizzarsi in domini globulari: le prime due (aminoacidi 273-371 e 450-552) coincidono con i domini FHA e FH, mentre la terza corrisponde al tratto di sequenza compresa tra gli aminoacidi 627-660 (ma ulteriormente estendibile fino al residuo 730). Per le restanti regioni della proteina, in accordo con il principio di "estimated pairwise energy content" su cui si basa questo tipo di analisi (Dosztányi *et al.*, 2005-b), la composizione aminoacidica non permette la formazione di interazioni favorevoli sufficienti a giustificare l'acquisizione di una struttura ben definita. La predizione di queste porzioni intrinsecamente destrutturate è perfettamente in linea con i numerosi esempi di regolatori trascrizionali eucariotici dotati di regioni disordinate (Wright and Dyson, 1999). Queste regioni solitamente acquisiscono strutture tridimensionali alternative quando interagiscono con altri fattori proteici: ciò permette al regolatore di riconoscere diversi target, anche molto differenti tra loro dal punto di vista strutturale (Dyson and Wright, 2002).

È forse a causa di queste estese regioni destrutturate e delle notevoli dimensioni che, secondo quanto è stato possibile trovare in letteratura, l'intera proteina Fhl1 non è mai stata espressa in sistemi batterici. Gli stessi esperimenti di *protein binding microarray* eseguiti per determinare la sua sequenza consenso sono stati condotti utilizzando solamente il dominio di legame al DNA (Badis *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2013).

Tenendo conto di queste premesse, nell'ambito del presente lavoro sono state espresse e purificate, oltre alla proteina intera, anche tre varianti tronche: la prima, indicata come "FH" coincide con il dominio di legame al DNA (aminoacidi 440-580), la seconda ("FHA-FH") corrisponde alla porzione di proteina compresa tra i domini FHA e FH (aminoacidi 266-580), la terza ("FHA-734") coincide con la regione centrale della proteina comprendente tutte le porzioni intrinsecamente ordinate (fig.3.20).

Le sequenze codificanti per Fhl1 e per le tre varianti tronche sono state ottenute mediante PCR a partire dal gene *YPR104C* del genoma di *S. cerevisiae* ceppo *S228C*, quindi clonate nel vettore di espressione pET28-b in modo tale che la loro estremità 5' fosse fusa alla sequenza codificante per un *tag* di istidine, che risulta quindi presente a livello dell'estremità N-terminale delle corrispondenti proteine.



Figura 3.20. (A) Predizione della tendenza al disordine della sequenza aminoacidica di Fhl1 ottenuta con il server IUPred: i rettangoli in blu corrispondono ai domini globulari. (B) Illustrazione grafica di Fhl1 e delle sue varianti tronche espresse e purificate: la box verde rappresenta il dominio FHA, quella azzurra il dominio FH e quella grigia la terza regione strutturalmente ordinata predetta con IUPred.

Le prove di induzione e di solubilità effettuate a seguito della trasformazione delle cellule del ceppo BL21-Gold(DE3)pLysS di *E. coli*, hanno permesso di verificare che le proteine “FH”, “FHA-FH” e “FHA-734” risultavano espresse in maniera efficiente e che si localizzavano prevalentemente nella frazione solubile (surnatante) ottenuta dopo la lisi delle cellule batteriche: questo ha permesso di purificare le tre proteine mediante un passaggio di cromatografia per affinità al Ni^{2+} , sufficiente per raggiungere un grado di purezza adatto agli scopi previsti da questo lavoro.

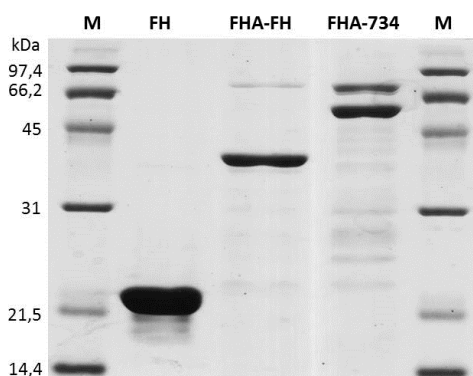


Figura 3.21. SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 12% eseguito per controllare le proteine FH-*his tag* (~ 18,8 kDa), FHA-FH-*his tag* (~ 38,4 kDa), FHA-734-*his tag* (~ 55 kDa) a seguito della purificazione mediante cromatografia di affinità. Le dimensioni delle specie presenti nel marker (M) sono indicate a sinistra dell'immagine.

La stessa strategia è stata utilizzata per un tentativo di espressione e purificazione di Fhl1, il cui esito però è stato inficiato dalla ridotta efficienza di induzione e, soprattutto, dalla notevole eterogeneità del campione ottenuto a seguito della cromatografia di affinità.

È possibile che tale eterogeneità fosse dovuta a diversi fattori, quali la presenza nell'estratto cellulare di copie di Fhl1 derivanti da eventi di traduzione incompleta, la parziale degradazione della proteina nel corso della purificazione e l'associazione alla colonna cromatografica di proteine batteriche contaminanti, favorita dalla ridotta quantità di Fhl1 presente nell'estratto cellulare.

Tenendo conto di questi fattori, si è deciso di esprimere una variante di Fhl1 addizionata di due tag compatibili ma differenti: il tag istidinico all'estremità N-terminale e lo Strep tag II (Schmidt and Skerra, 2007) a quella C-terminale. Ciò ha permesso sia di migliorare il grado di purezza che di selezionare le sole molecole corrispondenti alla proteina intera grazie a due passaggi di cromatografia di affinità consecutivi.

Attraverso due step di PCR condotti con opportuni primers mutagenici, la sequenza di *FHL1* è stata addizionata all'estremità 3' della sequenza codificante per il sito di taglio

riconosciuto dalla proteasi trombina, seguita da quella codificante per lo Streptag II. Il successivo clonaggio in pET28-b è stato eseguito in maniera analoga a quanto descritto in precedenza. Va precisato che tra l'*his-tag* e la proteina, così come tra quest'ultima e lo Streptag II, è presente un *linker* contenente la sequenza aminoacidica riconosciuta dalla trombina: in questo modo, qualora si rivelasse necessaria, l'eliminazione di entrambe le porzioni eterologhe potrebbe essere ottenuta mediante un unico passaggio di digestione enzimatica.

La proteina è stata espressa in cellule del ceppo BL21 CodonPlus di *E. coli* e, a seguito della prova di solubilità che ha permesso di verificare la sua presenza nella frazione cellulare solubile, è stata purificata mediante due passaggi successivi di cromatografia di affinità, sfruttando la presenza dei due tag. Come confermato mediante SDS-PAGE, con questa strategia la proteina è stata ottenuta con una resa limitata, ma con un grado di purezza decisamente migliore. La stessa analisi elettroforetica ha messo in evidenza che Fhl1 presenta una mobilità anomala, decisamente ridotta rispetto a quella attesa sulla base del suo peso molecolare. Questo comportamento è piuttosto comune per proteine che come questa sono caratterizzate da una acidità e una idrofilicità marcate (Shirai *et al.*, 2008) ed è già stato documentato in precedenza per altri regolatori di lievito, tra cui lo stesso Rap1 (Shore and Nasmyth, 1987).

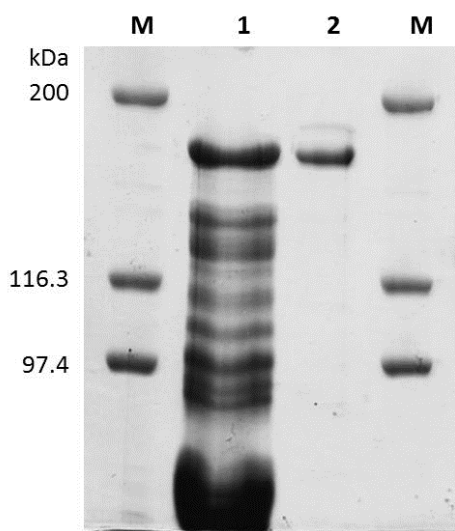


Figura 3.22. SDS-PAGE su gel di poliaccrilammide al 7,5% eseguito per controllare la proteina *his tag-Fhl1-Streptag II* (~ 107,7 kDa) a seguito della prima purificazione mediante cromatografia di affinità su colonna Ni-NTA (1) e dopo il secondo passaggio cromatografico, eseguito su colonna Strep-Tacin (2), che ha permesso di migliorare notevolmente il grado di purezza della proteina. Le dimensioni delle specie presenti nel marker (M) sono indicate a sinistra dell'immagine. Confrontando la posizione della banda relativa alla proteina *his tag-Fhl1-Streptag II* con quella delle bande del marker si può notare che la sua mobilità elettroforetica è ridotta rispetto a quanto attendibile sulla base del suo peso molecolare.

3.4.2. Clonaggio, espressione e purificazione della proteina Abf1

Abf1 è una proteina acida ($pI = 4.67$), composta da 731 aminoacidi (~81,7 kDa) della quale non è stata ancora caratterizzata la struttura. Analisi bioinformatiche e evidenze sperimentali confermano la presenza di un dominio bipartito di legame al DNA (Cho *et al.*, 1995), comprendente un motivo *zinc finger* (aminoacidi 40-91) e un *motivo helix-turn-helix* (aminoacidi 323-496). La regione C-terminale della proteina, compresa tra gli aminoacidi 604 e 731 corrisponde ad un dominio multifunzionale che risulta responsabile delle attività svolte da Abf1 nella regolazione trascrizionale, nella replicazione e nel silenziamento dei *loci* del *mating type* (Miyake *et al.*, 2002).

Nonostante l'elevato peso molecolare e la pronunciata tendenza al disordine che caratterizza la maggior parte della sequenza aminoacidica, evidenziata dall'analisi condotta con il programma IUPred, in letteratura sono riportati alcuni studi in cui Abf1 è stata espressa con successo in cellule di *Escherichia coli* (Halfter *et al.*, 1989; Cho *et al.*, 1995; Beinoravičiūtė-Kellner *et al.*, 2005).

Il gene *YKL112W* codificante per Abf1 è stato isolato dal genoma di *S. cerevisiae* ceppo *S228C* mediante PCR e clonato nel vettore di espressione pET28-b. Anche in questo caso si è fatto in modo che il gene risultasse fuso alla sequenza codificante per il *tag* di istidine, così che questo fosse presente a livello dell'estremità N-terminale della proteina.

Le prove di induzione e di solubilità effettuate a seguito della trasformazione delle cellule del ceppo BL21-Gold(DE3)pLysS di *E. coli*, hanno evidenziato che la proteina veniva espressa per buona parte in una forma solubile, cosa che ha permesso, a seguito della lisi delle cellule batteriche, la sua purificazione dal surnatante grazie ad un passaggio di cromatografia per affinità al Ni^{2+} . Un'analisi mediante SDS-PAGE ha mostrato che il grado di purezza ottenuto con questo passaggio cromatografico era adeguato per lo scopo del presente lavoro. È interessante notare che anche per Abf1, in accordo con quanto già evidenziato in precedenza (Halfter *et al.*, 1989), è stata riscontrata una mobilità elettroforetica anomala, minore rispetto a quella attendibile sulla base delle sue dimensioni e coerente con la sua pronunciata acidità e con la sua natura fortemente idrofila.

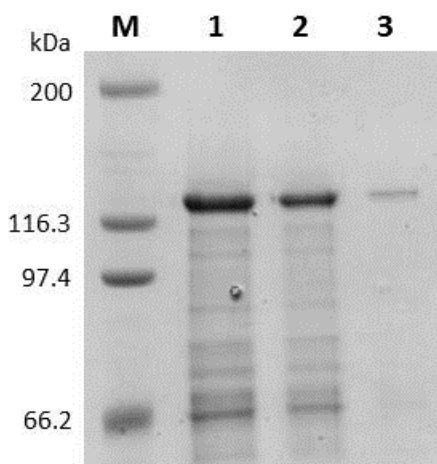


Figura 3.23. SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 7,5% eseguito per controllare la proteina Abf1-*his tag* (~ 85,2 kDa, pI = 5.02) a seguito della purificazione mediante cromatografia di affinità al Ni²⁺.

Le dimensioni delle specie presenti nel marker (M) sono indicate a sinistra dell'immagine. I campioni 1, 2, 3 corrispondono rispettivamente a 10 μ l, 5 μ l e 1 μ l della proteina Abf1 parzialmente purificata.

Confrontando la posizione della banda relativa ad Abf1-*his tag* con quella delle bande del marker si può notare che la mobilità elettroforetica della proteina è ridotta rispetto a quanto attendibile sulla base del suo peso molecolare.

3.4.3. Saggi di mobilità elettroforetica (EMSA)

Le proteine purificate sono state utilizzate per saggi di mobilità elettroforetica che permettono di valutare la loro capacità di legare in maniera sequenza specifica i promotori dei geni considerati. In particolare è stata valutata, per il momento, l'interazione del dominio di legame al DNA di Fhl1 con i promotori dei geni *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B* e *RPS28B* e sono state eseguite alcune prove preliminari dell'interazione tra Fhl1 e Abf1 con alcuni di questi promotori.

Il saggio è stato condotto in tutti i casi seguendo una strategia comune: dapprima sono state allestite in una opportuna soluzione di legame reazioni contenenti concentrazioni crescenti della proteina di interesse e 25 fmoli di DNA aspecifico (che non contiene cioè la sequenza riconosciuta dalla proteina). Dopo una preincubazione di 30' a temperatura ambiente, a ciascuna reazione di *binding* sono state aggiunte 25 fmoli di sonda radiomarcata. La sonda corrisponde ad un frammento di 150-200 bp del promotore del gene di interesse comprendente i siti di legame per le proteine Abf1 e Fhl1: per valutare la specificità dell'eventuale legame le reazioni sono state condotte in parallelo con il promotore *wild type* e con le specifiche varianti mutate descritte nel paragrafo 3.3.2.

Dopo un'ulteriore incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, le reazioni sono state risolte mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti. Nell'immagine del gel ottenuta mediante phosphorimaging gli eventuali complessi DNA-

proteina sono stati riconosciuti in virtù della mobilità elettroforetica ridotta che essi presentano rispetto alla sonda libera.

Il dominio FH di Fhl1 lega in maniera sequenza-specifica i promotori di *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B* e *RPS28B*

Gli esperimenti condotti utilizzando il dominio FH di Fhl1 sembrano confermare la capacità di questo dominio di legame al DNA di interagire con i promotori dei geni *RPL4*, *RPP1A*, *RPS22B* e *RPS28B*. In tutti e quattro casi, infatti, nell'immagine del gel ottenuta a seguito della corsa elettroforetica è stata riscontrata la comparsa di un segnale corrispondente al complesso sonda-proteina, progressivamente più intenso all'aumentare della concentrazione di proteina presente nella reazione.

L'analisi ha permesso inoltre di verificare che il legame del dominio FH a questi promotori dipende fortemente dalla presenza della sequenza "SACGCAM": l'interazione tra la proteina e la sonda viene fortemente ridotta, sebbene non del tutto abolita, quando quest'ultima presenta mutazioni nel sito di legame per Fhl1, come si può facilmente apprezzare confrontando i segnali relativi al complesso DNA-proteina in presenza della sonda *wild type* e di quella mutata, specialmente in corrispondenza delle concentrazioni di proteina minori (fig.3.24).

Il segnale residuo relativo al complesso che si osserva in presenza delle sonde mutate potrebbe essere imputato ad una affinità aspecifica per il DNA del dominio FH, che essendo fortemente basico ($pI = 9.8$) potrebbe instaurare interazioni elettrostatiche con le cariche negative dello scheletro fosfodiesterico della sonda. Una simile spiegazione potrebbe giustificare in parte anche la presenza di un terzo segnale, decisamente più debole ed individuabile solo in presenza delle concentrazioni di proteina più elevate, che potrebbe corrispondere ad un complesso contenente due monomeri di dominio FH, uno dei quali legato in maniera aspecifica. Tuttavia, il fatto che questo segnale sia più marcato nel caso dei geni *RPL4B* e *RPP1A* potrebbe suggerire anche che i promotori considerati contengano altri siti ad affinità nettamente ridotta, che vengono legati solo quando la proteina è presente a concentrazioni più alte.

L'esito di questi esperimenti di EMSA, pur non costituendo una prova conclusiva, rappresenta una buona indicazione a favore dell'ipotesi che anche *in vivo* si verifichi un'interazione tra Fhl1 e il corrispondente sito di legame presente su questi promotori. In

questo senso, ancora più utile sarebbe confermare che anche la proteina intera, similmente al suo dominio di legame al DNA, è capace di interagire con questi promotori *in vitro*, riconoscendo in maniera specifica il corrispondente elemento *cis*-regolativo.

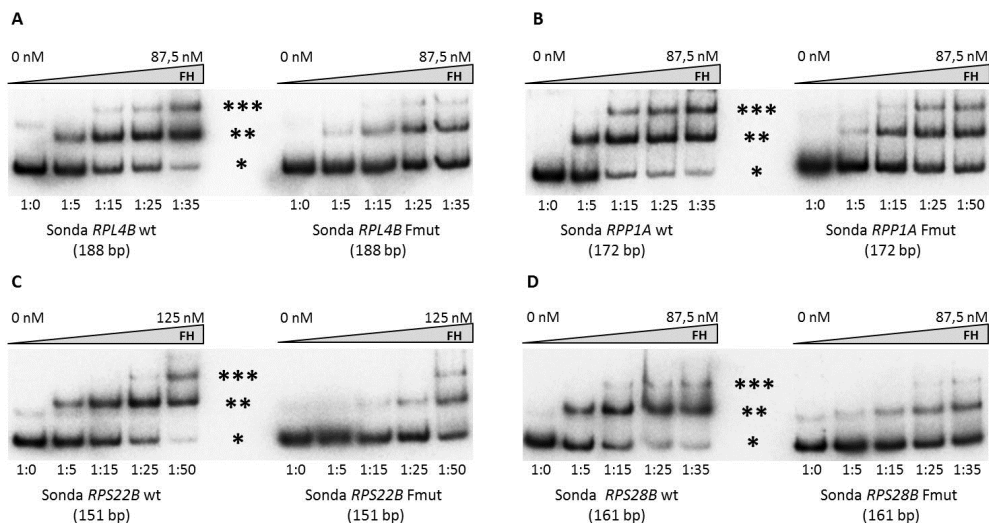


Figura 3.24. EMSA condotti con la proteina FH e le sonde corrispondenti ai promotori dei geni *RPL4B* (A), *RPP1A* (B), *RPS22B* (C) e *RPS28B* (D) nella versione *wild type* (wt, a sinistra) e mutata nel sito di legame di Fhl1 (Fmut, a destra). È stato specificato per ogni campione il rapporto sonda:proteina. (*) Sonda non legata; (**) complesso sonda-FH; (***) complesso sonda-2x FH?

Saggi preliminari dell'interazione tra Fhl1, Abf1 e i promotori dei geni RP

Poiché le proteine Fhl1 e Abf1 sono state ottenute solo al termine di questo percorso di Dottorato, il poco tempo a disposizione ha reso possibili solo alcune prove preliminari dell'associazione dei due regolatori con i promotori dei geni *RPP1A*, *RPS22B* e *RPS28B*. L'esito di questi esperimenti verrà brevemente illustrato di seguito: pur non permettendo di formulare alcuna conclusione in merito all'interazione tra le proteine e i promotori, questi primi tentativi possono fornire indicazioni utili per future analisi.

Come visibile in fig. 3.25, nell'immagine ottenuta dall'esperimento condotto con Fhl1 e la sonda corrispondente al promotore *wild type* di *RPS22B*, è stato possibile individuare un debole segnale compatibile con il complesso proteina-DNA, che sembra aumentare, anche se molto lievemente, all'aumentare della concentrazione della proteina.

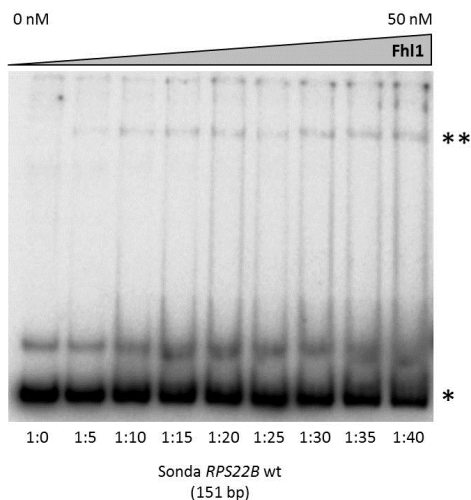


Figura 3.25. EMSA condotto con la proteina Fhl1 e la sonda corrispondente al promotore del gene *RPS22B* nella versione *wild type*. È stato specificato per ogni campione il rapporto sonda:proteina (*) Sonda non legata; (**) complesso sonda-Fhl1.

Anche l'esperimento condotto con le sonde corrispondenti ai promotori dei geni *RPP1A* e *RPS28B* sembrerebbe suggerire una debole associazione tra Fhl1 e il DNA (fig 3.26). Per questi due promotori, l'analisi è stata eseguita in parallelo anche con la sonda mutata nel sito di legame per Fhl1: in queste condizioni, il segnale corrispondente al complesso sembra lievemente ridotto rispetto a quello riscontrato in presenza della sonda *wild type*. Tale effetto risulta più apprezzabile nel caso del promotore di *RPS28B*.

