

Dottorato di ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare
XXV ciclo

**Regolazione trascrizionale della biogenesi
dei ribosomi in *Saccharomyces cerevisiae*:
geni per snoRNA e geni “*ribi*”**

Maria Cristina Bosio
Dipartimento di Bioscienze
Università degli Studi di Parma

Coordinatore del Corso:
Prof. Andrea Mozzarelli

Tutor:
Prof. Giorgio Dieci

2010-2012

Sommario

Introduzione generale	3
1. Il cuore della sintesi proteica, il Ribosoma	3
2. Biogenesi dei Ribosomi in <i>S. cerevisiae</i> : principi generali ed energetica.....	5
3. Promotori dei geni trascritti dalla RNA Polimerasi I e III.....	7
Organizzazione genica del locus per gli rRNA	7
Elementi di controllo della trascrizione della RNA Polimerasi I	8
Elementi di controllo della trascrizione della RNA Polimerasi III	11
4. Elementi di controllo della trascrizione della RNA Polimerasi II	15
I “General Regulatory Factors”	19
5. Promotori dei geni trascritti dalla RNA polimerasi II coinvolti nella biogenesi dei ribosomi	21
Geni codificanti per le proteine ribosomiali	21
Parte I: Regolazione trascrizionale dei geni <i>ribi</i>	27
Introduzione.....	29
Scopo.....	35
Risultati e Discussione	37
Conclusioni	71
Materiali e Metodi	73
Parte II: Regolazione trascrizionale dei geni per snRNA	91
Introduzione.....	93
Scopo.....	101
Risultati e Discussione	103
Conclusioni	117
Materiali e Metodi	119
Bibliografia	135
Appendice.....	153

1. Il cuore della sintesi proteica, il Ribosoma

Uno dei processi fondamentali per la vita di tutti gli organismi è la traduzione delle istruzioni genetiche, contenute nelle triplette nucleotidiche degli RNA messaggeri (mRNAs), nella sequenza amminoacidica delle proteine. Questo compito è svolto dai ribosomi, complessi macromolecolari asimmetrici formati da due subunità ribonucleoproteiche di dimensioni differenti, costituite ciascuna da una o più molecole di RNA ribosomiale (rRNA) e da numerose proteine (proteine ribosomiali, o r-proteins). Malgrado queste siano in numero molto maggiore rispetto agli rRNA, contribuiscono solo per circa il 50% alla massa del ribosoma, essendo per la maggior parte di piccole dimensioni (la massa molecolare media delle r-proteins batteriche è di 15 kDa) mentre gli RNA ribosomiali sono grandi e determinano in buona parte la forma di ciascuna subunità (Lafontaine and Tollervey, 2001). La struttura e la funzione dei ribosomi sono universalmente conservate, sebbene il numero e la lunghezza degli rRNA e delle r-proteins in ciascuna subunità (e, conseguentemente, la massa del ribosoma) varino sia tra procarioti ed eucarioti, sia tra le diverse specie. Nei batteri, il ribosoma, caratterizzato da un coefficiente di sedimentazione di 70S, ha una massa di ~2.5 MDa e la sua subunità maggiore (50S) è costituita da due molecole di RNA ribosomiale (5S, 23S) e da 34 proteine, mentre la sua subunità minore (30S) comprende un solo rRNA (16S) e 21 proteine.

Nell'eucariote unicellulare *Saccharomyces cerevisiae*, invece, la subunità maggiore (60S) del ribosoma (80S), contiene tre molecole di RNA ribosomiale (25S, 5.8S e 5S) e 46 proteine, mentre la minore (40S) consta di una molecola di RNA ribosomiale (18S) e 33 proteine. Con una massa totale di 3,3 MDa, il ribosoma eucariotico è circa il 40% più grande rispetto a quello procariotico e mostra una maggiore complessità. Ciò è dovuto non solo alla presenza di una molecola di RNA in più e alle 25 proteine che non hanno omologhi negli eubatteri, ma anche alla maggiore lunghezza sia degli rRNA sia delle proteine conservate. Rispetto ai corrispettivi batterici, infatti, gli RNA ribosomiali eucariotici e le proteine ribosomiali eucariotiche presentano elementi aggiuntivi localizzati prevalentemente nel "core" evolutivamente conservato degli rRNA e alle estremità N- e C-terminali delle proteine. Il ruolo di queste porzioni addizionali non è noto ma alcune osservazioni suggeriscono che contribuiscano ad aumentare il numero delle interazioni all'interno del ribosoma, stabilizzandone la struttura e favorendone il meccanismo d'azione, e a incrementare la

superficie totale disponibile per l'interazione con altre molecole. In effetti, il maggior grado di complessità dell'architettura del ribosoma eucariotico si accompagna a un incremento del numero di proteine "extra-ribosomiali" con cui interagisce e alla varietà di processi nel quale esso o le sue subunità giocano un ruolo importante. Ne sono un esempio il fenomeno di "non-sense mediated decay" e i vari meccanismi di regolazione della traduzione (Ben-Shem et al.).

Come già accennato, la funzione principale dei ribosomi è rappresentata dalla sintesi proteica; essi infatti sono i responsabili della formazione del legame peptidico tra aminoacidi successivi. Entrambe le subunità, seppur con ruoli differenti, sono necessarie per lo svolgimento di questo processo poiché insieme concorrono a formare i 3 siti di legame al tRNA: il sito A, a cui si lega il tRNA amminoacilato recante l'amminoacido che deve essere aggiunto alla catena polipeptidica in crescita; il sito P, dove è legato il peptidil-tRNA; e il sito E, ospitante il tRNA scarico che deve essere rilasciato a seguito del trasferimento della catena polipeptidica nascente all'amminoacil-tRNA. In particolare, la subunità minore contiene il centro di decifrazione dove avviene l'appaiamento tra gli anticodoni dei tRNA e i codoni dell'mRNA, interazione che determina l'ordine degli aminoacidi nella proteina sintetizzata. La subunità maggiore, invece, contiene il centro peptidil-trasferasico da cui viene catalizzata la formazione del legame peptidico tra un aminoacido e quello successivo. Sia il sito di decifrazione che quello peptidil-trasferasico sono nascosti all'interno del ribosoma e sono collegati all'esterno da tre canali, due nella subunità minore e uno in quella maggiore. I primi due permettono, rispettivamente, l'ingresso e l'uscita dell'mRNA che, date le dimensioni dei due canali, deve essere in forma distesa per passare attraverso di essi; il terzo, invece, permette la fuoriuscita della catena polipeptidica nascente. Questo canale ha dimensioni che limitano i ripiegamenti della catena proteica in crescita che, pertanto, può formare solo α -eliche. Tutti gli altri tipi di ripiegamento, invece, possono avvenire dopo l'uscita del polipeptide dal canale (Steitz, 2008).

Come evidenziato da studi cristallografici, i ribosomi possono essere considerati ribozimi, in quanto l'RNA ribosomiale non solo svolge una funzione strutturale, ma è direttamente responsabile dell'attività catalitica. In ciascuna subunità gli RNA formano il "core" centrale, dove si localizza il sito attivo del ribosoma, mentre le proteine sono situate per lo più all'esterno, nella porzione esposta al solvente, e alla periferia dell'interfaccia tra le due

subunità (Lafontaine and Tollervey, 2001). La maggior parte di esse presenta lunghe e strette estensioni di residui basici che si avvolgono attorno agli RNA stabilizzandone la struttura secondaria e terziaria. La loro funzione principale sembra quindi quella di stabilizzare gli rRNA altamente addensati, riducendo la repulsione tra le cariche negative dei fosfati, e di mediare le interazioni del ribosoma con altre molecole che ne regolano la sintesi e la funzione.

2. Biogenesi dei Ribosomi in *S. cerevisiae*: principi generali ed energetica

La biogenesi dei ribosomi è un processo molto complesso e articolato che in *S. cerevisiae*, come in tutti gli eucarioti, avviene per la maggior parte nel nucleolo, un compartimento specializzato del nucleo, e nel citoplasma. Il nucleolo è la sede della trascrizione dei geni per gli rRNA e dei primi passaggi di maturazione delle particelle ribosomiali. Il processo inizia con la sintesi di precursori degli rRNA (pre-rRNA) che, successivamente, subiscono diverse tappe di processamento e modificazioni covalenti, quali la 2'-*O*-metilazione e la pseudouridilazione, ad opera di varie endo- ed eso-ribonucleasi e di complessi ribonucleoproteici. Contemporaneamente avviene anche l'assemblaggio dei pre-rRNA con la maggior parte delle proteine ribosomiali, che determina la formazione dei precursori delle due subunità (pre-40S e pre-60S). Essi vengono quindi esportati nel citoplasma dove si conclude il loro processo di maturazione con l'associazione di ulteriori proteine ribosomiali, l'assemblaggio delle due subunità e il rilascio dei numerosi fattori che hanno partecipato al processo di maturazione (Venema and Tollervey, 1999) (Granneman and Baserga, 2004).

In cellule di lievito in rapida crescita ci sono circa 200000 ribosomi per cellula e il tempo di generazione di questi complessi ribonucleoproteici è stato stimato essere di 2000 ribosomi per min. L'intero processo coinvolge più di 750 unità trascrizionali e richiede l'attività coordinata delle tre RNA polimerasi. La RNA polimerasi I è responsabile della trascrizione delle 150 copie, trascrizionalmente attive, dei geni codificanti per il precursore degli rRNA 25S, 18S e 5.8S (pre-rRNA 35S); la RNA polimerasi II interviene nella trascrizione dei 138 geni codificanti per le 79 proteine ribosomiali, di 76 dei 77 geni codificanti per snoRNA e dei geni che codificano per le proteine coinvolte nella biogenesi dei ribosomi (indicati nel complesso come "*ribi genes*"); infine la RNA polimerasi III trascrive l'rRNA 5S e lo snoRNA snR52 (oltre, naturalmente, a tutti i tRNA, anch'essi componenti fondamentali dell'apparato

di sintesi proteica). In cellule in rapida crescita, l'rRNA costituisce circa l'80% dell' RNA trascritto, la trascrizione Pol I rappresenta il 60% della trascrizione totale della cellula e circa il 50% delle RNA polimerasi II sono ingaggiate nella sintesi dei messaggeri per le proteine ribosomiali, 20 dei quali sono tra i 30 mRNA più abbondanti (Velculescu et al., 1997; Warner, 1999). La biogenesi del ribosoma rappresenta quindi la principale fonte di consumo dell'energia cellulare e richiede pertanto una regolazione molto fine e coordinata del processo, in accordo con le esigenze cellulari, gli stimoli intra- ed extracellulari e il principio generale di risparmio energetico. Il controllo della biogenesi si articola in due livelli: una macroregolazione, necessaria per rendere il processo adeguato alle necessità della cellula, e una microregolazione, essenziale per garantire una sintesi bilanciata dei diversi componenti che devono essere presenti in quantità stechiometriche. In generale, mentre nei batteri e nei vertebrati la sintesi dei ribosomi, in particolare quella delle proteine ribosomiali, è regolata principalmente a livello traduzionale, in *S. cerevisiae* il controllo avviene per lo più a livello trascrizionale (Warner, 1999). I differenti elementi regolativi presenti nei promotori dei diversi geni coinvolti nella biogenesi dei ribosomi garantiscono sia elevati livelli di espressione in condizioni normali, sia la possibilità di modulare finemente e in modo coordinato tali livelli, in risposta a stimoli ambientali e intracellulari. A questo scopo risultano fondamentali: elementi regolatori *in cis*, molti regolatori *in trans*, che possono agire da attivatori o repressori, e particolari strutture cromatiniche che possono influenzare l'accessibilità ai loci permettendo una maggiore o minore trascrizione.

Nel complesso, il controllo ultimo della biogenesi dei ribosomi e la coordinazione dei diversi passaggi in cui essa si articola, è riconducibile all'azione di due "pathway" principali, le vie di segnalazione delle chinasi TOR1 e PKA, da cui dipendono le risposte cellulari alla disponibilità di nutrienti e allo stress. In particolare, la prima via interviene nel controllo della crescita e del metabolismo in risposta alle condizioni nutrizionali, mentre la seconda promuove i processi anabolici (tra cui il più importante è la sintesi proteica) e riduce quelli catabolici.

Sebbene esistano evidenze di un'integrazione dei segnali tra TORC1 e PKA (Schmelzle et al., 2004), si ritiene che queste due vie agiscano per lo più in parallelo (Chen and Powers, 2006; Zurita-Martinez and Cardenas, 2005) per determinare, quando attive, una regolazione positiva della trascrizione dei componenti del ribosoma.

3. Promotori dei geni trascritti dalle RNA Polimerasi I e III

Organizzazione genica del locus per gli rRNA

In *S. cerevisiae*, i geni codificanti per l'rRNA (rDNA) sono organizzati in un unico cluster composto da 150-200 unità ripetute in tandem, lunghe all'incirca 9.1 kb e posizionate sul braccio lungo del cromosoma XII (Johnston et al., 1997). I tre geni codificanti per gli rRNA 18S, 5.8S e 25S, strutturati in un solo operone, sono trascritti dalla RNA polimerasi I in un unico precursore, il pre-rRNA 35S. I tre geni sono separati da due tratti interni trascritti di DNA spaziatore (ITS1 e ITS2) e fiancheggiati alle estremità da due spaziatori esterni, anch'essi trascritti (5'-ETS e 3'ETS). L'unità trascrizionale completa comprende inoltre due ulteriori tratti di DNA non trascritto (NTS1 e NTS2), separati l'uno dall'altro dal gene codificante per il 5S rRNA, trascritto in direzione opposta dalla RNA polimerasi III.

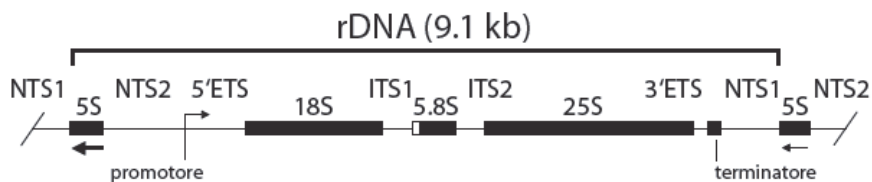


Figura 1 Rappresentazione dell'unità strutturale ripetuta di rDNA di *S. cerevisiae*. Adattato da Venema et al., 1999.

Le cellule di lievito presentano anche un piccolo numero di molecole di DNA circolare che consistono di una o più unità di rDNA. Il ruolo di questi elementi non è stato compreso ma, dal momento che ne sono stati osservati intermedi di replicazione, si suppone che possano prendere parte al meccanismo di regolazione del numero di copie geniche per rRNA trascrizionalmente attive (Planta, 1997). Si è inoltre osservato che queste molecole di rDNA circolare tendono a segregare in modo asimmetrico durante la divisione cellulare e a rimanere nella cellula madre. Il loro accumulo in cellule madri è associato all'invecchiamento cellulare in lievito, sebbene il meccanismo non sia ancora stato definito (Sinclair and Guarente, 1997).

Elementi di controllo della trascrizione della RNA Polimerasi I

La RNA Polimerasi I riconosce un unico tipo di promotore, quello del locus genico codificante per il pre-rRNA 35S. Tale promotore è compreso nel DNA spaziatore non trascritto NTS2. Si tratta di una regione di circa 150 bp contenente due elementi cruciali per la regolazione della trascrizione: l'elemento di controllo a monte (UCE), composto da due domini e localizzato tra le posizioni -146 e -50, e l'elemento promotore centrale (CPE), che si estende indicativamente tra -30bp e +8bp rispetto al sito di inizio della trascrizione (TSS). Queste regioni sono riconosciute da due distinti fattori multiproteici, noti come "upstream activating factor" (UAF) e "core factor" (CF), che si legano rispettivamente all'elemento UCE e al CPE. Tali complessi rappresentano, assieme alla TBP (TATA-box binding protein) e al fattore monomero Rrn3p, i quattro fattori generali di trascrizione della RNA polimerasi I di *S. cerevisiae*.

UAF è un complesso esamerico composto dalle proteine Rrn5p, Rrn9p, Rrn10p, Uaf30p e dagli istoni H3 e H4. Uaf30p è responsabile della specificità di sequenza dell'esamero, mentre l'affinità del complesso per il DNA dipende soprattutto dalla presenza dei due istoni; si suppone infatti che, grazie all'interazione con H3 e H4, l'rDNA possa avvolgersi attorno all'UAF a formare una struttura molto stabile, analoga a quella che si genera attorno al core istonico ottamerico dei nucleosomi (Planta, 1997). Le restanti proteine del multimerico sono invece richieste per l'interazione con gli altri fattori generali di trascrizione, in particolare, Rrn9 si associa con la TBP e con il "core factor" CF. Quest'ultimo, composto dalle tre proteine Rrn6p, Rrn7p e Rrn11p, viene reclutato sull'elemento centrale del promotore a seguito dell'interazione di Rrn6p con la TBP e l'UAF. A differenza di essi, però, il complesso CF, così come pure il fattore monomero Rrn3, è essenziale per la trascrizione ad opera della RNA polimerasi I, sia *in vivo* che *in vitro*, ed è in grado di garantire una trascrizione basale anche in assenza della TBP e del fattore UAF. Il complesso CF, sia per diretta associazione con il DNA, sia a seguito dell'interazione con il complesso Rrn3/Polimerasi I, promuove il legame della RNA polimerasi I al promotore e il suo corretto posizionamento al sito di inizio della trascrizione.

La TBP agisce invece da mediatore nel reclutamento del "core factor", di cui promuove il legame al DNA incrementando così la velocità di inizio della trascrizione.

UAF, TBP e CF formano una piattaforma per il reclutamento di Rrn3p, fattore che si associa alla subunità RPA43 della RNA polimerasi I (anche in assenza di DNA) guidandone il posizionamento sul promotore (Schneider).

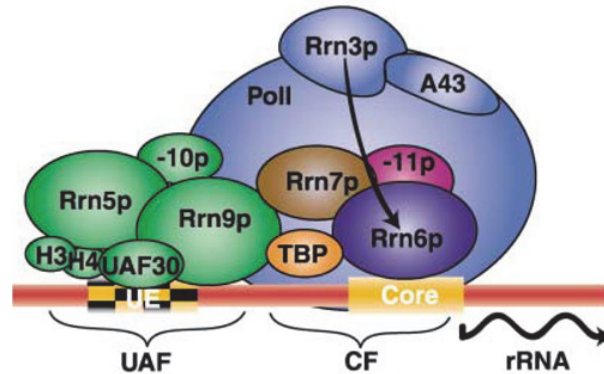


Figura 2 Rappresentazione schematica dei fattori generali richiesti per un'efficiente inizio della trascrizione della RNA Polimerasi I in lievito. Adattata da Moss e Stefanovsky, 2002.

L'associazione di Rrn3p con la Polimerasi I e la disponibilità di complessi competenti per la trascrizione è un punto centrale per la regolazione della sintesi degli rRNA, specialmente in risposta alla disponibilità di nutrienti. In carenza di glucosio, si ha una riduzione della quantità totale di Rrn3, e, di conseguenza, del numero di suoi complessi con la Polimerasi I, sia per effetto di un calo nella sua sintesi, sia in conseguenza alla sua degradazione proteolitica indotta dall'inibizione di TORC1 (Philippi et al.). È stato inoltre osservato che la stessa chinasi Tor1, avente tre classici motivi di legame al DNA, due a cerniera di leucina (LZ1, residui 277-291; LZ2, residui 311-332) e uno elica-giro-elica (HTH, residui 815-837), è in grado di interagire direttamente con il promotore dei geni per rRNA in cellule in rapida crescita ed è stato pertanto ipotizzato che tor1 possa modulare direttamente la formazione dei complessi Rrn3/Polimerasi I (Li et al., 2006). Infine, TORC1 interviene nella regolazione della trascrizione degli rRNA anche in maniera indipendente da Rrn3: tramite il suo diretto effettore Sch9, facilita il reclutamento della RNA Polimerasi I sull' rDNA e promuove il processamento degli rRNA (Huber et al., 2009).

Un ulteriore elemento di controllo *in cis* della trascrizione del DNA ribosomiale è il cosiddetto "elemento enhancer", un tratto di DNA di 170-190 bp, localizzato 2.2 Kb a

monte del sito di inizio della trascrizione, a circa 100 bp rispetto all'estremità 3' dell'unità trascrizionale precedente di cui comprende il terminatore (Elion and Warner, 1984; Elion and Warner, 1986). Tale regione, capace di stimolare la trascrizione in sistemi episomici ma non necessaria nel contesto cromosomico, contiene una porzione centrale conservata di 8 bp la cui sequenza (CCGGGTAA) è simile al sito di legame per la proteina Reb1 (RNA polymerase I Enhancer Binding protein) che è presente, con orientamento opposto, circa 210 bp a monte del sito di inizio della trascrizione e che è richiesto per un'efficiente trascrizione in vivo (Kulkens et al., 1992; Morrow et al., 1989). Studi biochimici indicavano il legame di Reb1, seppur con minor affinità, anche all'elemento enhancer; era stato pertanto proposto che Reb1 avesse essenzialmente un ruolo strutturale e che l'interazione tra monomeri di Reb1, legati ai differenti siti, servisse a creare una struttura a loop tale da avvicinare il terminatore di un'unità con il promotore di quella successiva, facilitando così il passaggio della polimerasi dall'una all'altra (Kulkens et al., 1992; Planta, 1997). Studi recenti, invece, hanno dimostrato che la sequenza presente nell'enhancer non è riconosciuta da Reb1 ma da Nsi1 (NTS1 silencing protein 1), una proteina omologa a Reb1 e dotata di un dominio di legame al DNA del tipo "Myb-related", direttamente implicata nel processo di silenziamento genico dell'rDNA e nella terminazione (Ha et al., 2012; Reiter et al., 2012). Reb1 si lega solo a livello della sequenza prossimale al promotore e il suo ruolo rimane elusivo; è stato ipotizzato che possa servire a regolare l'organizzazione cromatinica dei loci e a favorire il reclutamento dei fattori generali di trascrizione, ma non si può escludere un suo possibile coinvolgimento nell'organizzazione strutturale dell' rDNA nel nucleolo, come precedentemente ipotizzato.

Un altro importante aspetto da considerare è l'organizzazione cromatinica delle unità codificanti per gli rRNA; la loro sintesi, infatti, è regolata anche in base all'accessibilità del template e quindi al numero di copie trascrizionalmente attive. In ogni cellula, le unità codificanti per gli rRNA sono presenti in due diversi stati trascrizionali, ciascuno associato a un particolare tipo di organizzazione della cromatina (Conconi et al., 1989). Una parte delle unità è attivamente trascritta e caratterizzata da una struttura cromatinica dinamica e accessibile, per lo più povera di nucleosomi. Il promotore di queste unità è legato da Hmo1, proteina appartenente alla famiglia delle "HMG (High Mobility Group) proteins", che interagisce con il 35S rDNA essenzialmente in modo indipendente dalla sequenza e contribuisce al mantenimento della conformazione aperta (Berger et al., 2007; Hall et al.,

2006; Kasahara et al., 2007). Questa organizzazione della cromatina è ottenuta anche grazie all'intervento dei fattori generali di trascrizione, quali il complesso UAF, e sembra essere funzionale a garantire il reclutamento della RNA polimerasi I e impedire il legame della RNA polimerasi II a livello di un promotore criptico, localizzato in prossimità del sito di inizio della trascrizione del 35S rDNA (Goetze et al., 2010; Vu et al., 1999). Le altre copie dell'rDNA sono invece mantenute silenziate e presentano un'organizzazione della cromatina "chiusa", condensata e ricca di nucleosomi. Queste regioni sono così organizzate grazie all'intervento di istone deacetilasi quali Rpd3 (Sandmeier et al., 2002) o Sir2. Quest'ultima forma, assieme alle proteine Net1 e Cdc14, un complesso noto come RENT, la cui azione determina il silenziamento dell'rDNA (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999). In cellule in rapida crescita il rapporto tra i due diversi stati è di circa 1:1, mentre in condizioni di privazione di nutrienti, o all'inizio della fase stazionaria, il numero delle unità che si trovano in uno stato aperto si riduce. La regolazione del numero di copie trascrizionalmente attive è importante non solo in termini di dosaggio genico dell'rRNA ma anche per la stabilità e l'integrità dell'intero genoma (Ide et al., 2010).

Elementi di controllo della trascrizione della RNA Polimerasi III

La RNA polimerasi III, la più grande tra le RNA polimerasi eucariotiche, è responsabile della trascrizione di geni per RNA di piccole dimensioni, non codificanti per proteine. Tra questi è annoverato il gene per il 5S rRNA, che in *S. cerevisiae*, diversamente dagli altri eucarioti, è posizionato all'interno dell'unità trascrizionale codificante per il pre-RNA 35S, tra le due regioni NTS1 e NTS2, ed è trascritto in direzione opposta a quella del pre-rRNA 35S (Planta, 1997).

A differenza della RNA polimerasi I, la RNA polimerasi III è in grado di riconoscere diversi tipi di promotore, quello del gene per l'rRNA 5S è il solo esempio di promotore di tipo I. Esso è interamente intragenico e consiste in una box A, da +50 a +60, un elemento intermedio (IE), da +67 a +72, e una box C, da +80 a +90, unico elemento essenziale per la trascrizione in *S. cerevisiae* (Chalice and Segall, 1989; Willis, 1993). Queste tre sequenze formano, nel complesso, la regione ICR (Internal control region), strutturalmente discontinua ma molto conservata nel gene per il 5S rRNA di varie specie, importante sia nella trascrizione, sia nella

determinazione della struttura del 5S rRNA. La ICR è riconosciuta e legata *in primis* dal fattore generale di trascrizione TFIIA, una proteina appartenente alla famiglia degli “zinc-finger C₂H₂”, dotata di un dominio di legame al DNA costituito da 9 classici motivi “a dita di zinco”. TFIIA contatta principalmente la box A, ma interagisce anche con le regioni più a valle, formando con il DNA un complesso molto stabile che permette, probabilmente grazie a un segmento idrofobico di 84 aminoacidi tra gli zinc-finger 8 e 9 di TFIIA, il reclutamento del fattore TFIIC. Quest’ultimo è un complesso di 600 KDa costituito da 6 subunità, organizzate in due domini modulari di legame al DNA, τB e τA, uniti da una regione linker flessibile che permette al fattore di adattarsi ai differenti tipi di promotore riconosciuti dalla RNA polimerasi III. TFIIC agisce contattando il fattore TFIIB, formato dalle tre proteine Brf1, Bdp1 e TBP, mediante interazione della subunità Tfc4 con Brf1. TFIIB lega il DNA tramite la TBP e recluta la polimerasi, essenzialmente in virtù dell’interazione tra Brf1 e le subunità C34 e C17, e partecipa alla formazione del complesso aperto.

Dopo la fase di inizio della trascrizione, mentre TFIIA e TFIIC vengono rilasciati dal promotore, TFIIB rimane associato al DNA e promuove cicli di trascrizione multipli, garantendo un elevato livello di espressione (Costanzo et al., 2001; Kassavetis et al., 1990; Schramm and Hernandez, 2002).

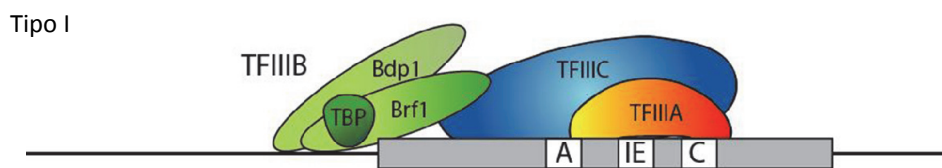


Figura 3 Rappresentazione schematica degli elementi *cis*-e *trans*-regolativi coinvolti nell’inizio della trascrizione Pol III dipendente a livello del 5S rDNA. Adattata da (Dieci et al., 2012).

Un altro gene trascritto dalla Polimerasi III e coinvolto nella biogenesi dei ribosomi è SNR52, codificante per lo snoRNA snR52 e avente un promotore di tipo “tRNA-like”. Esso è definito da due elementi intragenici, tipici anche di tutti i geni per tRNA, noti come A box, tra +8 e+19, e B box, situata in posizione variabile a valle della A box, e da una TATA box localizzata a monte del sito di inizio della trascrizione (Harismendy et al., 2003). Sia la A box che la B box, ma non la TATA, sono richieste per l’accumulo del trascritto in vivo; in

particolare, la B box è necessaria per il reclutamento di TFIIC sebbene esperimenti *in vitro* indichino che la sola A box è comunque sufficiente per avere trascrizione TFIIC-dipendente (Guffanti et al., 2006).

Nel lievito *S. cerevisiae* il controllo della trascrizione del gene per il 5S rRNA e la sua coordinazione con l'espressione delle altre componenti ribosomiali dipende da un numero limitato di modulatori: la caseina chinasi II, Maf1p e TFIIE (Dieci et al., 2009b).

La caseina chinasi II (CKII) è una serina/treonina chinasi altamente conservata negli eucarioti, presente nel nucleo e nel citoplasma e composta da due subunità catalitiche, α e α' , e da una regolativa, β . Questa proteina è fondamentale per il controllo del ciclo cellulare e della crescita: in lievito, è richiesta per la progressione nella fase G_1 , per il completamento della fase G_2/M e per la crescita vegetativa. Essa è direttamente implicata nella trascrizione della RNA polimerasi III; mutanti nel gene codificante per la proteina, infatti, presentano una ridotta trascrizione del 5S rRNA e dei tRNA. Il suo meccanismo d'azione non è noto ma, dal momento che i trascritti prodotti in condizioni di carenza di CKII presentano siti di inizio e terminazione corretti, si suppone che la sua attività sia richiesta per la formazione dei complessi di pre-inizio e/o per l'inizio della trascrizione (Hockman and Schultz, 1996).

Maf1p è una fosfoproteina di 44.7 kDa, ricca di residui di serina e asparagina, conservata in tutti gli eucarioti ma non essenziale alla sopravvivenza. Essa è implicata nella repressione della trascrizione della RNA polimerasi III in risposta alla disponibilità di nutrienti e, più in generale, a varie condizioni limitanti la crescita cellulare (Pluta et al., 2001; Upadhyya et al., 2002). La sua capacità di agire dipende dal suo stato di fosforilazione e dalla sua localizzazione all'interno della cellula; in condizioni favorevoli alla crescita cellulare, la proteina è per lo più fosforilata e mantenuta inattiva nel citosol. Condizioni di stress, invece, ne determinano la defosforilazione e la conseguente traslocazione nel nucleo dove essa agisce impedendo sia il legame *de novo* di TFIIB al promotore, sia il reclutamento della polimerasi sui complessi TFIIB/DNA già formati (Oficjalska-Pham et al., 2006; Roberts et al., 2006). Lo stato di fosforilazione di Maf1 è regolato dall'attività di numerose chinasi, tra cui PK, TOR e il suo diretto effettore Sch9, e la caseina chinasi II. Allo stesso modo, la defosforilazione è opera di varie fosfatasi quali la proteina fosfatasi 2A (PP2A), la cui attivazione è regolata dalla via di segnalazione TOR, e il complesso PP4 (Protein Phosphatase 4) (Huber et al., 2009; Lee et al., 2009; Moir et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Willis and Moir, 2007).

Un ultimo modulatore è l'attività denominata TFIIIE, che co-purifica con le proteine ribosomiali Rps4, Rps5, Rpl7, Rps8, Rpl13, Rps9, Rpl6A, Rps24, Rpl14, Rpl26, Rps25, Rpl36. Queste proteine, in particolare Rpl6A, si legano ai geni per l'rRNA 5S (e anche a quelli per i tRNA) e ne influenzano positivamente la trascrizione. Questo processo supporta l'ipotesi di un ruolo extra-ribosomiale delle proteine ribosomiali come modulatori positivi dell'espressione dei geni trascritti dalla RNA polimerasi III e amplia il quadro del complesso sistema di regolazione della biogenesi dei ribosomi (Dieci et al., 2009b).

4. Elementi di controllo della trascrizione della RNA Polimerasi II

La biogenesi dei ribosomi richiede anche l'attività della RNA polimerasi II, enzima responsabile della trascrizione di numerosi geni, codificanti sia per RNA messaggeri, sia per RNA non tradotti. Tanto elevato è il numero di geni diversi che questa polimerasi trascrive, tanto vari sono gli elementi che caratterizzano i promotori a cui questa essa si lega e tanto numerose sono le combinazioni di fattori che ne regolano le fasi di inizio della trascrizione. Come accade per le altre due polimerasi, ai primi passaggi dell'evento trascrizionale prendono parte proteine che riconoscono il DNA in maniera sequenza-specifica, complessi di rimodellamento della cromatina, fattori generali di trascrizione e loro regolatori. Per la polimerasi II, tuttavia, le tipologie di effettori coinvolti, e la conseguente possibilità di modulare in maniera estremamente fine l'attività dei diversi geni, sono decisamente maggiori. Nonostante le differenze tra un promotore e l'altro, però, i meccanismi della trascrizione sono essenzialmente gli stessi: il reclutamento sul DNA, in risposta a segnali cellulari, di regolatori sequenza-specifici e l'associazione di loro coattivatori, permette la modificazione della struttura locale della cromatina e promuove l'assemblaggio del complesso di pre-inizio, composto dai fattori generali di trascrizione e dalla Polimerasi II (Venters and Pugh, 2009).

L'analisi della distribuzione su scala genomica dei complessi di pre-inizio e dei siti di legame dei regolatori trascrizionali ha messo in evidenza che, in *S. cerevisiae*, essi non sono uniformemente distribuiti nel promotore, ma sono disposti per la maggior parte in posizioni discrete e definite tanto che, generalizzando, è possibile raggrupparli e descrivere i promotori riconosciuti dalla RNA polimerasi II come costituiti da due regioni regolative (Harbison et al., 2004). La prima è formata dai "core promoter elements" (CPEs), solitamente localizzati un centinaio di paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione, a livello dei quali si assembla il complesso di pre-inizio. Tra i vari CPE, la presenza di una TATA box con un buon consenso (TATAWAWR), è solitamente usata per suddividere i promotori Pol II in due categorie: quelli contenenti la TATA e quelli che ne sono privi.

In lievito, solo il 20% delle unità trascrizionali Pol II ha un promotore dotato di TATA box; si tratta per lo più di geni localizzati entro 30 Kb dai telomeri, espressi a livelli o molto ridotti o molto elevati, indotti in risposta allo stress e altamente regolati, soprattutto da fattori di

rimodellamento della cromatina e da regolatori dei nucleosomi e della TBP (Basehoar et al., 2004). Solitamente, in questi promotori, la TATA box viene riconosciuta dal complesso SAGA, comprendente la TBP e altre 14 proteine, tra cui fattori che si associano alla TBP (TAFs) e subunità con attività acetil-trasferasica (Huisinga and Pugh, 2004; Wu et al., 2004). L'80% dei geni di *S. cerevisiae*, invece, ha un promotore che manca della TATA box, o che contiene un elemento "TATA-like", che differisce per 2 basi dal consenso perfetto (Basehoar et al., 2004; Rhee and Pugh, 2012). Si tratta principalmente di geni "housekeeping", i quali, seppur repressi in condizioni di stress, richiedono un minore controllo trascrizionale. A livello di tali geni si osserva ugualmente il reclutamento della TBP, in questo caso come parte del complesso TFIID (Roeder, 1996), costituito da 12 subunità, alcune comuni al complesso SAGA, che si associano alla TBP (TAFs) e che la guidano sul DNA (Basehoar et al., 2004; Huisinga and Pugh, 2004). Una volta che la TBP è legata al DNA, può avvenire il reclutamento degli altri fattori generali di inizio: TFIIA, che stabilizza l'interazione tra la TBP e il DNA, TFIIB, la cui presenza è fondamentale per stabilizzare ulteriormente il complesso TBP/DNA e per determinare la corretta disposizione della polimerasi, TFIIF, che porta con sé la polimerasi stessa, e infine TFIIIE e TFIIH, che permettono la transizione dal complesso chiuso al complesso aperto (Shandilya and Roberts, 2012).