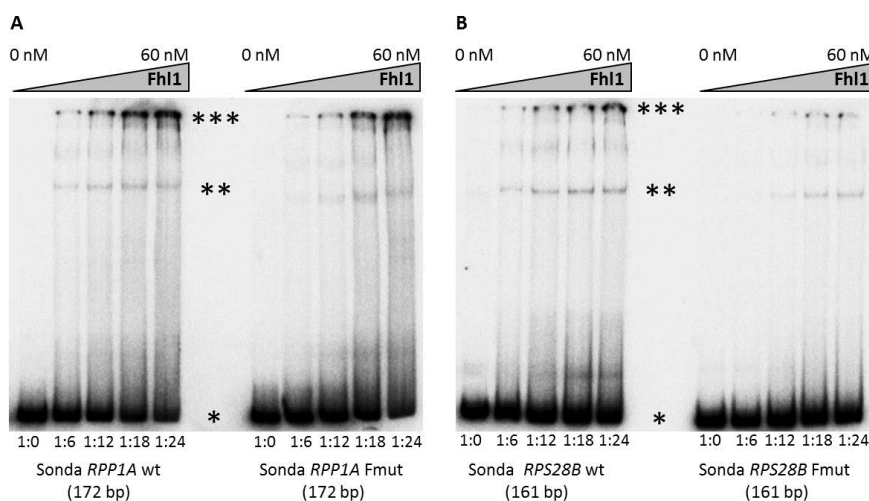


Figura 3.26. EMSA condotto con la proteina Fhl1 e le sonde corrispondenti ai promotori dei geni *RPP1A* (A) e *RPS28B* (B) nella versione *wild type* (wt, a sinistra) e mutata nel sito di legame per Fhl1 (Fmut, a destra). È stato specificato per ogni campione il rapporto sonda:proteina. (*) Sonda non legata; (**) complesso sonda-Fhl1; (***) aggregati nei pozzetti.

L'esperimento condotto con Abf1 e la sonda corrispondente al promotore *wild type* di *RPP1A* ha permesso di riconoscere la formazione di un complesso tra la proteina e il DNA, sebbene anche in questo caso il segnale fosse piuttosto debole e sembrasse sparire in presenza della concentrazione più elevata di proteina, in corrispondenza della quale diventava prevalente un segnale probabilmente dovuto ad aggregati di proteina e DNA a mobilità fortemente ridotta, rimasti nei pozzetti del gel (fig. 3.27). Questo stesso segnale è stato riscontrato in tutti gli esperimenti condotti con Abf1 e/o Fhl1, specialmente in presenza delle concentrazioni proteiche più elevate.

L'esperimento eseguito con la sonda "RPP1A Amut" sembra suggerire che la debole associazione di Abf1 al promotore risenta della presenza di mutazioni nel corrispondente sito di legame. Una interazione debole ma sequenza-specifica sembrerebbe verificarsi anche tra Abf1 e il promotore di *RPS28B*, anche se l'interpretazione dell'immagine derivante da questo esperimento risulta complicata dalla presenza di numerose bande: un leggero segnale compatibile con il complesso Abf1-DNA sembrerebbe riscontrabile in presenza della sonda *wild type*, ma non in presenza della sonda mutata (fig. 3.27).

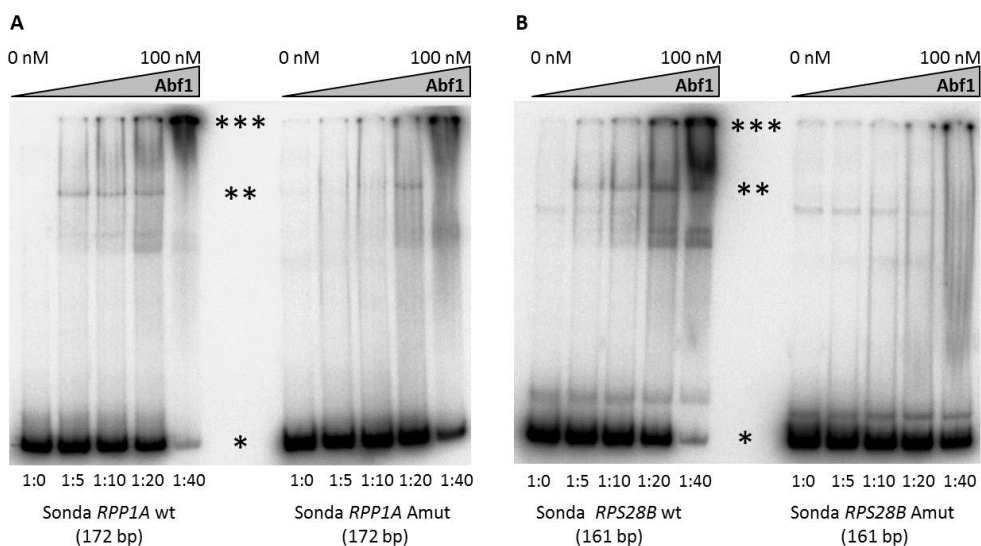


Figura 3.27. EMSA condotto con la proteina Abf1 e le sonde corrispondenti ai promotori dei geni *RPP1A* (A) e *RPS28B* (B) nella versione *wild type* (wt, a sinistra) e mutata nel sito di legame per Abf1 (Amut, a destra). È stato specificato per ogni campione il rapporto sonda:proteina. (*) Sonda non legata; (**) complesso sonda-Abf1; (***) aggregati nei pozzetti.

Di non immediata comprensione è il risultato derivante dall'esperimento condotto per valutare le interazioni che si instaurano in presenza dei promotori di *RPP1A* e *RPS28B* e di

entrambe le proteine (fig. 3.28). Per ciascuno dei due promotori, la sonda è stata incubata sia con ciascuna proteina da sola, che con concentrazioni crescenti di Fhl1 in presenza di una quantità costante di Abf1. Queste condizioni sono state ripetute sia in presenza della sonda *wild type* che della corrispondente variante "AFmut". Per entrambi i geni, questo esperimento ha confermato la formazione di un complesso sequenza-specifico tra Abf1 e il DNA. Non è stato invece individuato in queste condizioni alcun segnale compatibile con la formazione di un complesso Fhl1-DNA, contrariamente a quanto suggerito dagli esperimenti precedentemente descritti. In presenza di entrambe le proteine e della sonda *wild type*, invece, è ancora riconoscibile un segnale corrispondente al complesso Abf1-DNA, che sembra però più intenso di quello riscontrato in presenza della sola proteina Abf1. È difficile stabilire se il segnale non ben definito, forse più distinguibile nel caso di *RPS28B*, localizzato al di sopra della banda discreta corrispondente al complesso Abf1-DNA, e la cui intensità sembra aumentare progressivamente con la concentrazione di Fhl1 possa essere imputabile alla formazione di un complesso trimerico comprendente anche Fhl1, magari parzialmente dissociatosi durante la corsa elettroforetica.

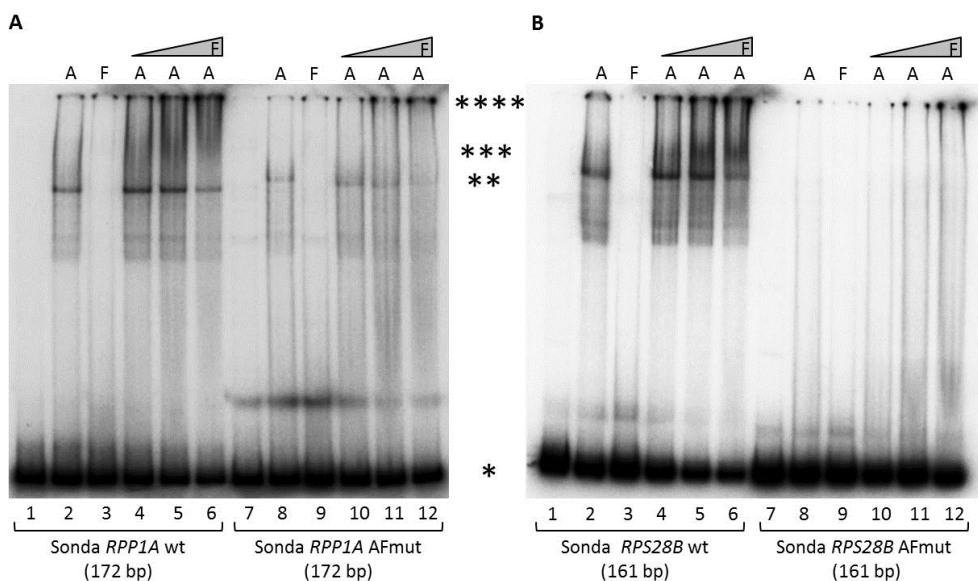


Figura 3.28. EMSA condotto con le proteine Abf1 e Fhl1 e le sonde corrispondente ai promotori dei geni *RPP1A* (A) e *RPS28B* (B) nella versione *wild type* (wt, 1-6) e mutata nei siti di legame di Abf1 e Fhl1 (AFmut, 7-12). Reazioni 2 e 8: 25 nM Abf1; reazioni 3 e 9: 15 nM Fhl1; reazioni 4 e 10: 25 nM Abf1 + 15 nM Fhl1; reazioni 5 e 11: 25 nM Abf1 + 30 nM Fhl1; reazioni 6 e 12: 25 nM Abf1 + 45 nM Fhl1. (*) Sonda non legata; (**) complesso sonda-Abf1; (***) possibile complesso sonda-Abf1-Fhl1?; (****) aggregati nei pozzetti

Al fine di chiarire le interazioni delle proteine con questi promotori, sarà necessario ripetere questi esperimenti, saggiando differenti condizioni di reazione e di successiva elettroforesi: è noto infatti che fattori quali la composizione della soluzione di legame, la durata e il voltaggio della corsa elettroforetica possono influenzare sensibilmente l'esito di questo tipo di esperimenti.

È possibile inoltre che un risultato migliore possa essere ottenuto a seguito della rimozione da Abf1 e Fhl1 dei *tag* che sono stati sfruttati per la purificazione e che potrebbero interferire con il legame delle proteine al DNA.

4. DISCUSSIONE

Rap1 è il fattore generale di regolazione che dirige la modulazione della maggior parte dei geni codificanti per proteine ribosomiali in *Saccharomyces cerevisiae*: i promotori di questi geni presentano uno, o molto più frequentemente due, siti di legame per la proteina, che si associa a questi elementi di sequenza in maniera costitutiva e attraverso l'interazione con numerosi altri fattori e co-fattori contribuisce al controllo della trascrizione genica in risposta alle esigenze cellulari.

Questo scenario però, come precisato all'inizio, riguarda la maggior parte ma non tutti i geni per RP. Attraverso l'impiego di differenti approcci, il presente lavoro di tesi ha cercato di contribuire alla caratterizzazione della classe minoritaria di geni i cui promotori sono caratterizzati dalla presenza di un sito di legame per Abf1 (Planta, 1997; Lascaris *et al.*, 1999). L'analisi filogenetica di questi promotori ha messo in evidenza per quelli dei geni *RPL3*, *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A* e *RPS28B* un'architettura comune, che comprende, oltre al sito di legame per Abf1, posto mediamente 160 bp a monte del sito di inizio della trascrizione, altri due elementi evolutivamente conservati. Uno corrisponde ad un tratto di sequenza omopolimerica composta da dieci o più T consecutive, frequentemente riscontrato nei promotori dei geni RP. Un'analisi condotta sui geni *RPS28B* e *RPP2B* aveva evidenziato il contributo fornito da questo elemento all'attivazione trascrizionale (Gonçalves *et al.*, 1995). Sequenze di questo tipo sono caratterizzate da una particolare rigidità che, sfavorendo l'avvolgimento attorno al core istonico, contribuisce al posizionamento dei nucleosomi (Segal and Widom, 2009), promuovendo la definizione di una *nucleosome free region* che assicura l'accessibilità dei siti di legame per i fattori trascrizionali (Field *et al.*, 2008).

L'altro elemento evolutivamente conservato presente in questi promotori è rappresentato da una sequenza corrispondente al consenso "SACGCAM" (dove S rappresenta G o C e M può indicare A o C), posta in prossimità del sito di legame per Abf1. Secondo quanto riportato da differenti lavori (Badis *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2013; Knight *et al.*, 2014), questa sequenza rappresenta il consenso riconosciuto in maniera specifica da Fhl1, altro regolatore chiave della trascrizione dei geni per proteine ribosomiali, attraverso il proprio dominio di legame al DNA *forkhead-like*. I risultati degli esperimenti di EMSA condotti nell'ambito del presente studio confermano la capacità del dominio FH di Fhl1 di legare in maniera sequenza-specifica questo elemento a livello del promotore dei geni di interesse. Risultati analoghi sono emersi da un set di esperimenti preliminari

condotti utilizzando l'intera proteina Fhl1, espressa e purificata per la prima volta in questo lavoro sperimentale allo scopo di contribuire alla comprensione della sua capacità di legare il DNA anche mediante approcci *in vitro*.

I sei promotori considerati sembrano caratterizzati da un livello di attività nettamente diverso, come evidenziato da uno studio condotto valutando l'espressione di un gene reporter posto sotto il controllo dei promotori dei geni RP (Zeevi *et al.*, 2011): per fare solo due esempi, secondo quanto emerso da questa analisi il promotore di *RPL4B* occuperebbe una delle ultime posizioni, mentre quello di *RPL3* sarebbe in testa nella classifica definita in base all'attività misurata per ciascun promotore. Piuttosto eterogenee sotto diversi punti di vista sono anche le proteine per cui questi geni codificano. Alcune fanno parte della subunità maggiore, altre della subunità minore e infine una appartiene alla regione stalk del ribosoma. Inoltre, si tratta in certi casi di proteine appartenenti al *core* del ribosoma comune a procarioti ed eucarioti, in altri di proteine che pur essendo universali, presentano regioni aggiuntive caratteristiche degli eucarioti, in altri ancora, di proteine che mancano di una controparte batterica.

Non è semplice quindi intuire quali possano essere le ragioni per cui questi geni siano accomunati dalla stessa architettura del promotore.

In proposito, potrebbe essere utile considerare il fatto che la regolazione dei geni codificanti per le proteine ribosomiali ha subito una profonda riorganizzazione nel corso della storia evolutiva dei funghi. Analisi sistematiche delle sequenze dei promotori di questi geni appartenenti a 17 differenti specie fungine hanno messo in evidenza che la comparsa dei siti di legame per Rap1 nei promotori delle specie appartenenti al genere *Saccharomyces* e ad altri generi affini si è accompagnata alla perdita di un altro elemento *cis*-regolativo caratteristico di questi geni, ancora oggi presente in specie filogeneticamente più distanti, come *C. albicans* o *S. pombe*. L'individuazione di alcune specie nelle quali sono presenti entrambe le sequenze regolative ha suggerito che questo *switch* si sia verificato grazie ad un passaggio attraverso un programma di regolazione intermedio, basato sulla presenza ridondante di entrambe le strategie (Tanay *et al.*, 2005). Studi successivi hanno dimostrato come a questa sostituzione degli elementi *cis*-regolativi si sia ovviamente accompagnato un cambiamento dei corrispondenti fattori agenti *in trans*: in *C. albicans* e in altri emiascomiceti infatti il principale regolatore dei geni per le proteine ribosomiali è Tbf1. Esso è dotato, come Rap1, di un dominio di legame al DNA di tipo Myb-like e, come Rap1,

risulta necessario per l'attivazione dei geni RP (Hogues *et al.*, 2008), che prevede il suo intervento nel reclutamento dei fattori omologhi alle proteine Fhl1 e Ifh1 di *S. cerevisiae* (Mallick and Whiteway, 2013).

Sebbene si tratti di sole speculazioni, è possibile ipotizzare che nel corso del processo di *rewiring* che ha segnato il passaggio dalla strategia di regolazione "Tbf1-dipendente" a quella "Rap1-dipendente", le sostituzioni di basi verificatesi a livello dei promotori dei geni considerati nel presente studio abbiano originato una sequenza più simile al sito di legame per Abf1 che a quello di Rap1 e che quindi questi geni siano rimasti sotto il controllo di Abf1, senza che ciò comportasse nella loro regolazione significative differenze rispetto a quella assicurata da Rap1 a livello di tutti gli altri geni. Esistono infatti prove a favore della forte interscambiabilità dei siti di legame per i due GRF (Yarragudi *et al.*, 2004) ed è noto inoltre che Abf1 e Rap1 sono in grado di adempiere funzioni comuni (Mencía *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2000; Ganapathi *et al.*, 2011), in virtù della notevole somiglianza dei loro domini di attivazione (Gonçalves *et al.*, 1996).

Ancora più intrigante è la possibilità che per questi geni, più che per tutti gli altri codificanti per RP, esista l'esigenza di una stretta co-regolazione con il gruppo piuttosto numeroso di membri del *ribi regulon* il cui promotore contiene un sito di legame per Abf1 (Bosio, 2012). Questa necessità potrebbe essere legata a qualche funzione extra-ribosomiale svolta dalle proteine per cui codificano i geni RP che presentano un sito di legame per Abf1. Per alcune di queste proteine, come descritto in precedenza, funzioni non strutturali sono già state individuate ed in parte caratterizzate. Alcune considerazioni suggeriscono poi che le attività extra-ribosomiali svolte dalle r-proteine possano essere in realtà molto più numerose di quanto evidenziato finora (Warner and McIntosh, 2009).

L'effettiva associazione di Abf1 e Fhl1 ai corrispondenti siti individuati nei promotori caratterizzati *in silico* è stata valutata attraverso saggi di immunoprecipitazione cromatinica seguita da PCR quantitativa. Queste analisi hanno permesso di confermare il legame di Abf1 con i promotori dei geni *RPL3*, *RPP1A*, *RPS28A* e *RPS28B*, anche se con bassi livelli di arricchimento, hanno evidenziato una più marcata associazione con il promotore del gene *RPS22B*, ma non hanno fornito alcuna conferma della presenza del regolatore a monte di *RPL4B*. L'associazione di Abf1 al proprio sito di legame a livello di questo promotore era stata dimostrata in precedenza, ma attraverso un approccio *in vitro* (Della Seta *et al.*, 1990). Il legame di Fhl1 invece è stato confermato solo a livello dei promotori di *RPS22B* e, in

maniera meno convincente, di *RPL3*. Un così modesto livello di associazione di Fhl1 a questo gene era già stato riscontrato in precedenza, con un analogo approccio di ChIP-qPCR (Rudra *et al.*, 2005). Nel commentare questa osservazione, tenendo conto del maggiore grado di associazione misurato su altri geni appartenenti al gruppo di quelli regolati da Rap1, gli autori si chiedevano se il basso livello di arricchimento riscontrato non solo per Fhl1 ma anche per Ifh1, potesse dipendere da una particolare modalità di associazione delle proteine a questi promotori, che potesse rendere poco efficiente il processo di immunoprecipitazione. Quest'ipotesi potrebbe essere estesa anche agli altri geni considerati nel presente studio, e potrebbe riguardare non solo Fhl1 ma anche Abf1. Le ragioni di una simile situazione andrebbero ricercate o in una caratteristica propria di questi loci cromatinici, che potrebbe renderli poco suscettibili all'immunoprecipitazione, o in una interazione debole o transiente delle proteine con questi promotori. A tal proposito, esperimenti condotti su altri geni regolati da Abf1 hanno suggerito che, contrariamente a quanto osservato per Rap1, il mantenimento di elevati livelli di trascrizione non sembra richiedere un'associazione continua di Abf1 ai promotori (Yarragudi *et al.*, 2004).

L'arricchimento più marcato osservato sia per Abf1 che per Fhl1 a livello del promotore di *RPS22B* potrebbe essere influenzato dalla presenza di un altro elemento regolativo: l'analisi filogenetica ha evidenziato infatti che a monte del sito di legame per Abf1 si trova un blocco di sequenza conservato, corrispondente al consenso riconosciuto da Tbf1. L'effettiva associazione della proteina a questo promotore trova conferma in una precedente analisi di ChIP-seq (Preti *et al.*, 2010). È possibile che la presenza di questo ulteriore elemento possa modificare la modalità secondo la quale Abf1 e Fhl1 interagiscono con il promotore, giustificando le differenze osservate tra questo caso e quello di tutti gli altri geni considerati.

La conservazione della sequenza dei siti di legame per Abf1 e Fhl1 su tutti i promotori considerati e l'assenza di altri elementi cis-regolativi nei promotori dei geni per cui non è stato possibile trovare conferma dell'effettiva associazione di Abf1 e Fhl1 mediante ChIP-qPCR, sono comunque a favore dell'ipotesi che i due regolatori siano effettivamente presenti anche a livello di questi geni.

Per iniziare a fare luce sugli aspetti regolativi dei geni considerati in questo studio, sono stati analizzati mutanti del promotore dei quattro geni non essenziali *RPL4B*, *RPP1A*, *RPS22B* e *RPS28B*: tale approccio ha permesso di ottenere alcune indicazioni in merito al

ruolo svolto da Abf1, Fhl1 e i rispettivi siti di legame nella trascrizione di questi geni in condizioni di crescita ottimali. L'analisi dei mutanti del sito di legame per Abf1 ha evidenziato che la distruzione di questo elemento *cis*-regolativo comporta una riduzione dell'espressione dei geni *RPL4B*, *RPS28B* e *RPP1A*, più marcata nel caso di quest'ultimo. Effetti simili erano già stati dimostrati con approcci differenti come conseguenza della mutazione del sito di legame di Abf1 a monte di *RPS28A* (Yarragudi *et al.*, 2007) e dello stesso *RPL4B* (Della Seta *et al.*, 1990). I risultati ottenuti suggeriscono che Abf1 sia necessario per la piena attivazione trascrizionale di questi geni richiesta quando le condizioni di crescita sono favorevoli ad una intensa attività di sintesi proteica. Lo stesso tipo di considerazione è stato suggerito anche dai risultati ottenuti da un analogo esperimento condotto su alcuni dei geni *ribi* che presentano un sito di legame per Abf1 nel loro promotore (Bosio, 2012). A livello di questi geni la presenza del sito di legame di Abf1 e del regolatore stesso sembrano essere importanti anche nella modulazione della repressione trascrizionale in risposta a condizioni di crescita sfavorevoli, quali la carenza di fonti di carbonio (Bosio *et al.*, 2015 manoscritto in preparazione). Sarebbe interessante valutare se anche nel caso dei geni RP esista un simile coinvolgimento di Abf1 nel controllo della trascrizione in risposta a situazioni di stress.