La seconda regione regolativa è formata da tutte le sequenze, tipicamente situate tra le 100 e le 500 paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione che, a seconda del loro effetto sull'espressione genica, si caratterizzano come elementi attivatori o repressori (UAS/URS), (Harbison et al., 2004). Si tratta di sequenze riconosciute da fattori che agiscono *in trans*, alcuni gene-specifici, altri capaci di regolare la trascrizione di centinaia di geni. Questi elementi *trans*-regolativi possono agire sia direttamente, ad esempio contattando i fattori generali di trascrizione o la polimerasi, sia indirettamente, promuovendo il reclutamento di complessi di rimodellamento della cromatina e controllando così l'accessibilità del genoma (Venters and Pugh, 2009). Come messo in luce da Pugh e collaboratori, la varietà degli elementi a monte sembra essere correlata con il complesso che porta la TBP sul promotore: i geni la cui espressione dipende prevalentemente da TFIID, infatti, presentano una minore varietà degli elementi regolatori a monte rispetto ai geni dipendenti da SAGA. È importante sottolineare che, nonostante questa distinzione, esistono promotori con caratteristiche intermedie e in vari casi, SAGA e TFIID sono funzionalmente ridondanti (Venters et al., 2011).

La trascrizione dei geni Pol II è influenzata anche dall'organizzazione della cromatina; il DNA eucariotico, infatti, è organizzato in una struttura dinamica ma compatta, caratterizzata dalla successione di nucleosomi, complessi formati da 8 istoni, proteine ricche di residui basici, che formano un core attorno al quale un tratto di DNA di 147 bp si avvolge per 1.7 volte (Richmond and Davey, 2003). I nucleosomi proteggono il DNA e numerosi sono i fattori che ne determinano la posizione. Alcuni studi sottolineano, a esempio, l'importanza della sequenza stessa del DNA; esistono tratti, infatti, caratterizzati da particolari pattern di dinucleotidi (come AA/TT, AT e TA), che presentano una maggiore affinità per l'ottamero istonico (Ioshikhes et al., 2006), mentre altri sono caratterizzati per lo più da una struttura rigida, poco propensa a ripiegarsi per formare un nucleosoma (Segal et al., 2006). Altri studi indicano invece come fattore fondamentale l'intervento di proteine, che possono agire come semplici barriere in grado di condizionare la posizione dei nucleosomi (Fedor et al., 1988; Kornberg and Stryer, 1988), o come complessi di rimodellamento della cromatina che si associano al DNA e modificano direttamente la posizione degli istoni o ne alterano l'affinità per il DNA (Badis et al., 2008; Whitehouse et al., 2007). Data la loro struttura, i nucleosomi rappresentano anche un ostacolo per la trascrizione poiché limitano l'accessibilità dei promotori. Per questo, solitamente, le regioni attive dal punto di vista trascrizionale sono caratterizzate da una struttura cromatinica "aperta", con nucleosomi spazati da regioni libere, a differenza delle regioni mantenute silenziate dove la cromatina è caratterizzata da nucleosomi compattati gli uni rispetto agli altri, che bloccano l'accesso di altri fattori al tratto di DNA interessato. I primi studi della disposizione dei nucleosomi su scala genomica hanno messo in evidenza che una caratteristica comune dei promotori di lievito è la presenza di una regione deprivata di nucleosomi (5'-Nucleosome free region, NFR), delimitata alle sue estremità da due nucleosomi ben posizionati (ossia la cui posizione è sempre la medesima in cellule diverse), indicati comunemente come nucleosoma -1 e nucleosoma +1, presenti, rispettivamente, al 5' e al 3' della NFR (Yuan et al., 2005). La loro posizione dipende dalla combinazione di siti di legame per fattori di trascrizione ed elementi di sequenza del promotore ed essi, oltre a definire la NFR, determinano anche l'organizzazione cromatinica nella sequenza codificante, dove i nucleosomi, soprattutto quelli vicini al TSS, non sono distribuiti in modo stocastico, bensì, sono situati in posizioni precise, a distanze definite dal sito di inizio della trascrizione (Mavrich et al., 2008). Analisi sistematiche più approfondite hanno successivamente fatto emergere un quadro più

complesso, indicando che, in lievito, a livello delle regioni promotoriali, esistono due principali tipologie di organizzazione dei nucleosomi, cui corrispondono due diversi livelli di “plasticità di espressione” (Tirosh and Barkai, 2008). Il primo tipo di promotori è definito da un’architettura statica, con nucleosomi ben posizionati e una NFR definita, che rende il promotore accessibile ai fattori di trascrizione. L’espressione di questi geni, che sono per lo più privi della TATA box, risulta essere meno dipendente dall’intervento di complessi di rimodellamento della cromatina ed è in genere costante, poco flessibile. La seconda tipologia di promotori, solitamente contenenti una TATA box, presenta invece una disposizione dei nucleosomi più omogenea e dinamica, con una maggiore concentrazione di nucleosomi in corrispondenza del TSS, una NFR meno ben definita e siti di legame per fattori di trascrizione spesso non accessibili. L’espressione di geni con questa architettura del promotore richiede eventi di rimodellamento della cromatina e riflette una competizione dinamica tra fattori di trascrizione e nucleosomi per l’interazione con il promotore.

Questa diversa tipologia di organizzazione sembra direttamente correlata con la sensibilità alle mutazioni, misurata come probabilità che una mutazione casuale nel promotore possa influire sull’espressione del gene: i geni con una struttura del primo tipo, infatti, sono meno sensibili alle mutazioni nel promotore rispetto ai geni del secondo tipo, anche se i meccanismi molecolari non sono stati chiariti (Hornung et al., 2012; Swamy et al., 2011). Unitamente ai risultati di Pugh e collaboratori (Venters et al., 2011), queste osservazioni indicano l’esistenza di due principali vie di regolazione: la prima, dipendente da TFIID, riguarda la maggior parte dei geni, in particolare quelli housekeeping, e si è evoluta in modo tale da sviluppare promotori più adatti a garantire una produzione costante di mRNA e ridurre la variabilità di espressione tra le cellule; la seconda, dipendente da SAGA, permette invece una maggiore dinamicità e conferisce pertanto una migliore capacità di rispondere ai cambiamenti delle condizioni ambientali. Questo non esclude la possibilità che un gene venga controllato da entrambe le vie descritte, in modo da ottenere l’appropriato livello di regolazione (Bai et al., 2010; Venters et al., 2011).

I “General Regulatory Factors”

In lievito, tra i vari regolatori trascrizionali identificati, ci sono Abf1, Rap1, Reb1 e Tbf1, quattro proteine differenti che condividono alcune caratteristiche comuni, in base alle quali sono state raggruppate e indicate in modo generico come “Fattori Generali di Regolazione” (GRFs, General Regulatory Factors). Sono proteine essenziali e abbondanti che riconoscono siti sparsi nel genoma a livello di promotori oltre che origini di replicazione, telomeri e regioni subtelomeriche. Tali siti di legame sembrano avere una ridotta attività regolativa intrinseca ma sembrano amplificare l’effetto di siti di regolazione vicini e possono sia promuovere, sia reprimere la trascrizione. Le proteine che li legano, infatti, sono considerate “multifunzionali” in virtù dei diversi ruoli che sembrano svolgere.

Abf1 (ARS Binding Factor 1) è una proteina di 731 aminoacidi che riconosce un motivo di sequenza piuttosto degenerato (RTCAYNNNNACGR), grazie a due domini di legame al DNA: uno zinc-finger atipico, situato nella regione N-terminale, e uno con una struttura riconducibile al motivo elica-giro-elica, localizzato in posizione centrale. Abf1 si lega alle origini di replicazione (ARS) ed è coinvolta nell’inizio della replicazione del DNA cromosomico, pur non essendo richiesta per l’attività della ARS stessa (Rhode et al., 1992). Siti di legame per la proteina sono presenti anche a livello dei loci per il “mating type” HML e HMR, dove Abf1, in sinergia con Rap1, agisce in come “silencer” (Buchman et al., 1988), contribuendo a reclutare le proteine Sir (Boscheron et al., 1996). È noto inoltre che Abf1 controlla l’espressione di 86 geni: di questi, 50 sono attivati dal legame di Abf1 e 36, tra cui il gene codificante per la stessa Abf1, sono repressi. Analisi di immunoprecipitazione cromatinica indicano che ai promotori dei geni attivati il legame della proteina è stabile e duraturo a differenza di quanto accade a livello dei promotori repressi, per i quali si osserva un legame transiente. Sembra pertanto che Abf1 possa agire con meccanismi regolativi distinti e che alla base di ciò ci sia la sua capacità di interagire con fattori differenti (Miyake et al., 2004; Yarragudi et al., 2004). Nel caso dei geni attivati, Abf1 è in grado di agire sia mediante il reclutamento di TFIID (Mencia et al., 2002), sia attraverso il legame della istone deacetilasi Esa1 (Reid et al., 2000), sia favorendo in corrispondenza dei promotori il mantenimento di una regione povera di nucleosomi (Ganapathi et al., 2011).

Rap1 (Repressor Activator Protein 1) è una proteina di 827 aminoacidi, legante il DNA in modo sequenza-specifico, per la presenza di due motivi del tipo elica-giro-elica,

strutturalmente correlati all'omeodominio del proto-oncogene Myc (Konig et al., 1996). Anche Rap1 si lega a numerosi siti sparsi nel genoma, dove svolge ruoli differenti: a livello telomerico nuclea il silenziamento genico, reclutando le proteine Sir2, Sir3 e Sir4 e partecipa alla modulazione della lunghezza dei telomeri, interagendo con le proteine Rif1 e Rif2; a livello dei loci per HMR e HML prende parte al silenziamento, sempre mediante il reclutamento delle proteine Sir (Boscheron et al., 1996); ai geni codificanti per gli enzimi della via glicolitica favorisce il legame dell'attivatore trascrizionale Gcr1 (Glycolysis Regulatory Protein 1); e infine a monte di numerosi altri geni può agire sia come attivatore che come repressore, sia direttamente, sia promuovendo il reclutamento dei complessi di rimodellamento cromatinico (Morse, 2000; Pina et al., 2003).

Reb1 (RNA polymerase I EnhanBinding protein) è una proteina di 810 aminoacidi, dotata di due domini di legame al DNA "Myb-like" (Morrow et al., 1993), e che riconosce la sequenza conservata CGGGTAA, anche se è permessa una certa flessibilità e l'affinità di legame viene influenzata dai nucleotidi adiacenti (Rhee and Pugh, 2011). Reb1 è implicata in numerosi processi e, in molti casi, la funzione svolta da questo regolatore non è chiara. Come indicato nel paragrafo 3, Reb1 è associata al promotore del 35S rDNA ma il suo ruolo rimane elusivo; inoltre, è implicata nel controllo dell'espressione di vari geni trascritti dalla RNA polimerasi II e può esercitare una regolazione, sia positiva che negativa, anche sul proprio gene (Wang and Warner, 1998). Reb1 è inoltre coinvolta nell'organizzazione della cromatina e la presenza di un sito di legame della proteina accanto a tratti poli(dA/dT) è in grado di determinare una maggiore deplezione di nucleosomi rispetto alla sola presenza di un tratto poli(dA/dT) (Field et al., 2008; Kaplan et al., 2009). È stato infine mostrato un ruolo di Reb1 anche ai subtelomeri, come fattore che impedisce il propagarsi del "silencing" oltre i telomeri (Fourel et al., 2001).

La proteina Tbf1 (TTAGGG repeat Binding Factor 1), costituita da 562 aminoacidi, è dotata, in posizione C-terminale, di un dominio di legame al DNA di 236 residui, di tipo "Myb-related", in grado di legare la sequenza TTAGGG, l'unità di base ripetuta nei telomeri nell'uomo (ma non nel lievito) (Brigati et al., 1993). Tbf1 è localizzata esclusivamente nel nucleo (Cockell et al., 2009; Koering et al., 2000), è essenziale per la crescita mitotica in lievito, e, come gli altri GRFs, sembra svolgere varie funzioni. Essa è presente in associazione con Reb1 a livello subtelomerico dove agisce sia da "boundary element" sia come regolatore della lunghezza dei telomeri (Berthiau et al., 2006; Fourel et al., 2002;

Fourel et al., 1999). La sequenza di legame per Tbf1 è presente però anche in regioni intergeniche (Koering et al., 2000) e, come vedremo successivamente, la proteina è associata *in vivo* a numerosi promotori dove è implicata nella regolazione trascrizionale.

5.Promotori dei geni trascritti dalla RNA polimerasi II coinvolti nella biogenesi dei ribosomi

Le unità trascrizionali coinvolte nella biogenesi dei ribosomi rappresentano un buon esempio della variabilità dei promotori riconosciuti dalla Pol II: come vedremo, pur essendo implicati nel medesimo processo di costruzione dei ribosomi, questi geni presentano promotori con architetture differenti.

Geni codificanti per le proteine ribosomiali

Il ribosoma di lievito contiene 79 proteine ribosomiali (RP), di cui 59 sono codificate da due geni identici o quasi identici (Warner, 1999), come conseguenza di un evento di duplicazione genomica, avvenuto dopo la divergenza tra i generi *Saccharomyces* e *Kluiveromyces* (Wolfe and Shields, 1997). Le due copie di ciascun gene sono funzionali e codificano per proteine identiche o quasi, ritenute, per la maggior parte, funzionalmente indistinguibili, anche se le loro sequenze non tradotte 5' e 3' (5'-3'-UTR) sono diverse e le due copie sono espresse a differenti livelli (Planta, 1997; Raue et al., 1991); questo permette di speculare che i due paraloghi non siano semplicemente sostituti equivalenti, ma possano contribuire a creare varianti dei ribosomi (Komili et al., 2007; Xue and Barna, 2012).

Le proteine ribosomiali rappresentano lo 0,1%-0,5% delle proteine cellulari totali e sono evolutivamente conservate (Warner, 1989). I geni che le codificano sono tra i più espressi del genoma (Li et al., 1999). Dei 138 geni di *S. cerevisiae* codificanti per r-proteins, 99 contengono un introne, generalmente posizionato all'estremità 5' della regione codificante, o nella sequenza leader. Pertanto, i trascritti dei geni RP sono coinvolti nel 99% degli eventi di splicing che avvengono nelle cellule di lievito e appare sempre più evidente che la presenza degli introni potrebbe essere importante per garantire la fine regolazione dei geni

per le proteine ribosomiali, in particolare di quelli duplicati (Parenteau et al., 2011); tra i meccanismi che controllano l'espressione di questo gruppo di unità trascrizionali, rimane comunque fondamentale la regolazione trascrizionale.

I geni per le proteine ribosomiali hanno promotori con una struttura comune, tipica dei geni housekeeping, con una regione depleta di nucleosomi a monte del sito di inizio della trascrizione, ben definita, nonostante la sostanziale mancanza del nucleosoma -1 (Mavrich et al., 2008). La maggior parte dei promotori è arricchita di un tratto poly(dA:dT) e, ad eccezione di 6 geni, non presenta la TATA box. Dei 138 promotori, 127 (90%) contengono siti di legame per Rap1 (WACAYCCRTACATY, con W, R e Y indicanti rispettivamente A o T, A o G, C o T) (Lascaris et al., 1999) e sono associati alla proteina *in vivo* (Harbison et al., 2004; Lee et al., 2002; Lieb et al., 2001); 8 promotori hanno un sito per Abf1 (RTCAYNNNNACGR) o Reb1 (RTTACCCK; con K sta per G o T) al posto del sito Rap1, mentre 3 promotori sembrano non presentare questi siti di legame (Planta, 1997).

A livello dei geni per le proteine ribosomiali, il sito di legame per Rap1 è solitamente duplicato, e i due siti, disposti nello stesso orientamento 5'→3' e separati da una corta sequenza spaziatrice di 5-15 bp, si localizzano tra le 200-500 bp dal TSS (Lascaris et al., 1999). La presenza di due siti per Rap1, entrambi orientati dal 5'→3', è importante per permettere la co-espressione delle proteine ribosomiali; l'assenza del secondo sito, infatti, riduce la probabilità di coregolazione dal 100% al 14%, mentre la presenza del solo secondo sito, o la presenza di due siti ma orientati in modo opposto, non è sufficiente per una regolazione coordinata (Beer and Tavazoie, 2004). Il legame di Rap1 a questi promotori è costitutivo e sembra che la proteina possa regolare la trascrizione di questi geni in più modi e che il suo ruolo di regolatore sia per lo più mediato da altri fattori. Studi *in vivo*, indicano che Rap1 è richiesta per garantire il legame della istone acetilasi Esa1, componente del complesso NuA4, che, acetilando gli istoni H3 e H4, contribuisce al mantenimento di una struttura cromatinica rilassata (Rohde and Cardenas, 2003). È stato però anche dimostrato che Rap1 è in grado di interagire con la subunità Taf12p di TFIID e con il mediatore, permettendo un'efficiente reclutamento del complesso di pre-inizio (Ansari et al., 2009; Garbett et al., 2007); Rap1, inoltre, è richiesta per il legame degli altri regolatori della trascrizione dei geni ribosomiali, Fhl1, Ifh1 e Sfp1, i quali sembrano non riconoscere direttamente il DNA (Zhao et al., 2006). Secondo il modello attualmente accettato, Rap1 media il reclutamento di Fhl1, proteina dotata di un dominio "Forkhead" di legame al DNA e

di un dominio FHA (ForkHead-Associated domain), specializzato nel riconoscimento di residui di fosfo-treonina (Durocher and Jackson, 2002). Fhl1, a sua volta, lega lfh1, proteina ricca di residui acidi, probabilmente mediante l'interazione tra il dominio FHA di Fhl1 e residui fosforilati di lfh1; tale interazione rappresenta l'evento chiave per l'attivazione della trascrizione ed esiste una diretta correlazione tra il livelli di lfh1 associata al promotore e il livello di espressione genica (Schawalder et al., 2004). Si ritiene che l'interazione tra Fhl1 e lfh1 sia promossa dalla fosforilazione reversibile di lfh1, presumibilmente dipendente dall'attivazione delle vie di segnalazione di TORC1 e PKA (Martin et al., 2004). In condizioni di crescita favorevoli, le due vie inibiscono la chinasi YAK1, responsabile dell'attivazione del repressore Crf1, che compete con lfh1 per il legame a Fhl1; Crf1 inattivo si localizza nel citoplasma, e lfh1 è in grado di legare Fhl1 e promuovere così la trascrizione. Al contrario, in condizioni di crescita sfavorevoli, TORC1 e PKA risultano inattive; ciò comporta l'attivazione di YAK1 e la conseguente fosforilazione di Crf1 che migra nel nucleo e può interagire con Fhl1, impedendo il legame di lfh1.

Un altro importante regolatore della trascrizione dei geni per le proteine ribosomiali è il fattore di trascrizione zinc-finger Cys2-His2 Sfp1 (Split Finger Protein). Esso è richiesto per un'efficiente espressione dei geni coinvolti nella biogenesi dei ribosomi, come suggerito dal fatto che mutanti, deleti della proteina, presentano un fenotipo di crescita lenta e ridotte dimensioni, dovuto alla repressione dei geni per le proteine ribosomiali e per le proteine "ribi" (Jorgensen et al., 2002; Jorgensen et al., 2004). Studi *in vitro* e *in vivo* indicano che Sfp1 non lega direttamente il DNA, pur risultando associata ai promotori delle proteine ribosomiali (Marion et al., 2004). Si suppone pertanto che il suo reclutamento a livello dei geni RP sia mediato da altri fattori, quali ad esempio Rap1. Il legame di Sfp1, inoltre, è controllato dalla fosforilazione indotta dalle vie TORC1 e PKA (Jorgensen et al., 2004): in condizioni favorevoli, la proteina è fosforilata e presente nel nucleo, mentre, in risposta a segnali di carenza nutrizionale e di stress, Sfp1 è delocalizzata nel citoplasma, dove viene sequestrata attraverso l'interazione con la proteina Mrs6 (Singh and Tyers, 2009). Tuttavia, come Sfp1 possa agire nel promuovere la trascrizione, non è tuttora noto. Ulteriori elementi di controllo dell'espressione dei geni per le proteine ribosomiali, sono Hmo1, il complesso Rpd3L e la proteina Stb3. Hmo1 si lega al 70% dei promotori dei geni per le proteine ribosomiali e ne influenza positivamente la trascrizione (Hall et al., 2006). Il suo reclutamento sembra dipendere dall'interazione con Rap1, anche se il fatto che Hmo1

si legghi anche ai promotori che non presentano siti di legame per questa proteina, lascia ipotizzare che altri elementi possano contribuire al suo reclutamento. Tra questi, vi è una sequenza *in cis*, nota come elemento IFHL, dal consenso CTAGGCNGR, che, quando presente, è richiesta per la piena attività del promotore. Il ruolo di questo elemento è tuttavia controverso: sebbene si ipotizzi che tale elemento di sequenza rappresenti il sito di legame per Hmo1, per quanto alcuni geni che risultano legati da tale fattore non presentino questo motivo IFHL (Kasahara et al., 2010), secondo un'ipotesi alternativa, questo tratto di sequenza potrebbe in realtà essere legato da Fhl1 (Wade et al., 2004). Un altro fattore potrebbe essere l'interazione con Fhl1 (e indirettamente con Fh1); in effetti, le due proteine sono in grado di interagire fisicamente e il legame di Hmo1 risulta abolito in assenza di Fhl1 e viceversa. Anche il preciso ruolo di Hmo1 non è ancora chiarito; è stato ipotizzato che esso possa servire a mantenere la cromatina in uno stato aperto e accessibile, ma lo studio di mutanti $\Delta hmo1$ ha dimostrato che, almeno per il promotore di RPS5, la proteina non è richiesta per la formazione e il mantenimento della NFR, bensì, per il corretto posizionamento del complesso di pre-inizio e per la scelta del sito di inizio della trascrizione (Kasahara et al., 2010).

Rpd3L, invece, è un complesso di rimodellamento della cromatina, dotato di una subunità con attività deacetilasi, che agisce sugli istoni in prossimità del TSS, reprimendo così l'inizio della trascrizione. Rpd3, la subunità catalitica del complesso, è implicata nella regolazione dei geni per le proteine ribosomiali e dei geni *ribi* a valle di TORC1 (Humphrey et al., 2004; Rohde and Cardenas, 2003) e, come dimostrato da Huber e collaboratori (Huber et al., 2011), la sua azione è controllata principalmente da Sch9. In condizioni di carenza di nutrienti, l'inattivazione di Sch9 determina il reclutamento della proteina Stb3 (di cui si tratterà meglio in seguito) in una posizione vicina o coincidente ai siti di legame per Rap1. Stb3 interferisce così con la funzione di Rap1/Fhl1 e media il legame di Rpd3L ai promotori, determinando la repressione della trascrizione. In condizioni favorevoli alla crescita, invece, Stb3 è fosforilata da Sch9 e mantenuta inattiva nel citoplasma. In alcuni promotori, a circa 160bp dal TSS, è stato trovato un motivo, detto RGE (Rapid Gro"wt" h Element, AAATTTT), la cui funzione non è nota, ma che molto somiglia al consenso per il sito di legame di Stb3. Questo elemento è noto per il suo ruolo nel "rewiring" del network trascrizionale delle RP citoplasmatiche e mitocondriali, avvenuto nel percorso evolutivo dei lieviti (Ihmels et al., 2005; Wapinski et al., 2010) e, in *Candida albicans*, è arricchito nei

promotori dei geni per le proteine ribosomiali mitocondriali ed è richiesto per la loro piena espressione (Ihmels et al., 2005).

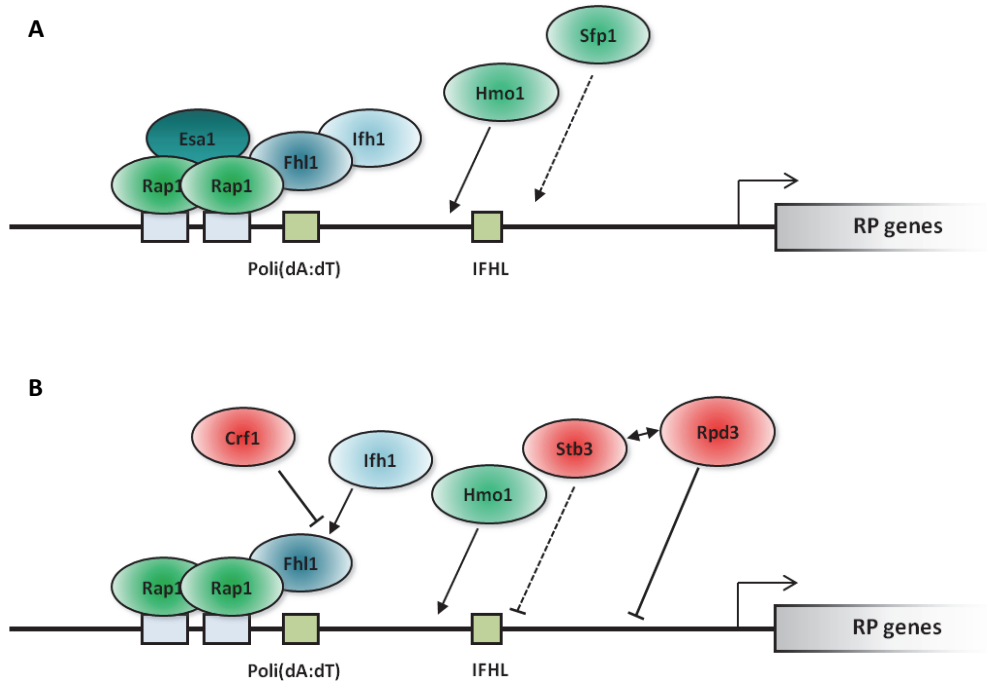


Figura 4 Rappresentazione schematica degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi coinvolti nella regolazione della trascrizione dei geni per le proteine ribosomiali in *S. cerevisiae*. **A)** Regolatori positivi della trascrizione. **B)** Regolatori negativi della trascrizione (sono indicati in rosso).

Parte I

Regolazione trascrizionale dei geni *ribi*

Geni *ribi*

La sintesi dei ribosomi richiede l'espressione di un gruppo numeroso ed eterogeneo di geni, indicati con il termine *ribi genes*, codificanti per proteine che partecipano al processo di biogenesi, ma che, a differenza delle proteine ribosomiali, non fanno parte del ribosoma stesso. Questo insieme comprende più di 230 unità trascrizionali, la maggior parte delle quali (circa 150) codifica per fattori che intervengono nella modificazione degli rRNA e nell'assemblaggio dei ribosomi, altre per subunità della RNA Polimerasi I e III, per enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi, per tRNA sintetasi e per fattori implicati nel metabolismo e nel trasporto nucleo-citoplasmatico dei tRNA. Nonostante le loro diverse funzioni, questi geni sono stati raggruppati in una comune categoria dal momento che, come emerso da studi finalizzati a ricercare programmi di espressione genica in particolari condizioni ambientali, sono soggetti a co-regolazione (Gasch et al., 2000; Jorgensen et al., 2002; Wade et al., 2001). L'idea alla base di questi lavori era identificare e raggruppare geni appartenenti al medesimo pathway. Utilizzando la tecnica del DNA microarray, sono stati analizzati i programmi di espressione dell'intero genoma in risposta a diversi cambiamenti ambientali, quali shock termici, shock iper- e ipo-osmotici, limitazione della disponibilità di amminoacidi, riduzione della fonte di azoto, progressione nella fase stazionaria, trattamenti con menadione, perossido di idrogeno e DTT. È stato così dimostrato che le cellule di lievito sono in grado di riconoscere i vari segnali cellulari e di rispondervi, creando un programma di espressione genica unico e specifico, che integra le varie risposte individuali a ognuno di questi singoli segnali (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000). Inoltre, sulla base del loro profilo di espressione, i geni sono stati suddivisi in gruppi e sono state definite classi di geni potenzialmente co-regolati. Tra le unità trascrizionali represses in condizioni di stress sono state identificate, oltre a quelle codificanti per le proteine ribosomiali citoplasmatiche, anche quelle codificanti per subunità delle RNA Polimerasi, per sintetasi del tRNA, per proteine richieste per il processamento degli rRNA e per un piccolo set di fattori di inizio della trascrizione. Studi successivi (Wade et al., 2001) hanno dimostrato la coregolazione di 65 di questi geni in condizioni di heat shock, trattamento con tunicamicina e fattore α . Dal momento che questo set risulta arricchito in geni coinvolti nella produzione degli rRNA maturi e dei ribosomi, è stato definito "RRB (rRNA and Ribosome Biosynthesis) regulon", distinguendolo dall' "RP regulon", poiché questi due gruppi di geni esibiscono un profilo di

espressione simile ma non sovrapponibile. Il numero di geni facenti parte di questo gruppo è stato successivamente ampliato, utilizzando come riferimento il set di 65 geni definito inizialmente; a oggi, secondo la stima più affidabile, si contano più di 200 unità trascrizionali (Jorgensen et al., 2004) anche se, rendendo meno stringenti i criteri, è possibile ampliare l'“RRB regulon” fino a 457 geni (Wade et al., 2006).

Elementi di controllo della trascrizione dei geni *ribi*

Come suggerito dalla loro regolazione coordinata, i promotori dei geni *ribi* hanno un'architettura comune, in modo analogo a quelli codificanti per le proteine ribosomiali.

Essi sono caratterizzati dall'assenza della TATA box e, come evidenziato da analisi bioinformatiche basate sul software MEME (Bailey and Elkan, 1994), sono arricchiti di due motivi di sequenza: PAC e RRPE (Wade et al., 2001; Wade et al., 2006). Il PAC (Polymerase A and C), così denominato per la sua presenza a monte dei geni codificanti per le subunità delle Polimerasi I e III, ha una sequenza consenso di circa 10 bp (GCGATGAGMT, M corrispondente a A o C) ed è localizzato 50-125 bp a monte del sito d'inizio della trascrizione. RRPE (Ribosomal RNA Processing Element) è lungo circa 11 bp, è localizzato 100-150 bp a monte del sito di inizio della trascrizione e ha, come consenso, la sequenza TGAAAA“WT”TTY (dove W sta per A o T e Y per T o C). Secondo Tyers e collaboratori, questi due elementi sono presenti, rispettivamente, a livello del 51% e del 57% dei promotori dei geni *ribi* e il 35% dei geni li presenta entrambi; in questo caso sono prevalentemente orientati in direzione 5'→3' e situati a una distanza di 12-35 bp l'uno dall'altro. La loro posizione, analoga a quella occupata dalla TATA box nei promotori che la contengono, ha indotto a suggerire che essi possano agire in questi promotori come “core promoter elements” (Boorsma et al., 2008) e varie evidenze sperimentali indicano che PAC e RRPE sono richiesti per la risposta dei geni *ribi* allo stress e per la loro espressione coordinata (Slattery and Heideman, 2007; Wade et al., 2001; Wade et al., 2006). È stato mostrato che la probabilità che più geni *ribi* rispondano ai trattamenti con il medesimo profilo di espressione è strettamente legata alla presenza di entrambi i motivi PAC e RRPE, al loro orientamento e alla loro distanza rispetto all'ATG (Beer and Tavazoie, 2004). I geni che presentano entrambi i siti e hanno il PAC entro 140 bp dall'ATG e l'RRPE entro 240 bp

dall'ATG hanno la maggiore probabilità di essere coregolati (67%); i geni che presentano entrambi i motivi, ma non soddisfano le regole di distanza dall'ATG, presentano una bassissima probabilità di coregolazione, non diversa da quella valutata considerando geni scelti casualmente.

Si ritiene che questi due elementi di sequenza siano dei siti di repressione, richiesti per la rapida repressione della trascrizione ad esempio in carenza di glucosio o in cellule in fase stazionaria, e sono stati identificati fattori agenti *in trans* in grado di legarli. Analisi di "protein-binding microarrays" (tecniche che si basano su array di proteine ibridati con sequenze di DNA e che permettono, su larga scala, i possibili siti di legame delle proteine di interesse) (Badis et al., 2008; Freckleton et al., 2009; Zhu et al., 2009) hanno mostrato che PAC è riconosciuto da due proteine: Dot6/Pbf1 (PAC Binding Factor 1) e Tod6/Pbf2 (PAC Binding Factor 2), fattori di trascrizione omologhi fra loro, dotati di un dominio di legame al DNA "Myb-like" del tipo elica-giro-elica, lo stesso che si ritrova in Tbf1 e Reb1. Dot6 e Tod6 agiscono in sinergia come repressori che, in condizioni di stress, si legano al PAC e reprimono la trascrizione dei geni per il processamento degli rRNA (Lippman and Broach, 2009).

Il motivo RRPE è riconosciuto e legato dalla proteina Stb3 (Sin Three Binding protein), nonostante in quest'ultima non sia ancora stato trovato un dominio di legame al DNA (Liko et al., 2007). Studi più recenti (Huber et al., 2011; Liko et al., 2010) indicano che in condizioni sfavorevoli, a esempio in carenza di nutrienti, la proteina è in grado di migrare dal citosol, dove è localizzata invece in condizioni favorevoli alla crescita, nel nucleo, dove agisce come repressore della trascrizione dei geni per le proteine ribosomiali e dei geni *ribi*; non esiste, al momento, una posizione concorde relativamente al suo meccanismo d'azione. Secondo Liko e collaboratori, Stb3 esplica la sua attività repressiva richiamando il complesso Sin3/HDAC (istone deacetilasi) che deacetila gli istoni presenti localmente, limitando la trascrizione; secondo Huber e collaboratori, invece, Stb3, unitamente a Dot6 e Tod6, agirebbe per reclutare il complesso Rpd3L, a sua volta responsabile della deacetilazione degli istoni e della repressione della trascrizione.

L'associazione delle tre proteine ai loro siti bersaglio è controllata dalla fosforilazione dipendente dalle due vie di segnalazione TORC1 e PKA, agenti in parallelo; la prima controlla tutte e tre le proteine, principalmente, ma non solamente, tramite il suo effettore Sch9; la seconda sembra agire essenzialmente su Dot6 e Tod6 (Chen and Powers, 2006;

Huber et al., 2011; Liko et al., 2010; Lippman and Broach, 2009). Il modello proposto prevede che, in condizioni favorevoli alla crescita, le tre proteine siano fosforilate su più siti da PKA e da TORC1 e/o da loro effettori, e mantenute così inattive. In condizioni di stress o di carenza di nutrienti, la loro defosforilazione, ad opera di una o più fosfatasi non ancora identificate, determina l'attivazione di Dot6 e Tod6 e quella di Stb3 che, defosforilato, migra nel nucleo. A questo punto si verifica il legame di Dot6, Tod6 e Stb3, rispettivamente, al PAC e all'RRPE. Una volta legate al DNA, le tre proteine agiscono insieme per reclutare complessi di rimodellamento della cromatina che deacetilano gli istoni e reprimono la trascrizione.

Tuttavia, come notato da Huber e collaboratori, il fenotipo di ridotta crescita che si osserva nei mutanti di Sch9, dovuto all'inibizione del processo di biogenesi dei ribosomi, è solo parzialmente alleviato dalla sovraespressione delle proteine Stb3, Dot6, Tod6 e questo fa pensare che, a valle di Sch9, possano esistere altri fattori, al momento non identificati, che intervengono nella regolazione dei geni richiesti per la biogenesi dei ribosomi (Huber et al., 2009). Inoltre, riguardo all'RRPE va sottolineato che la sua sequenza comprende due corti tratti poli(dA:dT), con orientamento opposto l'uno con l'altro, i quali, a causa della loro intrinseca rigidità strutturale, dovrebbero sfavorire la formazione di nucleosomi. Si può quindi ipotizzare che questo elemento possa contribuire alla regolazione della trascrizione dei geni che lo contengono in diversi modi: sia mediante il legame di fattori proteici agenti *in trans*, come il repressore Stb3, sia in virtù delle sue proprietà strutturali (Field et al., 2008). In quest'ultimo caso, i due tratti poli(dA:dT) potrebbero servire a mantenere la regione circostante libera da nucleosomi e accessibile. A questo proposito, è interessante l'osservazione che i geni che contengono il sito PAC in una regione libera di nucleosomi rispondono più rapidamente all'induzione a seguito dell'aggiunta di glucosio al terreno rispetto ai geni che hanno un sito PAC ma una NFR non ben definita e parzialmente coperta da nucleosomi (Zawadzki et al., 2009). A livello dei promotori *ribi*, pertanto, l'elemento RRPE potrebbe supportare l'attività del PAC non solo mediante la cooperatività tra le proteine che li legano, ma anche favorendo l'accessibilità del DNA semplicemente in virtù della sua sequenza (Lippman and Broach, 2009).

Un altro noto regolatore trascrizionale dei geni *ribi*, anch'esso sottoposto al controllo da parte di TORC1 (Lempiainen et al., 2009), è Sfp1, richiesta per l'attivazione della trascrizione (Fingerman et al., 2003; Jorgensen et al., 2002; Jorgensen et al., 2004). Dato che la proteina

contiene domini di legame al DNA e che il gruppo di unità trascrizionali regolate da Sfp1 è arricchito di geni aventi l'elemento RRPE nel promotore, era stato ipotizzato che la proteina potesse legare il DNA proprio riconoscendo questo sito. Tuttavia il legame della proteina ai promotori non è mai stato dimostrato, pertanto, si suppone che, in modo analogo ai geni per le proteine ribosomiali, Sfp1 possa essere reclutata da fattori tuttora non identificati, o che la sua azione si espliciti indirettamente, probabilmente mediante interazione con qualche altra proteina.

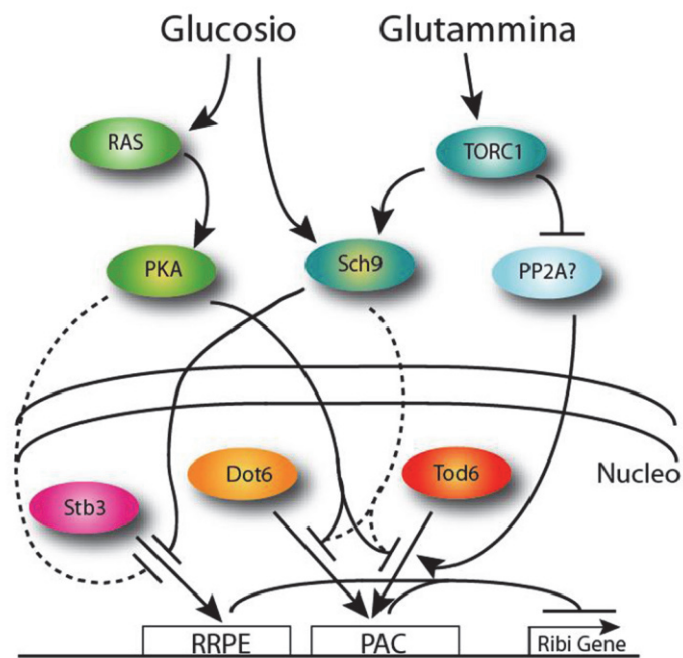


Figura 5 Rappresentazione dei diversi fattori responsabili della regolazione dell'espressione dei geni *ribi*. Adattata da (Lippman and Broach, 2009).

Scopo della Ricerca

Sebbene la regolazione dei geni *ribi* sia stata in parte definita e siano stati identificati vari fattori, quali Sch9 e, più a valle, Sfp1 e Stb3, che possono coordinarla con la trascrizione delle altre classi di geni coinvolti nel processo di sintesi dei ribosomi, esistono ancora punti non chiari e domande irrisolte. Queste proteine sono sufficienti a spiegare la regolazione di più di 200 geni? Inoltre, mentre lo scenario degli eventi che portano alla rapida repressione dei geni *ribi* in condizioni sfavorevoli alla crescita è stato delineato abbastanza bene, a oggi, non si conosce ancora cosa avvenga in condizioni che promuovono la crescita, quando la sintesi dei ribosomi è attiva e richiede l'espressione coordinata di queste centinaia di unità trascrizionali. Sfp1 agisce come regolatore positivo, ma è una proteina poco abbondante (Xu and Norris, 1998) e quindi può essere sufficiente per la regolazione di due classi di geni (per le proteine ribosomiali e *ribi*) così numerose? Senza contare che, come emerge dai lavori presentati, ci sono aspetti del suo meccanismo d'azione ancora non chiari.

Lo scopo di questa ricerca pertanto, è verificare se in *Saccharomyces cerevisiae* esistono altri elementi *cis*- e *trans*-regolativi non ancora identificati necessari per la trascrizione dei geni *ribi*.

Risultati e Discussione

Analisi delle regioni a monte dei geni

Al fine di identificare ulteriori elementi coinvolti nella regolazione trascrizionale dei geni *ribi* abbiamo deciso di analizzare le loro regioni promotore con un approccio computazionale, alla ricerca di motivi di sequenza conservati, aggiuntivi o alternativi al PAC e all'RRPE, che potrebbero essere importanti per l'espressione di questi geni o *per se*, o perché siti di legame per fattori di trascrizione.

In passato, era già stata effettuata un'analisi informatica dei promotori *ribi*, mediante l'uso del software MEME che, dato un insieme di sequenze, permette di trovare i motivi che vi sono arricchiti; tale analisi, tuttavia, non aveva rivelato altri motivi oltre a PAC e RRPE (Refs). Pertanto, abbiamo deciso di utilizzare un approccio differente, basato sull'analisi filogenetica dei promotori di ciascun gene in 5 specie di Saccaromiceti. In questo modo, per ogni unità trascrizionale, è possibile verificare la presenza, nella regione a monte, di sequenze conservate nell'evoluzione e, perciò, potenzialmente importanti per la regolazione. Successivamente, si procede confrontando i risultati sui singoli loci, per vedere se esistono sequenze a monte ricorrenti in più geni che, quindi, potrebbero essere richieste non solo per la regolazione dell'espressione di una singola unità trascrizionale, ma anche per permettere una trascrizione coordinata di più geni. Questo approccio, già usato in precedenza nel nostro laboratorio per caratterizzare i promotori di altri gruppi di geni, è più lento e laborioso di un'analisi MEME ma permette di identificare agevolmente anche elementi regolativi bipartiti, ossia costituiti da due tratti consenso separati da una regione con sequenza qualsiasi, come ad esempio il sito di legame per la proteina Abf1 (RTCAYNNNNACGR) o siti degenerati.

Abbiamo scelto di analizzare le sequenze promotrici dei 236 geni che formano l'RRB regulon secondo criteri stringenti e che sono indicati nei Materiali Supplementari del lavoro di Tyers e collaboratori (Jorgensen et al., 2004). Per ciascun gene è stata fatta una ricerca di omologia nel genoma di quattro specie di emiascomiceti, evolutivamente correlati a *S. cerevisiae*: *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii* (Kellis et al., 2003) per identificare gli orologi di ogni unità trascrizionale. Per ognuna sono state poi considerate le sequenze "upstream" (in media 600 bp rispetto all'ATG; per alcuni geni, quali YPR035W,

si sono considerate 1000bp data la notevole lunghezza della regione 5'UTR) che sono state allineate, usando il programma ClustalX, con le sequenze a monte dei geni ortologhi nelle altre specie. È stato possibile effettuare l'allineamento delle sequenze promotrici di 228 geni sui 236 d'interesse; 8 geni sono stati esclusi dall'analisi poiché non sono state trovate più di due sequenze ortologhe per ciascun gene. In questi casi, dall'allineamento risulta la conservazione dell'intera regione a monte e non è possibile distinguere le sequenze conservate perché importanti per la regolazione da quelle che risultano invece conservate per effetto della vicinanza evolutiva delle specie. L'analisi degli allineamenti è stata effettuata inizialmente in modo manuale e poi integrata con le informazioni riportate in diversi database (YPA (Chang et al., 2011), SGD (Cherry et al., 1998), Jaspar (Sandelin et al., 2004), <http://steinmetzlab.embl.de/NFRsharing/index.html> (Xu et al., 2009)) e controllati con il programma MatInspector (<http://www.genomatix.de>) che permette di identificare siti di legame per fattori di trascrizione noti. Relativamente al motivo PAC, è bene precisare che è stato considerato come consenso la sequenza GCGATGAGMT (M corrispondente a A o C) riportato da Wade (Wade et al., 2006) e nei lavori successivi, più breve rispetto alla sequenza GCGATGAGMTGAG indicata invece inizialmente (Wade et al., 2001) e ricercata nello studio di Tyers (Jorgensen et al., 2004).

L'analisi filogenetica ha confermato che gli elementi più frequenti nei promotori dei geni *ribi* sono i siti PAC e RRPE, in accordo con quanto noto in letteratura. In particolare, si è osservato che dei 228 promotori analizzati, 146 (64%) contengono il motivo PAC, 164 il motivo RRPE (72%) e 117 (51%) li presentano entrambi. Confrontando la lista dei geni i cui promotori contengono il PAC e/o l'RRPE ottenuta al termine della nostra analisi con quella di Tyers e collaboratori (Jorgensen et al., 2004), possiamo osservare che ritroviamo la maggior parte delle unità trascrizionali indicate nel loro lavoro; gli unici geni in più elencati da Tyers sono tra gli 8 che non abbiamo analizzato. Tuttavia, rispetto allo studio sopra citato, abbiamo identificato un maggior numero di promotori contenenti il PAC e/o l'RRPE; questa discrepanza è spiegabile considerando che, nella nostra analisi, abbiamo incluso anche i promotori contenenti motivi, conservati negli ortologhi, che differiscono per una o due basi rispetto al consenso. In questi casi, abbiamo notato che a variare sono generalmente le prime due basi del motivo o le ultime due. Inoltre, per quanto riguarda il PAC, bisogna considerare che la sequenza da noi usata come consenso è più breve rispetto a quella usata da Tyers e questo potrebbe essere un'ulteriore possibile spiegazione della

differenza nel numero di promotori trovati. La posizione dei motivi PAC e RRPE nei promotori analizzati conferma quanto descritto in letteratura: il primo si posiziona tra 75 bp e 150 bp a monte dell'ATG e tra 50 bp e 125 bp a monte del TSS, mentre il secondo è localizzato tra 100 bp e 175 bp a monte dell'ATG e tra 75 bp e 150 bp a monte del TSS.

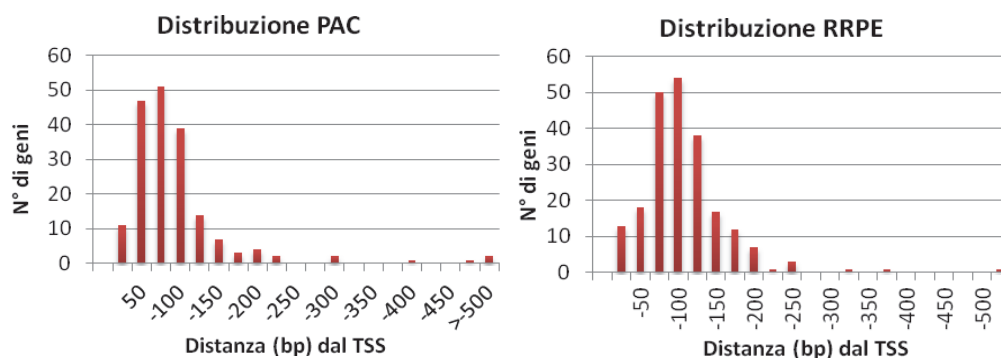


Figura 7 Istogrammi della distribuzione dei motivi PAC e RRPE rispetto al TSS nei promotori dei 228 geni *ribi* analizzati.

Si osserva poi un notevole arricchimento dei motivi che nella libreria dei siti di legame al DNA per fattori di trascrizione noti (Badis et al., 2008) sono riportati come possibili siti di riconoscimento per le proteine Sfp1, Sum1 e Azf1. Tuttavia, come già sottolineato nell'introduzione, il motivo ipotizzato come sito di legame per Sfp1, è sovrapponibile all'elemento RRPE e nessuno studio finora è riuscito a dimostrare il legame diretto della proteina a questo motivo. Anche Sum1, fattore di trascrizione richiesto in fase di crescita mitotica per la repressione dei geni specifici della sporulazione e noto anche come fattore di inizio della replicazione, ha un sito di legame al DNA non ben definito (WWATTTWH) e coincidente con l'elemento RRPE. Invece, Azf1, fattore di trascrizione coinvolto nell'induzione del gene CLN3 in risposta al glucosio, riconosce una sequenza consenso corta e ricca in T (TTTTTCTT), abbastanza frequente nei promotori. Di conseguenza, è possibile che riconosca queste regioni in modo non specifico; pertanto, almeno per una prima fase dello studio, abbiamo deciso di non considerare questi siti nelle successive analisi.

Il risultato più interessante di questa analisi è stata l'identificazione, per un numero elevato di geni *ribi*, della presenza, nel promotore, di siti di legame per i fattori generali di trascrizione (GRFs, General Regulatory Factors) Abf1, Reb1, Rap1 e Tbf1. Dei 228 promotori analizzati, 178 (78%) contengono almeno una delle sequenze consenso per i GRFs; di questi, 95 promotori hanno il sito di legame per Abf1, 79 quello per Reb1, 21 il sito per Rap1 e 15 per Tbf1. Nella maggior parte dei casi i promotori hanno siti di legame per un singolo GRF e solo in 32 si trovano siti per più di una tra queste proteine.

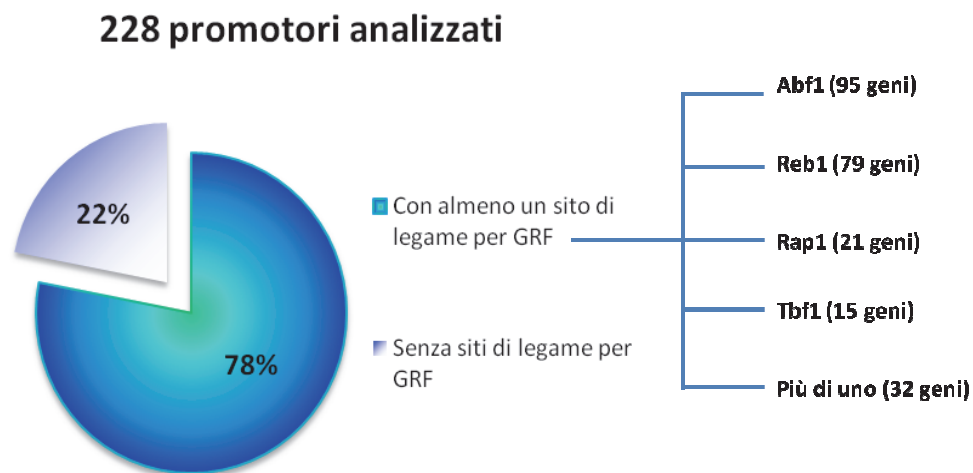


Figura 8 Grafico a torta rappresentante l'arricchimento dei siti di legame per GRFs nei 228 promotori dei geni *ribi* analizzati.

Andando ad analizzare la posizione dei siti di legame per i GRFs rispetto all'ATG o al TSS nelle diverse unità trascrizionali, si osserva che, generalmente, essi ricorrono in posizioni analoghe nei promotori dei differenti geni *ribi*. La posizione media per ciascun sito è specifica per ognuno dei GRFs considerati e corrisponde a quella di solito osservata nei promotori di altri geni bersaglio di questi fattori.

I siti per Abf1 e Reb1 sono rispettivamente localizzati, per lo più, tra le 150 bp e le 200 bp a monte dell'ATG e tra le 100 bp e le 150 bp rispetto al TSS.

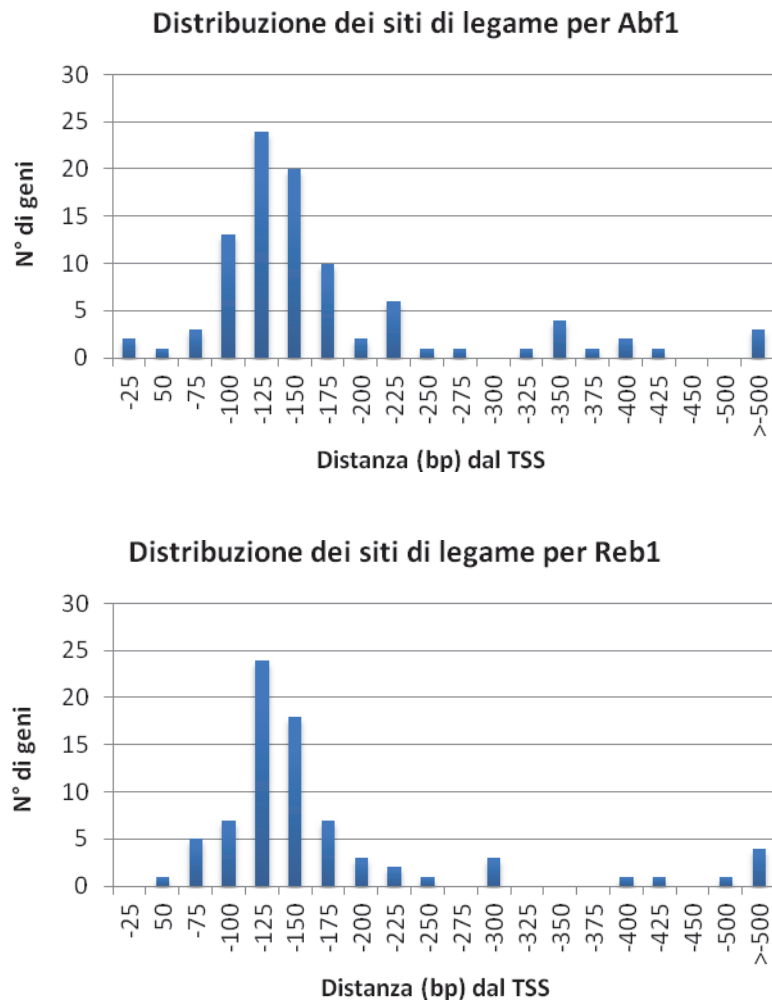


Figura 9 Istogrammi che definiscono la distribuzione rispetto al TSS dei siti per Abf1 (in alto) e Reb1 (in basso) nei promotori dei 228 geni *ribi* analizzati.

Più ampio è invece l'intervallo in cui si trovano i siti di legame per Rap1 e Tbf1; ciò è dovuto anche al ridotto numero di geni che presentano questi siti che fa disperdere maggiormente il dato rispetto a quanto succede per i GRFs più rappresentati. Tuttavia, ciò che si osserva

nella maggior parte dei casi è che il sito Rap1 si localizza più di 500 bp a monte sia dall'ATG che dal TSS, mentre il sito per Tbf1 è situato tra le 175 bp e le 250 bp rispetto all'ATG e tra le 150 bp e le 200 bp rispetto al TSS.

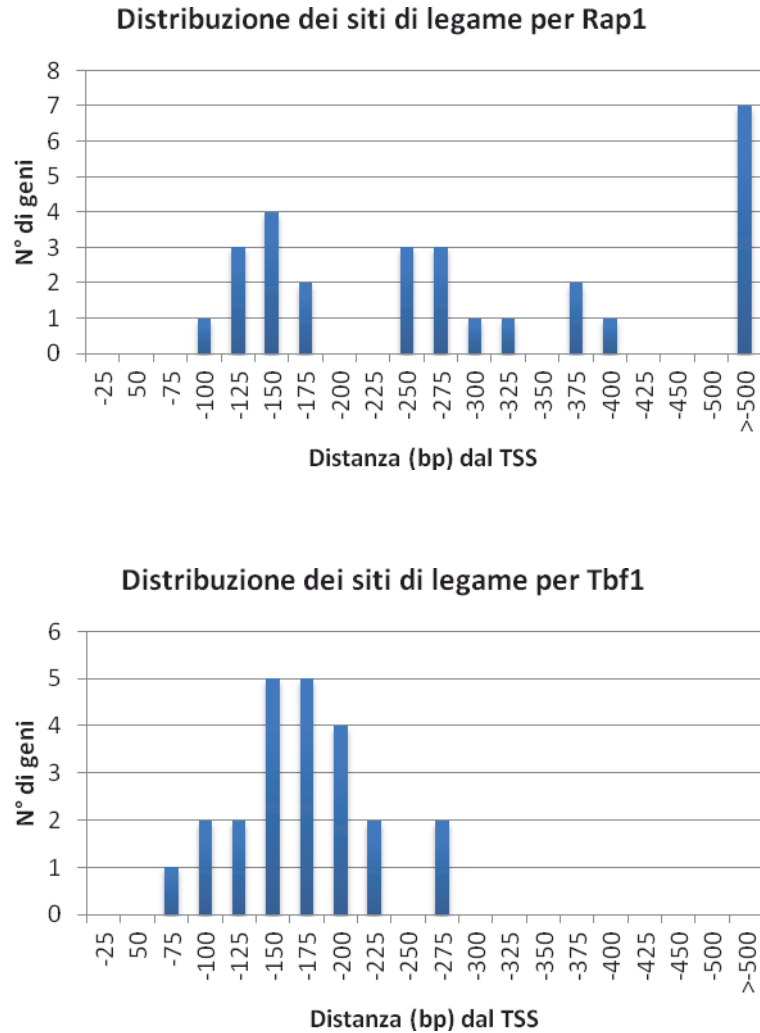


Figura 10 Istogrammi che definiscono la distribuzione rispetto al TSS dei siti per Rap1 (in alto) e Tbf1 (in basso) nei promotori dei 228 geni *ribi* analizzati.

È necessario precisare che la presenza dei siti di legame per GRFs inoltre, non è alternativa a quella del PAC e/o dell'RRPE; infatti, la maggior parte dei geni il cui promotore contiene

un sito di legame per queste proteine presenta anche PAC e RRPE. In particolare, si osserva che dei 95 promotori che hanno il sito per Abf1, il 64% ha anche il PAC, il 75% ha l'RRPE e il 56% li ha entrambi; dei 79 geni con il sito Reb1, il 68% ha il PAC, l'81% ha l'RRPE e il 59% ha sia PAC che RRPE; dei 21 geni con Rap1, 76% contiene il PAC o l'RRPE e il 62% li presenta entrambi; dei 15 geni con un sito per Tbf1, il 67% ha il PAC, l'80% l'RRPE e 60% ha sia PAC che RRPE.

Sulla base dell'analisi filogenetica eseguita, possiamo quindi concludere che i promotori dei geni *ribi* non sono caratterizzati esclusivamente dall'arricchimento degli elementi PAC e RRPE, ma anche dalla presenza di altri motivi che ricorrono in più promotori; tra questi i più rappresentati sono i siti di legame per i fattori generali di regolazione. Come è possibile che non siano stati trovati dagli studi precedenti? Per quanto riguarda il sito di legame per Abf1, la spiegazione più plausibile è che, come precisato in precedenza, l'analisi MEME non permette di trovare sequenze che siano bipartite e abbiano una regione centrale degenerata. Inoltre, se consideriamo singolarmente i siti di legame per ciascun fattore risulta evidente che sono meno frequenti del PAC e l'RRPE e pertanto potrebbero essere stati tralasciati. In ogni modo, l'identificazione di elementi noti per essere riconosciuti da regolatori trascrizionali in un numero elevato di promotori avvalorava l'ipotesi di un loro possibile ruolo nella regolazione trascrizionale dei geni *ribi* e ci premette di provare a ridefinire la struttura del promotore di questo gruppo di unità trascrizionali.

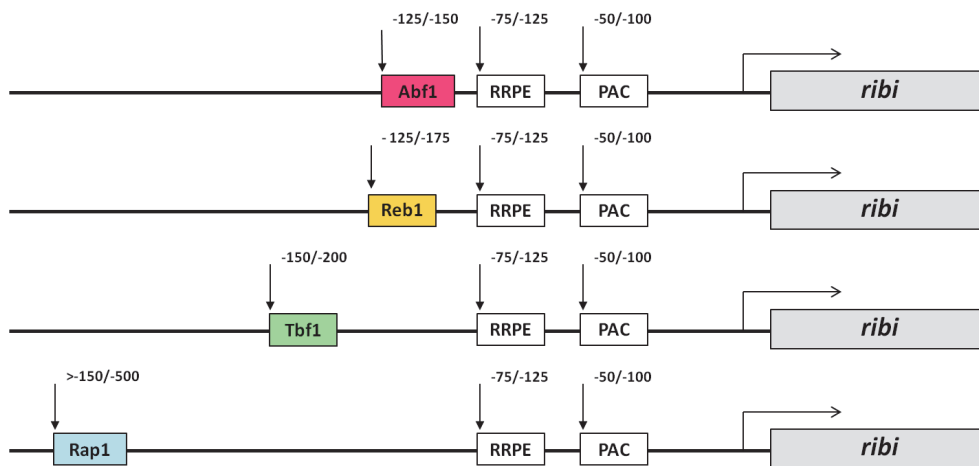


Figura 11 Rappresentazione della struttura dei promotori definita sulla base delle distanze dei siti di legame dal sito di inizio della trascrizione (TSS).

Associazione dei GRFs ai promotori dei geni *ribi*

Per verificare sperimentalmente i risultati dell'analisi *in silico* abbiamo deciso di procedere andando a monitorare *in vivo* il legame dei GRFs a tutti i promotori dei geni *ribi*, mediante un esperimento di immunoprecipitazione cromatinica seguita da sequenziamento massivo del DNA immunoprecipitato (ChIP-seq). Questa tecnica permette di mappare il legame di una proteina a livello genomico e di identificare tutti i suoi potenziali siti bersaglio (Furey, 2012). In questa fase ci siamo concentrati solo su Abf1 e Reb1 in quanto, tra i quattro GRFs, sono quelli i cui siti di legame sono più rappresentati nella regione a monte dei geni *ribi*.

L'esperimento di ChIP-seq è stato effettuato su due ceppi, Abf1_TAP e Reb1_Tap, della collezione "Yeast TAP-Fusion (Ghaemmaghami et al., 2003)", esprimenti le varianti TAP (Tandem Affinity Purification)-tagged dei due regolatori di interesse.

Il procedimento seguito è schematizzato in figura 12.

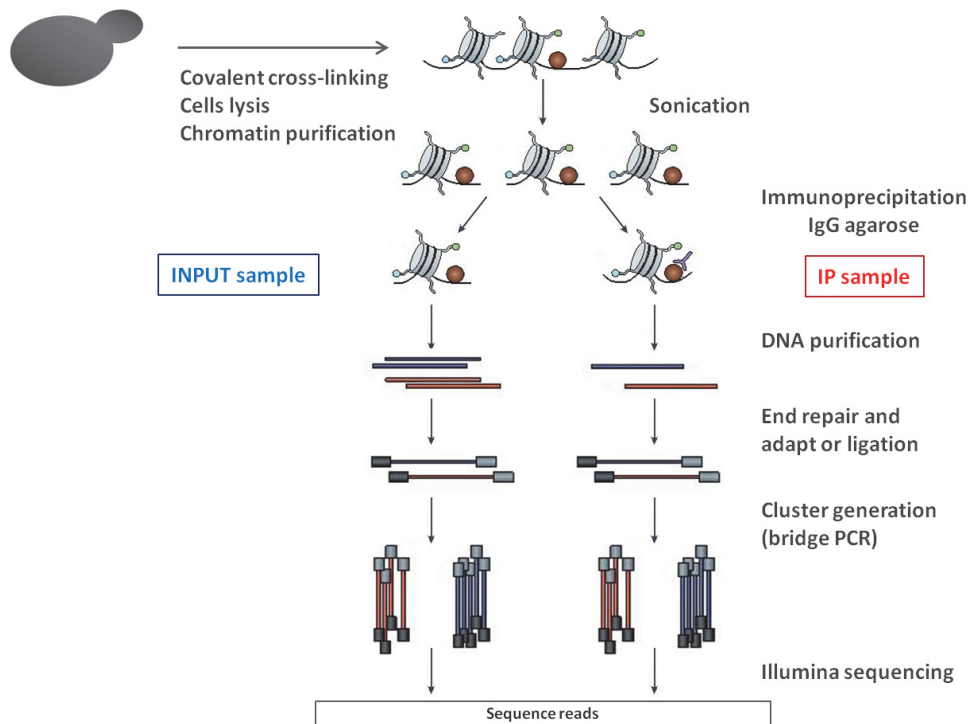


Figura 12 Rappresentazione schematica delle tappe di un esperimento di ChIP-seq.

In breve, le cellule, cresciute in terreno ricco, sono trattate con un agente cross-linkante che permette di legare in modo covalente le proteine alle regioni di cromatina con cui interagiscono. La cromatina viene quindi estratta dalle cellule e frammentata mediante sonicazione. A questo punto, una parte viene immunoprecipitata con un anticorpo specifico (IP sample) in modo da recuperare i complessi proteina-DNA, mentre l'altra (INPUT sample), non è sottoposta a immunoprecipitazione. Il DNA dei campioni IP e INPUT è quindi purificato e legato a delle sequenze adattatrici in modo da preparare delle librerie di frammenti che sono quindi amplificati e sequenziati in modo massivo.

Prima di procedere con l'esperimento di ChIP-seq vero e proprio abbiamo però deciso di verificare il nostro protocollo di immunoprecipitazione cromatinica andando ad analizzare la qualità dei preparati di cromatina mediante PCR quantitativa con primers specifici per un numero discreto di geni. Questa analisi è stata fatta in triplicato sui ceppi Abf1_TAP, Reb1_Tap e su BY4741 che è stato usato come controllo negativo "non-tagged". Sia per Abf1 che per Reb1 abbiamo testato l'associazione delle proteine ai promotori di quattro geni: due geni *ribi* aventi nel promotore un sito di legame per la proteina (*NOG1* e *EBP2* per Abf1; *DRS1* e *RPA49* per Reb1), un gene non-*ribi* riportato come target della proteina (*ARS1021* per Abf1 e *SNR32* per Reb1) e un controllo negativo (*FLR1* per Abf1 e per Reb1). Come si evince dalla figura 13, Abf1 è, come atteso, legato a livello della *ARS1021* e si associa al gene *ribi* *EBP2*; una debole associazione si osserva anche al promotore del gene *NOG1*, mentre nessun legame è riportato per il controllo negativo.

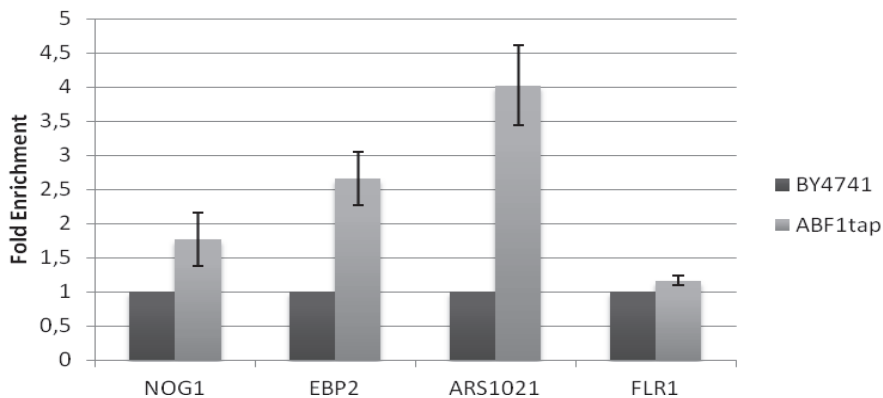


Figura 13 Grafico indicante l'arricchimento (-fold enrichment) riscontrato per i quattro geni analizzati (*NOG1*, *EBP2*, *ARS1021*, *FLR1*) nel ceppo Abf1_TAP. I valori sono espressi in rapporto a quelli ottenuti nel ceppo BY4741. Le barre di errore rappresentano l'errore standard calcolato su tre esperimenti indipendenti.

Un risultato analogo è ottenuto dall'analisi dell'associazione di Reb1 ai promotori; in questo caso, osserviamo un notevole arricchimento, nell'IP sample, della regione a monte del gene *ribi* DRS1 (fold enrichment di circa 20), che è addirittura superiore a quello osservato per il promotore di controllo (fold enrichment di 3,5); tuttavia, si ha solo una debole associazione della proteina all'altro gene *ribi* selezionato. Come atteso, nessun legame è riportato per il controllo negativo *FLR1*.

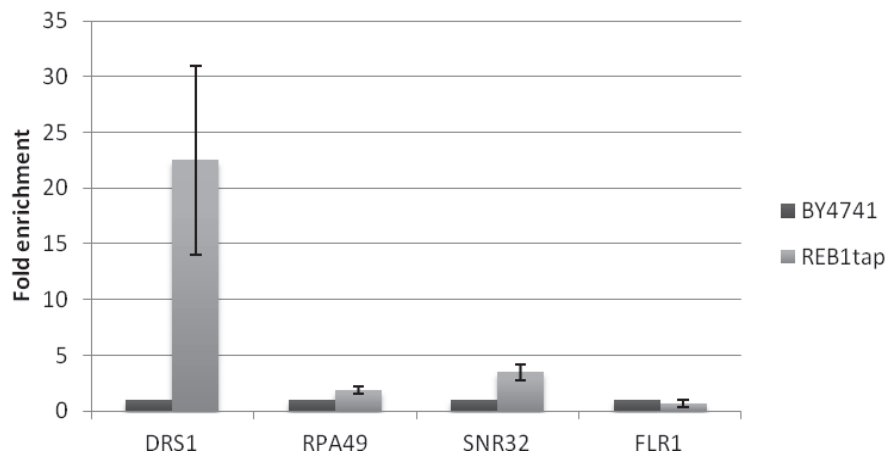


Figura 14 Grafico indicante l'arricchimento (-fold enrichment) riscontrato per i quattro geni analizzati (*DRS1*, *RPA49*, *SNR32*, *ARS1021* [sempre]) nel ceppo *Reb1_TAP*. I valori sono espressi in rapporto a quelli ottenuti nel ceppo *BY4741*. Le barre di errore rappresentano l'errore standard calcolato su tre esperimenti indipendenti.

Verificata la possibilità di recuperare complessi proteina-DNA nei due ceppi, abbiamo deciso di procedere con l'esperimento di CHIP-seq. A tal scopo, è stata effettuata nuovamente l'immunoprecipitazione cromatinica dai ceppi *Abf1_TAP* e *Reb1_TAP* e le cromatine dei campioni IP e INPUT (usato come controllo e per la successiva analisi dei dati) sono state sequenziate in parallelo mediante il sistema "Illumina HiSeq-2000". Le sequenze ottenute ("*reads*") sono state allineate con il genoma di riferimento (*SacCer3*) e filtrate in modo tale da eliminare tutte quelle che non si allineano perfettamente o che non si riescono a mappare in modo univoco. La distribuzione di *reads* è stata analizzata con l'algoritmo di analisi PeakSeq (Rozowsky et al., 2009) che, definita la lunghezza dell'intervallo genomico da analizzare, calcola i *reads* che mappano in ogni finestra e restituisce dei picchi che

rappresentano la densità di *reads* in quella regione. Tale densità è proporzionale alla quantità di cromatina precipitata, la quale a sua volta dipende dalla quantità di proteina associata in quella regione. I picchi possono poi essere visualizzati sul browser “Integrating Genome Browser”. Per valutare l’arricchimento di una particolare regione i picchi ottenuti dall’analisi dell’IP sono stati confrontati con quelli ottenuti dal campione INPUT e i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica in modo da tener conto dell’altezza e della forma di ogni picco oltre che del rumore di fondo medio. Le fasi di preparazione delle librerie, sequenziamento, allineamento delle *reads* e analisi statistica dei picchi sono state effettuate da Roberto Ferrari presso la University of California at Los Angeles.