La mutazione del sito di legame per Fhl1 ha prodotto una modesta riduzione del livello di espressione dei geni *RPL4B* e *RPP1A*. Sempre nell'ipotesi che Fhl1 sia effettivamente presente a livello di questi promotori, un simile risultato potrebbe suggerire che il ruolo svolto da Fhl1 nell'attivazione trascrizionale di questi geni sia meno determinante di quello svolto da Abf1. A tal proposito, è stata di recente ribadita l'esistenza di una interazione diretta tra Rap1 e Lfh1, che sembrerebbe contribuire al reclutamento dell'attivatore (Mallick and Whiteway, 2013). È possibile che, in maniera analoga, anche Abf1 partecipi al reclutamento di Lfh1 e che il suo intervento possa risultare più incisivo di quello di Fhl1. Forse più valida è un'altra ipotesi suggerita dalla debole riduzione del livello di espressione indotta dalla mutazione del sito di legame per Fhl1: tale mutazione potrebbe non comportare una completa perdita dell'associazione della proteina al promotore stesso. È più che plausibile l'idea che il legame diretto al DNA non sia l'unica via che permette il reclutamento di Fhl1 a monte di questi geni. In accordo con questa considerazione, è stato recentemente dimostrato che la delezione del dominio FH di Fhl1 riduce fortemente ma non abolisce il legame della proteina con i promotori dei geni regolati da Rap1 che

presentano un sito di legame per Fhl1 (Knight *et al.*, 2014). Analogamente a quanto dimostrato per Rap1, quindi, anche Abf1 potrebbe contribuire all'associazione di Fhl1 con i promotori dei geni per proteine ribosomiali. In tal senso, potrebbero rivelarsi utili saggi di interazione tra i due regolatori basati su strategie *in vivo* o *in vitro*, sfruttando, in quest'ultimo caso, le proteine ricombinanti prodotte nell'ambito del presente lavoro. L'impiego di Fhl1 e delle sue varianti tronche potrebbe eventualmente fornire anche qualche indicazione sulla regione della proteina richiesta per l'interazione con Abf1.

La mutazione del sito di legame per Fhl1 non ha prodotto invece alcun effetto sull'espressione del gene *RPS28B*: ciò potrebbe dipendere dalla mancata partecipazione di Fhl1 alla regolazione di questo gene oppure al fatto che il suo reclutamento su questo promotore non dipende da un legame diretto con il DNA. A questo proposito, è utile ricordare che, contrariamente a quanto osservato nel caso dei promotori di *RPL4B* e *RPP1A*, a monte di *RPS28B* il sito di legame per Fhl1 occupa una posizione immediatamente adiacente al sito di legame per Abf1: è possibile che l'associazione del GRF con il DNA rappresenti un impedimento sterico al legame di Fhl1 sul proprio sito. Ciò potrebbe suggerire che in una fase non troppo remota dell'evoluzione, data la conservazione che ancora contraddistingue il sito di legame per Fhl1, il reclutamento della proteina su questo promotore sia diventato progressivamente indipendente da un legame diretto con il DNA e che attualmente l'associazione sia interamente assicurata dall'interazione con lo stesso Abf1.

Lasciando che queste considerazioni suggeriscano una visione più ampia riguardo alla questione del legame diretto tra Fhl1 e i promotori dei geni per proteine ribosomiali, si potrebbe speculare che l'interazione diretta tra Fhl1 e il DNA possa aver svolto un ruolo importante nel corso del fenomeno di *rewiring* che ha sostituito Rap1 a Tbf1 nella regolazione di questi geni (Hogues *et al.*, 2008; Mallick and Whiteway, 2013). È possibile che un legame diretto tra Fhl1 e i promotori sia risultato cruciale nelle fasi di transizione, per assicurare il mantenimento della regolazione genica anche durante la conversione del controllo Tbf1-dipendente in controllo Rap1(o Abf1)-dipendente, su cui potrebbe addirittura aver esercitato un'azione positiva. È noto infatti che la sostituzione di elementi *cis*- e *trans*-regolativi avviene più facilmente e più rapidamente nel caso di promotori che presentino anche altri elementi di controllo che non vengono coinvolti nella riorganizzazione (Wray *et al.*, 2003). Una volta stabilitosi il nuovo quadro regolativo, il

legame diretto di Fhl1 al proprio sito su questi promotori potrebbe aver progressivamente perso importanza, sostituito da un'interazione con Rap1 o Abf1, portando quindi alla scomparsa del sito stesso da molti dei promotori a cui Fhl1 risulta associato.

Un'ultima considerazione relativa ai risultati fin qui discussi riguarda il livello di espressione residuo che si osserva in tutti i mutanti degli elementi *cis*-regolativi legati da Abf1 e Fhl1 che sono stati analizzati: questo livello è probabilmente dovuto, almeno in parte, alla presenza dei tratti poli(dT), che come già precisato prendono parte alla regolazione della trascrizione contribuendo all'accessibilità dei promotori. Evidenze dirette di questo contributo all'attivazione trascrizionale sono già state riportate anche nel caso specifico di geni per proteine ribosomiali, tra cui gli stessi *RPS28A* (Lascaris *et al.*, 2000) e *RPS28B* (Gonçalves *et al.*, 1995).

Merita sicuramente un discorso a parte il gene *RPS22B*, caratterizzato da un promotore e da una architettura insoliti che si riflettono negli effetti altrettanto particolari osservati in risposta alla mutazione degli elementi *cis*-regolativi che lo caratterizzano. Come specificato precedentemente, il promotore del gene *RPS22B* presenta, oltre ai siti di legame per Abf1 e Fhl1, un sito di legame per Tbf1. La regione trascritta è caratterizzata dalla presenza di due sequenze introniche, una localizzata nella 5'UTR, l'altra situata tra le due regioni esoniche codificanti per la proteina ribosomiale. Questo secondo introne ospita la sequenza codificante per lo snoRNA snR44.

Un primo aspetto interessante su cui soffermarsi riguarda il possibile significato funzionale della presenza di un sito di legame per Tbf1 a monte di questo gene. Da un lato, la presenza di questo elemento potrebbe rappresentare un residuo evolutivo della precedente strategia di regolazione dei geni RP (Lavoie *et al.*, 2010), come proposto anche da Knight e collaboratori nel commentare la presenza della sequenza riconosciuta da Tbf1 monte di *RPS22B* e di *RPL41A* (Knight *et al.*, 2014). Altrettanto suggestiva è l'ipotesi che la presenza di questa sequenza possa essere connessa alla regolazione del gene *SNR44* situato nell'introne di *RPS22B*: è stato infatti dimostrato che Tbf1 svolge un ruolo fondamentale nella regolazione trascrizionale di numerosi geni codificanti per snoRNA e che molti dei promotori di questi geni organizzati come unità trascrizionali indipendenti sono caratterizzati dalla presenza di siti di legame per questo GRF (Preti *et al.*, 2010). Quello di *RPS22B* non è l'unico caso di gene codificante per una proteina ribosomiale che ospita la sequenza di un gene per snoRNA: esiste un'altra situazione analoga, rappresentata dalla

coppia *RPL7A-SNR39*, a monte della quale tuttavia non sembra essere presente un sito di legame per Tbf1.

Decisamente inaspettato è l'effetto che si osserva a seguito della mutazione di uno qualsiasi dei siti di legame per Abf1, Fhl1 o Tbf1: in nessuno di questi casi l'espressione di *RPS22B* sembra subire alcuna riduzione significativa. Solo distruggendo contemporaneamente tutti e tre gli elementi *cis*-regolativi si produce un effetto sul livello intracellulare dell'mRNA codificante per la proteina ribosomiale, che risulta dimezzato. Questo suggerisce che, almeno nelle condizioni testate, i vari elementi regolativi considerati svolgano ruoli ridondanti rispetto all'attivazione trascrizionale di *RPS22B*. Forse la presenza di più elementi regolativi è legata a specifiche funzioni che ciascuno di essi svolge in condizioni di crescita diverse da quelle ottimali in cui sono stati condotti questi esperimenti.

Tali risultati appaiono ancora più insoliti se confrontati con quelli ottenuti relativamente all'espressione di *SNR44* che, similmente a quella di *RPS28B*, si riduce in risposta alla mutazione del sito di legame per Abf1 (anche se in maniera più contenuta di quanto osservato per *RPS28B*) ma non a seguito della mutazione del sito di legame per Fhl1. Questo è in accordo con l'ipotesi formulata a proposito di *RPS28B*, il cui promotore presenta la stessa disposizione reciproca dei siti di legame per Abf1 e Fhl1 che si osserva anche a livello del promotore di *RPS22B*.

L'espressione di *SNR44* risente poi in maniera marcata della mutazione del sito di legame di Tbf1, che determina un dimezzamento della quantità di snoRNA presente nelle cellule. Questo risultato è in accordo con l'effetto di simili mutazioni del sito di legame per Tbf1 riscontrato in precedenza sulla trascrizione di geni per snoRNA indipendenti e dotati di un promotore proprio (Preti *et al.*, 2010). Drastico è infine il calo dell'espressione di *SNR44* che si osserva come conseguenza della mutazione combinata dei tre siti di legame per Tbf1, Abf1 e Fhl1: in questa situazione, il livello dello snoRNA si riduce a meno del 20% del livello misurato in condizioni normali, un effetto decisamente più forte di quello che le stesse mutazioni producono sul livello dell'mRNA di *RPS22B*.

Come anticipato nel capitolo "Risultati", considerati nell'insieme i dati ottenuti dall'analisi di espressione di *RPS22B* evidenziano l'elevato grado di complessità che caratterizza la regolazione di questo gene codificante per proteina ribosomiale e quella del gene codificante per snoRNA che esso ospita. La differente risposta che si riscontra nei livelli dei due RNA a seguito della mutazione degli stessi elementi del promotore potrebbe suggerire

che essi vengano trascritti da due distinti complessi trascrizionali della Pol II, reclutati dallo stesso promotore ma su siti di inizio della trascrizione differenti e diversamente influenzati dalle alterazioni delle sequenze *cis*-regolative. Quest'ipotesi, oltre a contrastare con l'opinione diffusa secondo la quale gli snoRNA intronici derivano dal processamento di un unico trascritto primario da cui si genera anche l'mRNA codificato dal gene ospite (Filipowicz and Pogačić, 2002; Dieci *et al.*, 2009-b), non sembra trovare conferma nei dati derivanti dall'analisi dell'associazione su scala genomica della Pol II e dei suoi fattori di trascrizione, che evidenziano la presenza di subunità appartenenti al PIC solo immediatamente a monte e non a livello di regioni interne del gene *RPS22B* (Mayer *et al.*, 2010).

Nell'ipotesi che quindi i due RNA derivino dallo stesso trascritto primario, gli effetti osservati potrebbero riflettere il fatto che meccanismi di controllo dell'espressione genica agenti a livello *post*-traduzionale ma influenzati dalla natura del promotore determinino destini e stabilità diverse per lo snoRNA e per l'mRNA. Effettivamente, sono sempre più numerosi gli esempi della stretta relazione che esiste tra le diverse fasi della vita di un mRNA, dalla trascrizione fino alla degradazione (Haimovich *et al.*, 2013-a): è stato dimostrato ad esempio che alcuni fattori che prendono parte al processo di *mRNA decay* si associano al messaggero già durante la sua trascrizione, probabilmente grazie ad un'interazione con la stessa RNA Polimerasi II (Goler-Baron *et al.*, 2008); recentemente la natura ciclica dell'espressione genica è stata confermata dall'evidenza che altri componenti del complesso coinvolto nella degradazione citoplasmatica dell'mRNA sono localizzati anche a livello del nucleo, dove si associano con la cromatina e contribuiscono alla stimolazione dell'inizio della trascrizione e della fase di allungamento (Haimovich *et al.*, 2013-b); in un altro studio è stato dimostrato che la presenza di due siti di legame per Rap1 posti a monte della sequenza codificante per un gene reporter sono sufficienti per aumentare la velocità di degradazione del messaggero corrispondente, e che questi stessi elementi *cis*-regolativi sembrano essere i principali responsabili della rapida degradazione osservata per l'mRNA di un gene RP analizzato nell'ambito di questo lavoro. È stato proposto che l'associazione di Rap1 ai propri promotori bersaglio possa influenzare non solo la trascrizione dell'mRNA, ma anche la composizione della particella ribonucleoproteica di cui esso fa parte al momento dell'esportazione, così esercitare un effetto anche sul suo successivo destino citoplasmatico e influenzare la sua emivita (Bregman *et al.*, 2011).

È possibile che effetti dovuti a meccanismi di questo tipo possano contribuire ad aumentare la stabilità dell'mRNA derivante da *RPS22B*, estendendone l'emivita in modo da compensare la riduzione del livello di trascrizione dettata dalla mutazione del promotore e comportando quindi una variazione ridotta dell'abbondanza intracellulare dell'mRNA stesso.

Va infine precisato, che nel caso di *RPS22B*, almeno altri due elementi potrebbero avere qualche effetto sull'espressione genica e contribuire in qualche modo alla giustificazione dei risultati osservati a seguito della mutazione del promotore: la presenza degli introni, il cui processo di splicing influisce in modo significativo sul livello di mRNA maturo presente nella cellula (Danin-Kreiselman *et al.*, 2003; Ma and Xia, 2011), e l'esistenza di un CUT (*Cryptic Unstable Transcript*), mappato all'interno della regione corrispondente all'introne della 5'UTR (Neil *et al.*, 2009).

In conclusione, il presente lavoro di tesi costituisce il primo tentativo di caratterizzazione sistematica degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi dei geni codificanti per proteine ribosomiali Abf1-dipendenti in *Saccharomyces cerevisiae*. Le analisi condotte hanno permesso di delineare l'architettura caratteristica dei promotori di questi geni e hanno iniziato a fare luce sui meccanismi di regolazione della loro attivazione trascrizionale. Ulteriori indagini sono sicuramente richieste per andare più a fondo nella comprensione di tali sistemi regolativi, anche in risposta a condizioni di crescita diverse da quelle ottimali, così da mettere in evidenza somiglianze e differenze tra questi e gli altri geni codificanti per proteine ribosomiali, controllati da Rap1. Le osservazioni fatte hanno inoltre sottolineato la natura decisamente particolare del gene *RPS22B* e della sua regolazione. Questa unità trascrizionale costituisce sicuramente un significativo esempio del grado di complessità che l'espressione genica può raggiungere e dei numerosi fattori da cui può essere influenzata. I risultati ottenuti nel presente lavoro rappresentano un punto di partenza verso una più completa comprensione dei circuiti regolativi che la caratterizzano.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Ceppi di lievito

Per le analisi di immunoprecipitazione cromatinica sono stati utilizzati i seguenti ceppi di lievito, di cui vengono specificate le caratteristiche genotipiche:

Ceppo	Genotipo	Riferimento
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystem
Abf1-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystem
Fhl1-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FHL1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystem
Fhl1-13myc	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FHL1-13MYC-KANMX6</i>	Questo studio

Per le analisi dei livelli di espressione sono stati impiegati i ceppi riportati di seguito assieme al corrispondente genotipo:

Ceppo	Genotipo	Riferimento
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystem
Abf1-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystem
Tbf1-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystem
Fhl1-13myc	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FHL1-13MYC-KANMX6</i>	Questo studio
ΔRPL4B	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPL4B::URA3</i>	Questo studio
RPL4B Amut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPL4B Abf1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPL4B Fmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPL4B Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPL4B AFmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPL4B Abf1 bs mut Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
ΔRPP1A	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPP1A::URA3</i>	Questo studio
RPP1A Amut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPP1A Abf1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPP1A Fmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPP1A Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPP1A AFmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPP1A Abf1 bs mut Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
ΔRPS22B	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS22B::URA3</i>	Questo studio
RPS22B Amut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS22B Abf1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPS22B Fmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS22B Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPS22B Tmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS22B Tbf1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPS22B AFmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS22B Abf1 bs mut Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio

RPS22B TAFmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS22B Abf1 bs mut Fhl1 bs mut Tbf1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
ΔRPS28B	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS28B::URA3</i>	Questo studio
RPS28B Amut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS28B Abf1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPS28B Fmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS28B Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio
RPS28B AFmut	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 RPS28B Abf1 bs mut Fhl1 bs mut YEplac 181</i>	Questo studio

5.2. Analisi *in silico* dei promotori dei geni RP

Per eseguire l'analisi filogenetica dei promotori dei geni caratterizzati dalla presenza di un sito di legame per Abf1 (Lascaris *et al.*, 1999) le sequenze codificanti dei geni di interesse sono state recuperate dalla banca dati SGD (*Saccharomyces* GENOME DATABASE: <http://www.yeastgenome.org/>) e sono state utilizzate per eseguire mediante il programma BLASTN (<http://seq.yeastgenome.org/cgi---bin/blast---fungal.pl>) la ricerca di omologia che ha permesso di individuare le corrispondenti sequenze ortologhe nei genomi dei tre saccaromiceti *S. paradoxus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii*. Per ciascun set di ortologi, le regioni corrispondenti alle 1000 bp immediatamente a monte della sequenza codificante sono state allineate utilizzando il programma CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Sugli allineamenti ottenuti, visualizzati con il programma GeneDoc, sono stati identificati i blocchi di sequenze conservati, la cui posizione è stata espressa rispetto al sito di inizio della trascrizione, per la cui coordinata è stato fatto riferimento all'estremità 5' del trascritto più abbondante tra quelli recentemente mappati mediante la tecnica di TIF-seq (Pelechano *et al.*, 2013).

5.3. Costruzione del ceppo Fhl1-13myc

La cassetta per il *tagging* di Fhl1 è stata ottenuta mediante una reazione di PCR condotta con l'enzima ad alta fedeltà Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific) sul vettore pFA6a-13Myc-kanMX6 (Longtine *et al.*, 1999) e con i primers Fhl1_F2

(GGGTATCACTGAAGTAAATGTATCCCTTGAGGAAAACTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA) e Fhl1_R2 (AAGATTTATGCTTCTACTTCGAATATGCTAATACTATTATGAATTCGAGCTCGTTAAAC).

Il prodotto di questa reazione di amplificazione è stato separato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% e successivamente estratto dalla corrispondente banda di agarosio grazie all'impiego di un apposito kit commerciale per la purificazione del DNA da gel (Fisher Molecular Biology).

Circa 1 g del costrutto così ottenuto è stato utilizzato eseguire la trasformazione chimica di cellule appartenenti al ceppo BY4741 secondo il seguente protocollo: le cellule sono state inoculate in 10 ml di YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucosio) e lasciate crescere a 30°C a partire da un valore di OD₆₀₀ pari a 0,16 fino a raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ compreso tra 0,6 e 0,8. Le cellule sono state quindi raccolte per centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti a 4°C e lavate prima con 20 ml di H₂O sterile, quindi con 1 ml di litio acetato 100 mM, e infine risospese in 80 µl di litio acetato. È stata prelevata un'aliquota di 50 µl di cellule, raccolte per centrifugazione alla massima velocità per 20 secondi a cui, a seguito della rimozione del surnatante, è stata aggiunto il mix di trasformazione avente un volume finale di 360 µl e contenente, oltre ad 1 µg della cassetta di *tagging* e ad 10 µg di *salmon sperm* DNA (precedentemente denaturato per bollitura a 99°C per 5'), 240 µl di PEG 3500 al 50% e 36 µl di litio acetato 1M. Le cellule sono state risospese nel mix di trasformazione ed incubate a 42°C per 40 minuti, quindi recuperate per centrifugazione e risospese in H₂O sterile per essere successivamente piastrate su terreno selettivo (YPD + G418 a concentrazione finale di 200 µg/ml). Le cellule cresciute sono state nuovamente selezionate su YPD addizionato con G418 in modo da ridurre il numero di falsi positivi. Alcuni dei cloni ottenuti dal doppio passaggio di selezione sono stati dapprima analizzati attraverso *colony* PCR, quindi sottoposti ad estrazione del DNA genomico. Quest'ultimo è stato utilizzato come template per la preparazione mediante PCR di un amplicone da sottoporre a sequenziamento (Macrogen) per verificare la correttezza della sequenza della cassetta di *tagging* e del suo posizionamento a valle del gene *FHL1*.

5.4. Immunoprecipitazione cromatinica e PCR quantitativa

5.4.1. Immunoprecipitazione cromatinica

Per il saggio di immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) sui ceppi Abf1-TAP e Fhl1-TAP della collezione "Yeast TAP-Fusion" Thermo Scientific Open Biosystems (Ghaemmaghami *et al.*, 2003) e sul ceppo di controllo BY4741 si è proceduto secondo il seguente protocollo: le cellule appartenenti a ciascun ceppo sono state inoculate in 200 ml di YPD in modo da avere un valore di OD_{600} pari a 0,16. Le colture sono state incubate a 30°C fino al raggiungimento di un valore di $OD_{600} = 0,64$, quindi sono state trattate con formaldeide a concentrazione finale di 1%, per 20 minuti a temperatura ambiente, mantenendole in leggera agitazione. La reazione di cross-linking è stata in seguito bloccata aggiungendo glicina a concentrazione finale di 240mM e incubando con leggera agitazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state a questo punto raccolte mediante centrifugazione a 3000 rpm per 4 minuti a 4°C e lavate per due volte con 7,5 ml di TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) e una volta con 7,5 ml di FA-lysis buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% sodio deossicolato, 0,1% SDS, 1 mM PMSF). Dopo i lavaggi, le cellule sono state risospese in 1,2 ml di Fa-lysis buffer contenente 0.5% SDS e addizionate di un ugual volume di biglie di vetro con diametro 0,5 mm, che hanno permesso la successiva lisi meccanica. La cromatina presente nel lisato cellulare è stata raccolta per centrifugazione a 2000 g per 20 minuti a 4°C, lavata per due volte con 750 μ l di FA-lysis buffer per 30 minuti a 4°C, quindi frammentata mediante sonicazione fino ad ottenimento di una popolazione omogenea di frammenti di circa 200-500 bp. Al termine della sonicazione, i campioni sono stati portati a volume di 2,8 ml con FA-lysis buffer e centrifugati a 2000 g per 20 minuti a 4°C. Un'aliquota di 800 μ l del surnatante così ottenuto è stata incubata in leggera agitazione a 4°C *over night* dopo l'aggiunta di 20 μ l di resina IgG Sepharose (GE Healthcare), precedentemente lavata con TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA). Al termine dell'incubazione, sono stati eseguiti passaggi di lavaggio con 1 ml di FA-lysis buffer 275 mM NaCl, 1 ml di FA-lysis buffer 500 mM NaCl, 1 ml di wash buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,5% sodio deossicolato) e 1 ml di TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA). La cromatina è stata quindi eluita in 400 μ l di buffer di eluizione (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 1% SDS) mediante incubazione a 65°C per 10'. La cromatina immunoprecipitata (IP) e 400 μ l di quella non sottoposta a immunoprecipitazione (INPUT)

sono state trattate con 0.8 mg/ml di Pronasi, incubando per 1 ora a 42°C e successivamente per 5 ore a 65°C. Il DNA contenuto nei campioni è stato purificato mediante estrazione con fenolo:cloroformio e successiva precipitazione con etanolo e sodio acetato, quindi risospeso in 110 µl di H₂O.