In totale sono stati mappati circa 1000 siti di legame con un p-value $\leq 10^{-8}$ sia per Abf1 che per Reb1. In particolare, sono stati trovati 864 e 840 loci associati, rispettivamente, solo a Abf1 e a Reb1 e 283 legati da entrambe le proteine. Tali siti sono sparsi nell’intero genoma e sono in gran parte localizzati in regioni intergeniche. Il numero dei loci trovati associati ad Abf1 e Reb1 è inferiore rispetto a quello riportato in altri lavori di mappatura su scala genomica dei siti di legame per Abf1 (Schlecht et al., 2008) (basato su un esperimento di ChIP seguita da mappatura mediante ibridazione con un microarray di DNA) e per Reb1 (Rhee and Pugh, 2011) (dati di un esperimento di ChIP-seq); ciò è dovuto al fatto che, per discriminare i reali siti di legame dal rumore di fondo, abbiamo impostato una soglia di significatività molto elevata. Così facendo, siamo sicuri di ridurre il più possibile il numero dei falsi positivi anche se perdiamo quei siti genomici a cui la proteina è debolmente associata, come per esempio il promotore di RPA49.

La distribuzione dei siti di legame a livello delle regioni intergeniche è riportata in figura 15; come risulta più chiaramente dai pannelli B) e C) la distribuzione media è maggiormente definita per Reb1 rispetto ad Abf1 per il quale è stato riscontrato un maggiore rumore di fondo. In entrambi i casi, comunque, la densità dei segnali di associazione presenta un picco massimo, localizzato intorno alle 100-200 bp rispetto al TSS e, soprattutto per Abf1, ma anche per Reb1, si osserva un’estensione della distribuzione dei picchi a valle del TSS, nella regione codificante. Ciò potrebbe essere dovuto alla risoluzione del sequenziamento, che dipende in gran parte dalla taglia dei frammenti ottenuti dalla sonicazione della cromatina (150-300 bp), ma potrebbe anche non essere un artefatto sperimentale e dipendere da una possibile interazione della proteina con il complesso di pre-inizio o con il nucleosoma +1. La lista dei geni associati alle due proteine è presente in Appendice.

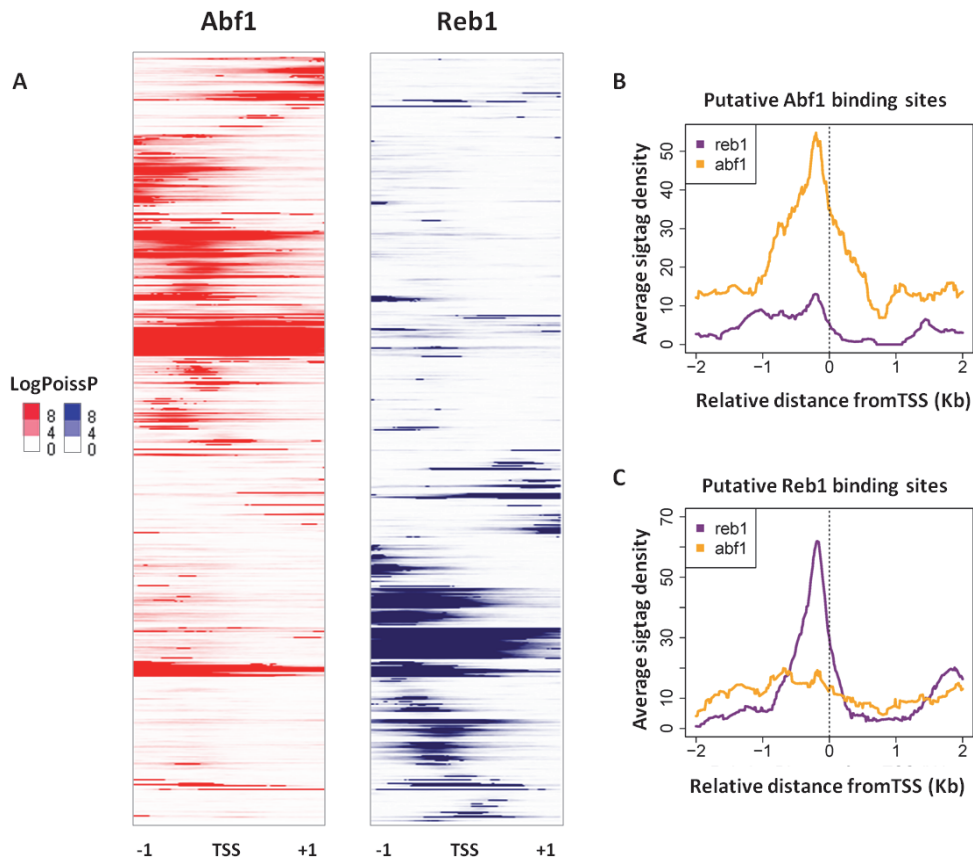


Figura 15 **A)** Heat map rappresentante la distribuzione dei siti di legame per Abf1 (in rosso) e Reb1 (in blu) nei promotori (la distribuzione dei tag dell'IP è normalizzata per quella dell' INPUT, pertanto, un segnale rosso/blu intenso indica un arricchimento dei tag dell'IP rispetto all'INPUT). Per ogni gene è rappresentata una regione di 2 Kb centrata rispetto al TSS e la direzione del filamento non è stata considerata. **B)** Rappresentazione grafica della distribuzione dei picchi per Abf1 (giallo) e Reb1 (viola) in rapporto al TSS dei geni associati a Abf1. Sull'asse X è indicata la distanza dal TSS (fissato come punto 0), sull'asse Y la media della densità dei picchi per ogni posizione; in questo caso la direzione del filamento è stata considerata. **C)** Rappresentazione analoga al pannello B) ma relativa ai geni associati a Reb1.

Per quanto concerne i 236 geni *ribi*, dall'analisi ChIP-seq sul ceppo Abf1_Tap troviamo che 72 (30.5%) risultano associati *in vivo* alla proteina con un p-value $\leq 10^{-8}$. Di questi il 75% è tra i geni che erano stati identificati come ipotetici target di Abf1 dall'analisi *in silico*. Come si evince dalla Heat Map di Abf1 in figura 16, non tutti i geni che contengono un sito Abf1 nel loro promotore sono legati *in vivo* dalla proteina, almeno nelle condizioni sperimentali usate e con il livello di significatività considerato.

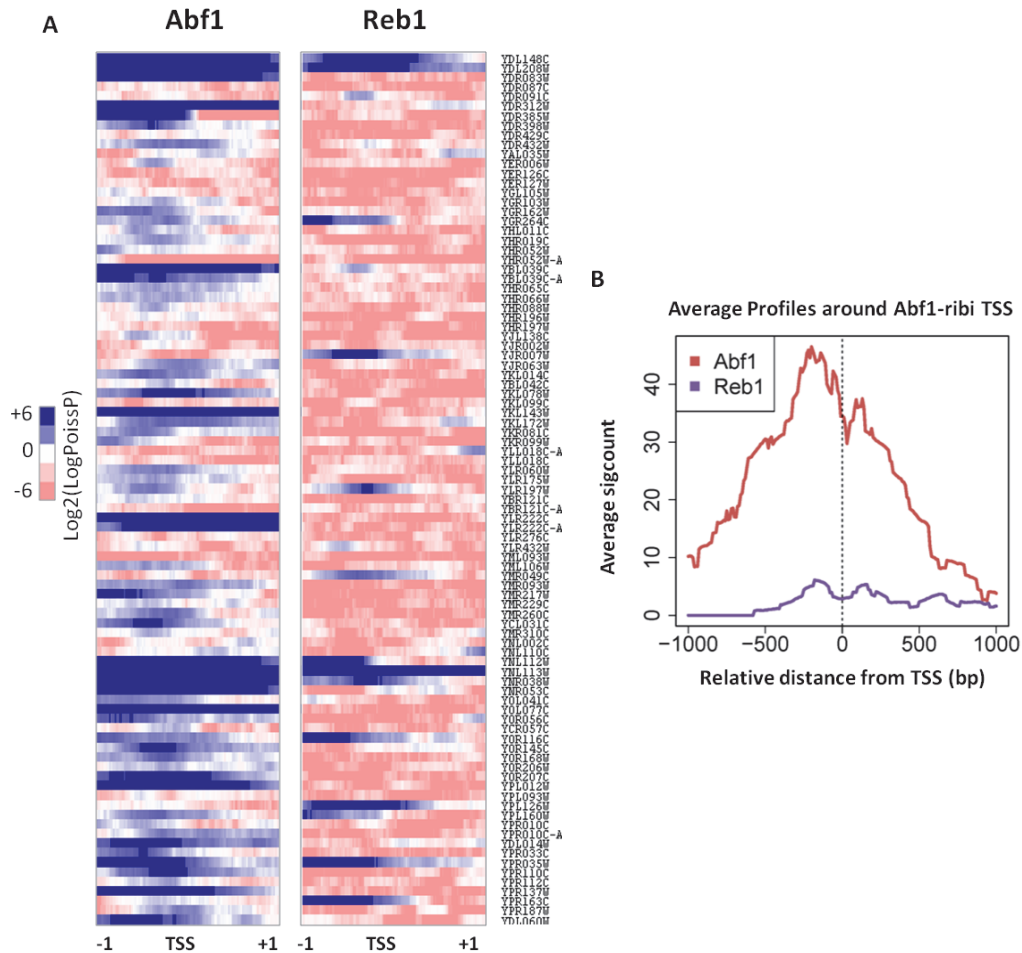


Figura 16 A) Heat map rappresentante la distribuzione dei siti di legame per Abf1 (sulla sinistra) e Reb1 (sulla destra) nei promotori *ribi* aventi un sito di legame per la proteina Abf1. Per ogni gene è rappresentata una regione di 2 kb centrata rispetto al TSS e la direzione del filamento non è stata considerata. **B)** Rappresentazione grafica della distribuzione dei picchi per Abf1 (rosso) e Reb1 (viola) in rapporto al TSS dei geni associati a Abf1. Sull'asse X è indicata la distanza dal TSS (fissato come punto 0), sull'asse Y la media della densità dei picchi per ogni posizione; in questo caso la direzione del filamento è stata considerata.

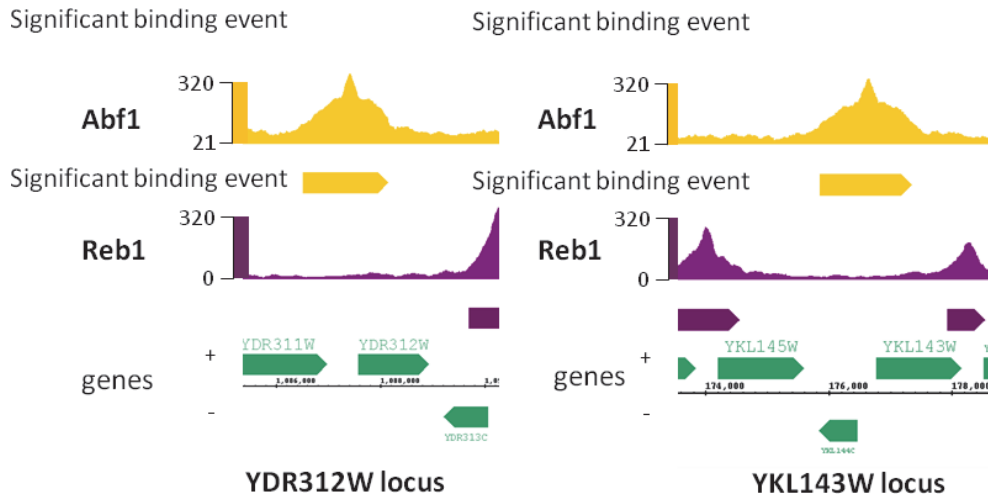


Figura 17 Esempi della distribuzione delle reads a livello dei geni YDR312W e YKL143W.

Inoltre, sono stati identificati altri 14 geni che non erano stati predetti come ipotetici target dall'analisi informatica. Di questi, per tre geni non era stato possibile effettuare l'allineamento, per ciò che riguarda gli altri invece, andando a riverificare gli allineamenti, troviamo che 4 hanno un sito conservato nell'evoluzione ma localizzato all'interno della ORF a monte, pertanto, non lo avevamo considerato nell'analisi *in silico* dal momento che, in questi casi, la regione è interamente conservata. Negli altri geni, invece, è presente in *S. cerevisiae* un sito di legame per Abf1, che però non è interamente conservato negli altri emiascomiceti analizzati e quindi non era stato identificato.

Dalla ChIP-seq effettuata su Reb1 si evince che 67 dei 236 geni *ribi* (28%) risultano associati *in vivo* alla proteina (con un $p\text{-value} \leq 10^{-8}$); 86% di questi erano stati identificati come ipotetici target della proteina dall'analisi *in silico*. Anche in questo caso, quindi, non tutti i geni che contengono un sito Reb1 nel loro promotore sono legati *in vivo* dalla proteina, almeno nelle nostre condizioni sperimentali. Inoltre, con la ChIP, sono stati identificati altri 9 geni target non predetti in precedenza. Di questi, uno è tra i geni non analizzati con l'analisi informatica, 4 hanno un sito conservato nell'evoluzione ma localizzato all'interno

della ORF a monte, e i restanti 4 hanno un sito imperfetto in *S. cerevisiae* e non conservato negli altri emiascomiceti.

Dai due esperimenti di ChIP-seq infine troviamo che 21 geni *ribi* sono associati a entrambe le proteine.

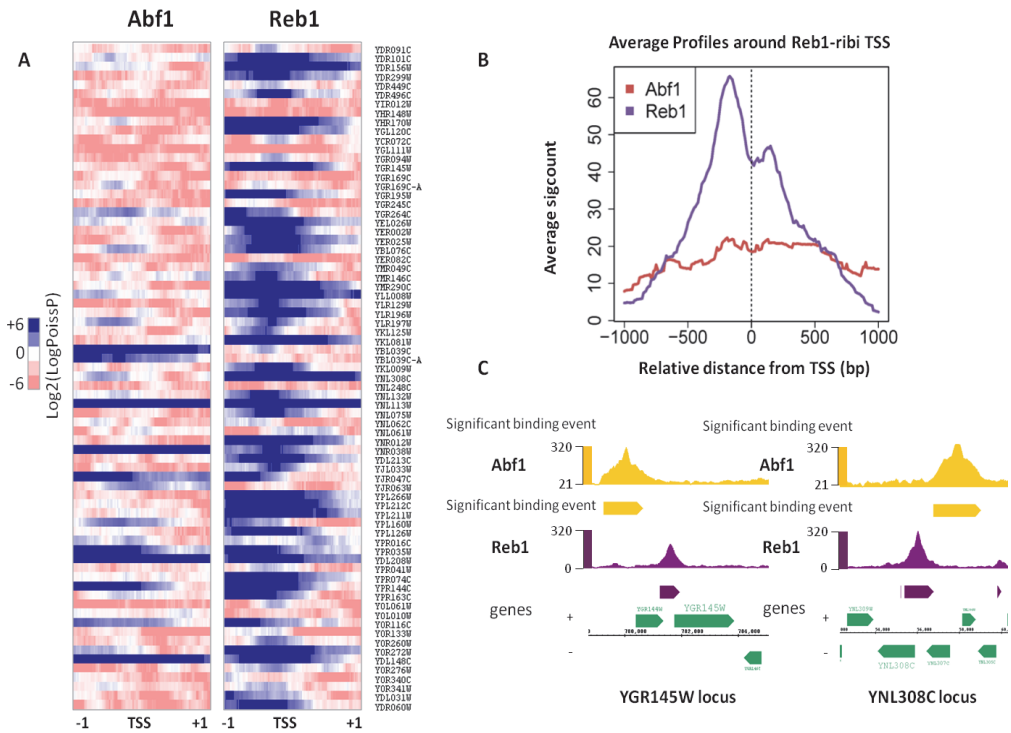


Figura 18 A) Heat map rappresentante la distribuzione dei siti di legame per Abf1 (sulla sinistra) e Reb1 (sulla destra) nei promotori *ribi* aventi un sito di legame per Reb1. Per ogni gene è rappresentata una regione di 2 kb centrata rispetto al TSS e la direzione del filamento non è stata considerata. **B)** Rappresentazione grafica della distribuzione dei picchi per Reb1 (viola) e Abf1 (rosso) in rapporto al TSS dei geni associati a Abf1. Sull'asse X è indicata la distanza dal TSS (fissato come punto 0), sull'asse Y la media della densità dei picchi per ogni posizione; in questo caso la direzione del filamento è stata considerata. **C)** Esempi della distribuzione delle reads a livello dei geni YGR145W e YNL308C, predetti come target di Reb1 dall'analisi *in silico*.

L'analisi di ChIP-seq ci ha quindi permesso di verificare che, nelle nostre condizioni sperimentali, complessivamente Abf1 e Reb1 si legano *in vivo* ai promotori di 118 dei 236 geni *ribi* (50%).

Per valutare l'associazione di Tbf1 a questo gruppo di unità trascrizionali, abbiamo usato i dati ottenuti da un esperimento di ChIP-seq, effettuato su un ceppo Tbf1_13xMyc, frutto di una precedente collaborazione con il gruppo di David Shore dell'Università di Ginevra (Preti et al., 2010). Abbiamo osservato che dei 197 siti che sono associati alla proteina *in vivo*, 9 sono geni *ribi* e sono inclusi tra i 15 nei quali abbiamo identificato, nel promotore, la presenza di un sito di legame per la proteina.

Infine, per poter verificare anche il legame di Rap1, abbiamo sfruttato i dati ottenuti da un esperimento di ChIP-exo (Rhee and Pugh, 2011), che ci hanno permesso di verificare il legame della proteina a 8 geni *ribi*.

Questi dati confermano in parte i risultati dell'analisi *in silico* indicando che, in totale, dei 236 geni *ribi*, 127 (54%) sono associati a un fattore generale di regolazione *in vivo*; di questi 72 a Abf1, 67 a Reb1, 8 a Rap1, 9 a Tbf1 e 29 a più di un GRF. Se estendiamo l'analisi anche agli altri 221 geni che, secondo criteri meno stringenti, possono essere inclusi nell'"RRB regulon", notiamo che, solo prendendo in considerazione Abf1, Reb1 e Tbf1, la frazione dei promotori che sono legati *in vivo* da queste proteine è del 56%; pertanto, il legame, in almeno metà dei geni dell'"RRB regulon", sia ristretto ai geni più coregolati, sia esteso a includere 457 geni, avvalorare l'ipotesi di un possibile ruolo dei GRFs nella regolazione trascrizionale dei geni *ribi*.

Ruolo dei Fattori Generali di Regolazione nella trascrizione dei geni *ribi*

Approccio sperimentale

Per verificare se i GRFs intervengono effettivamente nella regolazione trascrizionale dei geni *ribi* abbiamo deciso di valutare l'effetto di mutazioni sito-specifiche a carico del sito di legame per un dato GRF sulla trascrizione di singoli geni bersaglio; a tal scopo, sono stati scelti 5 geni target, due per Abf1 (YKL143W e YOL041C), due per Reb1 (YDR496C e YDL213C) e uno per Tbf1 (YKR024C).

Tali unità trascrizionali sono tutte non essenziali, presentano a livello del promotore un sito di legame per il GRF d'interesse e risultano legati *in vivo* dalla corrispondente proteina, come evidenziato dai risultati dell'analisi ChIP-seq. I promotori dei geni selezionati, inoltre, presentano i motivi PAC e RRPE; questo potrà essere utile qualora si dimostri un ruolo dei GRFs nella trascrizione, per valutare come questi mutanti si comportano, ad esempio, in condizioni di repressione e se sono sempre co-regolati con gli altri geni *ribi*. I mutanti sono stati creati nei rispettivi ceppi TAP-tagged, per poter monitorare il legame del GRF, e le mutazioni sito-specifiche sono state introdotte a livello genomico in modo tale da modificare esclusivamente il sito d'interesse lasciando inalterato il contesto genomico e cromatinico globale. Per ogni gene, la mutagenesi sito-specifica si è articolata in due passaggi successivi, entrambi basati sul processo di ricombinazione omologa:

- "gene disruption": il locus genomico di interesse viene distrutto mediante l'inserimento di una cassetta di delezione (ottenuta per amplificazione) contenente il gene *URA3* di *K.lactis*, fiancheggiato, alle estremità 5' e 3', da due tratti di 50 bp, omologhi alle sequenze immediatamente a monte e a valle della regione che si vuole eliminare. Nei nostri geni, essa comprende la porzione del promotore contenente il sito per il GRF e buona parte della sequenza codificante. Vengono così creati dei ceppi deleti in cui il gene di interesse è stato in gran parte sostituito dal gene *URA3*.

- "gene replacement": i deleti creati con la "gene disruption" sono trasformati con una seconda cassetta, ottenuta mediante PCR mutagenica, che differisce dal gene "wt" solo per la presenza di mutazioni sito-specifiche nel sito di legame per il GRF. In questo modo, la sequenza codificante viene ripristinata mentre il promotore risulta rimpiazzato da una variante contenente mutazioni puntiformi nel sito di interesse.

Le caratteristiche delle due cassette usate per la trasformazione sono schematizzate nella figura 19; per i dettagli sull'intera procedura, vedere Materiali e Metodi.

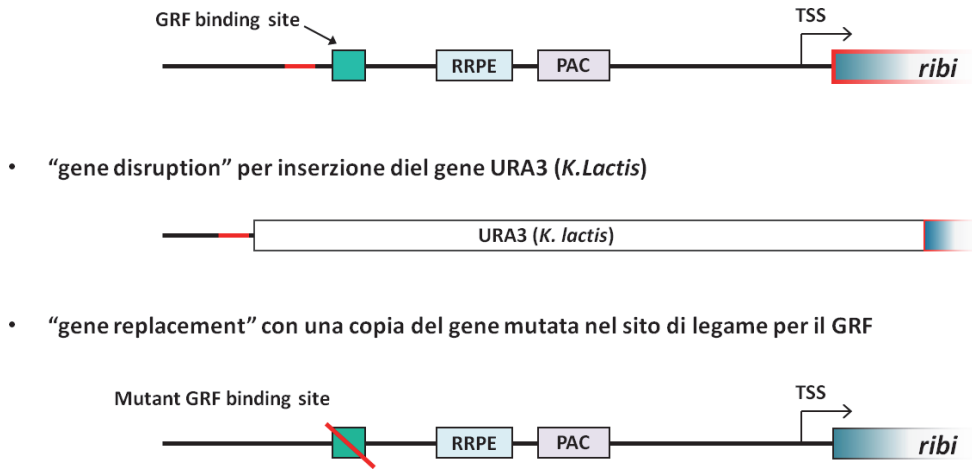


Figura 19 Rappresentazione grafica delle tappe principali della procedura di mutagenesi sito specifica, usata per creare dei ceppi mutanti aventi mutazioni genomiche del solo sito di legame per il GRF studiato. Dall'alto: schema generale della struttura del locus genico che sarà modificato; cassetta usata per la “gene disruption” in cui le porzioni in rosso indicano le regioni omologhe alle sequenze immediatamente a monte e a valle del locus da eliminare; locus genico che sarà presente dopo la fase di “gene replacement”.

In questo modo siamo riusciti a ottenere i mutanti per i due geni scelti come bersaglio di Abf1 (YKL143W e YOL041C), per uno dei due target di Reb1 (*YDR496C*) e per il bersaglio di Tbf1 (*YKR024C*). In quest'ultimo caso, siamo anche riusciti a creare il mutante del solo sito RRPE e un mutante sia del sito di legame per Tbf1 sia dell'RRPE.

Analisi di YKL143W

YKL143W (*LTV1*) è un gene non essenziale codificante per la proteina Ltv1, facente parte del complesso GSE (GTPase-containing complex for Gap1p sorting in the endosomes), richiesto per lo smistamento della permeasi Gap1p dagli endosomi alla membrana plasmatica (Gao and Kaiser, 2006). Ltv1, è anche necessaria per l'espportazione della subunità ribosomiale minore dal nucleo e mutanti della proteina, pur essendo vitali, hanno una ridotta velocità di crescita, attribuibile alla diminuzione della quantità di subunità 40S disponibile per l'assemblaggio dei ribosomi (Seiser et al., 2006).

Il promotore di questo gene contiene il motivo PAC, posizionato 112 bp a monte dell'ATG, il motivo RRPE, a 140 bp dall'ATG, e un sito di legame per Abf1 posizionato 154 bp a monte dell'ATG. Questi tre elementi sono ben conservati in quattro specie di Saccaromiceti (l'ortologo in *S. kudriavzevii*, infatti, non è stato identificato), come emerge dall'allineamento in figura 20.

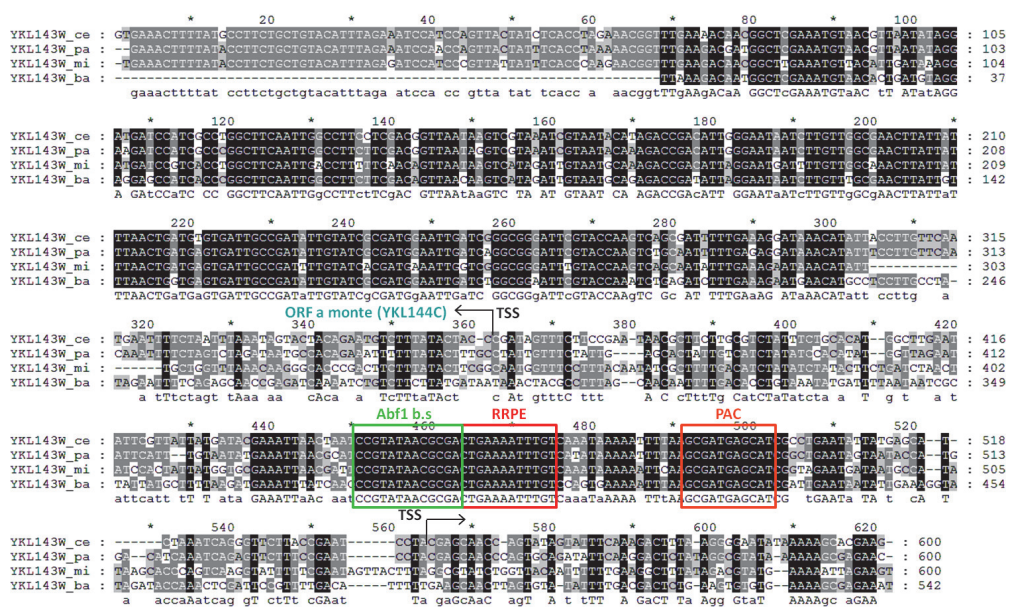


Figura 20 Allineamento delle regioni a monte (600bp) di YKL143W in quattro specie di Saccaromiceti; gli elementi conservati sono evidenziati con colori differenti: in arancione il PAC, in rosso l'RRPE e in verde il sito di legame per Abf1. Sono inoltre indicate le posizione del TSS di YKL143W e della ORF a monte (YKL144C).

La mutagenesi del promotore di *YKL143W* è stata effettuata nel ceppo *Abf1_TAP* e il sito *Abf1* (CCGTATAACGGGAC) è stato sostituito con la sequenza **CGTATTAACGGTAG**, in modo tale da distruggere le due porzioni del sito più conservate nel consenso noto per *Abf1* (YCGNNNNRTGAY). In particolare, per definire il tipo di sostituzioni da eseguire, abbiamo tenuto conto degli effetti osservati in uno studio precedente (Lascaris et al., 2000) sull'efficienza trascrizionale del promotore del gene *RPS28A*, a seguito di mutazioni del sito di legame per *Abf1*.

La riuscita della mutagenesi è stata verificata mediante sequenziamento. Abbiamo notato, inoltre, un rallentamento della crescita del ceppo mutante (*Abf1_TAP YKL143W Abf1b.smut*) rispetto al "wt"; infatti, mentre per *Abf1_TAP* è stato osservato un tempo di replicazione medio di circa 1h 40', il tempo di replicazione medio dei cloni *Abf1_TAP YKL143W Abf1b.smut* è circa di 2h 30'.

Per valutare l'effetto delle mutazioni sito-specifiche introdotte nel sito di legame per *Abf1*, il ceppo "wt" e il mutante sono stati cresciuti in terreno ricco e raccolti in fase esponenziale di crescita, per poi procedere con un esperimento di immunoprecipitazione cromatinica (ChIP), con anticorpi contro il TAP-tag, sui ceppi *BY4741*, *Abf1_TAP* e *Abf1_TAP YKL143W Abf1b.smut*. Il livello di arricchimento nei differenti ceppi è stato valutato mediante PCR quantitativa (Real Time qPCR) con coppie di primers specifici per la regione del promotore di *YKL143W* contenente il sito di legame per *Abf1*. I dati dei ceppi "wt" e del mutante sono stati normalizzati rispetto ai valori ottenuti per il ceppo *BY4741* e il valore di arricchimento nel ceppo mutante è stato espresso in funzione di quello osservato nel ceppo "wt", in modo da valutare il livello di "fold reduction". Come si osserva in figura 21, le mutazioni introdotte nel sito *Abf1* comportano la perdita del legame della proteina.

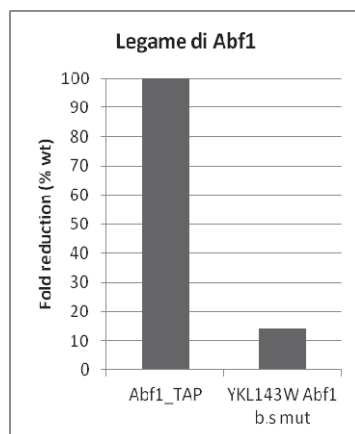


Figura 21 Grafico indicante la variazione dell'arricchimento riscontrato per *YKL143W* nei ceppi *Abf1_TAP* e *Abf1_TAP YKL143W Abf1b.smut*. I valori di associazione di *Abf1* nei due ceppi sono stati dapprima normalizzati per quelli ottenuti nel ceppo *BY4741* e poi il valore di associazione nel ceppo mutante è stato espresso in funzione di quello riscontrato nel "wt" (=100) in modo da rappresentare la percentuale di riduzione dell'arricchimento nel ceppo mutante rispetto al "wt".

Si è quindi proceduto andando a valutare l'effetto del mancato legame di Abf1 sull'espressione del gene; a tal scopo si sono estratti gli RNA da cellule "wt" e mutanti cresciute sempre in terreno ricco e raccolte in fase esponenziale di crescita. Gli RNA sono stati retro-trascritti e i livelli di espressione nei differenti ceppi sono stati valutati mediante un approccio di PCR quantitativa basato sulla tecnica di Real Time qPCR. Tutti i valori sono stati normalizzati rispetto a uno standard interno, *HHT2*, la cui espressione non varia nelle nostre condizioni sperimentali. L'esperimento è stato ripetuto su tre cloni indipendenti per ciascun ceppo.

Come si osserva dal grafico, la mutazione del sito Abf1 comporta una notevole riduzione dell'espressione genica; nel mutante infatti si ha una quantità di trascritto che è pari al 30% della quantità valutata nel "wt".

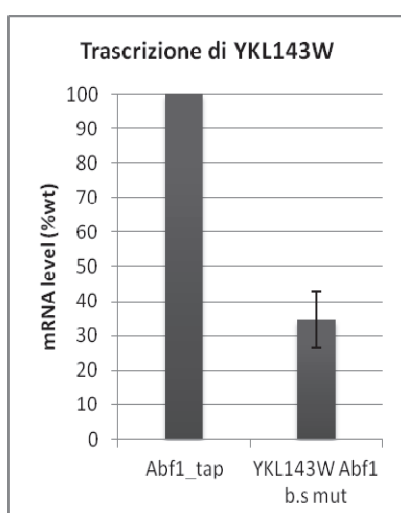


Figura 22 Rappresentazione grafica dei livelli di espressione del gene YKL143W nei ceppi Abf1_Tap ("wt") e Abf1_TAP YKL143W Abf1 b.s mut (mutante del sito Abf1 nel promotore del gene YKL143W). I valori di espressione in ciascun ceppo sono stati normalizzati rispetto ai valori dello standard interno *HHT2* e il livello di trascritto nel mutante è espresso come percentuale relativa del livello di espressione nel ceppo "wt" (100). I valori indicati e le barre di errore sono rispettivamente, la media e l'errore standard calcolati su tre esperimenti indipendenti.

Gli esperimenti compiuti sul promotore del gene *YKL143W* indicano che il sito di legame per Abf1 è un importante elemento *cis*-regolativo, richiesto per la piena funzionalità del promotore. Indicano inoltre che l'associazione di Abf1 a tale sito è fondamentale per il raggiungimento dei massimi livelli di espressione e suggeriscono che la proteina sia un regolatore positivo della trascrizione del gene.

Analisi di YOL041C

YOL041C (NOP12) è gene non essenziale codificante per la proteina nucleolare Nop12, dotata di un motivo RRM di riconoscimento dell'RNA e coinvolta nel processamento del pre-rRNA 25S e nella biogenesi della subunità ribosomiale 60S (Wu et al., 2001).

Il promotore di questo gene presenta elementi conservati nei cinque Saccaromiceti considerati (*S. cerevisiae*: *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii*): il motivo PAC, che, in *S. cerevisiae*, è posizionato 127 bp a monte dell'ATG e 79 bp a monte del TSS, il motivo RRPE posizionato a 137 bp a monte dell'ATG e 89 bp a monte del TSS e un sito di legame per Abf1, posizionato a 154 bp a monte dell'ATG e 106 bp dal TSS.

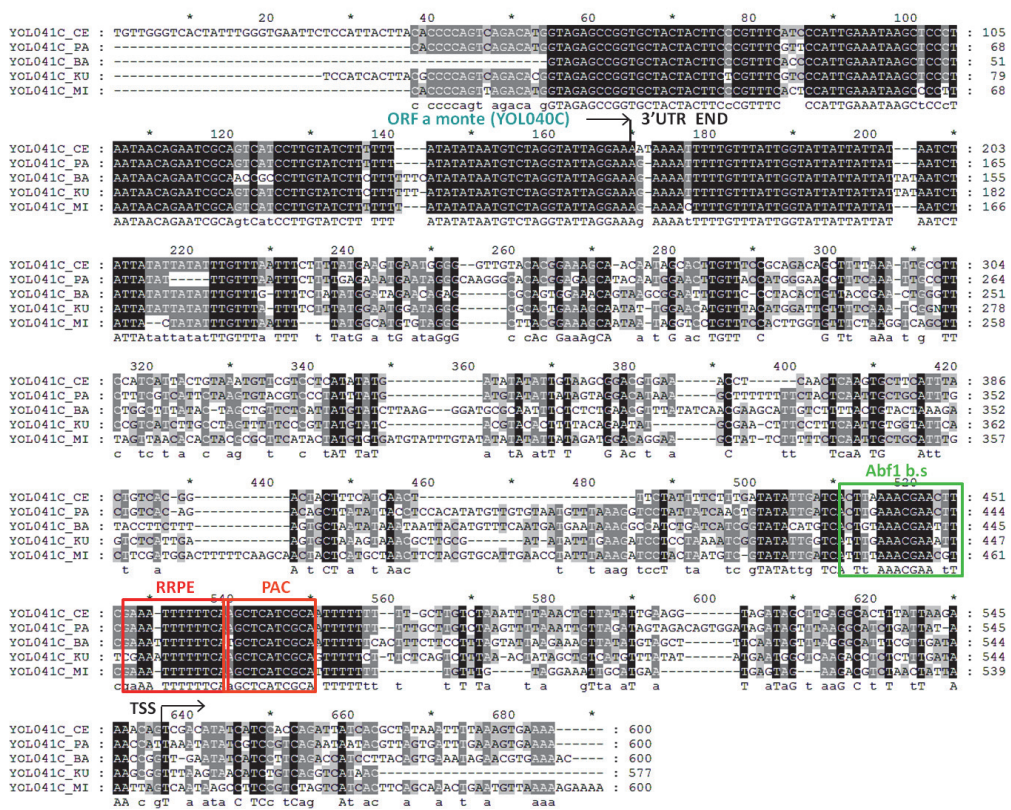


Figura 23 Allineamento delle regioni a monte (600bp) di YOL041C in cinque specie di Saccaromiceti; gli elementi conservati sono evidenziati con colori differenti: in arancione il PAC, in rosso l'RRPE e in verde il sito di legame per Abf1. Sono inoltre indicate le posizione del TSS di YOL041C e la fine della 3'UTR della ORF a monte (YOL040C).