Per il saggio di immunoprecipitazione cromatinica condotto sui ceppi Fhl1-13myc e BY4741 è stato seguito lo stesso protocollo, ma in questo caso per ottenere l'immunoprecipitazione la cromatina è stata incubata per 2 ore e 30 minuti a 4°C in leggera agitazione con 6 µl di anticorpi monoclonali murini 9E10 (Sigma Aldrich), quindi addizionata e incubata *over night* a 4°C in leggera agitazione con 30 µl di Dynabeads® M-280 Sheep-Anti Mouse IgG, precedentemente lavate con buffer PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 8,1 mM KH₂PO₄).

5.4.2. PCR quantitativa

Per la valutazione dell'associazione delle proteine Abf1 e Fhl1 a livello dei promotori di interesse, i campioni di DNA INPUT e IP ottenuti come sopra descritto sono stati utilizzati come template in reazioni di PCR quantitativa condotte con lo strumento ABI 7300 (Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System). Le coppie di primers da utilizzare per queste reazioni sono state disegnate con l'aiuto dei software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) e Primer Express (Applied Biosystems) e progettati in modo da produrre ampliconi di dimensioni comprese tra 100 e 125 bp. Le reazioni di qPCR sono state allestite in triplicato, ciascuna in un volume finale di 20 µl comprendente 2 µl di DNA IP o 2 µl di una diluzione 1:100 del DNA INPUT, 10 µl di 2X SYBR® Green PCR Master Mix e un volume variabile della coppia di primers specifici per ciascun gene di interesse e corrispondente ad una concentrazione finale dei primers stessi valutata come ottimale sulla base di precedenti prove di efficienza. Per ciascuna coppia di primers, la concentrazione utilizzata negli esperimenti finali assicurava un'efficienza di amplificazione approssimabile al 100%, soddisfacendo i requisiti necessari per la successiva determinazione del *fold enrichment* secondo il metodo di Livak (Livak and Schmittgen, 2001). Di seguito sono riportate le coppie di primers utilizzate e le relative concentrazioni.

Target	Nome primers	Sequenza	Concentrazione
RPL3	RPL3_fw_ChIP	GGCCGGACAGTAATATAGTAATCG	70 nM
	RPL3_rev_ChIP	TTTTCATGGACGATGATCACTG	70 nM
RPL4B	RPL4B_fw_ChIP	GAAGGCATGAATTGTCTATTCCG	70 nM
	RPL4B_rev_ChIP	CATGAAAACCTTTCCAGAGTACTTGA	70 nM
RPP1A	RPP1A_fw_ChIP	CCCTGTAGCCTCATCTATGTCTG	70 nM
	RPP1A_rev_ChIP	TTCAAATACCATGTAAGGCATTC	210 nM
RPS22B	RPS22B_fw_ChIP	GTTTCGAGTAATCCTAGAACCC	75 nM
	RPS22B_rev_ChIP	TCCAGCGTAGAAAACCTTTTAAAGAG	75 nM
RPS28A	RPS28A_fw_ChIP	TCCCAATCTTTATACCCTGCGA	210 nM
	RPS28A_rev_ChIP	TCCAAGTAGTTCAACGACCAAGA	70 nM
RPS28B	RPS28B_fw_ChIP	GCTAGTACTCTGGCAATCGACAC	73 nM
	RPS28B_rev_ChIP	GGAGCAAAAAGATCCAAGTTTC	73 nM
FLR1	FLR1_ChIP_fw	GGAGCAATAACAGTGCAGAAA	68 nM
	FLR1_ChIP_rev	TTATCCCGCCATTAGTCAG	68 nM
LTV1	LTV1_ChIP_fw	GCTTCTGCGTCTATTTCTGC	73 nM
	LTV1_ChIP_rev	TCAGTCGCGTTATACGGATTAG	73 nM
RPL28	RPL28_ChIP_fw	ATTTTTCTATTTTCTCTGGCG	200 nM
	RPL28_ChIP_rev	GATGAAAGGTTTGAACCTATCTGGG	200 nM
HHT2	HHT2_RT_fw	TCAATCTTCTGCTATCGGTGCTT	73 nM
	HHT2_RT_rev	GCGTGAATAGCAGCCAGATTAGT	73 nM

Come anticipato, la *fold enrichment* è stato calcolato in accordo con il metodo proposto da Livak e Schmittgen. In breve, sono stati dapprima calcolati i valori di C_T medio e deviazione standard per le tre repliche di ciascuna reazione di amplificazione condotta. Tenendo conto dell'opportuno fattore di diluizione del campione INPUT, è quindi stata calcolata la differenza (ΔC_T) tra il valore di C_T medio misurato nel campione IP e il valore di C_T medio misurato nel campione INPUT, sia per il gene *HHT2*, scelto come standard, che per ognuno dei geni di interesse. A questo punto, per valutare l'arricchimento di ogni gene target rispetto al gene standard, è stata calcolata la differenza ($\Delta \Delta C_T$) tra i corrispondenti valori di ΔC_T . Infine, per ottenere il valore di *fold enrichment* si è proceduto alla conversione lineare del suddetto $\Delta \Delta C_T$ ($2^{-\Delta \Delta C_T}$).

5.5. Costruzione e analisi di espressione dei mutanti genomici

Come descritto al paragrafo 3.3.1 del capitolo “Risultati” la strategia scelta per realizzare i mutanti genomici su cui è stata eseguita l’analisi di espressione ha previsto una prima fase di *gene disruption*, che ha permesso di ottenere i ceppi deleti, e un successivo step di *gene replacement* grazie al quale sono stati costruiti per ogni gene i diversi mutanti del promotore.

5.5.1. Gene disruption

La costruzione delle cassette mutageniche utilizzate per eseguire la delezione del promotore e di parte della sequenza codificante dei geni *RPL4*, *RPP1A*, *RPS22B*, *RPS28A*, *RPS28B* è stata realizzata mediante due passaggi di PCR. Il primo è stato condotto sul vettore pUG72, da cui è stato amplificato il gene scelto come marcatore di selezione, *URA3* di *K. lactis*, utilizzando una coppia di primers “1” progettata in modo da aggiungere a ciascuna delle estremità del gene *URA3* circa 25-30 bp corrispondenti alle estremità 5’ e 3’ della regione genomica da eliminare sfruttando il processo di ricombinazione omologa. Il prodotto di amplificazione ottenuto da questa PCR eseguita con l’enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) è stato separato mediante elettroforesi su gel di agarosio all’1% e successivamente estratto dalla corrispondente banda di agarosio grazie all’impiego di un apposito kit commerciale per la purificazione del DNA da gel (Fisher Molecular Biology).

Si è quindi proceduto al clonaggio di questa cassetta di delezione ancora incompleta nel vettore pGEM® T-easy (Promega). Il plasmide ricombinante realizzato con questo passaggio di clonaggio è stato utilizzato come template per la seconda reazione di PCR, eseguita con una coppia di primers “2” che hanno consentito di aggiungere altre 25-30 bp alle estremità 5’ e 3’ della cassetta di delezione, in modo da estendere la porzione omologa alla regione genomica da eliminare e da rendere quindi più efficiente il processo di ricombinazione. Come nel caso precedente, il prodotto di amplificazione ottenuto dalla reazione condotta con l’enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) è stato separato mediante elettroforesi su gel di agarosio all’1% e successivamente estratto dalla corrispondente banda di agarosio grazie all’impiego di un apposito kit commerciale per la purificazione del DNA da gel (Fisher Molecular Biology). La cassetta di delezione completa è stata quindi clonata nel vettore pGEM® T-easy (Promega). Il plasmide ricombinante è stato utilizzato come template nelle

reazioni di PCR condotte con l'enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e con la coppia di primers "2" per ottenere la quantità di cassetta di delezione necessaria per la successiva trasformazione di lievito. La purificazione della cassetta è stata ottenuta mediante la stessa strategia di gel-elettroforesi e successiva estrazione da gel con kit commerciale già descritta per i due passaggi precedenti.

Di seguito, sono riportate le coppie di primers "1" e "2" utilizzate per la costruzione delle cassette di delezione.

Gene	Nome primer	Sequenza primer
<i>RPL4B</i>	RPL4B::URA3 fw1	GGTATTCATCTTACAGGAATTTTTGAGAGCTCGTTTTATTTAGG
	RPL4B::URA3 rev1	CAGCCTTTTCAGAAACAGCGTAAGCGATCCCAATACAACAGAT
	RPL4B::URA3 fw2	TAAGTCCTGCCTTATTTATCGTAACGGTATTCATCTTACAGGAATTTTTG
	RPL4B::URA3 rev2	CAGGATTCAGCGGAGGTTTGGTGACCAGCCTTTTCAGAAACAGCG
<i>RPP1A</i>	RPP1A::URA3 fw1	GAAGCCTTAACCTGTAGCCTCATCAGAGCTCGTTTTATTTAGG
	RPP1A::URA3 rev1	AAGCCTTAGCAAAAATATCAGCCAGATCCCAATACAACAGAT
	RPP1A::URA3 fw2	ATCTTGCTAATACTTCATTTAAAAGAAGCCTTAACCTGTAGCC
	RPP1A::URA3 rev2	AAGTCCTCAAGTTTTGGCCGTCAAAGCCTTAGCAAAAATATCA
<i>RPS22B</i>	RPS22B::Ura3_fw1	CGCAGTAATCCTAGAACCCTAACTTTTTCAGAGCTCGTTTTATTTAGG
	RPS22B::Ura3_rev1	CCGAACTTAAGAACATTTACATTCAATATGATCCCAATACAACAGAT
	RPS22B::Ura3_fw2	TCATTATCTTTATGCATTACGTTTCGCAGTAATCCTAG
	RPS22B::Ura3_rev2	CTCTTGTAACAATATCCAAGTTCAACCGAACTTAAGAAC
<i>RPS28A</i>	RPS28A::URA3 fw1	TATCAATCCCAATCTTTATACCCTGAGAGCTCGTTTTATTTAGG-
	RPS28A::URA3 rev1	TTACAGTTCAGATTCCATTAGAACCGATCCCAATACAACAGAT
	RPS28A::URA3 fw2	CAAGCATCAAATCCCTTTAAGCATATCAATCCCAATCTTTATAC
	RPS28A::URA3 rev2	CTTCCTAACGCAAACGACGAGCTTCACGTTTCAGATTCCATTA
<i>RPS28B</i>	RPS28B::URA3 fw1	GCTAGTACTCTGGCAATCGACACTTAGAGCTCGTTTTATTTAGG
	RPS28B::URA3 rev1	CTTCACGTTTCAGATTCCATCAAGACGATCCCAATACAACAGAT
	RPS28B::URA3 fw2	TCGAATCTTTTTTTCTCGCAGAGCTAGTACTCTGGCAATCG
	RPS28B::URA3 rev2	ATATACCTTTAACGCAAACGACGAGCTTCACGTTTCAGATTCCATC

La trasformazione del ceppo Abf1-TAP (e del ceppo Tbf1-TAP, in cui è stata eseguita solamente la delezione del gene *RPS22B*) con le cassette di delezione è stata effettuata con la stessa strategia chimica e secondo lo stesso protocollo già descritti al paragrafo 5.3. In questo caso, i cloni trasformanti sono stati selezionati mediante crescita su terreno

contenente 0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0,025 mg/ml metionina, 0,03mg/ml leucina. Alcuni dei cloni cresciuti sul terreno selettivo sono stati controllati dapprima mediante *colony*-PCR per verificare che la cassetta di delezione si fosse integrata al *locus* genomico corretto, e successivamente sottoposti ad estrazione del DNA genomico, che è stato utilizzato per eseguire una PCR analitica di conferma dell'avvenuta delezione.

5.5.2. Gene replacement

I costrutti necessari per la fase di *gene replacement* sono stati realizzati mediante PCR mutagenica secondo la strategia di *overlap extension* (Ho *et al.*, 1989); Tale procedura si articola in tre reazioni di PCR (fig. 5.1): le prime due, eseguite con i primers mutagenici contenenti le mutazioni da introdurre, permettono di amplificare la regione “*upstream*” e la regione “*downstream*” rispetto alla posizione da mutare. Si ottengono così due frammenti complementari rispetto alla regione che corrisponde alla sequenza dei primers, che vengono utilizzati come template nella terza reazione di PCR che permette la fusione e amplificazione della cassetta mutagenica completa, comprendente tutta la regione cromosomica rimossa nella fase di *gene disruption*, rispetto alla quale differisce solo per le specifiche mutazioni introdotte a livello degli elementi *cis*- regolativi del promotore.

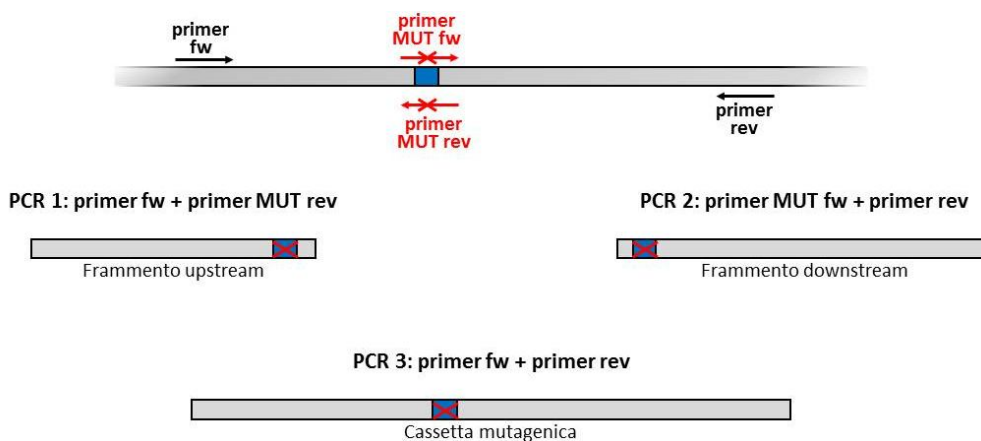


Fig. 5.1. Rappresentazione grafica della strategia di PCR “*overlap extension*” utilizzata per la costruzione delle cassette mutageniche.

Le reazioni di PCR per produrre i frammenti “*upstream*” e “*downstream*” dei costrutti mutanti “*Amut*” e “*Fmut*” (e “*Tmut*” nel caso del gene *RPS22B*) sono state condotte con

l'enzima ad alta fedeltà Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific) utilizzando il DNA genomico del ceppo S288C di *S. cerevisiae*. I prodotti delle due reazioni di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% e successivamente estratti dai corrispondenti frammenti di agarosio grazie all'impiego di un apposito kit commerciale per la purificazione del DNA da gel (Fisher Molecular Biology). I frammenti così ottenuti sono stati utilizzati in quantità equimolari come template nella PCR di fusione che ha permesso di ottenere le cassette mutageniche "Amut" e "Fmut" (ed anche "Tmut", nel caso del gene *RPS22B*). I prodotti delle reazioni di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% e successivamente estratti utilizzando un apposito kit commerciale per la purificazione del DNA da gel (Fisher Molecular Biology). Le cassette mutageniche sono state quindi clonate nel vettore pGEM® T-easy (Promega). I plasmidi ricombinanti contenenti il costrutto "Amut" (e "AFmut", nel caso del gene *RPS22B*) di ogni gene sono stati utilizzati come template per la costruzione delle cassette recanti le mutazioni sia nel sito di legame per Abf1, che nel sito di legame per Fhl1 (e in tutti e tre i siti di legame per Tbf1, Abf1 e Fhl1, nel caso del gene *RPS22B*). Una volta ottenute secondo la stessa strategia descritta in precedenza, anche le cassette mutageniche "AFmut" (e "TAFmut", per il gene *RPS22B*) sono state clonate nel vettore vettore pGEM® T-easy (Promega). I plasmidi ricombinanti contenti le differenti cassette mutageniche sono stati utilizzati come template nelle reazioni di PCR condotte con l'enzima ad alta fedeltà Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific) grazie alle quali è stata ottenuta per ciascuna cassetta mutagenica la quantità necessaria (circa 1 µg) per eseguire la successiva trasformazione dei ceppi deleti. Il DNA prodotto con queste reazioni di PCR è stato purificato mediante gel-elettroforesi e successiva estrazione con l'apposito kit commerciale (Fisher Molecular Biology). Di seguito, sono riportati i primers utilizzati per la costruzione e preparazione delle cassette mutageniche.

Gene	Nome primer	Sequenza primer
<i>RPL4B</i>	RPL4B fw	GCATAGTTCATTTCGACAGCTTGG
	RPL4B rev	GCAGTAGCAGCAATAGCAGAAGC
	RPL4B Abf1mut fw	TCCGTTAGAAATCGACTTATTTCTAAAGCATCGC
	RPL4B Abf1mut rev	GCGATGCTTTAGGAAATAAGTCGATTTCTAACGGA
	RPL4B Fhl1mut fw	AAAGCATCGCGCAGCCTCGATTTTTTAACATTTT
	RPL4B Fhl1mut rev	AATGTTAAAAAATCGAGGCTGCGCGATGCTTT

<i>RPP1A</i>	RPP1A fw	CGAATGCGACGTTTCCTGCC-
	RPP1A rev	GTCGTCATCGGATTCTTCTTAGC
	RPP1A Abf1mut fw	GTCTGCTACATCGCCTGAGGTCTAATATCGTAAG
	RPP1A Abf1mut rev	CTTACGATATTAGGACCTCAGGCGATGTAGCAGAC
	RPP1A Fhl1mut fw	ATCGTAAGATGATACCTCTCGACTTTGTAATGATT
	RPP1A Fhl1mut rev	AATCATTACAAAGTCGAGAGGTATCATCTTACGAT
<i>RPS22B</i>	RPS22B_fw	CAAGTATGATCCGTTATTCTTCTCG
	RPS22B_rev	TATTATCGGTTACAGTGGTCTTGAAAA
	RPS22B_Abf1mut fw	CTAAAATTACTATAAAAAATATCGGACGCAACT
	RPS22B_Abf1mut rev	AGTTGCGTCCGATATTTTTTAGTGAATTTTAG
	RPS22B_Fhl1mut fw	TCAAAAATGACGGCCTCGACTTTTCTCAGAAATT
	RPS22B_Fhl1mut rev	AATTTCTGAGAAAAGTCGAGGCCGTCATTTTTGA
	RPS22B Tbf1mut fw	GTAATCCTAGAAACAGATCTTTTTCTAAAATTAC
	RPS22B Tbf1mut rev	GTAATTTTAGAAAAAGATCTGTTTCTAGGATTAC
	RPS22B_Abf1mut Fhl1mut fw	TTCTAAAATTACTATAAAAAATATCGGCCTCGACT
	RPS22B_Abf1mut Fhl1mut rev	AGTCGAGGCCGATATTTTTTAGTGAATTTTAGAA
	RPS22B_fw	CAAGTATGATCCGTTATTCTTCTCG
	RPS22B_rev	TATTATCGGTTACAGTGGTCTTGAAAA
<i>RPS28B</i>	RPS28B fw	CAGAATGATACCAATGAGATGC
	RPS28B rev	TGTTTAGATGAGCTTACCAACG
	RPS28B Abf1mut fw	CGACACTTATTTAGGACAAAAGGCACACGCAACTT
	RPS28B Abf1mut rev	AAGTTGCGTGTGCCTTTTGTCTAAATAAGTGTCG-
	RPS28B Fhl1mut fw	TTTCGTACAAAATGATCTCTCGACTTTTGACAATT
	RPS28B Fhl1mut rev	AATTGTCAAAGTCGAGAGATCATTTGTACGAAA
	RPS28B Abf1mut Fhl1mut fw	TTTAGGACAAAAGGCACTCTCGACTTTTGACAATT
	RPS28B Abf1mut Fhl1mut rev	AATTGTCAAAGTCGAGAGTGCCTTTTGTCTAAA
	RPS28B_fw	CAGAATGATACCAATGAGATGC
	RPS28B_rev	TGTTTAGATGAGCTTACCAACG

La trasformazione dei ceppi $\Delta RPL4B$, $\Delta RPP1A$, $\Delta RPS22B$ e $\Delta RPS28B$ con le rispettive cassette mutageniche è stata eseguita secondo la stessa strategia descritta al paragrafo 5.3. In questo caso però al mix di trasformazione è stato aggiunto 1 μ g di vettore YEplac181, contenente il marcatore di selezione *LEU2*. Ciò assicura una strategia di selezione aggiuntiva che permette di ridurre il numero di falsi positivi. A seguito della trasformazione, i cloni trasformanti sono stati infatti selezionati dapprima su terreno contenente 0,67% yeast

nitrogen base, 2% glucosio, 0,025 mg/ml metionina e 0,02mg/ml uracile, e successivamente su un terreno avente la stessa composizione addizionato con 1mg/ml di 5-FOA (Acido 5-Fluoroorotico), che ha permesso la crescita selettiva delle sole cellule che avevano perso la cassetta di delezione e risultavano quindi prive del gene *URA3*. Alcuni dei cloni ottenuti dal doppio passaggio di selezione sono stati controllati mediante *colony*-PCR per confermare la sostituzione della cassetta di delezione con quella mutagenica, e successivamente sottoposti ad estrazione del DNA genomico. Quest'ultimo è stato usato come template per la reazione di PCR condotta per preparare gli ampliconi da sottoporre a sequenziamento (Macrogen) al fine di verificare la sequenza della cassetta mutagenica e la presenza delle mutazioni di interesse.

5.5.3. Analisi dei livelli di espressione nei mutanti genomici del promotore

L'analisi dei livelli di espressione è stata condotta sul ceppo *wild type* Abf1-TAP e sui mutanti *ΔRPL4B*, RPL4B Amut, RPL4B Fmut, RPL4B AFmut, *ΔRPP1A*, RPP1A Amut, RPP1A Fmut, RPP1A AFmut, *ΔRPS22B*, RPS22B Amut, RPS22B Fmut, RPS22B AFmut, e *ΔRPS28B*, RPS28B Amut, RPS28B Fmut, RPS28B AFmut. Nel caso del gene *RPS22B*, sono stati analizzati anche il ceppo *wild type* Tbf1-TAP e i mutanti RPS22B Tmut e RPS22B TAFmut.

Per ciascuno di questi ceppi, sono stati effettuati inoculi con un valore di OD₆₀₀ iniziale pari a 0,16 in 20 ml di YPD. Le colture cellulari sono state fatte crescere in incubazione a 30°C fino a raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ compreso tra 0,6 e 0,7. Le cellule sono state quindi raccolte mediante centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti a 4°C, lavate due volte con H₂O trattata con DEPC e infine sottoposte alla procedura di estrazione degli RNA totali per cui è stato utilizzato il kit commerciale RNeasy® MiniKit (Qiagen): la lisi delle cellule è stata ottenuta con una strategia di tipo meccanico e nel corso della purificazione degli RNA è stato eseguito il trattamento con DNasi suggerito nel manuale del kit per la rimozione di eventuale DNA genomico contaminante. Gli RNA estratti sono stati quantificati con un approccio fluorimetrico (Qubit® Fluorometric Quantitation, Life Technologies) e la loro integrità è stata valutata mediante elettroforesi in condizioni denaturanti, sia su gel di poliacrilammide (6% Acrilammide/Bisacrilammide 19:1, 7M Urea, 50 mM Tris-borato, 1 mM EDTA), che su gel di agarosio (1,5% agarosio, 1,8% formaldeide, 20 mM MOPS, 5 mM sodio acetato, 1mM EDTA).

500 ng di RNA totale proveniente da ciascuno dei ceppi di partenza sono stati utilizzati come template nella reazione di retrotrascrizione condotta con il kit commerciale iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad), sfruttando come primers la miscela di oligo(dT) ed esameri a sequenza casuale forniti nel kit stesso.

Per la successiva valutazione dei livelli di espressione dei geni di interesse, il cDNA totale così ottenuto è stato utilizzato come template nelle reazioni di PCR quantitativa condotte con lo strumento ABI 7300 (Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System). Le coppie di primers da utilizzare per queste reazioni sono state progettate secondo la strategia descritta al paragrafo 3.3.2 del capitolo “Risultati” e controllate con l’aiuto dei software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) e Primer Express (Applied Biosystems) per verificare che rispettassero i requisiti richiesti per l’utilizzo in reazioni di Real Time qPCR.

Le reazioni di qPCR sono state allestite in triplicato, ciascuna in un volume finale di 20 µl comprendente 2 µl di una diluzione 1:5 del cDNA totale, 10 µl di 2X SYBR® Green PCR Master Mix e un volume della coppia di primers specifici per ciascun cDNA di interesse corrispondente ad una concentrazione finale dei primers stessi valutata come ottimale sulla base di precedenti prove di efficienza. Per ciascuna delle coppie di primers, la concentrazione utilizzata in questi esperimenti finali assicurava un’efficienza di amplificazione approssimabile al 100%, soddisfacendo i requisiti necessari per la successiva quantificazione relativa dei livelli di espressione genica secondo il metodo di Livak (Livak and Schmittgen, 2001). Di seguito sono riportate le coppie di primers utilizzate e le rispettive concentrazioni.

Target	Nome primer	Sequenza	Concentrazione
<i>RPL4B</i>	RPL4B_exp_fw	CCTTGAAGCATGACTAGAATTTATAGT	280 nM
	RPL4B_exp_rev	GAAAACAAAAAGGTTTGATTAAAGAC	280 nM
<i>RPP1A</i>	RPP1A_exp_fw	GTCCAATACAACAGCTTAAACCG	100 nM
	RPP1A_exp_rev	CAAGGCGGCGTAAGACAAAG	100 nM
<i>RPS22B</i>	RPS22B_exp_fw	GACTCGCTCTCCGTTTTAGC	100 nM
	RPS22B_exp_rev	GGTCTCAATAGAACCTGACGTTTAC	100 nM
<i>SNR44</i>	SNR44_fw	CCGGGCTGATAACTAGATGG	100 nM
	SNR44_rev	TCCATAACCGTGAAGAAGCA	100 nM

<i>RPS28B</i>	RPS28B_exp_fw	TGGTCTTGATGGAATCTGAACG	510 nM
	RPS28B_exp_rev	CAATGCTCGAAGAGCACCAATAG	510 nM
<i>HHT2</i>	HHT2_RT_fw	TCAATCTTCTGCTATCGGTGCTT	73 nM
	HHT2_RT_rev	GCGTGAATAGCAGCCAGATTAGT	73 nM

Come anticipato, il livello di espressione è stato calcolato in accordo con il metodo proposto da Livak e Schmittgen. In sintesi, il valore di C_T medio derivante dai tre valori di C_T ottenuti dalle reazioni allestite in triplicato per ciascuno dei geni di interesse è stato normalizzato rispetto al valore medio ottenuto in maniera analoga per il gene *HHT2*, scelto come standard ($\Delta C_T = C_T$ gene target – C_T standard). Al valore di ΔC_T così calcolato per ognuno dei ceppi analizzati è stato sottratto quello ottenuto nel ceppo di controllo, ovvero il ceppo *wild type* ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ ceppo di interesse – ΔC_T ceppo *wild type*), in modo da esprimere tutti i livelli misurati nei diversi ceppi in maniera relativa rispetto a quello misurato nel *wild type*. Infine il valore di $\Delta\Delta C_T$ così ottenuto è stato sottoposto a conversione lineare ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).

5.6. Clonaggio, espressione e purificazione di Abf1, Fhl1 e delle proteine “FH”, “FHA-FH” e “FHA-734”

Il clonaggio, l’espressione e la purificazione delle proteine Abf1, Fhl1 e dei frammenti di quest’ultima denominati “FH”, “FHA-FH” e “FHA-734” sono stati eseguiti (salvo alcune differenze) secondo una procedura comune.

La sequenza codificante per ciascuna delle proteine di interesse è stata isolata dal DNA genomico del ceppo *S288C* di *S. cerevisiae* mediante PCR condotta con l’enzima ad alta fedeltà Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific) utilizzando primers mutagenici per aggiungere, rispettivamente, alle estremità 5’ e 3’ della sequenza codificante, le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione NheI e HindIII. Nel caso dei costrutti codificanti per le proteine “FH”, “FHA-FH” e “FHA-734”, il primer reverse è stato progettato in modo da inserire, prima del sito di taglio riconosciuto da HindIII, un codone di stop. Di seguito sono riportati i primers utilizzati per questo passaggio e le rispettive sequenze.

Target	Nome primer	Sequenza
<i>ABF1</i>	Abf1_NheI_fw	GCTAGCATGGACAAATTAGTCGTG
	Abf1_HindIII_rev	AAGCTTCTATTGACCTCTTAATTCTG

FHL1	Fhl1_NheI_fw	GCTAGCATGGATGGGGAAATGGC
	Fhl1_HindIII_rev	AAGCTTTTAAAGTTTTCTCAAGGGAT
"FH"	Fhl1FH_NheI_fw	GCTAGCAAGCCACCGAAAATACCA
	Fhl1FH_HindIII_rev	AAGCTTTTATTTTTGCCCTCTGCGG
"FHA-FH"	Fhl1FHA_NheI_fw	GCTAGCCAATCGATGCAAGTTTACC
	Fhl1FH_HindIII_rev	AAGCTTTTATTTTTGCCCTCTGCGG
"FHA-734"	Fhl1FHA_NheI_fw	GCTAGCCAATCGATGCAAGTTTACC
	Fhl1_734_HindIII_rev	AAGCTTTTACGGCGTCTGGACTATTGGTT

I prodotti delle reazioni di PCR sono stati purificati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% e successiva procedura di *gel extraction* utilizzando un kit per gel-eluzione (Fisher Molecular Biology), quindi sottoposti alla reazione di *A-tailing* condotta con l'enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e infine clonati nel vettore pGEM® T-easy (Promega). Il plasmide ricombinante ottenuto è stato sottoposto a doppia digestione con gli enzimi NheI e HindIII e l'inserto corrispondente alla sequenza codificante per la proteina di interesse, isolato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% e successiva procedura di *gel extraction* con kit commerciale (Fisher Molecular Biology), è stato clonato nel vettore di espressione pET28-b precedentemente sottoposto allo stesso trattamento. La corretta sequenza del costrutto è stata verificata mediante sequenziamento (Macrogen). Nel vettore ricombinante, la sequenza codificante per la proteina di interesse è posta sotto il controllo del promotore inducibile T7 e la sua estremità 5' risulta fusa alla sequenza che codifica per un tag esaistidinico, che nel corrispondente prodotto proteico risulta separato rispetto alla estremità N-terminale della sequenza della proteina di interesse da un sito riconosciuto dalla proteasi trombina. Per ciascuna delle proteine da ottenere, è stata eseguita la trasformazione di cellule di *E. coli* BL21-Gold(DE3)pLysS con il plasmide contenente la corrispondente sequenza codificante. Dopo aver determinato l'inducibilità e la solubilità di ciascuna proteina, ognuna di esse è stata over-espressa incubando 1 litro (2 litri, nel caso delle proteine Abf1 e Fhl1) di coltura cellulare in terreno LB addizionato di kanamicina e cloramfenicolo, in agitazione a 37°C, fino al raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ compreso tra 0,6 e 0,8, corrispondente alla fase di crescita esponenziale; si è proceduto quindi all'induzione mediante aggiunta di IPTG (Sigma-Aldrich) alla concentrazione finale di 1 mM. Dopo quattro ore in agitazione a 30°C le cellule sono state recuperate e sottoposte a lisi per

sonicazione in un opportuno tampone (Per le proteine FH, FHA-FH e FHA-734: 50 mM Tris pH 7.6, 300 mM NaCl, 5% glicerolo, 1 mM β -mercaptoetanolo, 1 μ M pepstatina, 1 μ M leupeptina, 1 mM PMSF, 0.1% Tween-20 e 0.2 mg/ml lisozima. Per le proteine Abf1 e Fhl1: 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 10 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo, 1 μ M pepstatina, 1 μ M leupeptina, 1 mM PMSF, 0.1% Tween-20 e 0.2 mg/ml lisozima). La frazione cellulare solubile è stata caricata su colonna Ni-NTA Agarose (Qiagen) pre-equilibrata con buffer 1 (Per le proteine FH, FHA-FH e FHA-734: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, 5% glicerolo, 2 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo. Per le proteine Abf1 e Fhl1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 10 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo). La colonna è stata quindi lavata con cinque volumi di buffer 2 (Per le proteine FH, FHA-FH e FHA-734: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, 5% glicerolo, 20 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo. Per le proteine Abf1 e Fhl1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 25 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo. A seguire la colonna è stata lavata con un volume di buffer avente la stessa composizione sopra descritta ma con 1M NaCl) mentre l'eluizione ha previsto l'utilizzo del buffer 3 (Per le proteine FH, FHA-FH e FHA-734: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, 5% glicerolo, 250 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo. Per le proteine Abf1 e Fhl1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 250 mM imidazolo, 1 mM β -mercaptoetanolo). Le frazioni di eluato contenenti la proteina (individuate mediante saggio con reattivo di Bradford) sono state caricate separatamente su SDS-PAGE e quelle risultate sufficientemente pure sono state unite e sottoposte a scambio del tampone mediante dialisi per la rimozione dell'imidazolo. La concentrazione di ciascun campione proteico è stata determinata mediante saggio fluorimetrico (Qubit® Fluorometric Quantitation, Life Technologies).

Clonaggio, espressione e purificazione della proteina Fhl1 con doppio tag

Il plasmide ricombinante derivato da pGEM T-easy e contenente la sequenza codificante di *FHL1* è stato utilizzato come template nella reazione PCR condotta con l'enzima Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific), il primer *forward* Fhl1_NheI_fw (GCTAGCATGGATGGGGAAATGGC) e il primer *reverse* Fhl1_throm_rev (AGAACCACGCGGAACCAGAAGTTTTTCTCAAGGGATAC). Quest'ultimo ha premesso l'aggiunta, immediatamente a valle dell'ultimo codone di *FHL1*, della sequenza codificante

per il sito di taglio riconosciuto dalla proteasi trombina. Il prodotto della reazione di PCR è stato purificato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% e successiva procedura di *gel extraction* con apposito kit commerciale (Fisher Molecular Biology), quindi sottoposto alla reazione di *A-tailing* condotta con l'enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e infine clonato nel vettore pGEM® T-easy (Promega). Il plasmide ricombinante ottenuto è stato utilizzato come template per una seconda reazione di PCR, condotta anche in questo caso con l'enzima Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific) e con il primer *forward* Fhl1_NheI_fw (GCTAGCATGGATGGGGAAATGGC). Il primer *reverse* (AAGCTTTTATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGAACCACGCGGAACCAG, indicato come "Fhl1_Strep_HindIII_rev") utilizzato in questa reazione, ha permesso di aggiungere, a valle della sequenza codificante per il sito di taglio della trombina, quella codificante per lo Strep-tag II, seguita dal sito di taglio riconosciuto dall'enzima di restrizione HindIII. Il prodotto ottenuto da questa PCR è stato purificato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% e successiva procedura di *gel extraction* eseguita con apposito kit commerciale (Fisher Molecular Biology), quindi sottoposto alla reazione di *A-tailing* condotta con l'enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e infine clonato nel vettore pGEM® T-easy (Promega). Il plasmide ricombinante è stato sottoposto a doppia digestione con gli enzimi NheI e HindIII e l'inserito corrispondente alla sequenza codificante per la proteina di interesse, isolato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% e successiva procedura di *gel extraction* con kit commerciale (Fisher Molecular Biology), è stato clonato nel vettore di espressione pET28-b precedentemente sottoposto allo stesso trattamento. La corretta sequenza del costruito è stata verificata mediante sequenziamento (Macrogen): nel vettore ricombinante la sequenza codificante per la proteina Fhl1 è posto sotto il controllo del promotore inducibile T7 e la sua estremità 5' risulta fusa alla sequenza che codifica per un tag esaistidinico e per il sito di taglio per la trombina. All'estremità 3', analogamente, una sequenza codificante per il sito di taglio riconosciuto dalla trombina separa l'ultimo codone di *FHL1* dalla sequenza codificante per lo Streptag II. Il plasmide ricombinante è stato utilizzato per la trasformazione di cellule di *E. coli* ceppo BL21 CodonPlus. Dopo aver determinato l'inducibilità e la solubilità della proteina, questa è stata over-espressa incubando 2 litri di coltura cellulare in terreno LB addizionato di kanamicina e cloramfenicolo, in agitazione a 37°C, fino al raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ compreso tra 0,6 e 0,8; si è proceduto quindi all'induzione mediante aggiunta di IPTG (Sigma-Aldrich)

alla concentrazione finale di 1 mM. Dopo quattro ore in agitazione a 30°C le cellule sono state recuperate, risospese in un opportuno tampone (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 10 mM imidazolo, 5 mM β -mercaptoetanolo, 1 μ M pepstatina, 1 μ M leupeptina, 1 mM PMSF, 0.1% Tween-20 e 0.2 mg/ml lisozima) e sottoposte a lisi per sonicazione. La frazione cellulare solubile è stata caricata su colonna Ni-NTA Agarose (Qiagen) pre-equilibrata con buffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 10 mM imidazolo, 5 mM β -mercaptoetanolo). La colonna è stata quindi lavata con cinque volumi di buffer 2 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 20 mM imidazolo, 5 mM β -mercaptoetanolo) e con un volume di buffer 3 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 5% glicerolo, 20 mM imidazolo, 5 mM β -mercaptoetanolo) mentre l'eluizione ha previsto l'utilizzo del buffer 4 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glicerolo, 250 mM imidazolo, 5 mM β -mercaptoetanolo). Le frazioni di eluato contenenti la proteina, individuate mediante SDS-PAGE, sono state unite e sottoposte ad un ulteriore step di purificazione su colonna Strep-Tactin® (IBA), pre-equilibrata con due volumi di buffer W (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). A seguito del caricamento del campione, la colonna è stata lavata con cinque volumi di buffer W. Si è proceduto quindi all'eluizione, ottenuta caricando la colonna con quattro volumi di buffer E (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM destiobiotina, 5% glicerolo). Le frazioni di eluato contenenti la proteina (individuate mediante saggio con reattivo di Bradford) sono state caricate separatamente su SDS-PAGE e una volta verificata la loro purezza, sono state unite in un unico campione la cui concentrazione è stata determinata mediante saggio fluorimetrico (Qubit® Fluorometric Quantitation, Life Technologies).

5.7. Saggi di mobilità elettroforetica (EMSA)

5.7.1. Preparazione delle sonde di DNA radiomarcate

Le sonde radiomarcate utilizzate per i saggi di mobilità elettroforetica sono state ottenute mediante PCR condotta con l'enzima Phusion® DNA Polymerase (Thermo Scientific) utilizzando come template i plasmidi ricombinanti derivati da pGEM T-easy (si veda il paragrafo 5.5.2) contenenti la versione *wild type* o mutata (Amut, Fmut, AFmut) dei promotori di interesse. Le 10 pmoli di ciascun primer fw da utilizzare nella reazione di PCR

sono state precedentemente marcate mediante una reazione di fosforilazione eseguita con l'enzima T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Scientific), in presenza di 15 pmoli di $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmmole). Vettori e primers utilizzati per ottenere ciascuna delle sonde sono riportati nella tabella sottostante.

Sonda	Templato	Nome primer	Sequenza primer
RPL4B wt	pGEM::RPL4B wt	RPL4B_promoter_fw	GAAGTGCCTGAAGGCATGA
		RPL4B_promoter_rev	GCGATTGCTGATAGGAAAGAA
RPL4B Fmut	pGEM::RPL4B Fmut	RPL4B_promoter_fw	GAAGTGCCTGAAGGCATGA
		RPL4B_promoter_rev	GCGATTGCTGATAGGAAAGAA
RPS22B wt	pGEM::RPS22B wt	RPS22B_promoter_fw	CATTATTCCTTATGCATTACGTTTCG
		RPS22B_promoter_rev	GAAGAGAACAATTTATCCAGCGTAG
RPS22B Fmut	pGEM::RPS22B Fmut	RPS22B_promoter_fw	CATTATTCCTTATGCATTACGTTTCG
		RPS22B_promoter_rev	GAAGAGAACAATTTATCCAGCGTAG
RPP1A wt	pGEM::RPP1A wt	RPP1A_promoter_fw	GCCTTAACCCTGTAGCCTCA
		RPP1A_promoter_rev	TCAGAACAGAAGAGATCGCAAA
RPP1A Amut	pGEM::RPP1A Amut	RPP1A_promoter_fw	GCCTTAACCCTGTAGCCTCA
		RPP1A_promoter_rev	TCAGAACAGAAGAGATCGCAAA
RPP1A Fmut	pGEM::RPP1A Fmut	RPP1A_promoter_fw	GCCTTAACCCTGTAGCCTCA
		RPP1A_promoter_rev	TCAGAACAGAAGAGATCGCAAA
RPP1A AFmut	pGEM::RPP1A AFmut	RPP1A_promoter_fw	GCCTTAACCCTGTAGCCTCA
		RPP1A_promoter_rev	TCAGAACAGAAGAGATCGCAAA
RPS28B wt	pGEM::RPS28B wt	RPS28B_promoter_fw	GGCAAGCTTATTCATGTTTCG
		RPS28B_promoter_rev	CCAAAAGTGCTATGGAGCAA
RPS28B Amut	pGEM::RPS28B Amut	RPS28B_promoter_fw	GGCAAGCTTATTCATGTTTCG
		RPS28B_promoter_rev	CCAAAAGTGCTATGGAGCAA
RPS28B Fmut	pGEM::RPS28B Fmut	RPS28B_promoter_fw	GGCAAGCTTATTCATGTTTCG
		RPS28B_promoter_rev	CCAAAAGTGCTATGGAGCAA
RPS28B AFmut	pGEM::RPS28B AFmut	RPS28B_promoter_fw	GGCAAGCTTATTCATGTTTCG
		RPS28B_promoter_rev	CCAAAAGTGCTATGGAGCAA

I prodotti delle PCR sono stati purificati mediante protocollo di "PCR-clean UP" eseguito con l'apposito kit (Fisher Molecular Biology). La quantificazione è stata ottenuta mediante

confronto con campioni di DNA a concentrazione nota visualizzati al transilluminatore dopo l'aggiunta di 2 µg/ml di etidio bromuro.