Anche in questo caso, la mutagenesi del promotore è stata effettuata nel ceppo Abf1_TAP e il sito Abf1 (ATCACTTAAAACGA) è stato sostituito con la sequenza **TCAAGTTAAACT**, in modo analogo a quanto fatto per il promotore di *YKL143W*. La riuscita della mutagenesi è stata verificata mediante sequenziamento e, anche in questo caso, è stato notato un lieve ritardo della crescita del ceppo mutante (Abf1_TAP YOL041C Abf1b.smut) rispetto al “wt”, seppure meno evidente in confronto a quello che abbiamo osservato nel ceppo derivante dalla “gene disruption”, in cui il gene è stato sostituito dalla cassetta URA3 di *K.lactis* (YOL041C::URA3); infatti, il tempo di replicazione medio dei cloni Abf1_TAP YOL041CAbf1b.smut è circa di 2h 10', mentre quello del ceppo YOL041C::URA3 è di 3h. Questa osservazione indica che la delezione del gene comporta un rallentamento della velocità crescita e suggerisce che le mutazioni sito-specifiche introdotte nel promotore possano influire almeno in parte sull'espressione del gene *YOL041C*. In modo analogo all'esperimento precedente, è stata effettuata una immunoprecipitazione cromatinica sui ceppi BY4741, Abf1_TAP e Abf1_TAP *YOL041C* Abf1b.smut per valutare l'effetto delle mutazioni introdotte sul legame della proteina. Il livello di arricchimento nel promotore di *YOL041C* è stato valutato mediante PCR quantitativa (Real Time qPCR) con coppie di primers specifici per la regione del promotore contenente il sito di legame per Abf1. Dal grafico in figura 24, si osserva che le mutazioni introdotte comportano la riduzione dell'associazione di Abf1 a questo promotore sebbene ci sia ancora una piccola percentuale di legame dal momento che nel mutante si ha comunque un arricchimento che è pari al 40% del “wt”.

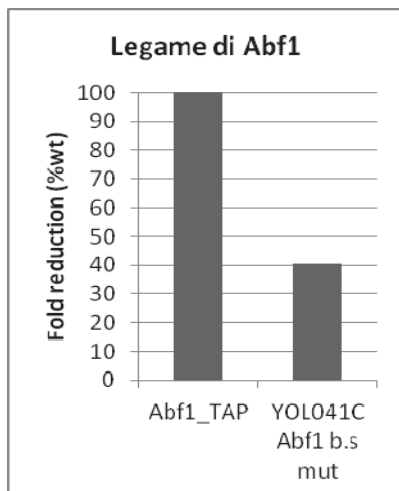


Figura 24 Grafico indicante la variazione dell'arricchimento riscontrato per *YOL041C* nei ceppi Abf1_TAP e Abf1_TAP *YOL041C* Abf1b.smut. I valori di associazione di Abf1 nei due ceppi sono stati dapprima normalizzati per quelli ottenuti nel ceppo BY4741 e poi il valore di associazione nel ceppo mutante è stato espresso in funzione di quello riscontrato nel “wt” (=100) in modo da rappresentare la percentuale di riduzione dell'arricchimento nel ceppo mutante rispetto al “wt”.

Si è poi proceduto all'analisi dei livelli di espressione nel ceppo "wt" e nel mutante in cellule cresciute in terreno ricco e raccolte in fase esponenziale di crescita: gli RNA sono stati estratti, retro-trascritti e, mediante RealTime qPCR, si sono valutati i livelli di espressione relativi del gene *YOL041C* nei differenti ceppi. Tutti i valori sono stati normalizzati sempre rispetto allo standard interno *HHT2*. L'esperimento è stato ripetuto su due cloni indipendenti per ciascun ceppo. Come si evince dal grafico, la mutazione del sito Abf1 a monte del gene *YOL041C* comporta una lieve riduzione dei livelli di trascrizione rispetto al ceppo selvatico; si ha infatti un livello di RNA pari al 60% di quello osservato in Abf1_TAP. Tale calo, sebbene meno evidente di quello descritto per il gene *YKL143W*, indica che, anche per *YOL041C*, il legame di Abf1 a monte del gene è richiesto per la piena funzionalità del promotore e per il raggiungimento dei massimi livelli di espressione.

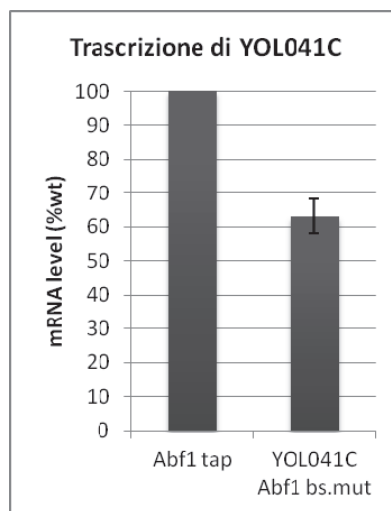


Figura 25 Analisi dei livelli di espressione del gene *YOL041C* nei ceppi Abf1_Tap ("wt") e Abf1_TAP *YOL041C* Abf1 b.s mut. I valori di espressione in ciascun ceppo sono stati normalizzati rispetto ai valori dello standard interno *HHT2* e il livello di trascritto nel mutante è espresso come percentuale relativa del livello di espressione nel ceppo "wt" (100). I valori indicati e le barre di errore sono rispettivamente, la media e l'errore standard calcolati su due esperimenti indipendenti.

Analisi di YDR496C

YDR496C (PUF6) è il gene, non essenziale, codificante per Puf6, proteina contenente un dominio di legame all'RNA omologo a quello Pumilio, identificata per la sua capacità di legare la 3'UTR dell'mRNA ASH1 e di inibirne la traduzione (Deng et al., 2008; Gu et al., 2004). Altri studi dimostrano che Puf6 co-sedimenta con la subunità ribosomiale 60S ed è richiesta per la biogenesi della stessa (Li et al., 2009).

Il promotore di questo gene contiene il motivo PAC, posizionato 83 bp a monte dell'ATG e 45 bp a monte del TSS, il motivo RRPE, posizionato a 107 bp a monte dell'ATG e 69 bp a monte del TSS, un tratto poli(dA:dT) e, appena più a monte, un sito di legame per Reb1, localizzato 159 bp a monte dell'ATG e 121 bp a monte del TSS.

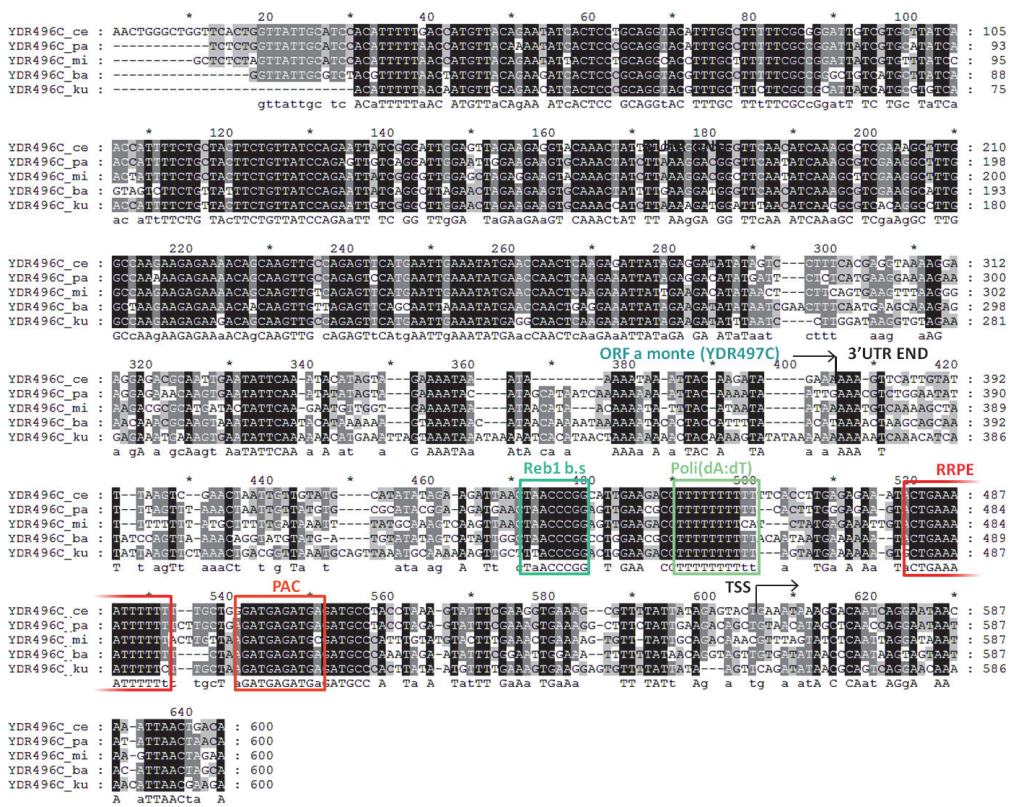


Figura 26 Allineamento delle regioni a monte (600bp) di YDR496C in cinque specie di Saccaromiceti; gli elementi conservati sono evidenziati con colori differenti: in arancione il PAC, in rosso l'RRPE e in verde acqua il tratto poli(dA:dT) e in azzurro sito di legame per Reb1. Sono inoltre indicate le posizioni del TSS di YDR496C e la fine della 3'UTR della ORF a monte (YDR497C).

La mutagenesi del promotore è stata effettuata nel ceppo Reb1_TAP e il sito Reb1 (TAACCCG) è stato sostituito con la sequenza TCACATG in modo tale da modificare completamente la porzione centrale del sito. La riuscita della mutagenesi è stata verificata mediante sequenziamento. Questo mutante (Reb1_TAP YDR496C Reb1b.smut) ha un tempo di replicazione medio di 1h 45', mentre il corrispondente del selvatico è di 1h30'.

Anche per l'analisi dell'espressione del gene YDR496C nei ceppi "wt" e mutante, gli RNA sono stati estratti da cellule cresciute in terreno ricco e raccolte in fase esponenziale di crescita. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante RealTime qPCR e sono stati normalizzati rispetto allo standard interno *HHT2*. L'esperimento è stato ripetuto su due cloni indipendenti per ciascun ceppo.

Come si evince dal grafico, in entrambi gli esperimenti, la mutazione del solo sito di legame per la proteina Reb1 comporta una notevole riduzione dei livelli di trascritto del gene *YDR496C* che sono circa il 40% di quelli osservati per il ceppo selvatico. Anche per questo gene pertanto, il motivo di legame per il GRF è un importante elemento regolativo, la cui integrità è necessaria per la piena espressione del gene.

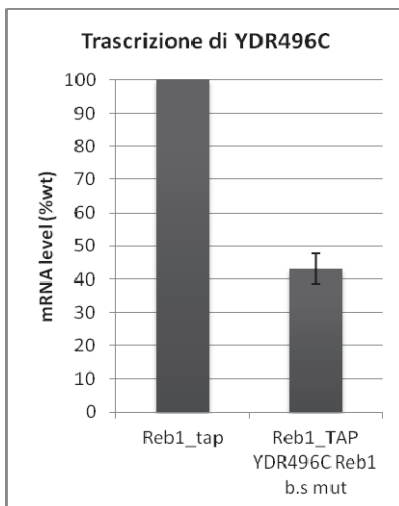


Figura 27 Rappresentazione grafica dei livelli di espressione del gene *YDR496C* nei ceppi Reb1_Tap ("wt") e Reb1_TAP *YDR496C* Reb1 b.s mut (mutante del sito Reb1 nel promotore del gene *YDR496C*). I valori di espressione in ciascun ceppo sono stati normalizzati rispetto ai valori dello standard interno *HHT2* e il livello di trascritto nel mutante è espresso come percentuale relativa del livello di espressione nel ceppo "wt" (100). I valori indicati e le barre di errore sono rispettivamente, la media e l'errore standard calcolati su due esperimenti indipendenti.

Analisi di YKR024C

Il gene scelto per valutare il ruolo del motivo di legame per Tbf1 è *YKR024C* (*DBP7*), codificante per Dbp7, un'ipotetica RNA elicasi ATP-dipendente della famiglia DEAD-box, richiesta per la biogenesi della subunità maggiore del ribosoma poiché coinvolta nella maturazione dei pre-rRNA 27S e 7S. *YKR024C* è essenziale per la crescita in condizioni anaerobiche ma non per quella in condizioni aerobiche, sebbene la sua delezione causi un fenotipo di ridotta velocità di crescita (Daugeron and Linder, 1998).

Il promotore di *YKR024C* contiene un motivo PAC, a 131bp dall'ATG, un motivo RRPE, a 141bp dall'ATG, e tre siti di legame per Tbf1. I primi due sono localizzati, rispettivamente, a 173bp e 195bp a monte dell'ATG, a una distanza relativa di 23bp l'uno dall'altro; il terzo sito, invece, è posto 58bp a monte del secondo sito e quindi dista 255bp dall'ATG. Va precisato che, in questo caso, la posizione dei siti è stata considerata solo rispetto all'ATG in quanto la posizione del TSS non è nota. La conservazione degli elementi citati è indicata nell'allineamento in figura 28; come si nota, per questo gene è stato possibile trovare gli ortologhi solo in tre Saccaromiceti, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, inoltre, la porzione a monte dell'ortologo in *S. bayanus* non è completa.

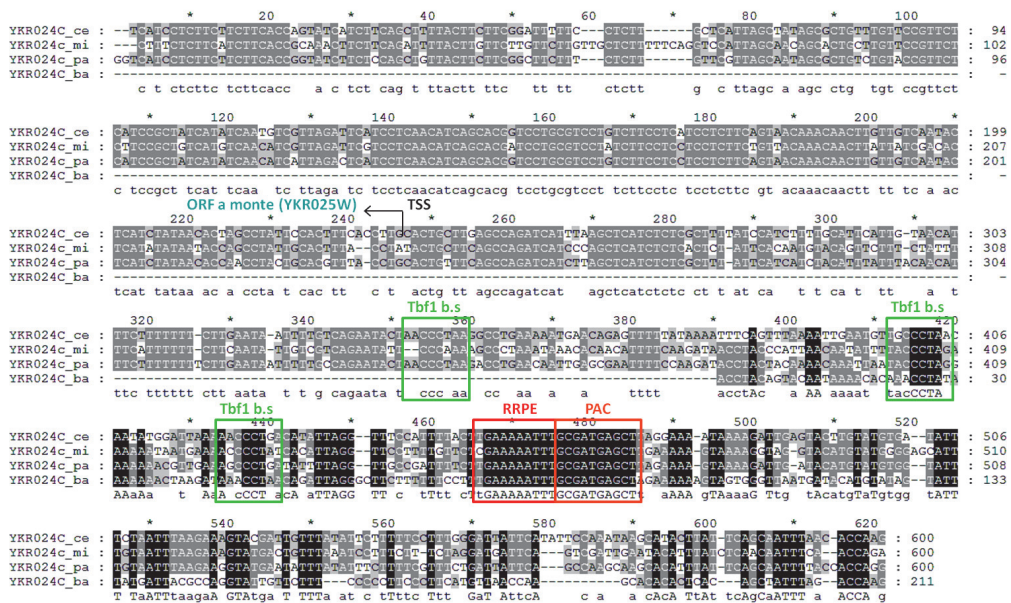
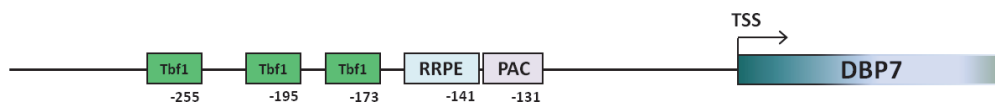


Figura 28 Allineamento delle regioni a monte (600bp) di *YKR024C* in quattro Saccaromiceti; gli elementi conservati sono evidenziati con colori differenti: in arancione il PAC, in rosso l'RRPE e in verde i tre siti di legame per Tbf1. È inoltre indicata la posizione del TSS della ORF a monte (*YKR025W*).

Lo studio dell'ipotetico ruolo di Tbf1 nella trascrizione del gene *YKR024C* è stato condotto nel ceppo Tbf1_TAP che è stato mutato inizialmente in modo tale distruggere i due siti di legame più prossimi all'ATG, che si è ipotizzato essere più importanti per la regolazione trascrizionale del gene. Dal momento che essi distano l'uno dall'altro solo di 23 bp, e sulla base delle osservazioni fatte in *C. albicans* (Hogues et al., 2008), si è supposto che una tale vicinanza dei siti potesse indicare una possibile interazione cooperativa di due molecole di Tbf1 per il legame al DNA. Perciò, si è pensato di mutare entrambi i siti contemporaneamente in modo da abrogare completamente il legame della proteina. Tuttavia, come dimostrato in (Preti et al., 2010), in *S. cerevisiae* Tbf1 è in grado di associarsi anche ai promotori che contengono un solo sito di legame per la proteina (sebbene l'associazione ai loci con due siti spazati di 21-23 bp risulti maggiore), pertanto, in una fase successiva, abbiamo deciso di mutare anche il terzo sito per Tbf1, localizzato più a monte, in modo tale da eliminare ogni possibilità di legame della proteina a livello del promotore. Dato che il sito di legame per Tbf1 presenta una porzione centrale altamente conservata CCCTaA, le mutazioni introdotte nel promotore di *YKR024C* sono state ideate così da eliminare la tripletta CCC. In particolare, il primo sito, AACCTGA (1), A, è stato mutato in CAACAGAA; il secondo sito (2), TGCCTAA, in TGACAGAC; il terzo sito (3), AACCTAA, in AAACAGAT (le basi mutate sono indicate in viola). I mutanti creati sono indicati rispettivamente come DBP7 Tbf1 b.s 1-2 mut (mutante dei siti 1 e 2) e DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut (mutante dei siti 1, 2 e 3); la struttura del promotore e le mutazioni introdotte sono schematizzati in figura:



<p>DBP7 Tbf1 b.s 1-2 mut: sito 1: AACCTGA → CAACAGAA sito 2: TGCCTAA → TGACAGAC sito 3: AACCTAA</p> <p>DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut: sito 1: AACCTGA → CAACAGAA sito 2: TGCCTAA → TGACAGAC sito 3: AACCTAA → AAACAGAA</p>
--

Figura 29 In alto, schema generale del promotore di *YKR024C* in *S. cerevisiae*; a lato: Grafica riassuntiva delle mutazioni introdotte per creare i mutanti dei siti di legame di Tbf1. Le basi mutate sono in viola.

In modo analogo a quanto trovato nei mutanti degli altri geni analizzati, anche per *YKR024C* abbiamo osservato una variazione della velocità di crescita dei ceppi mutanti rispetto al ceppo selvatico; in particolare, i mutanti Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2 mut e Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3 mut hanno un tempo di replicazione di 2h 15' rispetto al tempo di replicazione di 1h 40' del ceppo Tbf1_TAP. Questa osservazione sembra suggerire che, anche in questo caso, gli elementi mutati possano effettivamente giocare un ruolo nella regolazione trascrizionale del gene.

Una volta ottenuti i ceppi mutanti, abbiamo verificato se le mutazioni introdotte nei siti di legame per Tbf1 fossero tali da annullare il legame della proteina stessa. A tal scopo, abbiamo effettuato un'immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) sui ceppi BY4741, Tbf1_TAP e nei due mutanti ottenuti. Il livello di arricchimento nei differenti ceppi è stato valutato mediante PCR quantitativa (Real Time qPCR) con coppie di primers specifici per la regione del promotore di *YKR024C* contenente i siti di legame per Tbf1 e, come controllo negativo, per la *ARS1021*. I dati del ceppo "wt" e del mutante sono stati normalizzati in funzione dei valori ottenuti per BY4741; i risultati sono indicati dal grafico sulla sinistra in figura 30. Da questa analisi viene confermato il legame della proteina Tbf1 al promotore del gene *YKR024C*, come si deduce dall'arricchimento nel ceppo che esprime Tbf1-tap; questo arricchimento è specifico, dal momento che non si osserva a livello del controllo negativo *ARS1021*. Inoltre, possiamo notare come la mutazione nei siti per Tbf1 1 e 2 a monte del gene riduce il legame della proteina ma solo di un 50%, indicando che, come ipotizzato, in questo promotore, la presenza di un solo sito per Tbf1 è comunque sufficiente a permettere l'associazione della proteina, che viene invece completamente abolita nel triplo mutante.

Dimostrato l'effetto delle mutazioni introdotte sul legame di Tbf1, siamo andati a monitorare i livelli di trascrizione di *YKR024C* nel ceppo selvatico e nei mutanti in modo analogo a quanto fatto per gli altri geni, estraendo gli RNA da cellule cresciute in terreno ricco e raccolte in fase esponenziale. L'esperimento è stato ripetuto in triplo su tre cloni indipendenti per ciascun ceppo e i risultati sono indicati nel grafico a destra in figura 30. La mutazione dei siti di legame per Tbf1 comporta una riduzione della trascrizione del gene che è proporzionale al numero di siti che sono mutati e al livello di associazione della proteina nel promotore. Infatti, la mutazione nei due siti di legame per Tbf1 più vicini all'ATG, annulla almeno del 50% il legame della proteina e comporta il calo dei livelli di

trascritto che passano da un 100% del “wt” a un 43% nel doppio mutante. La rimozione anche del terzo sito di legame abolisce del tutto l’associazione della proteina e causa un’ulteriore diminuzione dei livelli di mRNA che arrivano al 27% rispetto a quelli del ceppo selvatico. I risultati ottenuti dimostrano quindi che, in condizioni di crescita in terreno ricco, Tbf1 è associata al gene *ribi DBP7* e agisce da regolatore positivo della trascrizione del gene in quanto la sua presenza è necessaria per il raggiungimento di livelli ottimali di espressione.

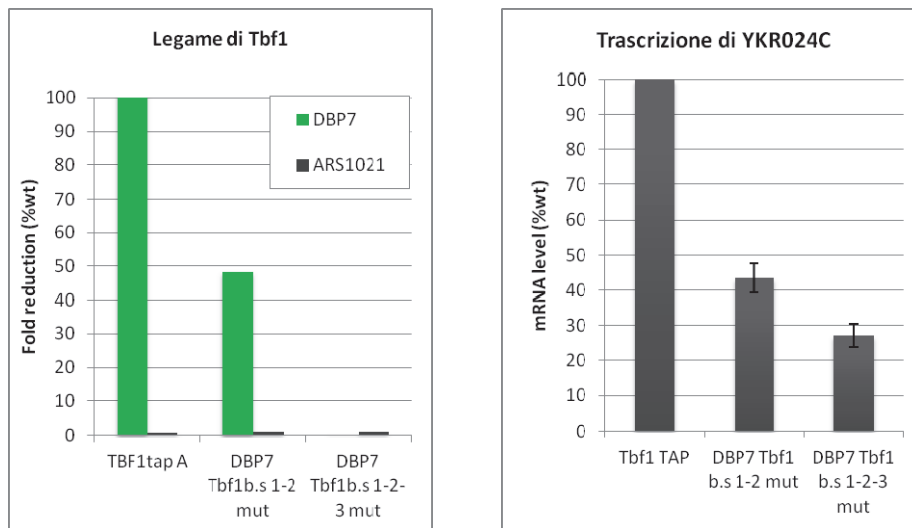


Figura 30 A sinistra: variazione dell’arricchimento riscontrato (-fold enrichment) per i due geni analizzati (*YKR024C*, *ARS1021*) nei ceppi BY4741, Tbf1_TAP, DBP7 Tbf1 b.s 1-2 mut e DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut. I valori sono normalizzati rispetto ai dati del BY4741 e il valore del mutante è espresso in funzione di quello riscontrato nel “wt” (=100). A destra: valutazione livelli di espressione del gene *YKR024C* nei ceppi Tbf1_Tap (“wt”) e nei mutanti DBP7 Tbf1 b.s 1-2 mut e DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut. I valori di espressione in ciascun ceppo sono stati normalizzati rispetto ai valori dello standard interno *HHT2* e il livello di trascritto nel mutante è espresso come percentuale relativa del livello di espressione nel ceppo “wt” (100). I valori indicati e le barre di errore sono, rispettivamente, la media e l’errore standard calcolati su tre esperimenti indipendenti.

Abbiamo deciso di proseguire lo studio di questo promotore andando a mutare il sito RRPE che è stato mutato sia individualmente, sia in combinazione con la tripla mutazione del sito Tbf1. L'obiettivo di questa mutagenesi è innanzitutto cercare di capire meglio il ruolo dell'elemento RRPE; in particolare, verificare se esso sia esclusivamente un elemento repressivo o se possa agire anche come regolatore *in cis* positivo. È stato infatti ipotizzato che l'RRPE, in virtù delle sue caratteristiche di sequenza, possa avere un ruolo indipendente dal legame di Stb3, e che, a esempio, possa servire a favorire la formazione di una regione libera da nucleosomi (Lippman and Broach, 2009). Inoltre, abbiamo pensato che mutare tale elemento anche nel contesto mutante per i tre siti di legame per Tbf1 ci avrebbe fornito un quadro più completo riguardo al ruolo giocato dai differenti elementi *cis*-regolativi, presenti nel promotore, e aiutato a capire il loro contributo relativo alla regolazione trascrizionale del gene.

La mutagenesi sito-specifica del motivo RRPE è stata eseguita con la stessa modalità utilizzata per la creazione degli altri mutanti genomici e, anche in questo caso, le mutazioni puntiformi introdotte sono state definite sulla base della regione maggiormente conservata, in modo tale cercare di abolire il legame della proteina Stb3. Nello specifico, il motivo RRPE, TGAAAAATTT, è stato modificato in **TCACCACTGA** (le basi mutate sono indicate in viola).

In questo modo sono stati ottenuti due ceppi: Tbf1_TAP DBP7 RRPE mut e Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3 mut RRPE mut, che, per brevità, saranno indicati, rispettivamente, come DBP7 RRPE mut e DBP7 Tb.sbf1 1-2-3 mut RRPE mut.

Curiosamente, mentre il mutante Tbf1_TAP RRPEmut ha un tempo di replicazione simile al selvatico (1h 40'), il mutante Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3 mut_RRPEmut ha un tempo di duplicazione di 2h, che è intermedio a quello osservato per il triplo mutante Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3 mut e il selvatico. Tale osservazione suggerisce che i due elementi considerati, il motivo RRPE e i siti di legame per Tbf1, abbiano ruoli differenti, dal momento che la loro distruzione causa fenotipi di crescita diversi.

In questa prima fase di studio, abbiamo deciso di procedere come fatto finora: andare a valutare esclusivamente se le mutazioni introdotte possono causare variazioni dei livelli di trascrizione del gene nel caso più semplice, quando i mutanti sono cresciuti in terreno ricco e raccolti in fase esponenziale di crescita e quindi l'espressione del gene dovrebbe essere massima.

L'esperimento è stato ripetuto in triplo su tre cloni indipendenti per ciascun ceppo e i risultati sono mostrati nel grafico in figura 31.

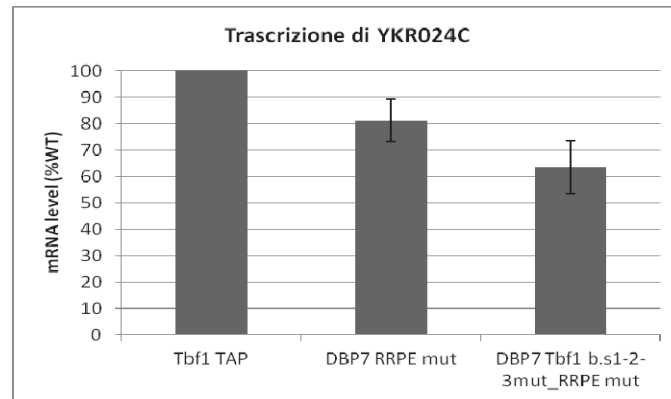


Figura 31 Grafico dei livelli di espressione del gene YKR024C nei ceppi Tbf1_Tap ("wt") e nei mutanti DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut e DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut, DBP7 RRPEmut DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut_RRPE mut. I valori di espressione in ciascun ceppo sono stati normalizzati rispetto ai valori dello standard interno HHT2 e il livello di trascritto nel mutante è espresso come percentuale relativa del livello di espressione nel ceppo "wt" (100). I risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti e le barre di errore sono l'errore standard.

Nelle condizioni sperimentali usate potremmo ipotizzare che il livello di espressione che monitoriamo sia una media di ciò che accade in ciascuna cellula della popolazione e possiamo immaginare che, almeno in alcune cellule, ci possa essere, anche in condizioni di attivazione, una piccola frazione di proteine repressive che si legano e che il livello "wt" sia il risultato dell'equilibrio dinamico tra l'effetto di regolatori positivi e negativi. In questo contesto, ci aspettiamo che anche in condizioni in cui i noti repressori Stb3, Dot6 e Tod6 non dovrebbero essere legati al promotore del gene, la rimozione del sito di legame per Stb3 possa comportare un aumento della trascrizione e ridurre gli effetti negativi della rimozione di elementi di attivazione (i siti di legame per Tbf1). Questo a maggior ragione se l'elemento rimosso, l'RRPE, può influenzare, per cooperatività di legame o perché mantiene la cromatina accessibile, la funzionalità dell'elemento PAC.

Ciò che osserviamo è invece un quadro più complesso: infatti, la mutazione del solo motivo RRPE comporta un lievissimo calo della quantità di trascritto a indicare che questo elemento potrebbe svolgere un ruolo positivo, seppure molto ridotto, sulla trascrizione del gene. Se così fosse, però, nel doppio mutante dei siti di Tbf1 e dell'RRPE, ci aspetteremmo un livello di trascrizione residuo analogo o lievemente più basso rispetto a quello del mutante dei soli siti Tbf1. Invece, quello che si osserva è esattamente l'opposto: il doppio mutante dei siti di Tbf1 e dell'RRPE ha infatti una quantità di trascritto che è circa due volte quella del mutante dei soli siti Tbf1. Questo dato sembra quindi indicare che l'elemento RRPE sia in realtà un regolatore negativo, la cui mutazione riduce l'effetto della rimozione di un regolatore positivo; questa ipotesi sembra la più probabile se consideriamo "l'entità" della variazione dei livelli di trascritto nei rispettivi mutanti: infatti, mentre nel mutante del solo sito RRPE si ha un quasi trascurabile calo di 1.2 volte rispetto al "wt", nel mutante dell'RRPE e dei siti di legame per Tbf1 si ha un aumento di 2.3 volte del trascritto rispetto al mutante dei soli siti per Tbf1. Tuttavia riteniamo che sarebbe utile procedere con l'analisi andando a eliminare anche l'elemento PAC, sia da solo, sia in combinazione con le mutazioni dell'RRPE e dei siti di legame per Tbf1, in modo da verificare il contributo di tutti gli elementi conservati del promotore. Inoltre, bisognerebbe valutare cosa accade nei vari mutanti, non solo in condizioni di crescita logaritmica, ma anche in condizioni repressive per la biogenesi dei ribosomi, in modo da verificare se la rimozione dell'RRPE ha ancora un effetto lieve o se acquista maggiore importanza.

In aggiunta sarebbe interessante vedere quale sia il contributo e l'importanza della presenza dell'elemento attivatore (Tbf1) sia in presenza, sia in assenza di elementi di repressione e in varie condizioni di crescita, per capire effettivamente quali siano gli equilibri che determinano l'espressione basale del gene e poter valutare nei vari mutanti come sia la sua regolazione con gli altri geni coinvolti nella biogenesi dei ribosomi.

Legame dei GRFs in condizioni di deplezione di glucosio

Per cercare di approfondire il ruolo dei GRF ai promotori dei geni *ribi* abbiamo deciso di procedere andando a valutare se il legame di questi fattori ai promotori sia costitutivo o no. A tal fine, abbiamo effettuato un esperimento di deplezione di glucosio sui ceppi Abf1_TAP e Reb1_TAP. In particolare, i ceppi sono stati cresciuti in terreno ricco (YPD con glucosio a concentrazione finale di 2%) per due repliche e poi sono stati separati in due colture, una coltura di controllo in terreno ricco (YPD con glucosio al 2%), e una coltura "test", posta in terreno privo di glucosio. E' ampiamente riportato in letteratura che, in condizioni di deprivazione di glucosio, la sintesi dei ribosomi viene rapidamente inibita e i primi geni a essere repressi sono proprio i geni *ribi*. Pertanto campioni di cellule sono stati recuperati dopo 10', 20' e 30' a partire dal momento dello shift e sono stati usati per un esperimento di ChIP- seq volto a valutare se, in condizioni di repressione, vi sia una alterazione dei profili di associazione alle regioni promotore dei fattori Abf1 e Reb1 o se, in modo analogo a quanto si osserva per Rap1 a livello dei promotori dei geni per le proteine ribosomiali, la loro associazione ai promotori dei geni *ribi* rimanga invariata. Siamo attualmente in attesa dei risultati del sequenziamento, condotto in collaborazione con Roberto Ferrari. Nel pannello B) della figura 32 sono riportati i livelli di espressione per due geni *ribi*, valutati su RNA estratti dalle cellule sottoposte a deplezione di glucosio, usate anche per l'esperimento di ChIP-seq.

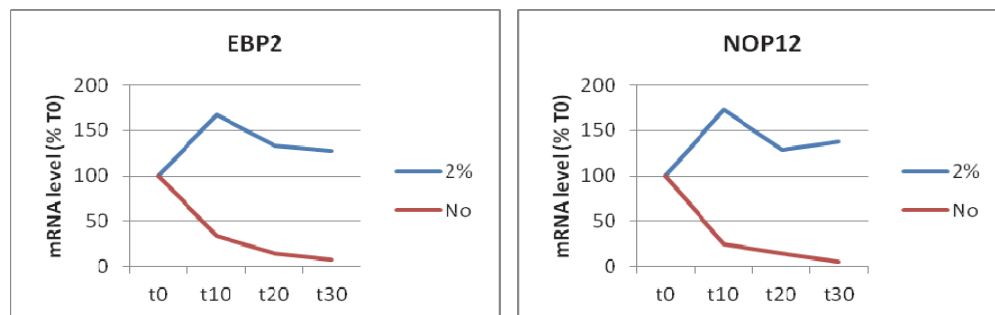


Figura 32 Grafico dei livelli di espressione del gene EBP2 (sinistra) e NOP12 (destra) nel ceppo Abf1_Tap. I valori di espressione sono stati normalizzati rispetto ai valori dello standard interno HHT2 e il livello di trascritto nei diversi tempi sono espressi in funzione del tempo 0 (100).

Conclusioni

Lo studio effettuato sui promotori dei geni *ribi* in *S. cerevisiae* ha permesso di identificare ulteriori elementi *cis*- e *trans*-regolativi rispetto a quelli già noti in letteratura, coinvolti nella regolazione della trascrizione di questo gruppo di unità trascrizionali.

L'analisi computazionale delle regioni a monte di 228 geni *ribi* ha fatto emergere che i loro promotori sono arricchiti non solo dei motivi PAC e RRPE, ma anche di altri elementi di sequenza che sono conservati nell'evoluzione e che ricorrono, in posizioni definite, a monte di più geni. Tra questi, i più abbondanti sono i siti di legame per i Fattori Generali di Regolazione (GRFs) Abf1, Rap1, Reb1 e Tbf1, trovati nel 76% dei promotori. Nello specifico, 95 promotori hanno un sito di legame per Abf1, localizzato mediamente 125-150 bp a monte dal sito di inizio della trascrizione, 79 contengono un sito di legame per Reb1, posizionato 125-175 bp a monte del TSS, 21 presentano un sito per Rap1, situato più a monte (150-500bp dal TSS) e 15 per Tbf1, a circa 150-200bp dal TSS.