5.7.2. Reazioni di legame

Le reazioni di legame sono state condotte in un volume complessivo di 10 µl. Dapprima sono stati preparati campioni contenenti concentrazioni crescenti della proteina da saggiare, pre-incubati per 30 minuti a temperatura ambiente con 25 fmoli di DNA competitore aspecifico (un frammento lineare di DNA privo dei siti di legame per le proteine, ottenuto mediante PCR) in un opportuno tampone di legame (Per le prove effettuate con le proteine FH e Fhl1: 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM KCl, 5% glicerolo, 0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 1 mM EDTA. Per le prove effettuate con la proteina Abf1, da sola o in combinazione con Fhl1: 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM KCl, 5% glicerolo, 0,5 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, ZnSO₄ 100 µM). Successivamente, sono state aggiunte 25 fmoli di sonda radiomarcata e si è proceduto ad una ulteriore incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente.

Nei diversi esperimenti, sono state saggiate le seguenti concentrazioni di proteine: per FH sono state saggiate le concentrazioni di 12,5 nM, 37,5 nM, 62,5 nM e 125 nM con la sonda RPS22B (wt e Fmut) e le concentrazioni di 12,5 nM, 37,5 nM, 62,5 nM e 87,5 nM con le sonde RPL4B (wt e Fmut), RPP1A (wt e Fmut) e RPS28B (wt e Fmut); per Fhl1 sono state saggiate le concentrazioni di 25 nM, 37,5 nM, 50 nM, 62,5 nM, 75 nM, 87,5 nM e 100 nM con la sonda RPS22B wt e le concentrazioni di 15 nM, 30 nM, 45 nM e 60 nM con le sonde RPP1A (wt e Fmut) e RPS28B (wt e Fmut); per Abf1 sono state saggiate le concentrazioni di 12,5 nM, 25 nM, 50 nM e 100 nM con le sonde RPP1A (wt e Fmut) e RPS28B (wt e Fmut); L'esperimento condotto con Abf1, Fhl1 e le sonde RPP1A e RPS28B (wt e AFmut) ha previsto l'utilizzo di una concentrazione costante di Abf1 pari a 25 nM e di concentrazioni crescenti di Fhl1, corrispondenti a 15 nM, 30 nM e 45 nM.

5.7.3. Gel elettroforesi in condizioni native

Al termine dell'incubazione, le miscele di reazione sono state risolte mediante elettroforesi a 10 V/cm in condizioni native a 4°C su gel di poliacrilammide (per gli esperimenti condotti con la proteina FH: 6% Acrilammide:Bisacrillamide 29:1, per quelli condotti con le proteine

Abf1 e Fhl1: 5% Acrilammide:Bisacrillamide 29:1), precedentemente equilibrato con il tampone TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) mediante precorsa a 4°C per 1 ora a 10 V/cm. La durata della corsa elettroforetica è stata di 3 ore e 30 minuti, per gli esperimenti condotti con la proteina FH, di 4 ore per gli esperimenti condotti con le proteine Fhl1 e Abf1 e di 4 ore e 30 minuti per gli esperimenti condotti con entrambe le proteine. L'immagine del gel è stata ottenuta mediante phosphorimaging e acquisita con Packard Cyclone (Alliance Analytical).

6. BIBLIOGRAFIA

Acker J., Conesa C., Lefebvre O. (2013) Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1829**, 283-295.

Anderson J. D. and Widom J. (2001) Poly(dA-dT) promoter elements increase the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 3830-3839.

Andrau J., Sentenac A., Werner M. (1999) Mutagenesis of Yeast TFIIB70 Reveals C-Terminal Residues Critical for Interaction with TBP and C34. *Journal of Molecular Biology*, **288**, 511-520.

Ansari S. A., He Q., Morse R. H. (2009) Mediator complex association with constitutively transcribed genes in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 16734-16739.

Aprikan P., Moorefield B., Reeder R. H. (2001) New Model for the Yeast RNA polymerase I Transcription Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 4847-4855.

Archambault J., Milnet C. A., Schappert K. T., Baum B., Friesen J. D., Segall J. (1992) The Deduced Sequence of the Transcription Factor FIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Extensive Divergence from *Xenopus* TFIIIA. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 3282-3288.

Armache J., Jarasch A., Anger A. M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., Habeck M., Dindar G., Franckenberg S., Marquez V., Mielke T., Thomm M., Berninghausen O., Beatrix B., Söding J., Westhof E., Wilson D. N., Beckmann R. (2010) Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 19748-19753.

Armache J., Jarasch A., Anger A. M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., Habeck M., Dindar G., Franckenberg S., Marquez V., Mielke T., Thomm M., Berninghausen O., Beatrix B., Söding J., Westhof E., Wilson D. N., Beckmann R. (2010) Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 19754-19759.

Badis G., Saveanu C., Fromont-Racine M., Jacquier A. (2004) Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Molecular Cell*, **15**, 5-15.

Badis G., Chan E. T., van Bakel H., Pena-Castillo L., Tillo D., Tsui K., Carlson C. D., Gossett A. J., Hasinoff M. J., Warren C. L., Gebbia M., Talukder S., Yang A., Mnaimneh S., Terterov D., Coburn D., Yeo A. L., Yeo Z. X., Clarke N. D., Lieb J. D., Ansari A. Z., Nislow C., Hughes T. R. (2008) A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Molecular Cell*, **32**, 878-887.

Basehoar B., Zanton S. J., Pugh B. F. (2004) Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, **116**, 699-709.

Beer M. A. and Tavazoie S. (2004) Predicting gene expression from sequence. *Cell*, **117**, 185-198.

Beinoravičiūtė-Kellner R., Lipps G., Krauss G. (2005) In vitro selection of DNA binding sites for ABF1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **579**, 4535-4540.

Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. (2011) The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*. **334**, 1524-1529.

Berger A. B., Decourty L., Badis G., Nehrbass U., Jacquier A., Gadal O. (2007) Hmo1 is required for TOR-dependent regulation of ribosomal protein gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 8015-8026.

Biddick R. and Young E. T. (2005) Yeast Mediator and its role in transcriptional regulation. *Comptes Rendus Biologies*, **328**, 773-782.

Bier M., Fath S., Tschochner H. (2004) The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Letter*, **564**, 41-46.

Blattner C., Jennebach S., Herzog F., Mayer A., Cheung A. C. M., Witte G., Lorenzen C., Hopfner K., Heck A. J. R., Aebersold R., Cramer P. (2011) Molecular basis of Rrn3-regulated RNA polymerase I initiation and cell growth. *Genes & Development*, **25**, 2093-2105.

Blumberg H. and Silver P (1991) A split zinc-finger protein is required for normal yeast growth. *Gene*, **107**, 101-110.

Boguta M. (2013) Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1829**, 376-384.

Boguta M., Czerska K., Żołądek T. (1997) Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **185**, 291-296.

Boorsma A., Lu X., Zakrzewska A., Klis F. M., Bussemaker H. J. (2009) Inferring condition-specific modulation of transcription factor activity in yeast through regulon-based analysis of genomewide expression. *PLoS ONE*, **3**, 1-8.

Bordi L., Cioci F., Camilloni G. (2001) In Vivo Binding and Hierarchy of Assembly of the Yeast RNA polymerase I Transcription Factors. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 753-760.

Bosio M. C., Negri R., Dieci G. (2011) Promoter architectures in the yeast ribosomal expression program. *Transcription*, **2:2**, 71-77.

Bosio M. C. (2012) Regolazione trascrizionale della biogenesi dei ribosomi in *Saccharomyces cerevisiae*: geni per snoRNA e geni "ribi". Tesi di Dottorato.

Braglia P., Kawauchi J., Proudfoot N. J. (2011) Co-transcriptional RNA cleavage provides a failsafe termination mechanism for yeast RNA polymerase I. *Nuclei Acids Research*, **39**, 1439-1448.

- Braun B. R.**, Riggs D. L., Kassavetis G. A., Geiduschek E. P. (1989) Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 2530-2534.
- Bregman A.**, Avraham-Kelbert M., Barkai O., Duek L., Guterman A., Choder M. (2011) Promoter elements regulate cytoplasmic mRNA decay. *Cell*, **147**, 1473-1483.
- Brigati C.**, Kurtz S., Balderes D., Vidali G., Shore D. (1993) An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, **13**, 1306-1314.
- Bussiere C.**, Hashem Y., Arora S., Frank J., Johnsonm A. W. (2012) Integrity of the P-site is probed during maturation of the 60S ribosomal subunit. *Journal of Cell Biology*, **197**, 747-759.
- Butler J. E. F.** and Kadonaga J. T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*, **16**, 2583-2592.
- Cai L.**, McCormick M. A., Kennedy B. K., Tu B. P. (2013) Integration of multiple nutrient cues and regulation of lifespan by ribosomal transcription factor Ifh1. *Cell Reports*, **4**, 1063-1071.
- Camier S.**, Dechampsme A., Sentenac A. (1995) The only essential function of TFIIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 9338-9342.
- Causton H. C.**, Ren B., Koh S. S., Harbison C. T. Kanin E., Jennings E. G., Lee T. I., True H. L., Lander E. S., Young R. A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 323-337.
- Challice J. M.** and Segall J. (1989) Transcription of the 5S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *Journal of Biological Chemistry*. **264**, 20060-20067.
- Chen C. Y.** and Powers T. (2006) Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Current Genetics*, **49**, 281-293.
- Cherel I.** and Thuriaux P. (1995) The IFH1 gene product interacts with a fork head protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 261-270.
- Cho G.**, Kim J., Rho H. M., Jung G. (1995) Structure-function analysis of the DNA binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* ABF1. *Nucleic Acids Research*, **23**, 2980-2987.
- Cioci F.**, Vu L., Eliason K., Oakes M., Siddiqi I. M., Nomura M. (2003) Silencing in Yeast rDNA chromatin: reciprocal relationship in gene expression between RNA polymerase I and II. *Molecular Cell*, **12**, 135-145.
- Claypool J. A.**, French S. L., Johzuka K., Eliason K., Vu L., Dodd J. A., Beyer A. L., Nomura M. (2004) Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of Yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 946-956.

- Cliften P.**, Sudarsanam P., Desikan A., Fulton L., Fulton B., Majors J., Waterston R., Cohen B. A., Johnston M. (2003) Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science*, **301**, 71-76.
- Conconi A.**, Widmer R. M., Keller T., Sogo J. M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, **57**, 753-761.
- Cormack B. P.** and Struhl K (1992) The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell*, **69**, 685-696.
- Costanzo G.**, Camier S., Carlucci P., Burderi L., Negri R. (2001) RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes *in vivo*: TFIIIB occupancy and promoter opening. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 3166-3178.
- Dammann R.**, Lucchini R., Koller T., Sogo J. M. (1993) Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **21**, 2331-2338.
- Danin-Kreiselman M.**, Lee C. Y., Chanfreau G. (2003) RNase III-Mediated Degradation of Unspliced Pre-mRNAs and Lariat Introns. *Molecular Cell*, **11**, 1279-1289.
- de Turris V.**, Di Leva G., Caldarola ., Loreni F., Amaldi F., Bozzoni I. (2004) TOP promoter elements control the relative ratio of intron-encoded snoRNA versus spliced mRNA biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, **344**, 383-394.
- Decatur W. A.** and Fournier M. J. (2002) rRNA modifications and ribosome function. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **22**, 344-351.
- Della Seta F.**, Ciafré S., Marck C., Santoro B., Presutti C., Sentenac A., Bozzoni I. (1990) The ABF1 factor is the transcriptional activator of the L2 ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **10**, 2437-2441.
- Dequard-Chablat M.**, Riva M., Carlesj C., Sentenac A. (1991) RPC19, the gene for a subunit common to yeast RNA polymerases A (I) and C (111). *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 15300-1530.
- Desai L.**, Lee J., Upadhya R., Chu Y., Moir R. D., Willis M. (2005) Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 6455-6462.
- Dieci G.**, Duimio L., Coda-Zabetta F., Sprague K. U., Ottonello S. (1993) A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 11199-11207.
- Dieci G.**, Fiorino G., Castelnuovo M., Teichmann M., Pagano A. (2007) The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in Genetics*, **23**, 614-622.
- Dieci G.**, Ruotolo R., Braglia P., Carles C., Carpentieri A., Amoresano A., Ottonello S. (2009) Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **379**, 489-493.

- Dieci G.**, Preti M., Montanini B. (2009) Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*, **94**, 83-88.
- Dosztányi Z.**, Csizmok V., Tompa P., Simon I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, **21**, 3433-3434.
- Dosztányi Z.**, Csizmok V., Tompa P., Simon I. (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *Journal of Molecular Biology*, **347**, 827-839.
- Downey M.**, Knight B., Vashisht A. A., Seller C. A., Wohlschlegel J. A., Shore D., Toczyski D. P. (2013) Gcn5 and sirtuins regulate acetylation of the ribosomal protein transcription factor Ifh1. *Current Biology*, **23**, 1638-1648.
- Dresios J.**, Panopoulos P., Synetos D. (2006) Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Molecular Microbiology*, **59**, 1651-1663.
- Dumay-Odelot E.**, Acker J., Arrebola R., Sentenac A., Marck C. (2002) Multiple Roles of the 131 Subunit of Yeast Transcription Factor IIIC (TFIIIC) in TFIIIB Assembly. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 298-308.
- Durocher D.** and Jackson S. P. (2002) The FHA domain. *FEBS Letters*, **513**, 58-66.
- Dyson H. J.** and Wright P. E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**, 54-60.
- Elion E. A.** and Warner J. R. (1986) An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **6**, 2089-2097.
- Engel C.**, Sainsbury S., Cheung A. C., Kostrewa D., Cramer P. (2013) RNA polymerase I structure and transcription regulation. *Nature*, **502**, 650-656.
- Fath S.**, Milkereit P., Peyroche G., Riva M., Carles C., Tschochner H. (2001) Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptional active RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 14334-14339.
- Fatica A.** and Tollervey D. (2002) Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 313-318.
- Ferreira-Cerca S.**, Pöll G., Gleizes P., Tschochner H., Milkereit P. (2005) Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Molecular Cell*, **20**, 263-275.
- Ferri M.**, Peyroche G., Siaut M., Lefebvre O., Carles C., Conesa C., Sentenac A. (2000) A novel subunit of Yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIIB-Related domain of TFIIIB70. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 488-495.

Field Y., Kaplan N., Fondufe-Mittendorf Y., Moore I. K., Sharon E., Lubling Y., Widom J., Segal E. (2008) Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Computational Biology*, **4**, 1-25.

Filipowicz W. and Pogačić V. (2002) Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 319-327.

Fingerman I., Nagaraj V., Norris D., Vershon A. K. (2003) Sfp1 plays a key role in yeast ribosome biogenesis. *Eukaryotic Cell*, **2**, 1061-1068.

Flores A., Briand J., Gadal O., Andrau J., Rubbi U., Van Mullem V., Boschiero C., Goussot M., Marck C., Carles C., P. Thuriaux P., Sentenac A., Werner M. (1999) A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 7815-7820.

Freckleton G., Lippman S. I., Broach J. R., Tavazoie S. (2009) Microarray profiling of phage-display selections for rapid mapping of transcription factor-DNA interactions. *PLoS Genetics*, **5**, 1-8.

French S. L., Osheim Y. N., Cioci F., Nomura M., Beyer A. L. (2003) In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 1558-1568.

Gabrielsen O. S., Hornes E., Korsnes L., Ruet A., Øyen T. B. (1989) Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor σ -a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Research*, **17**, 6523-6567.

Gamalinda M. and Woolford J. L. Jr. (2014) Deletion of L4 domains reveals insights into the importance of ribosomal protein extensions in eukaryotic ribosome assembly. *RNA*, **20**, 1725-1731.

Ganapathi M., Palumbo M. J., Ansari S. A., He Q., Tsui K., Nislow C., Morse R. H. (2011) Extensive role of the general regulatory factors, Abf1 and Rap1, in determining genome-wide chromatin structure in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, **39**, 2032-2044.

Ganley A. R. D., Ide S., Saka K., Kobayashi T. (2009) The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. *Molecular Cell*, **35**, 683-693.

Garbett K. A., Tripathi M. K., Cencki B., Layer J. H., Weil P. A. (2007) Yeast TFIID serves as a coactivator for Rap1p by direct protein-protein interaction. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 297-311.

García-Gómez J. J., Fernández-Pevida A., Lebaron S., Rosado I. V., Tollervey D., Kressler D., de la Cruz J. (2014) Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3. *PLoS Genetics*, **10**, 1-13.

Gartmann M., Blau M., Armache J., Mielke T., Topf M., Beckmann R. (2010) Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 14848-14851.

- Gasch A. P.**, Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D., Brown P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 4241-4257.
- Gerbi S. A.**, Borovjagin A. V., Lange T. S. (2003) The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 318-325.
- Ghaemmaghami S.**, Huh W., Bower K., Howson R. W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E. K., Weissman J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
- Ghavidel A.** and Schultz M. C. (2001) TATA Binding Protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell*, **106**, 575-584.
- Giaever G.**, Chu A. M., Ni L., Connelly C., Riles L., Véronneau S., Dow S., Lucau-Danila A., Anderson K., André B., Arkin A. P., Astromoff A., El Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D. J., Gerstein M., Gotte D., Güldener U., Hegemann J. H., Hempel S., Herman Z., Jaramillo D. F., Kelly D. E., Kelly S. L., Kötter P., LaBonte D., Lamb D. C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M., Mao R., Menard P., Ooi S. L., Revuelta J. L., Roberts C. J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schimmack G., Shafer B., Shoemaker D. D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R. K., Strathern J. N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C., Ward T. R., Wilhelmy J., Winzeler E. A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J. D., Snyder M., Philippsen P., Davis R. W., Johnston M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Goetze H.**, Wittner M., Hamperl S., Hondele M., Merz K., Stoeckl U., Griesenbeck J. (2010) Alternative chromatin structures of the 35S rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae* provide a molecular basis for the selective recruitment of RNA polymerases I and II. *Molecular and Cellular Biology*, **30**, 2028-2045.
- Goler-Baron V.**, Selitrennik M., Barkai O., Haimovich G., Lotan R., Choder M. (2008) Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. *Genes & Development*, **22**, 2022-2027.
- Gonçalves P. M.**, Griffioen G., Minnee R., Bosma M., Kraakman L. S., Mager W. H., Planta R. J. (1995) Transcription activation of yeast ribosomal protein genes requires additional elements apart from binding sites for Abf1 p or Rapip. *Nucleic Acids Research*, **23**, 1475-1480.
- Gonçalves P. M.**, Maurer K., van Nieuw Amerongen G., Bergkamp-Steffens K., Mager W. H., Planta R. J. (1996) C-terminal domains of general regulatory factors Abf1p and Rap1p in *Saccharomyces cerevisiae* display functional similarity. *Molecular Microbiology*, **19**, 535-543.
- Gordân R.**, Hartemink A. J., Bulyk M. L. (2009) Distinguishing direct versus indirect transcription factor–DNA interactions. *Genome Research*, **19**, 2090-2100.

- Graczyk D.**, Dębski J., Muszyńska G., Bretner M., Lefebvre O., Boguta M. (2011) Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 4926–4931.
- Greber B. J.**, Boehringer D., Montellese C., Ban N. (2012) Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nature Structural and Molecular Biology*, **19**, 1228-1233.
- Grummt I.** (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes & Development*, **17**, 1691-1702.
- Guffanti E.**, Ferrari R., Preti M., Forloni M., Harismendy O., Lefebvre O., Dieci G. (2006) A minimal promoter for TFIIC-dependent *in vitro* transcription of snoRNA and tRNA genes by RNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 23945-23957.
- Ha C. W.**, Sung M., Huh W. (2012) Nsi1 plays a significant role in the silencing of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **40**, 4892-4903.
- Haimovich G.**, Choder M., Singer R. H., Trcek T. (2013) The fate of the messenger is pre-determined: A new model for regulation of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1829**, 643-653.
- Haimovich G.**, Medina D. A., Causse S. Z., Garber M., Millán-Zambrano G., Barkai O., Chávez S., Pérez-Ortín J. E., Darzacq X and Mordechai Choder M. (2013). Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*, **153**, 1000-1011.
- Hall D. B.**, Wade J. T., Struhl K. (2006) An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 3672-3679.
- Halfter H.**, Kavety B., Vandekerckhove J., Kiefer F., Gallwitz D. (1989) Sequence, expression and mutational analysis of BAF1, a transcriptional activator and ARS 1-binding protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, **8**, 4265-4272.
- Hahn S.**, Maurer P., Caesar S., Schlenstedt G. (2008) Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, **379**, 678-694.
- Hahn S.** and Young E. T. (2011) Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, **189**, 705-736.
- Harbison C. T.**, Gordon D. B., Lee T. I., Rinaldi n. J., Macisaac K. D., Danford T. W., Hannett N. M., Tagne J., Reynolds D. B., Yoo J., Jennings E. G., Zeitlinger J., Pokholok D. K., Kellis M., Rolfe P. A., Takusagawa K. T., Lander E. S., Gifford G. K., Fraenkel E., Young R. A. (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature*, **431**, 99-104.
- Harismendy O.**, Gendrel C., Soularue P., Gidrol X., Sentenac A., Werner M., Lefebvre O. (2003) Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *The EMBO Journal*, **22**, 4738-4747.

- He F.**, Li C., Roy B., Jacobson A. (2014) Yeast Edc3 targets RPS28B mRNA for decapping by binding to a 3' untranslated region decay-inducing regulatory element. *Molecular and Cellular Biology*, **34**, 1438–1451.
- Hermann-Le Denmat S.**, Werner M., Sentenac A., Thuriaux P. (1994) Suppression of yeast RNA polymerase III mutations by FHL1, a gene coding for a fork head protein involved in rRNA processing. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 2905-2913.
- Ho S. N.**, Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., Pease L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Hogues H.**, Lavoie H., Sellam A., Mangos M., Roemer T., Purisima ., Nantel A., Whiteway M. (2008) Transcription factor substitution during the evolution of fungal ribosome regulation. *Molecular Cell*, **29**, 552-562.
- Holstege F. C. P.**, Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R., Golub T. R., Lander E. S., Young R. A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717-728.
- Hontz R. D.**, French S. L., Oakes M. L., Tongaonkar P., Nomura M., Beyer A. L., Smith J. S. (2008) Transcription of multiple yeast ribosomal DNA genes requires targeting of UAF to the promoter by Uaf30. *Molecular and Cellular Biology*, **28**, 6709-6719.
- Hornung G.**, Oren M., Barkai N. (2012) Nucleosome organization affects the sensitivity of gene expression to promoter mutations. *Molecular Cell*, **46**, 362-368.
- Huang J.** and Moazed D. (2003) Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes & Development*, **17**, 2162-2176.
- Huang Z.**, Zhou H., He H., Chen C., Liang D., Qu L. (2005) Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs. *RNA*, **11**, 1303-1316.
- Huber A.**, Bodenmiller B., Uotila A., Stahl M., Wanka S., Gerrits B., Aebersold R., Loewith R. (2009) Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & Development*, **23**, 1929-1943.
- Huber A.**, French S. L., Tekotte H., Yerlikaya S., Stahl M., Perepelkina M. P., Tyers M., Rougemont J., Beyer A. L., Loewith R. (2011) Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *The EMBO Journal*, **30**, 3052-3064.
- Hughes J. D.**, Estep P. W., Tavazoie S., Church G. M. (2000) Computational identification of cis-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, **296**, 1205-1214.
- Huisinga K. L.** and Pugh B. F. (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, **13**, 573-585.

- Ito T.**, Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 4569-4574.
- Jakob S.**, Ohmayer U., Neueder A., Hierlmeier T., Perez-Fernandez J., Hochmuth E., Deutzmann R., Griesenbeck J., Tschochner H., Milkereit P. (2012) Interrelationships between yeast ribosomal protein assembly events and transient ribosome biogenesis factors interactions in early pre-ribosomes. *PLoS ONE*, **7**, 1-15.
- Jimenez A.** and Davies J. (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* **287**, 869-871.
- Jiménez-Díaz A.**, Remacha M., Ballesta J. P. G., Berlanga J. J. (2013) Phosphorylation of initiation factor eIF2 in response to stress conditions is mediated by acidic ribosomal P1/P2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, **8**, 1-11.
- Johnston I. M.**, Allison S. J., Morton J. P., Schramm L., Scott P. H., White R. J. (2002) CK2 forms a stable complex with TFIIB and activates RNA polymerase III Transcription in human cells. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 3757-3768.
- Jorgensen P.**, Nishikawa J. L., Breitkreutz B., Tyers M. (2002) Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science*, **297**, 395-400.
- Jorgensen P.**, Rupeš I., Sharom J. R., Schnepfer L., Broach J. R., Tyers M. (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & Development*, **18**, 2491-2505.
- Juneau K.**, Palm C., Miranda M., Davis R. W. (2007) High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 1522-1527.
- Juven-Gershon T.** and Kadonaga J. T. (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, **339**, 225-229.
- Kasahara K.**, Ohtsuki K., Ki S., Aoyama K., Takahashi H., Kobayashi T., Shirahige K., Kokubo T. (2007) Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 6686-6705.
- Kasahara K.**, Ki S., Aoyama K., Takahashi H., Kokubo T. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* HMO1 interacts with TFIID and participates in start site selection by RNA polymerase II. *Nucleic Acids Research*, **36**, 1343-1357.
- Kasahara K.**, Ohyama Y., Kokubo T. (2011) Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Research*, **39**, 4136-4150.
- Kassavetis G. A.**, Braun B. R., Nguyen L. H., Geiduschek E. P. (1990) *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell*, **26**, 235-245.

- Kassavetis G. A.**, Joazeiro P. A., Pisano M., Geiduschek E. P., Colbert T., Hahn S., Blanco J. A. (1992) The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIB. *Cell*, **71**, 1055-1064.
- Kassavetis G. A.**, Kumar A., Ramirez E., Geiduschek E. P. (1998) Functional and structural organization of Brf, the TFIIB-related component of the RNA polymerase III transcription initiation complex. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 5587-5599.
- Kassavetis G. A.**, Kumar A., Letts G. A., Geiduschek E. P. (1998) A post-recruitment function for the RNA polymerase III transcription-initiation factor IIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 9196-9201.
- Kassavetis G. A.**, Letts G. A., Geiduschek E. P. (2001) The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIB participates in two steps of promoter opening. *The EMBO Journal*, **20**, 2823-2834.
- Kasten M. M.** and Stillman D. J. (1997) Identification of the *Saccharomyces cerevisiae* genes STB1-STB5 encoding Sin3p binding proteins. *Molecular Genetics and Genomics*, **256**, 376-386.
- Keener J.**, Dodd J. A., Lalo D., Nomura M. (1997) Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 13458-13462.
- Keener J.**, Josaitis C. A., Dodd J. A., Nomura M. (1998) Reconstitution of yeast RNA polymerase I transcription *in vitro* from purified components. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 33795-33802.
- Kelley L. A.** and Sternberg M. J. E. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, **4**, 363-371.
- Kellis M.**, Patterson N., Endrizzi M., Birren B., Lander E. S. (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, **423**, 241-254.
- Kellis M.**, Birren B. W. and Lander E. S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **428**, 617-624.
- Kempers-Veenstra A. E.**, Musters W., Dekker A. F., Klootwijk J., Planta R. J. (1985) Deletion mapping of the yeast Pol I promoter. *Current Genetics*, **10**, 253-260.
- Keys D. A.**, Vu L., Steffan J. S., Dodd J. A., Yamamoto R. T., Nogi Y., Nomura M. (1994) *RRN6* and *RRN7* encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, **8**, 2349-2362.
- Keys D. A.**, Lee B., Dodd J. A., Nguyen T. T., Vu L., Fantino E., Burson L. M., Nogi Y., Nomura M. (1996) Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes & Development*, **10**, 887-903.

Klekamp M. S. and Weil P. A. (1986) Partial purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIB. *Journal of Biological Chemistry*, **6**, 2819-2827.

Knight B., Kubik S., Ghosh B., Bruzzone M. J., Geertz M., Martin V., Déneraud N., Jacquet P., Ozkan B., Rougemont J., Maerkl S. J., Naef F., Shore D. (2014) Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes & Development*, **28**, 1695-1709.

Knutson B. A. and Hahn S. (2011) Yeast Rrn7 and human TAF1B are TFIIB-related RNA polymerase I general transcription factors. *Science*, **333**, 1637-1640.

Knutson B. A., Luo J., Ranish J. and Hahn S. (2014) Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I Core Factor complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, **21**, 810-819.

Kobayashi T., Heck D. J., Nomura M., Horiuchi T. (1998) Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes & Development*, **12**, 3821-3830.

Kobayashi T., Horiuchi T., Tongaonkar P., Vu L., Nomura M. (2004) SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell*, **117**, 441-453.

Kolesnikova O., Back R., Graille M., Séraphin B. (2013) Identification of the Rps28 binding motif from yeast Edc3 involved in the autoregulatory feedback loop controlling RPS28B mRNA decay. *Nucleic Acids Research*, **41**, 9514-9523.

Komili S., Farny N. G., Roth F. P., Silver P. A. (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*, **131**, 557-571.

König P., Giraldo R., Chapman L., Rhodes D. (1996) The Crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell*, **85**, 125-136.

Koś M. and D. Tollervey (2010) Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Molecular Cell*, **37**, 809-820.

Kressler D., Hurt E., Baßler J. (2010) Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1803**, 673-683.

Kulkens T., van der Sande C. A. F. M., Dekker A. F., van Heerikhuizen H., Planta J. (1992) A system to study transcription by yeast RNA polymerase I within the chromosomal context: functional analysis of the ribosomal DNA enhancer and the RBP1/REB1 binding sites. *The EMBO Journal*, **11**, 4665-4674.

Lafontaine D. L. J. and Tollervey D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews*, **2**, 514-520.

- Lalo D.**, Steffan J. S., Dodd J. A., Nomura M. (1996) *RRN11* encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 21062-21067.
- Lascaris R. F.**, Mager W. H., Planta R. D. (1999) DNA-binding requirements of the yeast protein Rap1p as selected *in silico* from ribosomal protein gene promoter sequence. *Bioinformatics*, **15**, 267-277.
- Lascaris R. F.**, de Groot E., Hoen P., Mager W. H., Planta R. D. (2000) Different role for Abf1p and a T-rich promoter element in nucleosome organization of the yeast RPS28A gene. *Nucleic Acids Research*, **28**, 1390-1396.
- Lavoie H.**, Hogues H., Mallick J., Sellam A., Nantel A., Whiteway M. (2010) Evolutionary tinkering with conserved components of a transcriptional regulatory network. *PLOS Biology*, **8**, 1-12.
- Lee C.**, Shibata Y., Rao B., Strahl B. D., Lieb J. D. (2004) Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nature Genetics*, **36**, 900-905.
- Lee J.**, Moir R. D., Willis I. M. (2009) Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the Target of Rapamycin (TOR) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 12604-12608.
- Lee J.**, Evans C. F., Engelke D. R. (1991) Expression of RNase P RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by an unusual RNA polymerase III promoter. *Proceedings of the National Academy of Science*, **88**, 6986-6990.
- Lee T. I.**, Causton H. C., Holstege F. C. P., Shenk W., Hannett N., Jennings E. G., Winston F., Greenk M. R., Young R. A. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*, **405**, 701-704.
- Lee T. I.**, Rinaldi N. J., Robert F., Odom D. T., Bar-Joseph Z., Gerber G. K., Hannett N. M., Harbison C. T., Thompson C. M., Simon I., Zeitlinger J., Jennings E. G., Murray H. L., Gordon D. B., Ren B., Wyrick J. J., Tagne J., Volkert T. L., Fraenkel E., Gifford D. K., Young R. A. (2002) Transcriptional Regulatory Networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **298**, 799-804.
- Lee Y.**, Erkin A. M., Van Ryk D. I., Nazar R. N. (1995) *In vivo* analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **23**, 634-640.
- Lee Y.**, Wong W. M., Guyer D., Erkin A. M., Nazar R. N. (1997) *In Vivo* analyses of upstream promoter sequence elements in the 5 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, **269**, 676-683.
- Lempiäinen H.** and Shore D. (2009) Growth control and ribosome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, **21**, 855-863.
- Li B.**, Nierras C. R., Warner J. R. (1999) Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 5393-5404.

- Li H.**, Tsang C. K., Watkins M., Bertram P. G., Zheng X. F. S. (2006) Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature*, **442**, 1058-1061.
- Lieb J. D.**, Liu X., Botstein D., Brown P. O. (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps protein-DNA association. *Nature Genetics*, **28**, 327-334.
- Liko D.**, Slattery M. G., Heideman W. (2007) Stb3 binds to ribosomal RNA processing element motifs that control transcriptional responses to growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 26623-26628.
- Liko D.**, Conway M. K., Grunwald D. S., Heideman W. (2010) Stb3 plays a role in the glucose-induced transition from quiescence to growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **185**, 797-810.
- Lippman S. I.** and Broach J. R. (2009) Protein kinase A and TORC1 activate genes for ribosomal biogenesis by inactivating repressors encoded by Dot6 and its homolog Tod6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 19928-19933.
- Livak J.** and Schmittgen T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, **25**, 4020-408.
- Longtine M. S.**, Mckenzie III A., Demarini D. J., Shah N. G., Wach A., Brachat A., Philippsen P., Pringle J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Lopez A. D.**, Tar K., Krügel U., Dange T., Ros I. G., Schmidt M. (2011) Proteasomal degradation of Sfp1 contributes to the repression of ribosome biogenesis during starvation and is mediated by the proteasome activator Blm10. *Molecular Biology of the Cell*, **22**, 528-540.
- Lucioli A.**, Presutti C., Ciafré S., Caffarelli E., Frangapane P., Bozzoni I. (1988) Gene dosage alteration of L2 ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on ribosome synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, **8**, 4792-4798.
- Luscombe N. M.**, Austin S. E., Berman H. M., Thornton J. M. (2000) An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biology*, **1**, 1-37.
- Ma P.** and Xia X. (2011) Factors Affecting Splicing Strength of Yeast Genes. *Comparative and Functional Genomics*, **2011**, 1-13.
- Mager W. H.** and Planta R. J. (1990) Multifunctional DNA-binding proteins mediate transcription activation of yeast ribosomal protein genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1050**, 351-355.
- Mallick J.** and Whiteway M. (2013) The evolutionary rewiring of the ribosomal protein transcription pathway modifies the interaction of transcription factor heteromer Ifh1-Fhl1 (interacts with forkhead 1-forkhead-like 1) with the DNA-binding specificity element. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 17508-17519.

- Marion R. M.**, Regev A., Segal E., Barash Y., Koller D., Friedman N., O'Shea E. K. (2004) Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science*, **101**, 14315-14322.
- Martin D. E.**, Soulard A., Hall M. N. (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the forkhead transcription factor FHL1. *Cell*, **119**, 969-979.
- Marzouki N.**, Camier S., Ruet A., Moenne A., Sentenac A. (1986) Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor τ . *Nature*, **323**, 176-178
- Mavrich T. N.**, Ioshikhes I. P., Venters B. J., Jiang C., Tomsho L. P., Qi J., Schuster S. C., Albert I., Pugh B. F. (2008) A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Research*, **18**, 1073-1083.
- Mayán M. D.** (2013) RNAP-II transcribes two small RNAs at the promoter and terminator regions of the RNAP-I gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **30**, 25-32.
- Mayán M.** and Aragón L. (2010) Cis-interactions between non-coding ribosomal spacers dependent on RNAP-II separate RNAP-I and RNAP-III transcription domains. *Cell Cycle*, **9**, 4328-4337.
- Mayer A.**, Lidschreiber M., Siebert M., Leike K., Söding J., Cramer P. (2010) Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, **17**, 1272-1279.
- Maxwell E.S.** and Fournier M.J. (1995) The small nucleolar RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, **64**, 897-934.
- Mélèse T.** and Xue Z. (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**, 319-324.
- Melnikov S.**, Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, **19**, 560-567.
- Mencía M.**, Moqtaderi Z., Geisberg J. V., Kuras L., Struhl K. (2002) Activator-specific recruitment of TFIID and regulation of ribosomal protein genes in yeast. *Molecular Cell*, **9**, 823-833.
- Meskauskas A.** and Dinman J. D. (2007) Ribosomal Protein L3: Gatekeeper to the A Site. *Molecular Cell*, **25**, 877-888.
- Meskauskas A.** and Dinman J. D. (2010) A molecular clamp ensures allosteric coordination of peptidyltransfer and ligand binding to the ribosomal A-site. *Nucleic Acids Research*, **38**, 7800-7813.
- Merz K.**, Hondele M., Goetze H., Gmelch K., Stoeckl U., Griesenbeck J. (2008) Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes & Development*, **22**, 1190-1204.

Milkereit P. and Tschochner H. (1998) A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *The EMBO Journal*, **17**, 3692–3703.

Miller O. L. Jr. and Beatty B. R. (1969) Visualization of Nucleolar Genes. *Science*, **164**, 955-957.

Mitchell P., Petfalski E., Tollervey D. (1996) The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes & Development*, **10**, 502-513.

Miyake T., Loch C. M., Li R. (2002) Identification of a Multifunctional Domain in Autonomously Replicating Sequence-Binding Factor 1 Required for Transcriptional Activation, DNA Replication, and Gene Silencing. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 505-516.

Moir R. D., Lee J., Haeusler R. A., Desai N., Engelke D. R., Willis I. M. (2006) Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proceedings of the National Academy of Science*, **103**, 15044-15049.

Moqtaderi Z. and Struhl K. (2004) Genome-wide occupancy profile of the RNA polymerase III machinery in *Saccharomyces cerevisiae* reveals loci with incomplete transcription complexes. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 4118-4127.

Morrow B. E., Johnson S. P., Warner J. R. (1989) Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 9061-9068.

Morse R. H. (1999) RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. *Yeast biochemical genomics*, **16**, 51-53.

Moy T. I. and Silver P. A. (2002) Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *Journal of Cell Science*, **115**, 2985-2995.

Murawski M., Szcześniak B., Żołądec T., Hopper A. K., Martin N. C., Boguta M. (1994) *maf1* mutation alters the subcellular localization of the Mod5 protein in yeast. *Acta Biochimica Polonica*, **41**, 441-448.

Murugesapillai D., McCauley M. J., Huo R., Holte M. H. N., Stepanyants A., Maher L. J. III, Israeloff N. E., Mark C. Williams (2014) DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin. *Nucleic Acids Research*, **42**, 8996-9004.

Musters W., Knol J., Maas P., Dekker A. F., van Heerikhuizen H., Planta R. J. (1989) Linker scanning of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Research*, **17**, 9661-9678.

Mylona A., Fernández-Tornero C., Legrand P., Haupt M., Sentenac A., Acker J., Müller C. W. (2006) Structure of the $\tau 60/\Delta\tau 91$ subcomplex of yeast transcription factor IIIc: insights into preinitiation complex assembly. *Molecular Cell*, **24**, 221-232.

- Nakagawa S.**, Gisselbrecht S. S., Rogers J. M., Hartl D. L., Bulyk M. L. (2013) DNA-binding specificity changes in the evolution of forkhead transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Science*, **110**, 12349-12354.
- Neil H.**, Malabat C., d'Aubenton-Carafa Y., Xu Z., Steinmetz L. M., Jacquier A. (2008) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature*, **457**, 1038-1043.
- Nissen P.**, Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**, 920-930.
- Oakes M.**, Siddiqi I., Vu L., Aris J., Nomura M. (1999) Transcription factor UAF, expansion and contraction of ribosomal DNA (rDNA) repeats, and RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 8559-8569.
- Oakes M. L.**, Siddiqi I., French S. L., Vu L., Sato M., Aris J. P., Beyer A. L., Nomura M. (2006) Role of histone deacetylase Rpd3 in regulating rRNA gene transcription and nucleolar structure in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 3889-3901.
- Ofcjalaska-Pham D.**, Harismendy O., Smagowicz W. J., Gonzalez de Peredo A., Boguta M., Sentenac A., Lefebvre O. (2006) General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Molecular Cell*, **22**, 623-632.
- Ogle J. M.** and Ramakrishnan V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annual review of Biochemistry*, **74**, 129-177.
- Ogle J. M.**, Brodersen D. E., Clemons W. M. Jr., Tarry M. J., Carter A. P., Ramakrishnan V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**, 897-902.
- Oler A. J.** and Cairns B. R. (2012) PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *The EMBO Journal*, **31**, 1440-1452.
- Orioli A.**, Pascali C., Pagano A., Teichmann M., Dieci G. (2012) RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*, **493**, 185-194.
- Osheim Y. N.**, French S. L., Keck K. M., Champion E. A., Spasov K., Dragon F., Baserga S. J., Beyer A. N. (2004) Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, **16**, 943-954.
- Parenteau J.**, Durand M., Morin G., Gagnon J., Lucier J., Wellinger R. J., Chabot B., Elela S. A. (2011) Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell*, **147**, 320-331.
- Pelczar P.** and Filipowicz W. (1998) The host gene for intronic U17 small nucleolar RNAs in mammals has no protein-coding potential and is a member of the 59-terminal oligopyrimidine gene family. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 4509-4518.

Pelechano V., Wei W., Steinmetz L. M. (2013) Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature*, **497**, 127-133.

Pelham H. R. B. and Brown D. D. (1980) A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Science*, **77**, 4170-4174.

Pertschy B., Schneider C., Gnädig M., Schäfer T., Tollervey D., Hurt E. (2009) RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 35079-35091.

Petes T. D. (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proceedings of the National Academy of Science*, **76**, 410-414.

Peyroche G., Milkereit P., Bischler N., Tschochner H., Schultz P., Sentenac A., Carles C., Riva M. (2000) The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *The EMBO Journal*, **19**, 5473-5482.

Philippi A., Steinbauer R., Reiter A., Fath S., Leger-Silvestre I., Milkereit P., Griesenbeck J., Tschochner H. (2010) TOR-dependent reduction in the expression level of Rrn3p lowers the activity of the yeast RNA Pol I machinery, but does not account for the strong inhibition of rRNA production. *Nucleic Acids Research*, **38**, 5315-5326.

Philipsen P., Thomas M., Kramer R. A., Davis R. W. (1978) Unique arrangement of coding sequences for 5 S, 5.8 S, 18 S and 25 S ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R-loop and hybridization analysis. *Journal of Molecular Biology*, **123**, 387-404.

Piekna-Przybylska D., Decatur W. A., Fournier M. J. (2007) New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA. *RNA*, **13**, 305-312.

Piña B., Fernández-Larre J., García-Reyero N., Idrissi . Z. (2003) The different (sur)faces of Rap1p. *Molecular Genetics & Genomics*, **268**, 791-798.

Planta R. J. (1997) Regulation of ribosome synthesis in yeast. *Yeast*, **13**, 1505-1518.

Planta R. J. and Mager W. H. (1998) The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 471-477.

Pluta K., Lefebvre O., Martin N. C., Smagowicz W. J., Stanford D. R., Ellis S. R., Hopper A. K., Sentenac A., Boguta M. (2001) Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 5031-5040.

Pöll G., Braun T., Jakovljevic J., Neueder A., Jakob S., Woolford J. L. Jr., Tschochner H., Milkereit P. (2009) rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. *PLoS ONE*, **4**, 1-13.

Poss Z. C., Ebmeier C. C., Taatjes D. J. (2013) The Mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **48**, 575-608.