Gli esperimenti di ChIP-seq sui ceppi Abf1_TAP e Reb1_TAP, unitamente ai dati di un nostro precedente lavoro su Tbf1 (Preti et al., 2010) e all'analisi dei dati di associazione di Rap1, pubblicati da Pugh e collaboratori (Rhee and Pugh, 2011), hanno confermato che il 54% dei promotori *ribi* viene legato *in vivo* da queste proteine. In particolare, dei 236 geni *ribi*, 72 (31%) sono associati a Abf1, 67 (28%) a Reb1, 8 a Rap1, 9 a Tbf1 e 29 a più di un GRF. La percentuale di geni legati *in vivo* da almeno una tra queste proteine, è mantenuta anche se si considerano gli altri 221 geni che possono essere inclusi nell'"RRB regulon". Questo arricchimento permette di ridefinire l'architettura tipica del promotore di questo gruppo di geni e di ipotizzare un possibile ruolo dei GRFs nella loro regolazione trascrizionale.

La costruzione dei mutanti genomici nei siti di legame per i GRFs a monte di quattro geni *ribi*, due legati da Abf1 (*YKL143W* e *YOL041C*), uno da Reb1 (*YDR496C*) e uno da Tbf1 (*YKR024C*) e la successiva analisi dei livelli di trascrizione in confronto a quelli dei rispettivi ceppi selvatici ci ha permesso di dimostrare che, per i quattro geni analizzati, i siti di legame per i GRF sono importanti elementi di regolazione *in cis*, richiesti per la funzionalità del promotore e per una trascrizione ottimale dell'unità trascrizionale. Le analisi di *YKL143W*, *YOL041C* e *YKR024C*, confermano che il legame rispettivamente di Abf1 e Tbf1 nella regione a monte dei geni è necessario per la loro piena espressione e indicano che i GRFs agiscono da attivatori. I dati dei mutanti di *YDR496C* permettono di ipotizzare che lo stesso si possa

dire anche per questo locus, sebbene manchi ancora la prova sperimentale che le mutazioni introdotte siano tali da impedire il legame della proteina.

La creazione di mutanti dell'RRPE nel promotore di *YKR024C* e l'analisi dei livelli di trascritto nei ceppi mutati nel solo RRPE e dell'RRRPE e dei siti per Tbf1, sembrano suggerire un ruolo dell'RRPE come elemento repressore e indicano che gli effetti delle mutazioni introdotte nel sito di legame per il GRF possono essere parzialmente alleviati dalla rimozione del motivo RRPE. Riteniamo però necessari ulteriori studi per chiarire il contributo relativo dei diversi elementi nell'espressione di questo gene.

Inoltre, per cercare di capire meglio quale potrebbe essere il ruolo dei GRF nella trascrizione dei geni *ribi* e per avere qualche dettaglio in più utile a delucidare il meccanismo d'azione dei GRF abbiamo effettuato un esperimento di CHIP-seq su cellule sottoposte a deplezione di glucosio per valutare se il legame dei GRFs ai promotori sia costitutivo o meno. Attualmente siamo in attesa dei risultati del sequenziamento.

Infine, sarebbe interessante poter capire non solo quale sia il meccanismo d'azione dei GRFs ai promotori dei geni *ribi* ma anche se questi elementi siano richiesti per la regolazione di singoli geni o se siano necessari per la coregolazione dei geni dell'"RRB Regulon", come si potrebbe ipotizzare data la percentuale di unità trascrizionali *ribi* a cui sono associati. Tuttavia, ancora più intrigante è la possibilità che essi servano a includere i geni *ribi* in un circuito regolativo ancora più ampio, che riguarda tutti i geni coinvolti nella biogenesi dei ribosomi. Infatti, le medesime proteine sono arricchite nei promotori degli altri geni che fanno parte del processo: Reb1 a monte dei geni per gli rRNA, Rap1 e Abf1 nei geni per le proteine ribosomiali e, come vedremo, Tbf1 e Reb1, nei promotori geni per snRNA.

Materiali e Metodi

1. Ceppi di lievito

- Per gli esperimenti di CHIP tradizionale e CHIP-seq i ceppi utilizzati sono:

Ceppo	Genotipo	Riferimento
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
Abf1_TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystems
Reb1_TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 REB1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystems

- Per lo studio dei mutanti genomici i ceppi usati sono:

Ceppo	Genotipo	Riferimento
Abf1_TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystems
Reb1_TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 REB1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystems
Tbf1_TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystems
YCB 19	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-TAP-HIS3MX6 DBP7::URA3</i>	Questo studio
YCB 20	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-TAP-HIS3MX6 DBP7 Tbf1 b.s 1-2 mut Yeplac181</i>	Questo studio
YCB 26	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-TAP-HIS3MX6 DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut Yeplac181</i>	Questo studio
YCB 27	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-TAP-HIS3MX6 DBP7 RRPE mut Yeplac181</i>	Questo studio
YCB 28	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-TAP-HIS3MX6 DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut_RRPEmut</i>	Questo studio
YCB 29	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 YKL143W::URA3</i>	Questo studio
YCB 30	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 YOL041C::URA3</i>	Questo studio
YCB 31	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 REB1-TAP-HIS3MX6 YDR496C::URA3</i>	Questo studio
YCB 33	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 YKL143W Abf1 b.s mut Yeplac181</i>	Questo studio
YCB 34	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ABF1-TAP-HIS3MX6 YOL041C Abf1 b.s mut Yeplac181</i>	Questo studio
YCB 35	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 REB1-TAP-HIS3MX6 YDR496C Reb1 b.s mut Yeplac181</i>	Questo studio

2. Analisi computazionale

L'elenco dei 236 geni *ribi* è stato recuperato dai Materiali Supplementari del lavoro di Tyers e collaboratori (Jorgensen et al., 2004) e le sequenze codificanti dei singoli geni sono state ricavate dalla banca dati SGD (Saccharomyces Genome Database: www.yeastgenome.org).

Le sequenze sono state utilizzate per effettuare una ricerca di omologia, eseguita con il programma BLASTN (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-fungal.pl>), al fine di individuare le sequenze ortologhe nei genomi dei quattro Saccaromiceti *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus* e *S. kudriavzevii*.

Le sequenze a monte di ciascun gene *ribi* nei 5 emiascomiceti sono state ricavate mediante ricerca nella banca dati NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizzando come riferimento la sequenza codificante; per ciascun gene è stato recuperato un tratto di 600bp a monte dell'ATG.

Le sequenze a monte sono state quindi allineate con il programma ClustalX e gli allineamenti ottenuti sono stati visualizzati con GeneDoc. L'analisi degli allineamenti per la ricerca di possibili siti di legame per fattori di trascrizione, è stata effettuata manualmente e successivamente integrata con le informazioni riportate nei database:

- SGD (Cherry et al., 1998), usato per valutare le coordinate genomiche e le distanze dalla ORF a monte.
- YPA (Chang et al., 2011), consultato per informazioni sulla posizione del sito di inizio della trascrizione, la distanza dalla ORF a monte, le caratteristiche del promotore già note in letteratura.
- <http://steinmetzlab.embl.de/NFRsharing/index.html> (Xu et al., 2009), interrogato per controllare il sito di inizio della trascrizione e l'eventuale presenza di unità trascrizionali criptiche.
- Jaspar (Sandelin et al., 2004), per valutare se le sequenze conservate negli allineamenti corrispondono a siti di legame per fattori di trascrizione noti.

Infine, i risultati ottenuti sono stati controllati con il programma di analisi di sequenza MatInspector (<http://www.genomatix.de>) che permette di verificare se sono presenti siti di legame per fattori di trascrizione noti.

3. Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Le immunoprecipitazioni cromatiniche per studiare l'associazione di Abf1, Reb1 e Tbf1 al promotore di singoli geni e per mappare su scala genomica il legame di Abf1 e Reb1 sono state eseguite mediante il seguente protocollo: i ceppi "TAP-tagged" d'interesse e il ceppo parentale BY4741 sono stati inoculati in 200 ml di YPD a OD_{600} pari a 0.16 - 0.2 e lasciati crescere fino a OD_{600} pari a 0.5 - 0.6. Le cellule sono quindi state trattate con formaldeide a concentrazione finale 1% per 20 minuti a temperatura ambiente, agitando occasionalmente, per "cross-linkare" DNA e proteine. La reazione è stata interrotta mediante aggiunta di glicina 240 mM finale e incubazione a temperatura ambiente per 5' e le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 3000 rpm per 4'. I pellet sono stati lavati due volte con 5 ml di TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) freddo, una volta con 5 ml di FAlysis 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) e infine, raccolti per centrifugazione a 3000rpm per 4'. Le cellule sono state risospese in 1 ml di FA-lysis buffer freddo contenente 0.5% SDS e mescolate con un ugual volume di "glass beads" (diam. 0.5 mm); la sospensione è quindi stata agitata con vortex per 15 minuti a 4°C. Il lisato è stato recuperato dal fondo delle provette e raccolto per gravità in tubi da centrifuga tenuti in ghiaccio. La cromatina è stata sedimentata centrifugando per 20 minuti a 2000g, poi lavata per 1 ora a 4°C con 1.5 ml di FA-lysis buffer freddo, centrifugata nuovamente, risospesa in 1.5 ml di FA-lysis buffer freddo e lasciata nuovamente in agitazione per 1 ora a 4°C. Si è proceduto alla frammentazione della cromatina che è stata ottenuta mediante sonicazione, in modo da avere frammenti di 100-300 bp: per verificare la taglia effettiva del DNA, 1.5 µl di sonicato sono stati caricati su gel di agarosio 1%. Al termine della sonicazione, il volume dei campioni è stato portato a 4 ml con FA-lysis buffer freddo, centrifugato per 20 minuti a 2000 g a 4°C, recuperato e suddiviso in due aliquote da 400 µl, quattro da 800 µl, e una da 800 µl scarsi. Di queste, una aliquota da 800 µl è stata immunoprecipitata mentre le altre sono state conservate a -80°C. L'immunoprecipitazione è stata effettuata mediante incubazione o/n a 4°C in blanda agitazione con 20 µl di "beads" IgG-Sepharose (GE Healthcare), precedentemente lavate due volte con 100 µl di TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA). Il giorno successivo le "beads" sono state lavate con 1.4 ml di FA-lysis buffer freddo 275 mM NaCl per 5 minuti, 1.4 ml di FA-lysis buffer freddo 500 mM NaCl, 1.4 ml di "wash buffer" (10 mM Tris, pH 8, 0.25M LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 % sodio deossicolato) e infine con 1.4 ml di TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM

EDTA). La cromatina (IP sample) è stata quindi eluita scaldando le “beads” per 10 minuti a 65°C in 200 µl di buffer di eluizione (50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) e il surnatante recuperato. Le “beads” sono state lavate con altri 200 µl di TE, che sono stati recuperati e uniti al surnatante raccolto in precedenza. La cromatina IP e una delle aliquote da 400 µl non immunoprecipitate (INPUT sample) sono state trattate con Pronasi 0.8 mg/ml per 1 ora a 42°C e poi 5 ore a 65°C. Il DNA è stato quindi estratto con fenolo/cloroformio/isoamyl alcool e poi con cloroformio e infine precipitato con etanolo e sodio acetato. Il DNA è stato risospeso in 50 µl di Tris 10 mM, pH 8.

La cromatina così preparata è stata usata per le analisi successive (PCR quantitativa e sequenziamento massivo).

3.1 PCR quantitativa per verificare il legame dei GRFs al promotore di singoli geni

Per valutare l'associazione di Abf1 e Reb1 a monte di singoli geni in modo da verificare la bontà del protocollo di ChIP prima di procedere alla ChIP-seq e per verificare l'arricchimento di Abf1, Reb1, e Tbf1 ai promotori dei singoli geni che sono stati mutati nel sito di legame per il GRF, le cromatine IP e INPUT (preparate mediante il protocollo di ChIP illustrato sopra) sono state usate come templatato in reazioni di PCR quantitative basate sulla tecnica di Real Time qPCR con lo strumento ABI 7300 (Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System).

I primers per la ChIP sono stati disegnati con il programma Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) in modo da avere una T_m tra 58°C e 60°C e tali da ottenere ampliconi di taglia simile (90-120 bp). Le concentrazioni finali di reazione in qPCR sono state decise a seguito di prove di efficienza che ci hanno permesso di trovare, per ciascuna coppia di primers, la concentrazione ottimale da usare in modo da avere un'efficienza di amplificazione del 100%. Queste prove sono state effettuate usando come templatato il DNA INPUT di BY4741 e per ciascuna coppia di primers sono state eseguite reazioni di RealTime qPCR con 5 diluizioni seriali del templatato: si è partiti da una diluizione 1:5 e poi si è proceduto con altre quattro diluizioni seriali di 1:10. I dati ottenuti da queste reazioni sono stati utilizzati per calcolare la curva di regressione lineare e verificare quale concentrazione permette di avere una curva di regressione lineare con una pendenza (slope) tra -3.3 e -3.4 e un $R^2 > 0,99$ (valori che indicano un'efficienza di amplificazione del 100% nelle condizioni testate); inoltre l'analisi delle curve di dissociazione ha evidenziato la presenza

di un picco unico e ben definito, in corrispondenza di un valore di T_m coerente con quello stimato sulla base della sequenza degli ampliconi attesi.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in 15 µl finali con il seguente mix di reazione: 2µl DNA templato (2µl di campione IP non diluito e 2µl di campione INPUT diluito 1:100), 1X SYBR[®] Green PCR Master Mix (ABI), XnM primer fw e rev (vedere tabelle per sequenza e quantità). Il programma impostato prevede una fase di amplificazione di 50°C per 2', 95°C per 10', 40 cicli a 95°C per 15" e 60°C per 1' e poi una fase di analisi degli ampliconi mediante costruzione della curva di dissociazione (95°C per 15", 60°C per 30", 95°C per 15"). Tutte le reazioni sono state allestite in triplicato in modo da poter calcolare media e deviazione standard dei singoli valori di CT ottenuti.

Le coppie di primers usate per testare le cromatine di Abf1_TAP e Reb1_TAP sono:

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer	Concentrazione finale
NOG1	NOG1_ChIP_fw	CCCACTCTTCTCCCTCTGA	69nM
	NOG1_ChIP_rev	AAAGAAAGTGAAGATCGTGTGC	69nM
EBP2	EBP2_ChIP_fw	GCATAAGAATTAAGCAATATGTCCA	70nM
	EBP2_ChIP_rev	ATTTTCAGTCCCGATGAGTAGTT	70nM
ARS1021	ARS1021_ChIP_fw	GTAGTTCATGTTGCGGGTTG	68nM
	ARS1021_ChIP_rev	CCTTATTAGCCGCCGAAAT	68nM
DRS1	DRS1_ChIP_fw	AGATTCTGATTCGCCGCTAT	70nM
	DRS1_ChIP_rev	CAACCTCATCTCATCGCATTT	70nM
RPA49	RPA49_ChIP_fw	CCAATTAGCAATACTGTTCTTTTCAA	124nM
	RPA49_ChIP_rev	TTTCAGCTCATCGCAATAAAA	124nM
FLR1	FLR1_ChIP_fw	GGAGCAATAACAGTGCGAAA	68nM
	FLR1_ChIP_rev	TTATCCCGCCATTAGTCAG	68nM
SNR32	SNR32_ChIP_fw	CTACAACGGAACCCAAAAAATCA	68nM
	SNR32_ChIP_rev	TCGACTTTTATAGTGC GGTTCTA	68nM
HHT2	HHT2_RT_fw	TCAATCTTCTGCTATCGGTGCTT	70nM
	HHT2_RT_rev	GCGTGAATAGCAGCCAGATTAGT	70nM

Le coppie di primers usate per l'analisi dei mutanti genomici del gene YKR024C sono:

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer	Concentrazione finale
DBP7	DBP7 ChIPT_fw	AAAATTGAATGTTGCCCTAACAA	200nM
	DBP7 ChIPT_rev	AATCTTTTATTTTCTAAGCTCATCG	200nM
ARS1021	ARS1021_ChIP_fw	GTAGTTCATGTTGCGGGTTG	68nM
	ARS1021_ChIP_rev	CCTTATTAGCCGCCGAAAT	68nM

HHT2	HHT2_RT_fw	TCAATCTTCTGCTATCGGTGCTT	70nM
	HHT2_RT_rev	GCGTGAATAGCAGCCAGATTAGT	70nM

La determinazione della percentuale di arricchimento è stata eseguita in Excel secondo il metodo di Livak (Livak and Schmittgen, 2001): per le tre repliche di ciascun campione sono calcolate la media (Ct) e la relativa deviazione standard; il Ct di ciascun campione (sia INPUT, che IP) è stato normalizzato rispetto allo standard interno ($CtN = Ct_{campione} - Ct_{standard}$) e poi il valore di CtN di ciascun immunoprecipitato è stato normalizzato rispetto al CtN del proprio input, in modo da tenere conto delle eventuali differenze nella preparazione dei campioni di cromatina ($\Delta CtN = \Delta CtN_{IP} - (\Delta CtN_{input} \cdot \log_2 \text{fattore di diluizione input})$). Il valore di ΔCtN è convertito in funzione lineare, in modo da poter calcolare ciascun valore del campione IP come percentuale del proprio input ($\% \text{ input} = 2^{-\Delta CtN}$). Per calcolare invece il valore di *fold enrichment* al valore di ΔCtN di ciascun ceppo analizzato viene sottratto quello del ceppo di controllo "nontagged" BY4741, al fine di poter tenere conto di un eventuale background dovuto ad un legame aspecifico dell'anticorpo ($\Delta \Delta CtN = \Delta CtN_{ceppo d'interesse} - \Delta CtN_{ceppo di controllo}$) e poi si è proceduto alla conversione lineare del valore di $\Delta \Delta CtN$ ($\text{Fold enrichment} = 2^{-\Delta \Delta CtN}$).

3.2 Mappatura del legame di Abf1 e Reb1 a livello genomico

Per valutare l'associazione di Abf1 e Reb1 su scala genomica la cromatina dei ceppi Abf1_Tap e Reb1_Tap è stata preparata mediante il protocollo di CHIP illustrato sopra. Quindi 10 ng di dsDNA, misurati con qubit (Life technology), sono stati usati per la preparazione delle librerie secondo le istruzioni della casa produttrice (Nugen Ovation Ultra Low). Le librerie sono state sequenziate con l' Illumina HiSeq-2000" e sono state ottenute sequenze di 50bp ("*reads*") che sono state allineate con il genoma di riferimento di lievito SacCer3 (ucsc) usando il software di allineamento Bowtie. Solo i *reads* che si sono allineati in modo univoco con non più di due basi appaiate in modo non corretto (mismatch) sono stati considerati nelle analisi successive; invece, i *reads* duplicati che mappano nella stessa identica posizione sono stati contati solo una volta in modo tale da ridurre possibili variazioni dovute alla fase di amplificazione nella preparazione delle librerie. Il genoma è stato suddiviso in finestre di analisi di 10bp, ogni *read* è stata estesa di 150bp ed è stata conteggiata una volta per ciascuna finestra coperta dalla stessa

in modo completo o parziale. A questo punto i “counts” totali del campione IP sono stati analizzati rispetto a quelli dell’INPUT: la distribuzione di “counts” osservata nel campione INPUT è usata per calcolare la distribuzione attesa in ogni finestra di analisi del genoma e alle finestre in cui non ci sono counts viene assegnato il valore medio di tutte le finestre. Quindi, il valore atteso per ogni finestra è usato per stimare la probabilità di osservare nel campione IP un segnale in quella data finestra secondo la distribuzione di Poisson. Solo le regioni che hanno un P-values inferiore a $1.0E-8$ vengono considerate come significative e usate per definire la presenza di un picco di associazione in quella regione. Il valore di P-value è stato scelto in modo tale da avere un valore di False Discovery Rate (FDR) (proporzione dei falsi positivi rispetto a tutti i positivi) inferiore a 0.05%.

Questo algoritmo di analisi restituisce diversi file di dati: “BED file”, contenente le coordinate di ogni regione in cui vi è un arricchimento significativo, “Wiggle (wig) file”, in cui vi sono tutte le informazioni con i read normalizzati per le finestre significative (se una finestra non è significativa non sono riportati tag), “GR file” che riporta i “counts” dei *reads* normalizzati (sia per IP che per input) ed è creato anche per essere caricato e visualizzato sul genome browser.

Infine, a partire dai dati ottenuti sono stati generati dei grafici indicanti l’arricchimento a livello dei promotori; tali grafici rappresentano tutte le finestre di 10bp che coprono una regione di 1kb. Per ogni regione è indicato il numero di *reads* significativi.

4. Creazione dei mutanti genomici

I mutanti genomici, contenenti mutazioni sito-specifiche nel promotore, sono stati creati mediante una procedura di mutagenesi in due passaggi successivi, entrambi basati sul processo di ricombinazione omologa:

-“gene disruption”: consiste nell’eliminazione della regione di DNA genomico da mutare, comprendente parte della ORF, mediante sostituzione con una cassetta di delezione. In questo caso, essa è composta dalla sequenza codificante per il gene *URA3* di *K.lactis* fiancheggiata, alle estremità 5’ e 3’, da due tratti di 50 bp, omologhi alle sequenze immediatamente a monte e a valle della regione che si vuole eliminare.

-“gene replacement”: trasformazione dei ceppi deleti con costrutti recanti le mutazioni puntiformi sito specifiche che si inseriscono a livello genomico sostituendosi alla cassetta di delezione e permettendo il ripristino dell’intera ORF.

Le cassette per la “gene disruption” e per il “gene replacement” sono state generate mediante PCR.

4.1 Preparazione delle cassette di delezione *URA3*

Le cassette di delezione *YKL143W::URA3*, *YOL041C::URA3*, *YDR496C::URA3* e *YKR024C::URA3* sono state preparate mediante due reazioni di amplificazione successive. La prima reazione ha previsto l’amplificazione del gene *Ura3* di *K.lactis*, clonato nel plasmide pUG72, con coppie di primers aventi, alle estremità 5’, due regioni non complementari al template ma corrispondenti a un tratto di 25-30bp dell’ estremità 5’ e 3’ della sequenza genomica da sostituire.

Le reazioni di amplificazione sono state allestite in 20 µl finali ed è stato usato l’enzima Phusion DNA Pol (Finnzyme) con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer forward, 0.5 µM primer reverse, 0.25 ng/µl DNA template pUG72, 0.02 U/µl Phusion DNA Pol (Finnzyme).

Il programma dei cicli per le cassette *YKL143W::URA3*, *YOL041C::URA3* e *YDR496C::URA3* è il seguente: 98°C 30”, 30 cicli di 98°C 10” - 53°C 10” - 72°C 45” e poi 72°C 5’.

Il programma dei cicli per la cassetta *YKR024C::URA3* è il seguente: 98°C 30”, 30 cicli di 98°C 7” - 53°C 15” - 72°C 30” e poi 72°C 5’.

I primers utilizzati sono i seguenti (la porzione in blu è quella che si appaia al gene *URA3*):

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer
<i>YKL143W</i>	YKL143W::URA3_Fw1	TCTAAATCAGGGTTCTTACCGAATCCTACAGAGCTCGTTTTATT AGG
	YKL143W::URA3_Rev1	CTTTTCTTCTCCCGTCTTGCTTTTGTCGATCCCAATACAACAGA TC
<i>YOL041C</i>	YOL041C::URA3_Fw1	AGCTTGAGGCACTTTATTAAGAAAACAGTCAGAGCTCGTTTTATT TAGG
	YOL041C::URA3_Rev1	CAATATCGCCACATGGTTCAAAATGTTTCGATCCCAATACAACAG ATC
<i>YDR496C</i>	YDR496C::URA3_Fw1	AATCAGGAATAACAAATTAAGTACAAGAGCTCGTTTTATTAG G
	YDR496C::URA3_Rev1	CTGGAATAATCTTTTGATATAGTGCTTAGATCCCAATACAACAGA TC

YKR024C	DBP7::URA3 fw	TTCAGCAATTTAACACCAAGAGAGCTCGTTTTATTAGG
	DBP7::URA3 rev	GGCTTTTTAATACGCATTTTTTGCGATCCCAATACAACAGATC

Le amplificazioni sono state caricate su gel di agarosio 1% e gli ampliconi sono stati gel-eluiti utilizzando un kit commerciale (Fischer Molecular Biology). Gli ampliconi ottenuti sono poi stati usati come template per la successiva reazione di PCR che ha permesso di riamplicare la cassetta in modo da allungare la regione di omologia con il locus genomico da distruggere.

Le reazioni di amplificazione sono state allestite in 20 µl finali con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer forward, 0.5 µM primer reverse, 0.5 ng/µl cassetta template, 0.02 U/µl Phusion DNA Pol (Finnzyme).

Il programma dei cicli per le cassette *YKL143W::URA3*, *YOL041C::URA3*, *YDR496C::URA3* e *YKR024C::URA3* è il seguente: 98°C 30", 30 cicli di 98°C 10" - 50°C 10" - 72°C 45" e poi 72°C 5'.

I primers utilizzati sono i seguenti (la porzione in azzurro è quella che si appaia alla prima cassetta):

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer
YKL143W	YKL143W::URA3_Fw2	CATCGCCTGAATATTATGAGCATCTAAATCAGGGTTCTTA CCGA
	YKL143W::URA3_Rev2	ACCCTTTTTTTGACGGCTCTTTCTTTCTTCTCCCGTCTT GCT
YOL041C	YOL041C::URA3_Fw2	AACTGTTATATTGAAGGTAGATAGCTTGAGGCCACTTTATT AAG
	YOL041C::URA3_Rev2	TCTGATAATACGGACATATTCAATATCGCCACATGGTTC
YDR496C	YDR496C::URA3_Fw2	TAGAGTACTGAAATAAAGCACAAATCAGGAATAACAAATT AAC
	YDR496C::URA3_Rev2	CCTAGATTCTGTCAATATACTGGAATAATCTTTTGATAT AG
YKR024C	DBP7::URA3_2 fw	GATTATTCATATCCAAATAAGCATACTTATTCAGCAATTT AACACCAAG
	DBP7::URA3_2 rev	TGGCCTGCTTCTGGATGCTCGTAGGCTTTTTAATACGCATT TTTTGC

Le reazioni sono stata ripetute fino a ottenere 1-2 µg di ciascuna cassetta che sono stati utilizzati per la trasformazione delle cellule di lievito Abf1_TAP, Reb1_TAP e Tbf1_TAP.

4.2 Trasformazione chimica di lievito e analisi dei trasformanti

Il ceppo di lievito da trasformare sono stati inoculati in 10 ml di YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucosio) e lasciati crescere da OD₆₀₀ di 0.2 fino ad una OD₆₀₀ di 0.6-0.8. (N.B ogni trasformazione richiede 5 ml). Le cellule sono quindi state raccolte, lavate con 20 ml di H₂O sterile e poi con 1 ml di LiAc 100 mM e poi risospese delicatamente in 80 µl di LiAc 100 mM (il volume di LiAc è proporzionale all'OD). 50 µl di cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 14000 rpm per 15-20 secondi a 4°C e al pellet di cellule sono stati aggiunti 240 µl PEG 50%, 36 µl LiAc 1M, 10 µl SS-DNA 10mg/ml (denaturato per bollitura a 99°C per 5'), 2 µg di DNA per la trasformazione e H₂O sterile fino a volume finale di 360 µl. La miscela è stata mescolata delicatamente e incubata per 40 minuti a 42°C (heat shock); al termine dell'incubazione le cellule sono state separate dal mix di trasformazione, risospese delicatamente in 200 µl di H₂O sterile e piastrate in terreno selettivo (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0,03mg/ml leucina, 0,025 mg/ml metionina, 1% agar).

Le colonie cresciute in terreno selettivo sono state analizzate mediante colony PCR nelle seguenti condizioni: 25 µl finali, 1X Go Taq Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer fw, 0.5 µM primer rev, 3 µl DNA template (colonia risospesa in 50 µl di NaOH 0.02 N e incubata per 40 minuti a 37°C), 0.04U/µl Taq. Il programma eseguito è il seguente: 95°C 5', 35 cicli di 95°C 30'' - 55°C 30'' - 72°C 2'30'' e 72°C 5'.

I cloni risultati positivi alla colony PCR sono stati ulteriormente analizzati mediante estrazione del DNA genomico e successiva PCR analitica di controllo. L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita secondo il metodo "Smash and Grab" e la PCR è stata eseguita nelle medesime condizioni della Colony PCR ad eccezione che sono stati usati 50ng di DNA genomico estratto come template.

4.3 Preparazione delle cassette per il “gene replacement”

Le cassette per il “gene replacement” sono state costruite mediante PCR mutagenica secondo la strategia della “overlap extension” (Higuchi et al., 1988). Tale procedura si articola in tre reazioni di PCR: le prime due, effettuate con primers contenenti le mutazioni che si vogliono introdurre, sono necessarie per amplificare la regione “upstream” e la regione “downstream” rispetto alla posizione da mutare. La terza reazione, eseguita con primers esterni, permette la fusione dei due frammenti in un’unica molecola contenente le mutazioni.

Per tutte le reazioni di amplificazione dei frammenti parziali “upstream” e “downstream” è stato usato lo stesso protocollo, cambiando di volta in volta, i primers, il DNA templatato e il programma di reazione.

Il DNA templatato usato per creare le cassette upstream e downstream per creare i mutanti dei promotori dei geni *YKL143W*, *YOL041C*, *YDR496C* e per la creazione dei mutanti Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2mut e Tbf1_TAP DBP7 RRPEmut è il DNA genomico del ceppo Δ snr32 (che è wt nei geni considerati). Il DNA templatato usato per creare le cassette upstream e downstream per il mutante Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3mut è il DNA genomico del ceppo mutante Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2mut e quello usato per creare il mutante Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3mut_RRPEmut è il genomico estratto dal ceppo Tbf1_TAP DBP7 Tbf1b.s 1-2-3mut.

Tutte le reazioni di amplificazione sono state allestite in 20 μ l finali ed è stato usato l’enzima Phusion DNA Pol (Finnzyme) con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 3% DMSO, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M primer forward, 0.5 μ M primer reverse, 2.5 ng/ μ l DNA genomico, 0.02 U/ μ l Phusion DNA Pol.

Il programma dei cicli per le cassette upstream dei mutanti dei geni *YKL143W*, *YOL041C*, *YDR496C* è stato il seguente: 98°C 2’, 35 cicli di 98°C 10’’- 60°C 10’’- 72°C 10’’ e poi 72°C 5’.

Il programma dei cicli per le cassette downstream dei mutanti dei geni *YKL143W*, *YOL041C*, *YDR496C* è stato il seguente: 98°C 2’, 35 cicli di 98°C 10’’- 63°C 10’’- 72°C 2’ e poi 72°C 5’.

Il programma dei cicli per le cassette upstream e downstream dei mutanti del gene *YKR024C* è stato il seguente: 98°C 2’, 35 cicli di 98°C 1’- 63°C 10’’- 72°C 35’’ e poi 72°C 5’.

Il programma dei cicli per la cassetta *YKR024C::URA3* è il seguente: 98°C 30’’, 30 cicli di 98°C 7’’- 53°C 15’’ - 72°C 30’’ e poi 72°C 5’.

I primers utilizzati sono i seguenti (le basi in viola sono quelle mutate):

Costrutto	Nome Primer	Sequenza Primer
<i>YKL143W Ad</i> Upstream	YKL143W_Fw	GTTTCTCCGAATAACGCTTCTT
	YKL143W_Abf1mut_rev	CAAATTTTCACTACCGTTAATACGATTAGTTA
<i>YKL143W Ad</i> Downstream	YKL143W_Abf1mut_Fw	TAACTAATCGTATTAACGGTAGTGAAAATTG
	YKL143W_Rev	CGTAACCATTGATGATTTGATCGT
<i>YOL041C Ad</i> Upstream	YOL041C_Fw	ACACGGAAAGCAACAATAGCAC
	YOL041C_Abf1mut_Rev	AAATTTCGAAGTAGTATTTAACTTGACAATATATCAAAG
<i>YOL041C Ad</i> Downstream	YOL041C_Abf1mut_Fw	CTTTGATATATTGTCAAGTTAAATACTACTTCGAAATT
	YOL041C_Rev	GACTTCATAGGCTTTTCGTTCA
<i>YDR496C Rd</i> Upstream	YDR496C Fw	CGAGGTAAGGAAGGAGACGC
	YDR496C_Reb1mut rev	GTCTTCAATGCCATGTGAGTTAATCTTCT
<i>YDR496C Rd</i> Downstream	YDR496C_Reb1mut Fw	AGAAGATTAACACATGGCATTGAAGAC
	YDR496C rev	TGTATTGGGTGCTCTTCTTCGG
<i>DBP7 T1-2d</i> Upstream	DBP7_Upstream	CTTGAGCCAGATCATTTAAGCTCATC
	DBP7 Tbf1d_rev	GGAAACCTAATATGTTCTGTTGTTTAAATCCATATTGGTCT GTCAACATTCAATTTTAA
<i>DBP7 T1-2d</i> Downstream	DBP7 Tbf1d_fw	AGTTTAAAATTGAATGTTGACAGACCAATATGGATTTAA CAACAGAACATATTAGGTTT
	DBP7_Downstream	GATATATTTGTGATGCTAGTTCTCG
<i>DBP7 T1-2-3d</i> Upstream	DBP7_Upstream	CTTGAGCCAGATCATTTAAGCTCATC
	DBP7 Tbf1 up d_rev	ATTTTTCAGGCCATCTGTTTAGTATTCTGACA
<i>DBP7 T1-2-3d</i> Upstream	DBP7 Tbf1 up d_fw	TGTCAGAATACTAAACAGATGGCCTGAAAAAT
	DBP7_Downstream	GATATATTTGTGATGCTAGTTCTCG
<i>DBP7 RRPEd</i> Upstream	DBP7_Upstream	CTTGAGCCAGATCATTTAAGCTCATC
	DBP7 RRPE mut_rev	CTAAGCTCATCGCTCAGTGGTGAAGTAAAATGGAA
<i>DBP7 RRPEd</i> Downstream	DBP7 RRPE mut_fw	TTCCATTTTACTTCACCACTGAGCGATGAGCTTAG
	DBP7_Downstream	GATATATTTGTGATGCTAGTTCTCG

I singoli ampliconi sono stati separati su gel di agarosio 1%, eluiti da gel utilizzando il kit commerciale Fisher Molecular Biology e poi usati come template nella reazione di PCR di fusione per realizzare i costrutti mutanti completi. Le quantità dei due frammenti sono state calcolate tenendo conto delle rispettive dimensioni e facendo in modo che fossero presenti in rapporto equimolare, considerando che si sono usati sempre 5ng di cassetta upstream.

Tutte le reazioni di amplificazione sono state allestite in 20 µl finali ed è stato usato l'enzima Phusion DNA Pol (Finnzyme) con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer forward, 0.5 µM primer reverse, 0.25 ng/µl cassetta upstream e quantità equimolare di rispettiva cassetta downstream, 0.02 U/µl Phusion DNA Pol.

In ogni PCR le coppie di primers usate sono composte dai due primers esterni usati per la creazione delle cassette upstream e downstream.

Il programma dei cicli per le cassette dei mutanti dei geni *YKL143W*, *YOL041C*, *YDR496C* è stato il seguente: 98°C 2', 35 cicli di 98°C 10''- 60°C 10''- 72°C 2' e poi 72°C 5'.

Il programma dei cicli per le cassette di tutti i mutanti del gene *YKR024C (DBP7)* è stato il seguente: 98°C 2', 35 cicli di 98°C 10''- 65°C 10''- 72°C 40'' e poi 72°C 5'.

Tutte le reazioni di PCR di fusione sono state interamente caricate su gel di agarosio 1% e gli ampliconi di taglia corretta sono stati eluiti da gel. Le PCR di fusione sono state replicate nelle medesime condizioni fino ad ottenere un quantitativo di costrutti pari a 1-2µg necessari per la seconda trasformazione.

4.4 Trasformazione chimica di lievito e analisi dei trasformanti

La trasformazione chimica è stata eseguita con il medesimo protocollo illustrato in precedenza (paragrafo 4.2); l'unica variazione è che in questa seconda fase le cassette sono state cotrasformate con 1 µg di plasmide YEplac181 per poter effettuare una doppia selezione dei trasformanti e ridurre il numero dei falsi positivi. I trasformanti ottenuti dal "gene replacement" sono stati selezionati dapprima mediante crescita su terreno minimo contenente 0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0,025 mg/ml metionina, 0,02mg/ml uracile, in modo da selezionare le cellule che hanno ricevuto il plasmide. Le cellule cresciute sono state sottoposte a una seconda selezione in terreno minimo costituito da 0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0,025 mg/ml metionina, 0,02mg/ml uracile, 1 mg/ml 5'FOA (Acido 5'-Fluoroorotico) che permette la sopravvivenza della sole cellule che hanno perso il gene *URA3*, codificante per la orotidina 5-fosfato decarbossilasi.

Le cellule cresciute sono state poi sottoposte a screening mediante colony PCR come descritto in precedenza, e, sui cloni risultati positivi, si è proceduto con l'estrazione del DNA genomico e successiva PCR analitica. Infine i cloni sono stati analizzati mediante sequenziamento della porzione di DNA genomico relativa al promotore in modo da poter confermare l'introduzione delle mutazioni desiderate nei siti d'interesse.

5. Analisi dei livelli di trascrizione

La valutazione dei livelli di trascrizione è stata effettuata sui ceppi: Abf1_TAP, Abf1_TAP YKL143W Abf1 b.s mut, Abf1_TAP YOL041C Abf1 b.s mut, Reb1_TAP, Reb1_TAP YDR496C Reb1 b.s mut, Tbf1_TAP, Tbf1_TAP DBP7 Tbf1 b.s 1-2 mut, Tbf1_TAP DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut, Tbf1_TAP RRPEmut e Tbf1_TAP DBP7 Tbf1 b.s 1-2-3 mut_ RRPEmut.

5.1. Estrazione degli RNA

Per tutti i ceppi le cellule per l'estrazione degli RNA sono state inoculate in 20 ml di YPD a OD₆₀₀ pari a 0.16 - 0.2 e lasciati crescere fino a OD₆₀₀ pari a 0.5 -0.6. Le cellule sono quindi state raccolte mediante centrifugazione, lavate due volte con H₂O trattata con DEPC e gli RNA totali sono stati estratti utilizzando il kit commerciale RNeasy MiniKit (Qiagen®), seguendo il protocollo della casa produttrice. Il metodo di lisi cellulare usato è quello di lisi meccanica ed è stato effettuato il trattamento con DNasi opzionale suggerito nel protocollo.

Gli RNA estratti sono stati quantificati allo spettrofotometro e l'integrità degli RNA estratti è stata valutata mediante caricamento su gel di Acrilammide/Bisacrilammide 19:1 6% Urea 7M, TBE TXN 1x.

5.2. PCR analitica per valutare l'eventuale presenza di DNA genomico contaminante

Sugli RNA estratti è stata effettuata una PCR analitica per valutare l'eventuale presenza di DNA genomico contaminante. In queste reazioni di controllo gli RNA ottenuti sono stati utilizzati come templat e sono state usate coppie di primers che danno ampliconi di differente taglia.

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer	Taglia amplicone
<i>DBP7</i>	DBP7 upstream	CTTGAGCCAGATCATTTAAGCTCATC	1074 bp
	DBP7 downstream	GATATATTTGTGATGCTAGTTCTCG	
<i>ARX1</i>	RT ARX1 fw	TCACAGGCCAATTGATTAGAACT	162 bp
	RT ARX1 rev	ACTCTGTCCAACAACACCCCTTA	

Le reazioni di amplificazione di controllo sono state allestite in 25 µl finali ed è stato usato l'enzima Taq DNA Pol (prodotto in laboratorio) con il seguente mix di reazione: 1x Buffer GoTaq

flexy (Promega), 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.25mM Primer fw e Primer rev, 5ng/μl Templato, 2,5μl Taq Home made.

Il programma dei cicli è stato il seguente: 95°C 5', 35 cicli di 95°C 30''- 55°C 30''- 72°C 1'10'' e poi 72°C 5'.

I campioni sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1.5%: ciò ha confermato la purezza dell'RNA estratto.

5.3 Retro-trascrizione degli RNA totali estratti

500ng di RNA totale estratto dalle cellule sono stati retro-trascritti utilizzando il Kit "iScript cDNA Synthesis Kit" (Biorad). Tale kit contiene come trascrittasi inversa, la Rnasi H+, una versione modificata della trascrittasi inversa MMLV e, come primers, una miscela di oligo dT e random examers. Per la reazione si sono seguite le condizioni suggerite dalla casa produttrice.

5.4 Analisi dei livelli di trascrizione genica mediante Real Time qPCR

I cDNA ottenuti dalla retro-trascrizione sono stati usati come template in reazioni di PCR quantitative basate sulla tecnica di Real Time qPCR con lo strumento ABI 7300 (Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System).

La reazione di amplificazione è stata eseguita con coppie di primers specifici per i geni di interesse e per lo standard interno *HHT2*. Tutti i primers sono stati disegnati con il programma PrimerExpress in modo da avere una T_m tra 58°C e 60°C e tali da ottenere ampliconi di taglia simile (90-120 bp). Le concentrazioni finali di reazione in qPCR sono state decise a seguito di prove di efficienza che sono state effettuate usando come template il cDNA di *Abf1_TAP* e per ciascuna coppia di primers sono state eseguite reazioni di RealTime qPCR con 5 diluizioni seriali del template: si è partiti da una diluizione 1:5 e poi si è proceduto con altre quattro diluizioni seriali di 1:10.

La reazione di amplificazione per la valutazione dei livelli di espressione è stata eseguita in 20 μl finali con il seguente mix di reazione: 4μl DNA template (cDNA diluito 1:10), 1X SYBR[®] Green

PCR Master Mix (ABI), XnM primer fw e rev (vedere tabelle per sequenza e quantità). Il programma impostato prevede una fase di amplificazione di 50°C per 2', 95°C per 10', 40 cicli a 95°C per 15'' e 60°C per 1' e poi una fase di analisi degli ampliconi mediante costruzione della curva di dissociazione (95°C per 15'', 60°C per 30'', 95°C per 15''). Tutte le reazioni sono state allestite in triplicato in modo da poter calcolare media e deviazione standard dei singoli valori di CT ottenuti.

Le coppie di primers usate per testare le cromatine di Abf1_TAP e Reb1_TAP sono:

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer	C.finale
YKL143W	LTV1_RT_fw	GTTCTGTCTCCAATCCAATAAAA	67nM
	LTV1_RT_rev	AGCCCTCCTACCCCTTTGGTTT	67nM
YOL041C	NOP12_RT_fw	CACGACTGTCTTCCTGATTTCG	75nM
	NOP12_RT_rev	CTGAAACATCAGGTTTGCTTGCT	75nM
YDR496C	PUF6_RT_fw	TCAGACGTTGCTTGACTTTGGTT	52nM
	PUF6_RT_rev	CAATTTTTCGGCGTGGTTTTT	52nM
DBP7	RT_DBP7_FW	GGAGATCCGCATTCAAAAA	140nM
	RT_DBP7_rev	GCCTTTCACGTAACCCAAAA	140nM
HHT2	HHT2_RT_fw	TCAATCTTCTGCTATCGGTGCTT	73nM
	HHT2_RT_rev	GCGTGAATAGCAGCCAGATTAGT	73nM

I dati sono stati analizzati in Excel, secondo il metodo di Livak (Livak and Schmittgen, 2001): la media (Ct) dei tre replicati di ciascun campione è stato normalizzato rispetto allo standard interno ($\Delta Ct = Ct_{campione} - Ct_{standard}$) e poi al valore di Ct_N relativo a ciascun ceppo analizzato è stato sottratto quello del relativo ceppo di controllo (per ciascun mutante il ceppo di riferimento è il corrispettivo wt): $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{ceppo\ di\ interesse} - \Delta Ct_{ceppo\ di\ controllo}$.

Il valore di espressione normalizzato è stato quindi ottenuto a seguito della conversione lineare del valore di $\Delta\Delta Ct$ ($Livello\ di\ espressione = 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

6. Deplezione di glucosio

L'esperimento di deplezione di glucosio è stato effettuato sui ceppi: Abf1_TAP e Reb1_TAP seguendo le indicazioni di (Lippman and Broach, 2009). Le cellule sono state cresciute in terreno massimo YPD in modo da partire da OD₆₀₀ pari a 0,056 e cresciute in terreno massimo YPD fino a OD₆₀₀ pari a 0,4. Le cellule sono quindi state raccolte, sciacquate con H₂O sterile, risospese in 210ml di H₂O sterile e divise in 7 aliquote. Le aliquote sono state quindi raccolte e risospese in 220ml di terreno: 4 sono state risospese in YPD fresco e 3 in YP (2% peptone, 1% yeast extract), entrambi pre-riscaldati a 30°C. Una delle aliquote (tempo 0) è stata raccolta e trattata immediatamente mentre le altre sono state messe a crescere a 30°C e raccolte a intervalli di tempo regolari di 10' (in totale sono stati raccolti quattro tempi: t0, t10', t20' e t30'). A ogni tempo, 20ml di cellule sono stati prelevati immediatamente, sciaquati in H₂O DEPC e usati per l'estrazione degli RNA, mentre i restanti 200ml sono stati trattati con formaldeide e si è proceduto con il protocollo di immunoprecipitazione cromatinica descritto nel paragrafo 3.

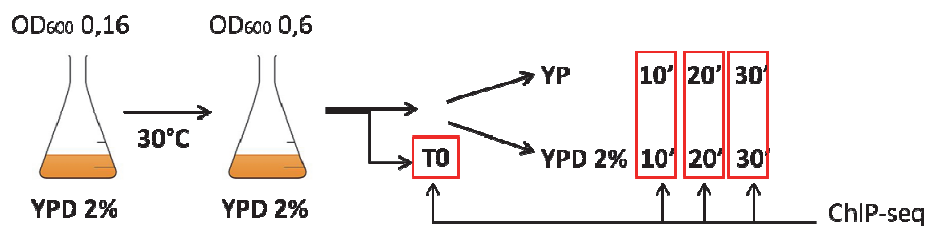


Figura 33 Schema generale dell'esperimento di "glucose depletion" effettuato sui ceppi Abf1_TAP e Reb1_TAP.

Parte II

Regolazione trascrizionale dei geni per snoRNA

snoRNA

Gli “small nucleolar RNA” (snoRNA) sono RNA non codificanti, chimicamente stabili, di lunghezza variabile tra 60 e 300 nt che si associano con uno specifico set di proteine a formare complessi ribonucleoproteici noti come “snoRNP”. Essi sono localizzati nel nucleolo e intervengono nella maturazione di rRNA e snRNA; nelle snoRNP, lo snoRNA agisce da guida del complesso, portandolo sul sito bersaglio mediante appaiamento al target, mentre la componente proteica è responsabile della catalisi. Le snoRNP sono presenti in un’ampia varietà di organismi: dagli Archea, dove sono note come “sno-like RNP”, agli Eucarioti; non sono state identificate invece nei batteri, nei quali funzioni corrispondenti sono svolte da enzimi specifici. Il numero degli snoRNA è taxon-specifico e sembra correlare con la complessità dell’organismo; in effetti, quello dei vertebrati è circa dodici volte maggiore di quello del lievito (Bachellerie et al., 2002).

La famiglia degli snoRNA è di per sé molto varia, sia nell’organizzazione genica e nelle vie di biosintesi descritte, sia per i tipi di strutture, targets e funzioni. Infatti, è stato dimostrato che, oltre a essere coinvolti nella biogenesi di rRNA, gli snoRNA possono avere altri ruoli, quali, ad esempio, la stabilizzazione della telomerasi e della RNasi P e la maturazione degli snRNA nei Cajal bodies (Matera et al., 2007) nei vertebrati e la modificazione degli mRNAs nei mammiferi.

Questi RNA sono suddivisi in due grandi famiglie, definite dalla presenza di elementi di sequenza conservati: gli snoRNA C/D box e gli snoRNA H/ACA box, che guidano, rispettivamente, la 2’O metilazione e la pseudouridilazione degli RNA bersaglio.

Gli snoRNA C/D box sono caratterizzati da due corti motivi di sequenza conservati, la box C (5’-RUGAUGA-3’) e la box D (5’-CUGA-3’), localizzati, rispettivamente, vicino al terminale 5’ e 3’ della sequenza. Le due estremità 5’ e 3’ contengono inoltre 4-5 nt complementari che si appaiano, portando alla formazione di una “stem-box” 5’-3’ terminale, in cui i domini C e D sono ravvicinati. Insieme, le cassette C e D e la forcina terminale costituiscono il motivo C/D, che fornisce il sito di legame per le “core proteins” della snoRNP ed è importante per la biogenesi e per la localizzazione nucleolare dello snoRNA (Caffarelli et al., 1996; Cavaille and Bachellerie, 1996; Lange et al., 1998; Samarsky et al., 1998; Villa et al., 2000). Molti snoRNA di questa famiglia contengono, inoltre, altri due motivi di sequenza degenerati: la box C’, in posizione centrale, e la box D’, localizzata nella metà 5’(Kiss-Laszlo et al., 1996; Tycowski et

al., 1996), solitamente poste a 3-9 nt di distanza l'una dall'altra. Immediatamente a monte della box D e/o D' si trovano elementi guida antisenso, lunghi 10-21nt, perfettamente complementari alla molecola di RNA bersaglio. A seguito dell'appaiamento, si forma una doppia elica nella quale il nucleotide da modificare è sempre posizionato esattamente 5 nt a monte delle box D o D' (Kiss-Laszlo et al., 1996).

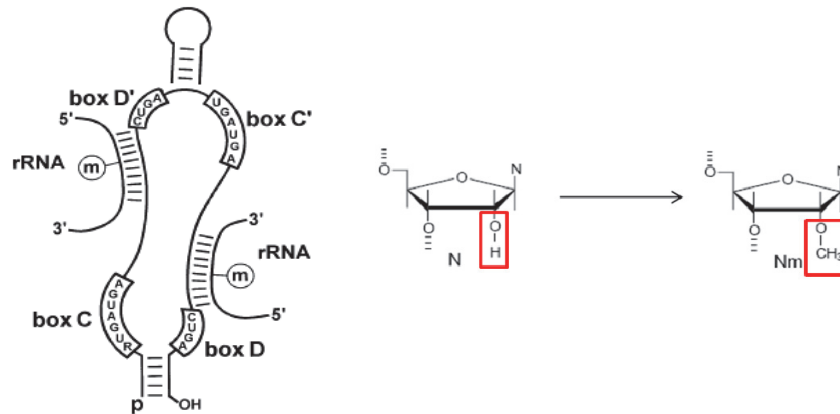


Figura 34 Struttura di un tipico snoRNA C/D box; è mostrato anche l'appaiamento con l'rRNA substrato. A destra: reazione di modificazione guidata dagli snoRNA C/Dbox: metilazione del 2'-O-ribosio.

Gli snoRNA della famiglia H/ACA, lunghi mediamente 50-100 nt, hanno una caratteristica struttura secondaria definita "hairpin-hinge-hairpin-tail", composta di due domini a "forcina" (hairpin) connessi da un motivo a singolo filamento (hinge) e seguiti da una corta coda terminale. Un motivo conservato, detto box H (5'-ANANNA-3', dove N sta per qualsiasi nucleotide), è localizzato nel filamento "hinge", mentre un secondo elemento conservato, la box ACA, si trova sempre a 3nt di distanza dall'estremità 3', nella coda terminale dello snoRNA (Balakin et al., 1996; Ganot et al., 1997a; Ganot et al., 1997b). Ciascuno snoRNA di questa classe contiene una sequenza guida bipartita all'interno di uno o di entrambi i loop dei due grandi domini a forcina; questa sequenza si appaia perfettamente all'RNA bersaglio, formando con esso due corti duplex di 3-10 bp e lasciando al centro due soli nucleotidi non appaiati, uno dei quali corrisponde all'uridina che verrà pseudouridilata. La distanza tra l'uridina bersaglio e le box H/ACA è sempre di 14-16 nt e determina quale sito subirà la pseudouridilazione. In lievito e nei mammiferi, le due box e la forcina interposta sono sufficienti a garantire la localizzazione nucleolare dello snoRNA, mentre, per la corretta

attività di pseudouridilazione, sono richieste entrambe le forcine, anche quando lo snoRNA contiene una sola sequenza guida (Bortolin et al., 1999).

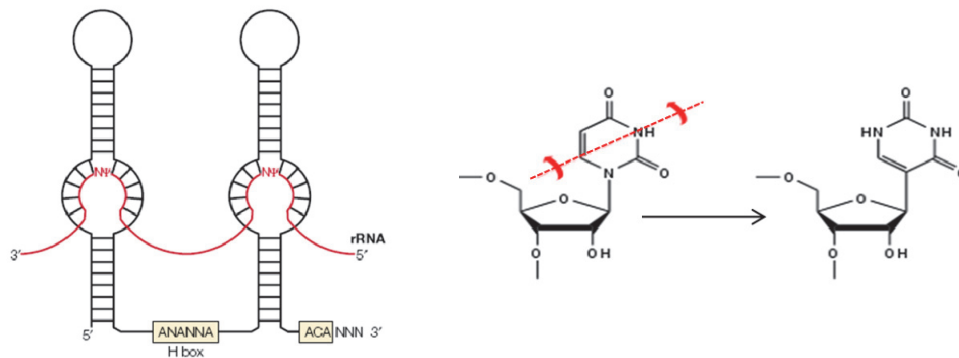


Figura 35 Struttura di un tipico snoRNA H/ACA box; è mostrato anche l'appaiamento con l'rRNA substrato. A destra: reazione di pseudouridilazione guidata dagli snoRNA H/ACA box.

Esistono infine due snoRNA che non possono essere classificati nelle due categorie precedenti: l'rRNA componente della RNAsi MRP (Mitochondrial RNA Processing) e lo snoRNA U85.

La 2'O metilazione e la pseudouridilazione sono le due modificazioni post-trascrizionali più frequenti degli RNA ribosomiali in tutte le specie. Il numero di nucleotidi modificati nell'rRNA è taxon- specifico e, nel ribosoma eucariotico, ciascuna modificazione riguarda 50-100 siti (Weinstein and Steitz, 1999). I nucleotidi modificati sono situati prevalentemente nella porzione interna, funzionalmente importante dell'rRNA, comprendente le parti che formano la regione peptidil-transferasica del ribosoma (Decatur and Fournier, 2002; Decatur and Fournier, 2003). Questa localizzazione suggerisce che le modificazioni covalenti possano avere un ruolo nel ripiegamento e nella stabilità dell'rRNA, ma è stato anche ipotizzato che possano contribuire alla regolazione della specificità dei singoli ribosomi: la presenza di modificazioni differenti negli rRNA potrebbe essere uno dei meccanismi utili a creare nella cellula un pool di ribosomi eterogenei, capaci di interagire con affinità differenti con i vari mRNAs da tradurre (Mauro and Edelman, 2002). Un piccolo numero di snoRNA di entrambe le famiglie (in *S. cerevisiae*, sono gli snoRNA C/D box U3 e U14 e gli H/ACA snR10 e snR30) è inoltre coinvolto nel taglio endonucleolitico del pre-rRNA 35S durante la biogenesi degli rRNA (Tollervey, 1996).

Organizzazione genomica dei geni per snoRNA

La famiglia degli snoRNA è caratterizzata da una grande eterogeneità nell'organizzazione genica (Dieci et al., 2009a); negli Eucarioti, infatti, sono state descritte numerose architetture differenti, ciascuna corrispondente a una particolare modalità di trascrizione. In generale, esistono sia unità trascrizionali indipendenti, sia unità presenti in introni di geni ospiti; in entrambi i casi le sequenze per snoRNA possono essere individuali o disposte in cluster.

Le unità trascrizionali indipendenti, mono- o policistroniche, sono organizzate in maniera classica, con la sequenza codificante fiancheggiata dal promotore e dal terminatore e, nel caso delle sequenze policistroniche, la trascrizione porta alla sintesi di un unico trascritto, successivamente processato per formare i singoli snoRNA.

Le unità introniche, caratteristiche degli eucarioti superiori, sono contenute all'interno di introni di geni ospiti e mancano di un proprio promotore. Spesso, più snoRNA sono presenti in un medesimo gene ospite e possono essere organizzati nella modalità "un gene per introne", ossia distribuiti in introni differenti, oppure in quella "più geni per introne", cioè in cluster. Una caratteristica interessante, osservata negli eucarioti superiori, è che i geni ospiti sono in genere geni costitutivi e molti appartengono alla famiglia 5'TOP (5'-Terminal OligoPyrimidine), comprendente anche i geni per le proteine ribosomiali, il cui trascritto inizia con un tratto oligopirimidinico che potrebbe servire a regolare la traduzione in risposta alle condizioni di crescita (de Turris et al., 2004; Pelczar and Filipowicz, 1998; Tycowski and Steitz, 2001).

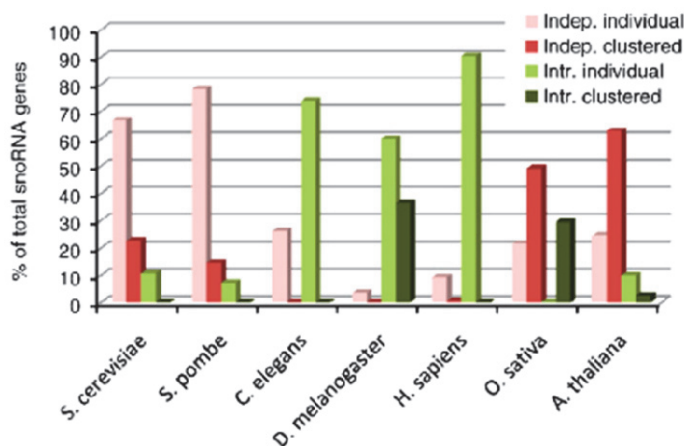


Figura 36 Distribuzione dei differenti tipi di organizzazione genomica dei geni per snoRNA negli Eucarioti. Adattata da (Dieci et al., 2009a).

In *S. cerevisiae*, dei 76 snoRNA noti, 67 sono codificati da unità trascrizionali indipendenti di cui 50 monocistroniche, 17 da 5 unità di-o-policistroniche, mentre solo 8 sono in intronici.

Trascrizione dei geni per snoRNA

Sebbene i geni codificanti per snoRNA siano tra i loci più trascritti del genoma, le conoscenze relative ai meccanismi di trascrizione e alla loro regolazione sono ancora molto limitate. È noto che esistono differenti modalità di trascrizione a seconda del tipo di organizzazione genica; inoltre, sembra che in tutti gli organismi i livelli di espressione di questo gruppo di geni siano elevati e coordinati con l'espressione dei geni per gli rRNA, le proteine ribosomiali e dei geni *ribi*. In lievito, evidenze di una tale coregolazione emergono dallo studio del locus policistronico *SNR78-SNR72* (Qu et al., 1999): quando cellule cresciute in glicerolo vengono trasferite in terreno con glucosio, si assiste a un incremento di circa due volte dei livelli di trascrizione del locus, coordinato con l'aumento più marcato dell'espressione dei geni per le proteine ribosomiali.

L'analisi filogenetica dei promotori dei geni per snoRNA indipendenti in cinque specie di Saccaromiceti (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*), compiuta nel nostro laboratorio, ha permesso la caratterizzazione dei promotori di questo gruppo di geni e ha messo in evidenza che anche queste unità trascrizionali hanno un promotore con un'architettura comune e conservata. Come i promotori dei geni per le proteine ribosomiali e dei geni *ribi*, sono caratterizzati dalla presenza di una regione 5' libera da nucleosomi. Ciò che invece li contraddistingue è che la maggior parte di essi presenta una canonica TATA box, localizzata 80-90 bp a monte del TSS, spesso circondata da sequenze ricche in GC, e responsabile della trascrizione basale. Nel 51% dei casi, 50bp a monte della TATA box, è presente un tratto poli(dA:dT), lungo almeno 7bp, che potrebbe servire a mantenere una regione priva di nucleosomi (nucleosome-free region, NFR). In 15 promotori (26%) è presente, in una posizione simile a quella del tratto poli(dA:dT), ma più variabile nei diversi promotori, il motivo di sequenza RRPE, a volte associato all'elemento PAC. La presenza di questi due elementi suggerisce una possibile coregolazione con i geni *ribi*. Oltre a questi, che rappresentano gli elementi "core" del promotore, a monte sono presenti altre regioni *in cis*: le più frequenti sono un sito di legame per la proteina Reb1, presente nel 40% dei

promotori, e una sequenza di 8bp, dal consenso aRCCCTaa, che rappresenta, dopo la TATA box, il secondo elemento più frequente a monte di questo gruppo di geni. Questo sito, posizionato a circa 200 bp dal TSS e delimitante l'estremità 5' del promotore, corrisponde alla sequenza consenso riconosciuta dalla proteina Tbf1 (Brigati et al., 1993) e, come dimostrato da esperimenti di immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) su singoli geni, è legato *in vivo* dalla proteina che si lega al promotore dei geni per snoRNA contenenti la sequenza aRCCCTaa, ma non a quelli che ne sono privi. Inoltre, si osserva che dei 45 geni aventi la TATA, 33 hanno anche il sito Tbf1 e che, a parte due eccezioni, tutti i promotori contenenti il sito Reb1 hanno a monte anche il sito di legame per Tbf1 a una distanza fissa 23-35 bp.

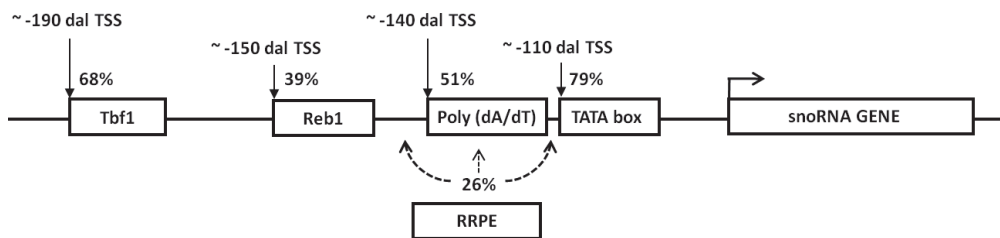


Figura 37 Schema riassuntivo delle posizioni degli elementi che caratterizzano il promotore tipico dei geni per snoRNA indipendenti in *S. cerevisiae*.

Il legame di Tbf1 *in vivo* è stato confermato dall'analisi di immunoprecipitazione cromatinica di Tbf1 su scala genomica (ChIP-seq), effettuata in collaborazione con il gruppo di David Shore; tale esperimento ci ha permesso di identificare tutti i geni target della proteina in *S. cerevisiae*.

In totale sono stati identificati 197 siti di legame, di cui 27 localizzati a livello dei telomeri, 136 in promotori di geni non codificanti per snoRNA e 34 in promotori di geni per snoRNA. Inoltre, l'analisi ha messo in evidenza differenze nel legame di Tbf1 nel genoma. A livello telomerico ci sono siti di legame multipli spesso associati a siti di legame per la proteina Reb1; a livello dei promotori "non-snoRNA", non vi è associazione con la TATA box e sono generalmente presenti due siti di legame per Tbf1, a 21-23 bp di distanza l'uno dall'altro e

orientati in direzioni opposte. Invece, come già messo in evidenza dall'analisi bioinformatica, nei promotori per snoRNA è presente un solo sito di legame per Tbf1 e vi è una forte associazione con la presenza della TATA box.

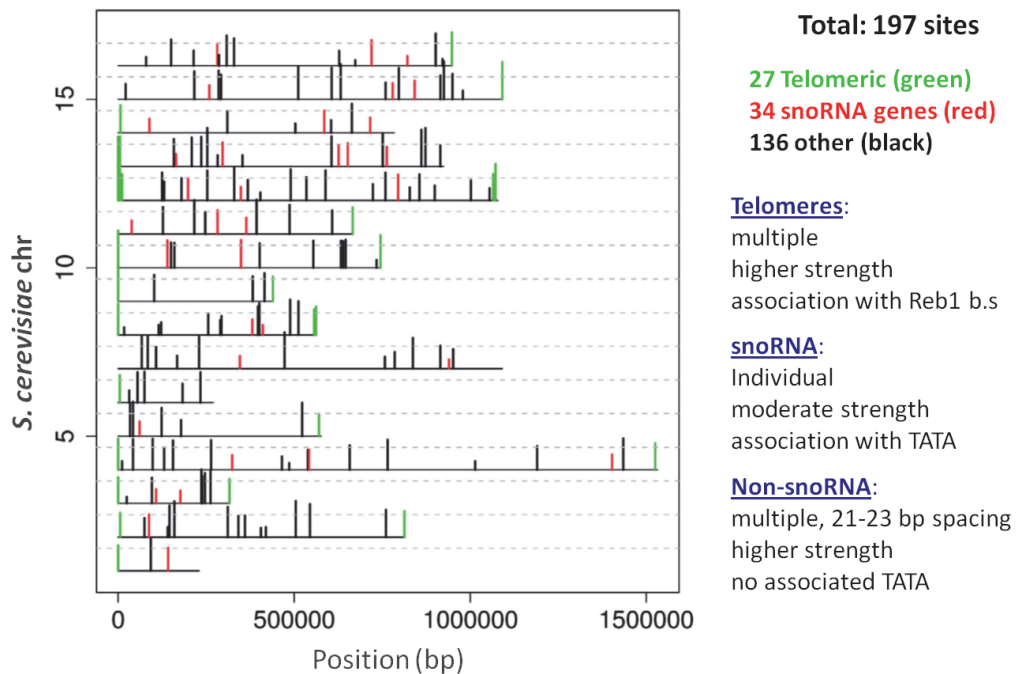


Figura 38 Mappa dei 197 siti di legame di Tbf1 nei 16 cromosomi di *S. cerevisiae*. Ogni barra rappresenta un picco di associazione; i siti telomerici sono indicati in verde, i siti nei promotori di geni per snoRNA in rosso mentre i siti nei promotori non-snoRNA in nero. L'altezza dei singoli picchi è proporzionale alla densità delle reads trovate in quella data posizione. Adattata da (Preti et al., 2010).

Scopo della Ricerca

Dal momento che in *S. cerevisiae* il sito Tbf1 è, dopo la TATA box, il secondo elemento più frequente nei promotori dei geni per snoRNA, abbiamo ipotizzato che possa essere coinvolto nella regolazione dell'espressione di questo gruppo di unità trascrizionali. L'ipotesi è avvalorata dal fatto che in *Candida albicans* e in altri ascomiceti strettamente correlati, la sequenza consenso per Tbf1 è presente nell'82% dei promotori dei geni per le proteine ribosomiali e, come dimostrato in (Hogues et al., 2008), in *C. albicans* il legame di Tbf1 al promotore delle proteine ribosomiali è essenziale per la loro espressione. Infatti, la deplezione di Tbf1 in mutanti condizionali comporta la specifica riduzione dei livelli delle proteine controllate direttamente da Tbf1; tale riduzione è coordinata con la diminuzione della sintesi e del processamento del pre-rRNA, che, a sua volta, potrebbe dipendere da Tbf1, dal momento che la sequenza consenso per la proteina è presente a livello del terminatore dell'rDNA.

Lo scopo di questo lavoro è verificare se gli elementi presenti nel promotore dei geni per snoRNA di *S. cerevisiae* siano necessari per la loro regolazione trascrizionale, andando a studiare l'effetto di mutazioni sito-specifiche di questi elementi a monte di singoli geni. Nel corso di queste analisi, la nostra attenzione si è per lo più focalizzata sul sito di legame per Tbf1 e sull'eventuale coinvolgimento di questo regolatore nella trascrizione di queste unità trascrizionali.

Risultati e Discussione

Analisi della regione a monte di *SNR32*

Il gene *SNR32*, è unico e codifica per snR32, uno snoRNA H/ACA box non essenziale che guida la pseudouridilazione della subunità maggiore (LSU) dell'rRNA in posizione U2191 (Balakin et al., 1993). Il gene è posizionato tra la ORF *YHR140W*, codificante per un'ipotetica proteina di membrana a funzione ignota, e il gene *RPL42B*, trascritto in direzione opposta e codificante per una componente della subunità 60S del ribosoma. Il suo promotore è caratterizzato dalla presenza di una TATA box in posizione -89, un tratto poli(dA:dT) di 11 bp posizionato 115 bp a monte del TSS, un sito Reb1, a 127 bp a monte del TSS e il sito di legame per Tbf1, localizzato 160bp a monte del TSS. La struttura del promotore è schematizzata in figura:

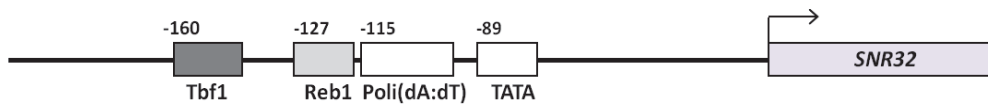


Figura 39 Schema riassuntivo delle posizioni degli elementi identificati nel promotore del gene *SNR32*.

Per studiare *in vivo* il ruolo del tratto Poli(dA:dT), del sito di legame per Reb1 e del sito di legame per Tbf1, sono stati preparati differenti costrutti recanti l'intera sequenza codificante del gene *SNR32* e circa 400bp della regione a monte, contenente mutazioni sito-specifiche a livello dei siti da analizzare. Il tipo di mutazioni è stato scelto in modo tale da distruggere completamente il sito, in particolare gli elementi sono stati così modificati (le basi mutate sono indicate in rosso):

- tratto Poli(dA:dT) → CAGTAA**CA**
- sito Reb1 (AGGGTAA) → AATGT**CA**
- sito Tbf1 (AGCCCTA) → AGAC**AGA**

Questi sono stati mutati sia singolarmente, sia in combinazione, e i frammenti ottenuti sono stati successivamente clonati all'interno del plasmide centromerico pFL39. Gli episomi ricombinanti sono quindi stati trasformati nel ceppo YS670, delecto per *SNR32* (Balakin et al., 1993) e gli effetti delle mutazioni sull'espressione del gene sono stati valutati mediante

Northern blot, con una sonda specifica per snR32. L'esperimento è stato ripetuto in doppio e i dati sono stati normalizzati rispetto al segnale del tRNA Ala(AGC), utilizzato come standard interno. La scelta del tRNA è dipesa dal fatto che i suoi livelli sono costanti nelle condizioni sperimentali utilizzate e che la sua taglia, di 73 nt, ne rende il segnale distinguibile rispetto a quello di snR32.