- Presutti C.**, Ciafré S. A., Bozzoni I. (1991) The ribosomal protein L2 in *S. cerevisiae* controls the level of accumulation of its own mRNA. *The MBO Journal*, **10**, 2215-2221.
- Preti M.**, Ribeyre C., Pascali C., Bosio M. C., Cortelazzi B., Rougemont J., Guarnera E., Naef F., Shore D., Dieci G. (2010) The telomere-binding protein Tbf1 demarcates snoRNA gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, **38**, 614-620.
- Qu L.**, Henras A., Lu Y., Zhou H., Zhou W., Zhu Y., Zhao J., Henry Y., Caizergues-Ferrer M., Bachellerie J. (1999) Seven Novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 1144-1158.
- Reeder R. H.**, Guevara P., Roan J. G. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 7369-7376.
- Reid J. L.**, Iyer V. R., Brown P. O., Struhl K. (2000) Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Molecular Cell*, **6**, 1297-1307.
- Reiter A.**, Hamperl S., Seitz H., Merkl P., Perez-Fernandez J., Williams L., Gerber J., Németh A., Léger I., Gadal O., Milkereit P., Griesenbeck J., Tschochner J. (2012) The Reb1-homologue Ydr026c/Nsi1 is required for efficient RNA polymerase I termination in yeast. *The EMBO Journal*, **31**, 3480-3493.
- Remacha M.**, Jimenez-Diaz A., Bermejo B., Rodriguez-Gabriel M. A., Guarinos E., Ballesta J. P. G. (1995) Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 4754-4762.
- Rhee H. S.** and Pugh B. F. (2011) Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell*, **147**, 1408-1419.
- Rhee H. S.** and Pugh B. F. (2012) Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*, **483**, 295-301.
- Roberts D. N.**, Wilson B., Huff J. T., Stewart A. J., Cairns B. R. (2006) Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression. *Molecular Cell*, **22**, 633-644.
- Rockel S.**, Geertz M., Maerkl S. J. (2012) MITOMI: a microfluidic platform for *in vitro* characterization of transcription factor-DNA interaction. *Methods in Molecular Biology*, **786**, 97-114.
- Rohde J. R.** and Cardenas M. E. (2003) The Tor pathway regulates gene expression by linking nutrient sensing to histone acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 629-635.
- Rosado I. V.**, Kressler D., de la Cruz J. (2007) Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. *Nucleic Acids Research*, **35**, 4203-4213.

Rowland O. and Segall J. (1998) A hydrophobic segment within the 81-amino-acid domain of TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* is essential for its transcription factor activity. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 420-432.

Rudra D. and Warner J. R. (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes & Development*, **18**, 2431–2442.

Rudra D., Zhao Y., Warner J. R. (2005) Central role of Ifh1p-Fhl1p interaction in the synthesis of yeast ribosomal proteins. *The EMBO Journal*, **24**, 533-542.

Rudra D., Mallick J., Zhao Y., Warner J. R. (2007) Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 4815-4824.

Santos C. and Ballesta J. P. G. (2005) Characterization of the 26S rRNA-binding domain in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk phosphoprotein P0. *Molecular Microbiology*, **58**, 217-226.

Sayani S., Janis M., Lee C. Y., Toesca I., Chanfreau G. F. (2008) Widespread impact of nonsense-mediated mRNA decay on the yeast intronome. *Molecular Cell*, **31**, 360-370.

Saïda F. (2008) Structural characterization of the interaction between TFIIIB components Bdp1 and Brf1. *Biochemistry*, **47**, 13197-13206.

Sandmeier J. J., French S., Osheim Y., Cheung W. L., Gallo C. M., Beyer A. L., Smith J. S. (2002) RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *The EMBO Journal*, **21**, 4959-4968.

Schawaldner S. B., Kabani M., Howald I., Choudhury U., Werner M., Shore D. (2004) Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature*, **432**, 1058-1061.

Shirai A., Matzuyama A., Yashiroda Y., Hashimoto A., Kawamura Y., Arai R., Komatsu Y., Horinouchi S., Yoshida M. (2008) Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 10745-10752.

Schmidt T. G. M. and Arne Skerra (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols*, **2**, 1528-1535.

Schmeing T. M. and Ramakrishnan V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, **461**, 1234-1242.

Schneider D. A. (2012) RNA polymerase I activity is regulated at multiple steps in the transcription cycle: recent insights into factors that influence transcription elongation. *Gene*, **493**, 176-184.

Schramm L. and Hernandez N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development*, **16**, 2593-2620.

- Segal E.**, Fondufe-Mittendorf Y., Chen L., Thåström A., Field Y., Moore I. K., Wang J. Z., Widom J. (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, **442**, 772-778.
- Segal E.** and Widom J. (2009) Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Current Opinion in Structural Biology*, **19**, 65-71.
- Seizl M.**, Hartmann H., Hoeg F., Kurth F., Martin D. E., Söding J., Cramer P. (2011) A conserved GA element in TATA-less RNA polymerase II promoters. *PLoS ONE*, **6**, 1-8.
- Sengupta J.**, Bussiere C., Pallesen ., West M., Johnson A. W., Frank J. (2010) Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. *Journal of Cell Biology*, **189**, 1079-1086.
- Shore D.** and Nasmyth K. (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, **51**, 721-732.
- Shore D.** (1994) RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends in Genetics*, **11**, 408-412.
- Shou W.**, Seol J. H., Shevchenko A., Baskerville C., Moazed D., Chen Z. W. S. (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*, **97**, 233-244.
- Shou W.**, Sakamoto K. M., Keener J., Morimoto K. W., Traverso E. E., Azzam R., Hoppe G. J., Feldman R. M. R., DeModena J., Moazed D., Charbonneau H., Nomura M., Deshaies R. J. (2001) Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Molecular Cell*, **8**, 45-55.
- Siddiqi I. M.**, Dodd J. A., Vu L., Eliason K., Oakes M. L., Keener J., Moore R., Young M. K., Nomura M. (2001) Transcription of chromosomal rRNA genes by both RNA polymerase I and II in yeast *uaf30* mutants lacking the 30 kDa subunit of transcription factor UAF. *The EMBO Journal*, **20**, 4512-4521.
- Simonović M.** and Steitz T. A. (2009) A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1789**, 612-623.
- Sinclair D. A.** and Guarente L. (1997) Extrachromosomal rDNA Circles—A Cause of Aging in Yeast. *Cell*, **91**, 1033-1042.
- Singh J.** and Tyers M. (2009) A Rab escort protein integrates the secretion system with TOR signaling and ribosome biogenesis. *Genes & Development*, **23**, 1944-1958.
- Smale S. T.** (2001) Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes & Development*, **15**, 2503-2508.
- Smale S. T.** and Kadonaga J. T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*, **72**, 449-479.
- Spingola M.**, Grate L., Haussler D., Ares M. Jr. (1999) Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, **5**, 221-234.

- Stage-Zimmermann T.**, Schmidt U., Silver P. A. (2000) Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit *in vivo*. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 3777-3789.
- Staley J. P.** and Woolford J. L. Jr. (2009) Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Current Opinion in Cell Biology*, **21**, 109-118.
- Steffan J. S.**, Keys D. A., Dodd J. A., Nomura M. (1996) The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes & Development*, **10**, 2551-2563.
- Steffen K. K.**, McCormick M. A., Pham K. M., MacKay V. L., Delaney J. R., Murakami C. J., Kaeberlein M., Kennedy B. K. (2012) Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **191**, 107-118.
- Straight A. F.**, Shou W., Dowd G. J., Turck C. W., Deshaies R. J., Johnson A. D., Moazed D. (1999) Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell*, **97**, 245-256.
- Strunk B. S.**, Loucks C. R., Su M., Vashisth H., Cheng S., Schilling J., Brooks C. L. III, Karbstein K., Skiniotis G. (2011) Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science*, **333**, 1449-1453.
- Swamy K. B. S.**, Cho C., Chiang S., Tsai Z. T., Tsai H. (2009) Impact of DNA-binding position variants on yeast gene expression. *Nucleic Acids Research*, **37**, 6991-7001.
- Swamy K. B. S.**, Chu W., Wang C., Tsai H., Wang D. (2011) Evidence of association between nucleosome occupancy and the evolution of transcription factor binding sites in yeast. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 1-10.
- Synetos D.**, Frantzioua C. P., Alksneb E. (1996) Mutations in yeast ribosomal proteins S28 and S4 affect the accuracy of translation and alter the sensitivity of the ribosomes to paromomycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, **1309**, 156-166.
- Tanay A.**, Regev A., Shamir R. (2005) Conservation and evolvability in regulatory networks: the evolution of ribosomal regulation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science*, **102**, 7203-7208.
- Tavenet A.**, Suleau A., Dubreuil G, Ferrari R., Ducrot C., Michaut M., Aude J., Dieci G., Lefebvre O., Conesa C., Acker J. (2009) Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription. *Proceedings of the National Academy of Science*, **106**, 14265-14270.
- Thiry M.** and Lafontaine D. L. J. (2005) Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *TRENDS in Cell Biology*, **15**, 194-199.
- Thompson J. D.**, Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882.

- Tirosh I.**, Berman J., Barkai N. (2007) The pattern and evolution of yeast promoter bendability. *TRENDS in Genetics*, **23**, 318-321.
- Tirosh I.** and Barkai N. (2008) Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Research*, **18**, 1084-1091.
- Tongaonkar P.**, French S. R., Oakes M. L., Vu L., Schneider D. A., Beyer A. L., Nomura M. (2005) Histones are required for transcription of yeast rRNA genes by RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Science*, **102**, 10129-10134.
- Tschochner H.** and Hurt E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *TRENDS in Cell Biology*, **13**, 255-263.
- Turowski T. W.** and Tollervey D. (2014) Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *WIREs RNA*, **6**, 129-139.
- Tycowski K. T.** and Steitz J. A. (2001) Non-coding snoRNA host genes in *Drosophila*: expression strategies for modification guide snoRNAs. *European Journal of Cell Biology*, **80**, 119-125.
- Upadhyaya R.**, Lee J., Willis I. M. (2002) Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Molecular Cell*, **10**, 1489-1494.
- Vannini A.**, Ringel R., Kusser A. G., Berninghausen O., Kassavetis G. A., Cramer P. (2010) Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*, **143**, 59-70.
- Velculescu V. E.**, Zhang L., Zhou W, Vogelstein J., Basrai M. A., Bassett D. E. Jr., Hieter P., Vogelstein B., Kinzler K. W. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, **88**, 243-251.
- Venema J.** and Tollervey D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, **33**, 261-311.
- Vu L.**, Siddiqi I., Lee B., Josaitis C., Nomura M. (1999) RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA: role of transcription factor UAF (upstream activation factor) in silencing rDNA transcription by RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Science*, **96**, 4390-4395.
- Wade C.**, Shea K. A., Jensen R. V., McAlear M. A. (2001) EBP2 is a member of the yeast RRB regulon, a transcriptionally coregulated set of genes that are required for ribosome and rRNA biosynthesis. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 8638-8650.
- Wade J. T.**, Hall D. B., Struhl K. (2004) The transcription factor Ifh1 is a key regulator of yeast ribosomal protein genes. *Nature*, **432**, 1054-1058.
- Wade C. H.**, Umbarger M. A., McAlear M. A. (2006) The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. *Yeast*, **23**, 293-306.

- Wai H.**, Johzuka K., Vu L., Eliason K., Kobayashi T., Horiuchi T., Nomura M. (2001) Yeast RNA polymerase I enhancer is dispensable for transcription of the chromosomal rRNA gene and cell growth, and its apparent transcription enhancement from ectopic promoters requires Fob1 protein. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 5541-5553.
- Wang C. K.** and Weil P. A. (1989) Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIA. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 1092-1099.
- Warner J. R.** (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**, 437-40.
- Warner J. R.** and McIntosh K. B. (2009) How common are extra-ribosomal functions of ribosomal proteins? *Molecular Cell*, **34**, 3-11.
- Wei Y.**, Tsang C. K., Zheng X. F. S. (2009) Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *The EMBO Journal*, **28**, 2220-2230.
- Weigel D.**, Jürgens G., Küttner F., Seifert E., Jlicke H. (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*, **57**, 645-658.
- Willis I. M.** (1993) RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *European Journal of Biochemistry*, **212**, 1-11.
- Willis I. M.**, Desai N., Upadhy R. (2004) Signaling repression of transcription by RNA polymerase III in yeast. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **77**, 323-53.
- Wittner M.**, Hamperl S., Stöckl U., Seufert W., Tschochner H., Milkereit P., Griesenbeck J. (2011) Establishment and maintenance of alternative chromatin states at a multicopy gene locus *Cell*, **145**, 543-554.
- Woolford J. L. Jr.**, Baserga S. J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **195**, 643-681.
- Wray G. A.**, Hahn M. W., Abouheif E., Balhoff J. P., Pizer M., Rockman M. V., Romano L. A. (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1377-1419.
- Wright P. E.** and Dyson H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology*, **293**, 321-331.
- Xue S.** and Barna M. (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Reviews*, **13**, 355-369.
- Yamamoto R. T.**, Nogil Y., Dodd J. A., Nomura M. (1996) *RRN3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *The EMBO Journal*, **15**, 3964-3973.

- Yamashita R.**, Suzuki Y., Takeuchi N., Wakaguri H., Ueda T., Sugano S., Nakai K. (2008) Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucleic Acids Research*, **36**, 3707-3715.
- Yarragudi A.**, Miyake T., Li R., Morse R. H. (2004) Comparison of ABF1 and RAP1 in chromatin opening and transactivator potentiation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 9152-9164.
- Yarragudi A.**, Parfrey L. W., Morse R. H. (2007) Genome-wide analysis of transcriptional dependence and probable target sites for Abf1 and Rap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **35**, 193-202.
- Yuan G.**, Liu Y., Dion M. F., Slack M. D., Wu L. F., Altschuler S. J., Rando O. J. (2005) Genome-Scale Identification of Nucleosome Positions in *S. cerevisiae*. *Science*, **309**, 626-630.
- Zawadzki K. A.**, Morozov A. V., Broach J. R. (2009) Chromatin-dependent transcription factor accessibility rather than nucleosome remodeling predominates during global transcriptional restructuring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 3503-3513.
- Zaher H. S.** and Green R. (2009) Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell*, **136**, 746–762.
- Zeevi D.**, Sharon E., Lotan-Pompan M., Lubling Y., Shipony Z., Raveh-Sadka T., Keren L., Levo M., Weinberger A., Segal E. (2011) Compensation for differences in gene copy number among yeast ribosomal proteins is encoded within their promoters. *Genome Research*, **21**, 1-16.
- Zhang J.**, Vingron M., Roepcke S. (2008) Characteristic differences between the promoters of intron-containing and intronless ribosomal protein genes in yeast. *BMC Research Notes*, **109**, 1-16.
- Zhang Y.**, Smith A. D. IV, Renfrow M. B., Schneider D. A. (2010) The RNA polymerase-associated factor 1 complex (Paf1C) directly increases the elongation rate of RNA polymerase I and is required for efficient regulation of rRNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 14152-14159.
- Zhao Y.**, McIntosh K. B., Rudra D., Schawalter S., Shore D., Warner J. R. (2006) Fine-structure analysis of ribosomal protein gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 4853-4862.
- Zhu C.**, Byers K. J. R. P., McCord R. P., Shi Z., Berger M. F., Newburger D. E., Saulrieta K., Smith Z., Shah M. V., Radhakrishnan M., Philippakis A. A., Hu Y., De Masi F., Pacek M., Rolfs A., Murthy T., LaBaer J., Bulyk M. L. (2009) High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Research*, **19**, 556-566.

APPENDICE

Publicazioni

Dieci G., Bosio M.C., Fermi B., Ferrari R. (2013). Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, **1829**, 331–341.

Dieci G., Fermi B., Bosio M.C. (2014) Investigating transcription reinitiation through *in vitro* approaches. *Transcription*, 5:1, e27704, DOI: 10.4161/trns.27704.

Fermi B., Bosio M.C., Dieci G. (2015). Promoter architecture and transcriptional activation of Rap1-independent ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Manuscript in preparation.**

Bosio M.C., Fermi B., Spagnoli G., Ferrari R., Pellegrini M., Dieci G. (2015). Transcriptional activation of ribosome biogenesis genes by Abf1 and other multifunctional global regulators in *Saccharomyces cerevisiae*. **Manuscript in preparation.**

Le pubblicazioni prodotte nel corso del Dottorato comprendono oltre a quella attualmente in preparazione relativa al progetto di ricerca principale su cui verte la presente tesi (Fermi *et al.*, 2015), un manoscritto anch'esso attualmente in preparazione relativo ad un altro progetto sperimentale a cui è stata fornita una fattiva collaborazione, e due *reviews*: tutti gli articoli sono relativi a differenti aspetti chiave della trascrizione genica negli eucarioti.

Il lavoro di Bosio e collaboratori, in particolare, è strettamente correlato al progetto principale descritto in questa tesi: mediante l'iniziale analisi filogenetica delle sequenze, i successivi saggi di ChIP-qPCR e la valutazione dei livelli di espressione genica in mutanti genomici del promotore, questo studio ha portato alla luce il coinvolgimento di Abf1 e di altri GRF nella regolazione dei geni *ribi* in *Saccharomyces cerevisiae*.

La review "Transcription reinitiation by RNA polymerase III" ha fornito un quadro esaustivo della attuali conoscenze relative al fenomeno noto come reinizio trascrizionale. In questo lavoro sono stati forniti numerosi esempi di fattori trascrizionali che rimangono stabilmente associati al promotore dei geni attivamente trascritti per assicurare, a seguito di un iniziale evento trascrizionale relativamente lento, successivi cicli multipli di trascrizione facilitata, che avvengono con una rapidità nettamente maggiore. È stato inoltre messo in evidenza come questo fenomeno, ampiamente caratterizzato e particolarmente significativo per il sistema trascrizionale della RNA Polimerasi III, sia effettivamente condiviso anche dai sistemi della Pol I e della Pol II e rappresenti in molti casi un importante punto di controllo

della trascrizione, regolato da diversi *pathway* di segnalazione che contribuiscono alla coordinazione dell'espressione genica con la crescita cellulare.

Nella successiva review "Investigating transcription reinitiation through *in vitro* approaches" è stata effettuata una panoramica dei numerosi approcci messi a punto per lo studio dei sistemi trascrizionali eucariotici *in vitro*, il cui impiego ha permesso di ottenere le importanti evidenze sperimentali che hanno fornito un contributo determinante alla comprensione dei meccanismi molecolari sottesi al reinizio trascrizionale e alla sua regolazione.

Last, but not least....

Dopo aver riempito decine e decine di pagine con rigorose e razionali considerazioni scientifiche, è arrivato il momento di lasciarmi andare ad un po' di sano sentimentalismo. È arrivato il momento dei doverosi ringraziamenti a tutti coloro che mi hanno permesso di arrivare in fondo a questa "impresa".

Innanzitutto, grazie al Prof. Dieci, che mi ha dato la possibilità di fare questa questa grande esperienza, e di crescere come persona e come ricercatrice (mi si permetta questa licenza poetica!). Questi tre anni mi hanno fatto comprendere a fondo la passione che nutro per lo studio e per la ricerca, aiutandomi a capire qual'è il cammino che mi piacerebbe intraprendere. Grazie anche a tutti i colleghi del Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare, che durante questo Dottorato è stata la mia seconda (..quasi prima) casa.

Grazie a mamma e papà, che sono la mia forza, e che incarnano alla perfezione gli ideali di amore, di rispetto, di onestà e di impegno che mi fanno da guida nella vita di ogni giorno. Se mai avrò figli, mi auguro di poter essere per loro l'esempio che voi siete per me.

Un grazie a Fede, che è diventato un uomo senza che neanche me ne accorgessi e che sempre più spesso mi stupisce con la sua saggezza e maturità. A te, che tra pochi mesi intraprenderai un nuovo percorso, dedico questo pensiero, frutto di ciò che io stessa ho sperimentato: realizza i progetti che desideri davvero, perché perseguire un obiettivo comporta sempre sacrifici, ma il fardello della fatica è più leggero, se lungo la strada puoi dedicarti a ciò che ti piace.

Un grazie ai nonni, a cui ho dedicato questo frutto delle mie fatiche: una dedica che vuole essere un modo per dirvi quanto vi sono grata per l'amore e gli insegnamenti che mi avete donato.

Grazie agli zii, a Vale, ad Ale e a Melissa: è davvero bello sapere di essere parte di una grande famiglia allargata, che condivide profondamente gioie e dolori di ogni suo membro: la gioia è più grande, quando condivisa, e il dolore meno difficile da affrontare.

Grazie agli Amici con la A maiuscola, forse pochi ma sicuramente buoni, che mi sono sempre accanto, mi sostengono, capiscono le mie stranezze e mi vogliono bene per ciò che sono.

Un ringraziamento va anche alla nuova famiglia di cui entrerò a far parte ufficialmente solo tra qualche mese, ma che mi ha accolta a braccia aperte sin dal principio: grazie ad Elisa, a

Mauro e soprattutto ad Antonella, che con i suoi preziosi manicaretti ci ha salvati più volte dall'andare a letto senza cena!

È arrivato il momento di dire grazie a te, Nick. Potrà sembrare strano, ma questi sono proprio i ringraziamenti più difficili da scrivere. Come ringraziarti per tutto ciò che fai e per tutto ciò che sei per me? Compagno, amico, collega. Grazie a te, che mi hai sostenuto in questi tre anni Dottorato, dai giorni del faticoso studio in preparazione al concorso, fino a questo mese di scrittura matta e disperatissima della tesi. Grazie a te, che ogni giorno ti prendi cura di me e mi stai accanto, con pazienza e con amore. Grazie a te, che condividi con me l'amore per il nostro lavoro, la passione per la cucina e per il vino, la curiosità del viaggio e della scoperta di luoghi sempre nuovi. Grazie a te, che più di chiunque altro mi capisci. Tre anni fa ci siamo incamminati insieme lungo una strada che ci porterà chissà dove, all'inseguimento dei nostri sogni...una strada lungo la quale avremo sempre la certezza di proseguire fianco a fianco, sicuri di poter contare l'uno sull'altro.

Questa è davvero la fine, perciò ora..... KEEP CALM AND ORGANIZE WEDDING!!