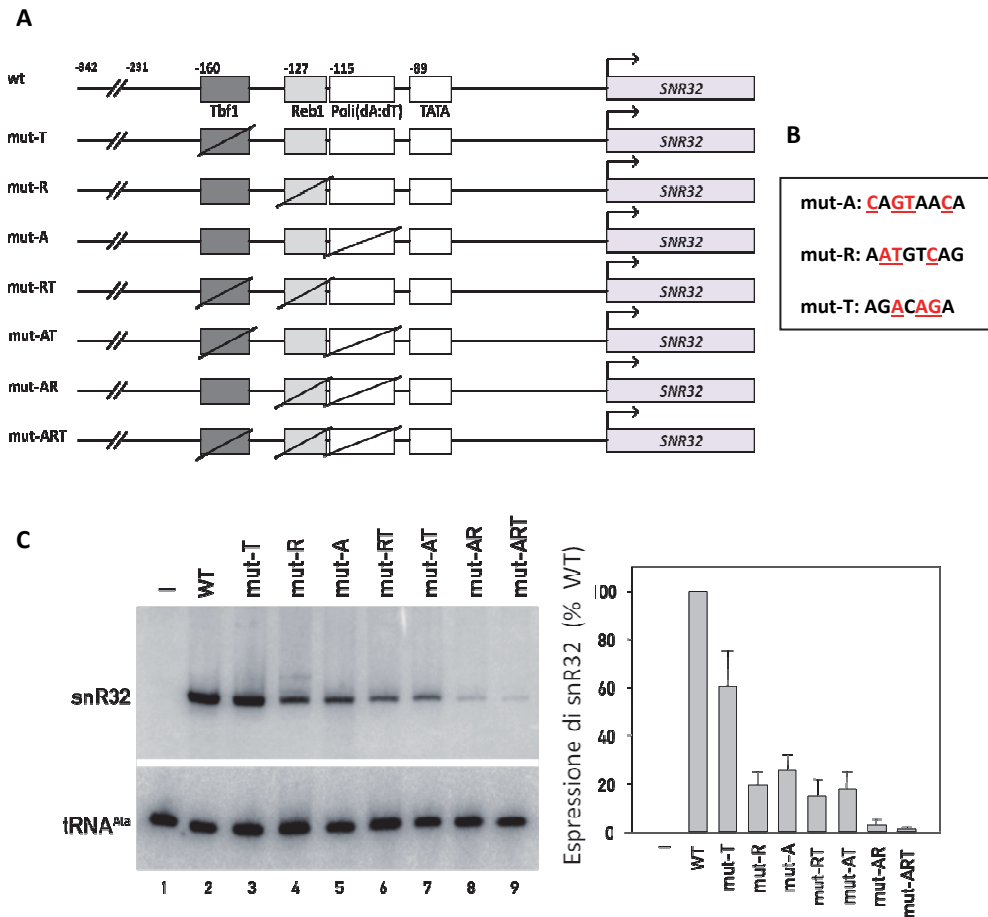


Figura 40 **A)** Schema dei costrutti episomici per studiare *SNR32*: mut-T, mutante del sito Tbf1, mut-R mutante del sito Reb1, mut-A mutante del tratto poli(dA:dT), mut-RT, mutante dei siti Tbf1 e Reb1, mut-AT mutante del sito Tbf1 e del poli(dA:dT), mut-AR mutante del sito Reb1 e del poli(dA:dT), mut-ART, mutante dei siti Tbf1, Reb1 e del poli(dA:dT). **B)** Mutazioni introdotte nei tre siti. **C)** Analisi Northern sugli RNA estratti dai ceppi trasformati con una sonda specifica per snR32 e per il tRNA Ala(AGC), usato come standard interno. L'analisi è stata ripetuta in doppio per ogni ceppo; i valori medi espressi come percentuale del "wt" (100) sono indicati nel pannello sulla destra. Le barre di errore sono l'errore standard calcolato sui due esperimenti. Adattata da (Preti et al., 2010).

L'analisi Northern blot (figura 40), indica che tutti gli elementi analizzati sono richiesti per l'efficiente trascrizione del gene, dal momento che la loro distruzione comporta la riduzione dei livelli di trascritto che sono completamente annullati nel triplo mutante. Come si evince dall'analisi dei mutanti singoli, la mutazione del sito Tbf1 ha un effetto minore rispetto quella del tratto Poli(dA:dT) e del sito Reb1; infatti, il livello di espressione residuo monitorato nel mutante del solo sito Tbf1 è del 60%, in confronto al 25% del mutante del Poli(dA:dT) e al 20% del mutante di Reb1. Quest'ultimo sembra essere pertanto l'elemento più importante per l'espressione di SNR32 e tali risultati si confermano anche nei doppi mutanti. Inoltre, la maggiore riduzione dell'efficienza di trascrizione rilevata nel mutante AR rispetto ai mutanti singoli suggerisce una possibile cooperazione tra Reb1 e l'elemento Poli(dA:dT). L'esame delle mappe dei nucleosomi su scala genomica e studi *in vitro* del loro posizionamento dimostrano che la presenza di Reb1 è in grado di aumentare il livello di deplezione dei nucleosomi associato ai tratti Poli(dA:dT) (Field et al., 2008; Kaplan et al., 2009). E' pertanto possibile che, anche in questo promotore, Reb1 possa avere il medesimo ruolo e servire ad aumentare la forza del tratto Poli(dA:dT). Invece, non sembra esserci alcuna sinergia tra Tbf1 e Reb1, né tra Tbf1 e il tratto Poli(dA:dT), dal momento che i livelli di trascrizione dei doppi mutanti RT e AT sono simili a quelli riscontrati nei mutanti singoli mut-R e mut-A.

Analisi della regione a monte di *SNR64*

SNR64 è un gene unico, localizzato sul cromosoma cromosoma XI e codificante per snR64, uno snoRNA C/D box non essenziale di 101 nt che guida la 2'O metilazione della subunità maggiore (LSU) dell'rRNA in posizione C2337 (Lowe and Eddy, 1999). Questo snoRNA viene sintetizzato in forma di precursore e successivamente processato in 5', pertanto, non è dotato del cappuccio di trimetilguanosa in 5'. Il sito di inizio della trascrizione non è stato determinato in maniera precisa ma un'analisi di primer extension, effettuata nel nostro laboratorio, lo posiziona tra -164 e -162 bp rispetto alla prima base dello snoRNA maturo. Nella regione a monte del gene, invece, sono stati identificati una TATA box, in posizione -65 bp rispetto al putativo sito di inizio della trascrizione (-164 rispetto all'inizio dello snoRNA maturo), un tratto poli(dA:dT) di 26 bp e il sito di legame per Tbf1.

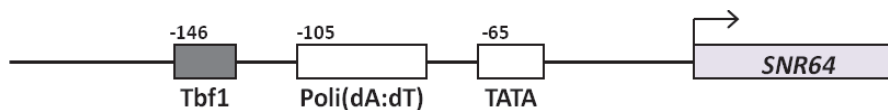
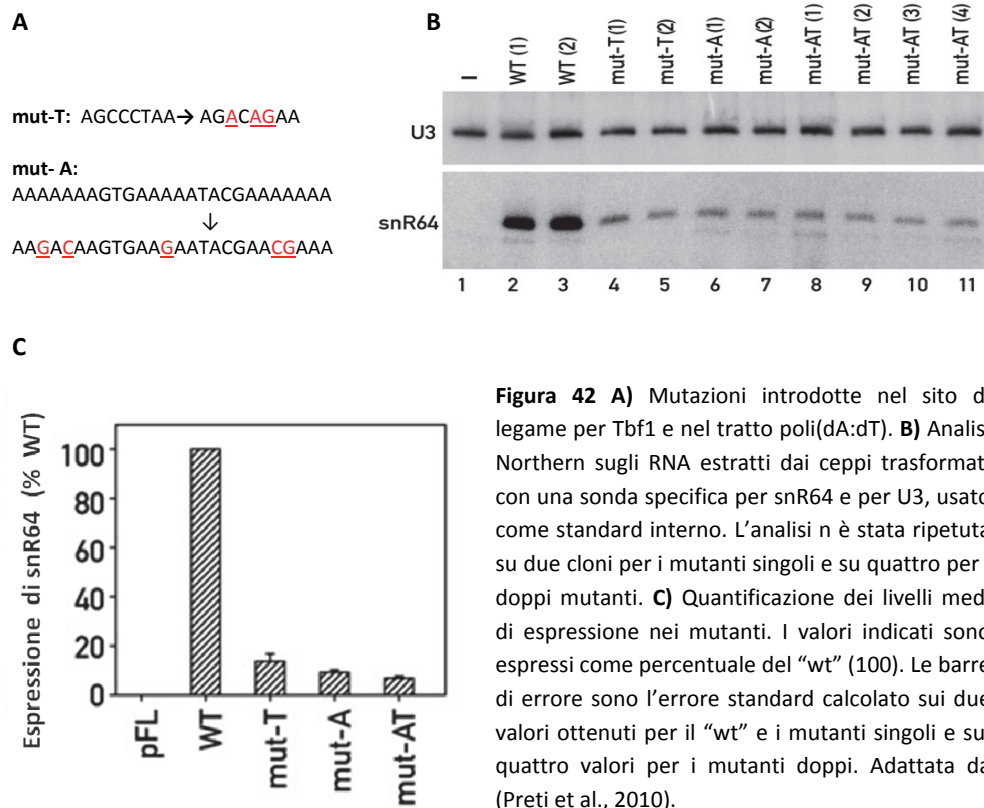


Figura 41 Schema riassuntivo delle posizioni degli elementi identificati nel promotore del gene *SNR64*.

L'analisi del possibile ruolo del sito Tbf1 e del tratto poli(dA:dT) è stata condotta in modo analogo quanto fatto per *SNR32*; dapprima, sono stati creati frammenti recanti l'intera sequenza codificante del gene *SNR64* e circa 350 bp della regione a monte, contenente mutazioni sito-specifiche dei due motivi. Questi sono stati mutati sia singolarmente, sia in combinazione, e i vari costrutti sono stati clonati in pFL39. Gli episomi sono stati usati per la trasformazione del ceppo YM4585 Δ *SNR64*, decto per *SNR64*. Il livello di trascrizione nei diversi ceppi è stato valutato mediante Northern blot con una sonda specifica per snR64 e una per U3, usato come standard interno. Gli esperimenti sono stati ripetuti su due cloni indipendenti per i mutanti singoli e su quattro cloni per i mutanti doppi.



Come si osserva dal grafico (fig. 42, pannello C), la quantità di trascritto snR64 prodotto nei mutanti singoli è molto ridotta se confrontata con quella del "wt". Tra i due, gli effetti maggiori si osservano nel mutante del tratto poli(dA:dT) che sembra influire maggiormente sulla trascrizione del gene (~ 8% di trascritto residuo in confronto al 15% di trascritto prodotto nel mutante di Tbf1). La mutazione di entrambi i siti, invece, non comporta grandi variazioni rispetto alla singola mutazione dell'elemento poli(dA:dT) e suggerisce che, anche per snR64, non vi sia sinergia tra questi due motivi del promotore.

I dati di Northern blot indicano dunque che entrambi i siti, in modo indipendente l'uno dall'altro, sono richiesti per un'efficiente trascrizione del gene.

Analisi della regione a monte di *SNR5* e *SNR65*

- *SNR5* codifica per lo snoRNA H/ACA box snR5 che guida la pseudouridialzione della subunità maggiore (LSU) dell'rRNA nelle posizioni U1004 e U1124. Il gene è localizzato sul cromosoma XV e trascritto in direzione opposta al gene *SNR31*, codificante per lo snoRNA H/ACA box snR31. La regione a monte di *SNR5* è caratterizzata dalla presenza di una TATA box, localizzata a 70 bp dal primo codone dello snoRNA, da un elemento RRPE, situato in posizione -108 e da un sito di legame per Tbf1 localizzato a -136. Data la sua posizione e da osservazioni fatte in precedenza nel nostro laboratorio, sembra che il sito di legame per Tbf1 sia riferito per lo più al gene *SNR5*.

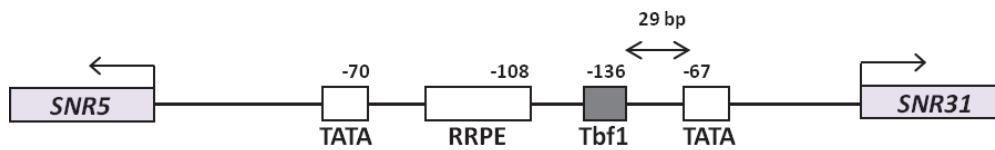


Figura 43 Schema riassuntivo degli elementi identificati nella regione intergenica tra i loci *SNR5* e *SNR31*, le posizioni di tutti gli elementi sono indicate rispetto al primo codone di *SNR5*, ad eccezione della TATA box prossimale a *SNR31*, la cui posizione è relativa al gene *SNR31*.

- *SNR65* è localizzato sul cromosoma III e codifica per lo snoRNA C/D box snR65 che guida la 2'-O-metilazione della subunità maggiore (LSU) dell'rRNA in posizione U2347. Nel promotore del gene sono presenti una TATA box, in posizione -59 rispetto alla prima base del costrutto maturo, un tratto poli(dA:dT) a 15 bp a monte della TATA box e un sito di legame per Tbf1, a 67 bp dalla TATA box.

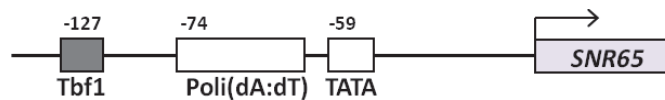


Figura 44 Schema riassuntivo degli elementi identificati nella regione a monte di *SNR65*. Il sito di inizio della trascrizione non è noto con precisione, pertanto, le posizioni dei diversi elementi sono indicate rispetto al primo nucleotide dello snoRNA maturo.

Nello studio di *SNR5* e *SNR65*, abbiamo analizzato esclusivamente il ruolo del sito di legame per Tbf1 e, per ciascuna delle due unità trascrizionali, sono stati preparati due costrutti episomici in pFL39, contenenti, rispettivamente, un frammento con la regione codificante e il promotore “wt” e uno avente la regione codificante “wt” ma il promotore mutato nel sito di legame per Tbf1. I plasmidi ricombinati sono stati quindi trasformati nei rispettivi ceppi deleti (YM4585 Δ SNR5 e YM4585 Δ SNR65) (Lowe and Eddy, 1999) e i livelli di RNA in ciascun ceppo sono stati analizzati mediante PCR quantitativa (RealTimeqPCR) con coppie di primers specifici per gli RNA analizzati e una coppia di primers per *ADH1*, usato come standard interno.

Come si evince dai due grafici in figura 45, la mutazione del sito Tbf1 a monte di SNR5 e SNR65 comporta, in entrambi i casi, la riduzione della quantità di trascritto a circa 50% rispetto al livello monitorato nel rispettivo “wt”.

Pertanto, anche per questi due snoRNA, il sito di legame della proteina è richiesto per l’attività trascrizionale del gene e per il raggiungimento dei massimi livelli di espressione.

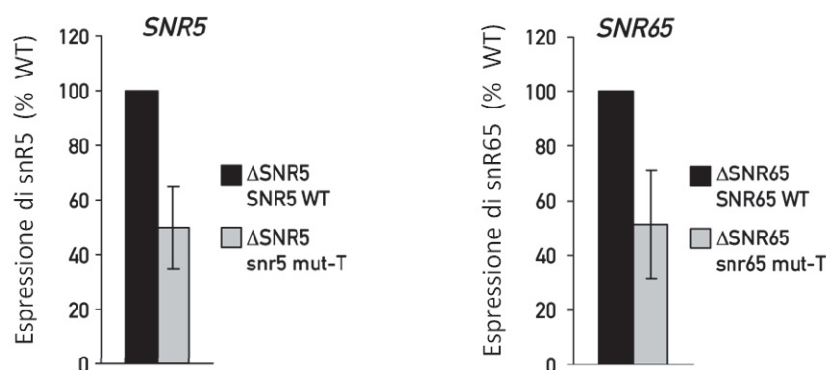


Figura 45 A sinistra: analisi dei livelli di espressione di SNR5 nel ceppo Δ SNR5 trasformato rispettivamente con un costrutto contenente il gene e il promotore “wt” (nero) e uno contenente il gene “wt” ma il promotore mutato nel sito di legame per Tbf1 (grigio). I valori dei mutanti sono espressi come percentuale del “wt” e le barre di errore sono l’errore standard calcolato su due esperimenti indipendenti. A destra: analisi dei livelli di espressione di SNR65 nel ceppo Δ SNR65 trasformato rispettivamente con un costrutto contenente il gene e il promotore “wt” (nero) e uno contenente il gene “wt” ma il promotore mutato nel sito di legame per Tbf1 (grigio). I valori dei mutanti sono espressi come percentuale del “wt” e le barre di errore sono l’errore standard calcolato su due esperimenti indipendenti. Adattata da (Preti et al., 2010).

Tbf1 e la posizione dei nucleosomi nei promotori

Gli esperimenti di mutagenesi condotti nei promotori di *SNR32*, *SNR64*, *SNR5* e *SNR65*, confermano la nostra ipotesi sul possibile ruolo di Tbf1 nella regolazione trascrizionale dei geni per snoRNA in *S. cerevisiae*. Infatti, i dati raccolti sui quattro promotori indicano che la presenza di un sito Tbf1 intatto è necessaria per garantire la trascrizione ottimale del gene. Anche se il suo contributo come attivatore varia a seconda dei casi considerati, in media, si osserva che Tbf1 è responsabile almeno per il 50% dell'attivazione genica.

Ma quale potrebbe essere il suo meccanismo d'azione? In letteratura è riportato che in *S. cerevisiae* Tbf1 è presente, in associazione con Reb1, nelle regioni subtelomeriche. In questa posizione, le due proteine possono agire come fattori di "boundary" che contribuiscono a delimitare le regioni telomeriche, così da mantenere separati domini del cromosoma aventi una diversa organizzazione della cromatina (Fourel et al., 2001; Fourel et al., 2002). Inoltre, lo studio compiuto da Badis e collaboratori (Badis et al., 2008) su *tbf1-ts*, un mutante termo-sensibile di Tbf1, indica che, in condizioni di crescita a temperatura non permissiva, si ha variazione della posizione dei nucleosomi su scala genomica. Pertanto, è possibile ipotizzare che il ruolo di Tbf1 ai promotori snoRNA sia connesso con l'organizzazione della cromatina e il posizionamento dei nucleosomi in questi loci. Andando a confrontare la posizione di Tbf1 nei promotori snoRNA, associati *in vivo* alla proteina, con la posizione dei nucleosomi, ricavata da due differenti mappe di posizionamento dei nucleosomi su scala genomica (Kaplan et al., 2009; Lee et al., 2007), si osserva che Tbf1 è posizionata al bordo del nucleosoma -1, posto tra -300bp e -150bp dal sito di inizio della trascrizione, e delimita al 5' la regione libera di nucleosomi a monte dei geni (5'NFR) (figura 46).

Data la sua posizione abbiamo ipotizzato che Tbf1 potrebbe essere coinvolta nel posizionamento del nucleosoma -1 e potrebbe servire a impedirgli di invadere la 5'NFR, favorendo la trascrizione in modo indiretto. In questo contesto, la rimozione di un sito di riconoscimento di Tbf1, e il conseguente mancato legame della proteina, potrebbe comportare l'occupazione della 5'NFR da parte del nucleosoma e, quindi, una minore accessibilità del promotore ai fattori di trascrizione e al complesso di pre-inizio.

Dati estratti da:

Kaplan *et al.* (2009) *Nature* 458:362

Lee *et al.* (2007) *Nat Genet* 39:1235

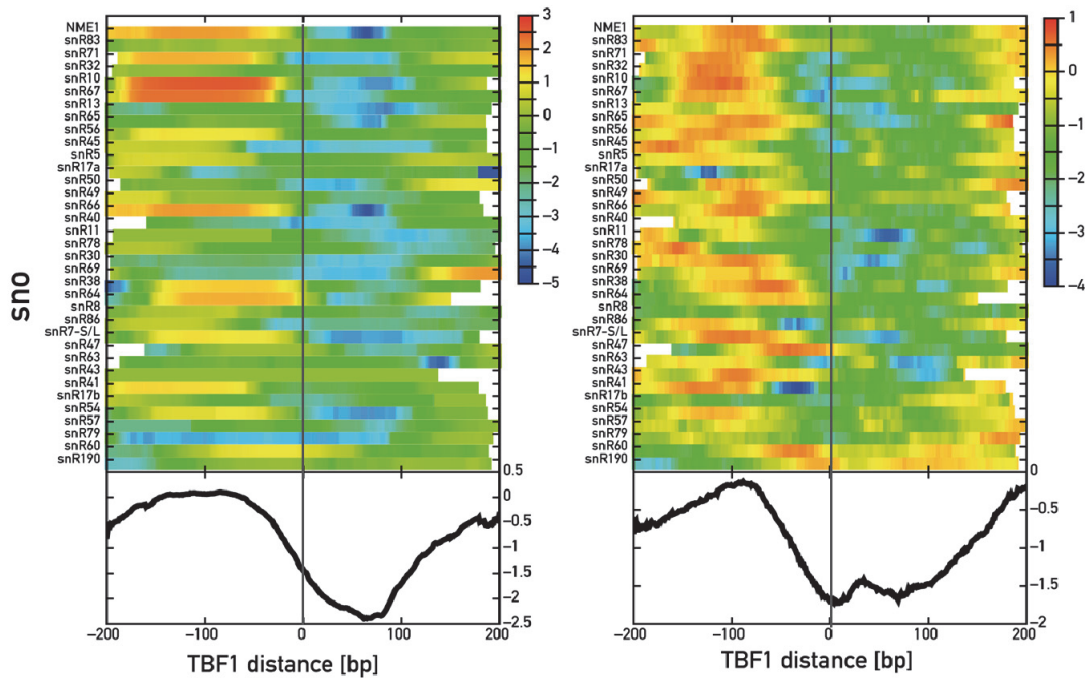


Figura 46 HeatMap rappresentanti i livelli di occupazione dei nucleosomi nei promotori dei geni per snoRNA associati *in vivo* a Tbf1. La posizione indicata come 0 sull'ascissa corrisponde alla posizione del sito Tbf1 nel promotori. Tutti i promotori sono indicati nel medesimo orientamento. Le mappe di posizione dei nucleosomi sono state ricavate dai dati di due lavori differenti: sulla sinistra i dati di Kaplan *et al.*, 2009; sulla destra quelli di Lee *et al.*, 2007. Adattata da (Preti *et al.*, 2010).

Per saggiare questa ipotesi, abbiamo creato due mutanti genomici recanti mutazioni sito-specifiche del sito di legame per Tbf1 a monte dei due geni snoRNA *SNR32* e *SNR64*, in modo da poter andare a valutare la posizione dei nucleosomi a monte del gene.

I mutanti genomici (*snr32* mut-T e *snr64* mut-T) sono stati creati con la stessa modalità utilizzata per ottenere i mutanti usati nello studio sulla regolazione trascrizionale dei geni *ribi* (pag. 41-42); i due mutanti sono stati realizzati all'interno di un ceppo Tbf1_13xMyc, in cui la proteina è etichettata al C- terminale con l'epitopo 13x Myc e le mutazioni sono le medesime di quelle introdotte nei costrutti episomici.

Inizialmente, i due mutanti sono stati testati mediante ChIP seguita da PCR quantitativa in modo da verificare l'efficacia delle mutazioni introdotte nell'abolire il legame della proteina. Come si evince dai grafici di arricchimento in figura 47, in entrambi i mutanti si osserva la mancata associazione di Tbf1 nel promotore del gene mutato, ma non in quello di un gene di controllo avente, nel promotore, un sito Tbf1 intatto.

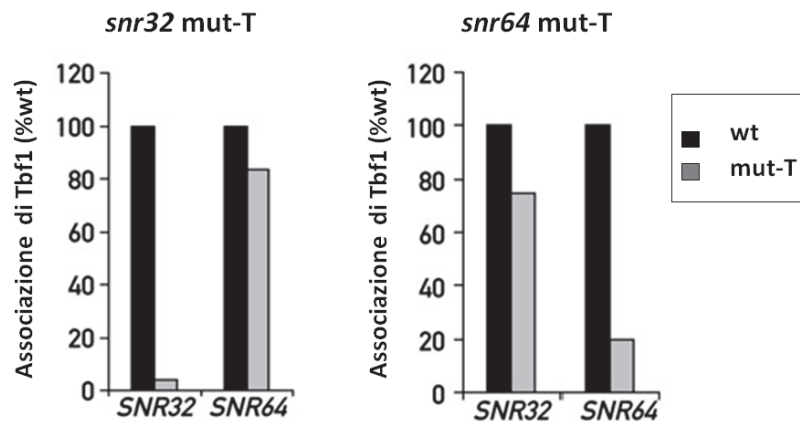


Figura 47 Associazione di Tbf1 ai promotori di *SNR32* e *SNR64* nei due mutanti *snr32 mut-T* (grafico a sinistra) e *snr64 mut-T* (grafico a destra). I valori di arricchimento sono stati calcolati come percentuale del rispettivo "wt". Per *snr32 mut-T* l'associazione di Tbf1 a monte di *SNR64* è usato come controllo positivo; viceversa, per *snr64 mut-T*, l'associazione di Tbf1 a monte di *SNR32* è usato come controllo. Adattata da (Preti et al., 2010).

Nei medesimi ceppi si è anche proceduto all'estrazione degli RNA in modo da valutare mediante RT-qPCR l'effetto del mancato legame della proteina sull'espressione del gene. In questo caso, l'esperimento è stato ripetuto in triplo e i valori sono stati normalizzati rispetto allo standard interno *ADH1*.

Come evidenziato in figura 48, in entrambi i ceppi si osserva che il mancato legame della proteina comporta un calo della trascrizione rispetto al ceppo "wt", specifico per il gene mutato; infatti, tale riduzione non si osserva nei due controlli introdotti per ciascun ceppo (che hanno nel promotore un sito di legame per Tbf1 "wt").

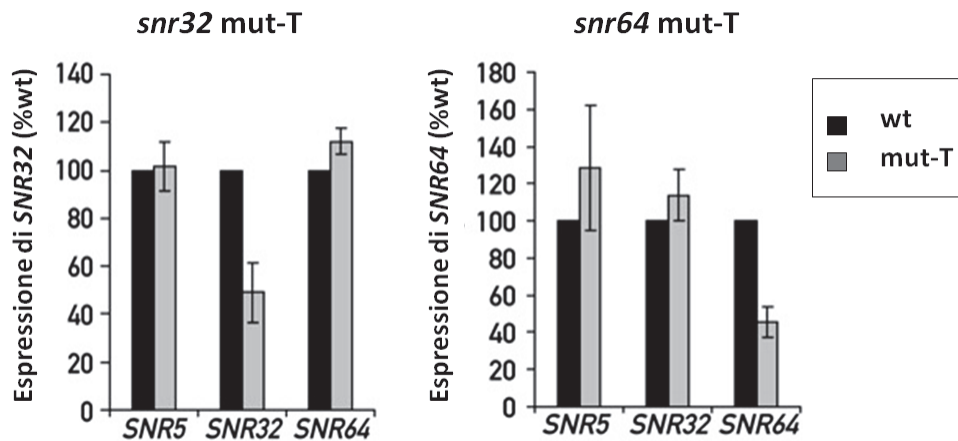


Figura 48 Espressione di *SNR5*, *SNR32*, *SNR64* nei mutanti *snr32 mut-T* (a sinistra) e *snr64 mut-T* (a destra). I valori di espressione sono stati normalizzati con lo standard interno *ADH1* ed espressi come percentuale del valore rispettivo nel ceppo “wt” (100). Le barre di errore sono l’errore standard calcolato su tre esperimenti indipendenti. In ciascun ceppo è mostrata l’espressione del gene in esame e di due controlli positivi (*snR5* e *snR64* per *snr32 mut-T* e *snR5* e *snR32* per *snr64 mut-T*). Adattata da (Preti et al., 2010).

A questo punto siamo andati a valutare la posizione dei nucleosomi nel promotore di *SNR32* e *SNR64*, nel ceppo “wt” e nei mutanti *snr32 mut-T* e *snr64 mut-T*, come descritto in (Lam et al., 2008). In breve, si procede all’estrazione della cromatina e alla sua digestione con DNasi da micrococco, che taglia il DNA non protetto da nucleosomi in modo non specifico e permette così di ottenere DNA mononucleosomale. Quest’ultimo, recuperato da gel e purificato, viene poi usato come template in reazioni di “nested-qPCR” con coppie di primers specifici che si sovrappongono, in modo da mappare l’intera regione che si vuole analizzare. In parallelo, viene analizzata anche la cromatina estratta dai medesimi ceppi ma non trattata con DNasi, che serve come controllo, per normalizzare i dati di ciascun ceppo. Se una regione è coperta da nucleosomi, non sarà digerita dall’enzima e quindi si potrà ottenere un amplicone; viceversa, una regione non associata a un nucleosoma verrà digerita e pertanto, in corrispondenza di quella zona, non si avrà alcuna amplificazione. Dunque, se la posizione dei nucleosomi è diversa nel ceppo “wt” e nel mutante, la DNasi taglierà la cromatina in punti differenti e ci saranno due diversi profili di PCR.

In totale sono state usati 16 coppie di primers che permettono di ottenere ampliconi di 102 ± 2 bp che si sovrappongono e sono centrati ogni 25-30bp (risoluzione della mappatura).

Come mostrato in figura 49, per entrambi i loci del genoma, il profilo dei nucleosomi, nelle 500 bp a monte del sito di inizio della trascrizione, nel ceppo “wt” è identico a quello del ceppo mutante.

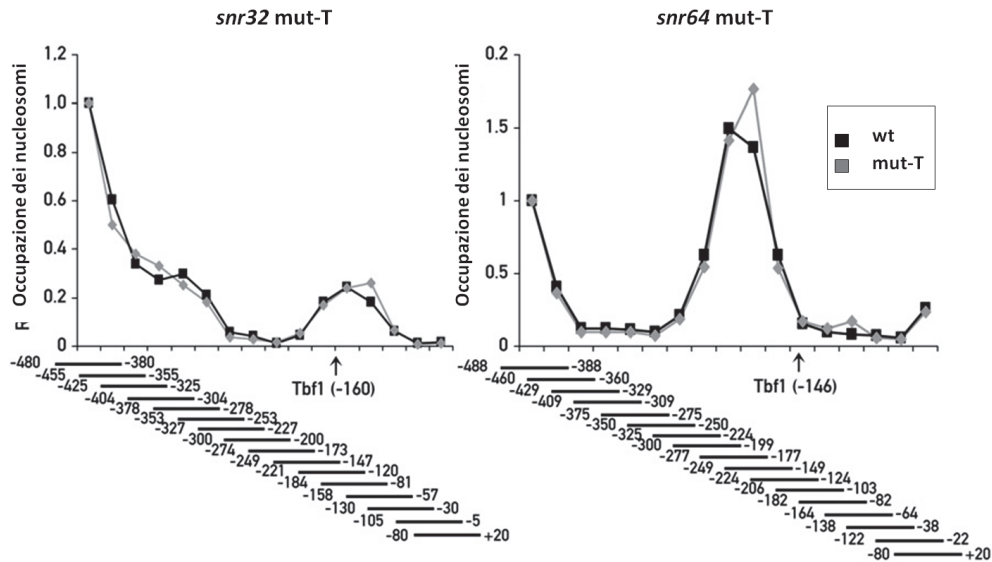


Figura 49 Profilo di disposizione dei nucleosomi nei mutanti *snr32* mut-T (a sinistra) e *snr64* mut-T (a destra). In ogni pannello sono indicati i profili del “wt” (nero) e del mutante (grigio); tutti i valori sono stati normalizzati rispetto al rispettivo DNA genomico non digerito con DNasi. I valori sono relativi al segnale della prima coppia di primers (=1). È inoltre indicata la posizione del sito Tbf1 in ciascun promotore e le coppie di primers usate per mappare la regione (~500 bp). In totale sono state usate con 16 coppie di primers che permettono di amplificare frammenti di 102 ± 2 bp centrati ogni 25-30bp. Adattata da (Preti et al., 2010).

Pertanto, in questi due promotori Tbf1 non è coinvolta nel posizionamento del nucleosoma -1 dal momento che il suo mancato legame non influisce sulla sua localizzazione.

Per confermare questi risultati, abbiamo analizzato i dati di posizionamento dei nucleosomi su scala genomica del mutante termo-sensibile di Tbf1, *tbf1_ts*, pubblicati come materiale supplementare del lavoro di Badis e collaboratori (Badis et al., 2008). Come si evince dal grafico A in figura 50, nei promotori snoRNA, il picco associato a Tbf1 è localizzato a circa 50 bp dal centro della 5’NFR e il profilo medio dei nucleosomi (in una regione di 1.6 kb attorno al sito di legame di Tbf1) del ceppo mutante dopo 3 h a temperatura non permissiva (in figura indicato in arancione) è analogo a quello del “wt” (segnale verde).

Effettuando la medesima analisi sui geni non-snoRNA associati a Tbf1 si osserva, invece, che il picco di associazione di Tbf1 è posizionato al centro della 5'NFR e che l'inattivazione di Tbf1 comporta un aumento della densità di nucleosomi in quella regione.

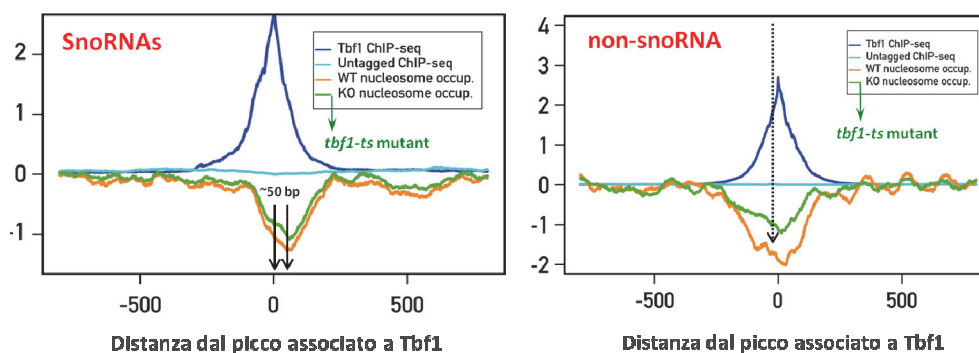


Figura 50 Analisi dei dati di posizionamento dei nucleosomi in un ceppo “wt” e nel mutante *tbf1-ts* ai promotori snoRNA associati a Tbf1 (pannello A) e ai promotori non-snoRNA associati a Tbf1 (pannello B). In ogni pannello, è indicata una regione di 1.6 kb centrata rispetto al sito di associazione di Tbf1. Il segnale blu corrisponde alla distribuzione media del picco di associazione di Tbf1 ai promotori; il segnale in arancione indica la distribuzione dei nucleosomi nel ceppo “wt” mentre quello verde è la distribuzione dei nucleosomi nel ceppo mutante. Adattata da (Preti et al., 2010). Dati estratti da (Badis et al., 2008).

I dati sperimentali sui mutanti di *SNR32* e *SNR64* e l’analisi dei dati estratti dal lavoro di Badis indicano che ai promotori dei geni per snoRNA Tbf1 non agisce sul posizionamento dei nucleosomi e suggeriscono che la proteina possa favorire la trascrizione del gene attraverso un meccanismo più diretto, tuttora sconosciuto. Nei promotori non-sno, invece, sembra che Tbf1 possa agire in modo differente e che la proteina sia coinvolta nell’organizzazione della cromatina a livello del promotore.

Queste differenze potrebbero essere legate anche alla diversa struttura dei due tipi di promotore; infatti, come indicato in precedenza, mentre nella regione a monte dei geni per snoRNA è presente un solo sito di legame per Tbf1 e una forte associazione con la TATA box, nei promotori non snoRNA, sono presenti solitamente due siti di legame per la proteina e non vi è associazione con la TATA.

Questo potrebbe però anche essere dovuto all’interazione con ulteriori fattori che potrebbero spiegare le differenze osservate.

Possibili Interattori

Nel database di interazioni proteiche Biogrid sono riportate 33 possibili interattori di Tbf1. I primi due sono Vid22, riportata in SGD come proteina di membrana glicosilata localizzata nella membrana plasmatica, e Ygr071c, proteina poco conosciuta che sembra coinvolta nelle funzioni del vacuolo. Entrambi questi interattori sono caratterizzati dalla presenza di un dominio di legame al DNA di tipo “BED-type Zinc finger”, pertanto abbiamo ipotizzato che potessero realmente interagire con Tbf1 ai promotori. L’ipotesi è stata testata da Cyril Ribeyre, del gruppo di David Shore, mediante un esperimento di ChIP seguito da PCR quantitativa, effettuato sui ceppi Vid22-13xMyc e Ygr071c-13xMyc. Le cromatine sono state testate con coppie di primers specifiche per alcuni promotori snoRNA e non-sno associati a Tbf1.

Come si evince dal grafico in figura 51, Vid22 e Ygr071c co-localizzano con Tbf1 ma solo nei promotori non-sno; infatti, nei promotori snoRNA non si alcuna associazione di queste proteine come indicato dal fatto che il valore di arricchimento di Vid22 e Ygr071c è pari a quello rilevato per il gene MEI4, che non è un target di Tbf1.

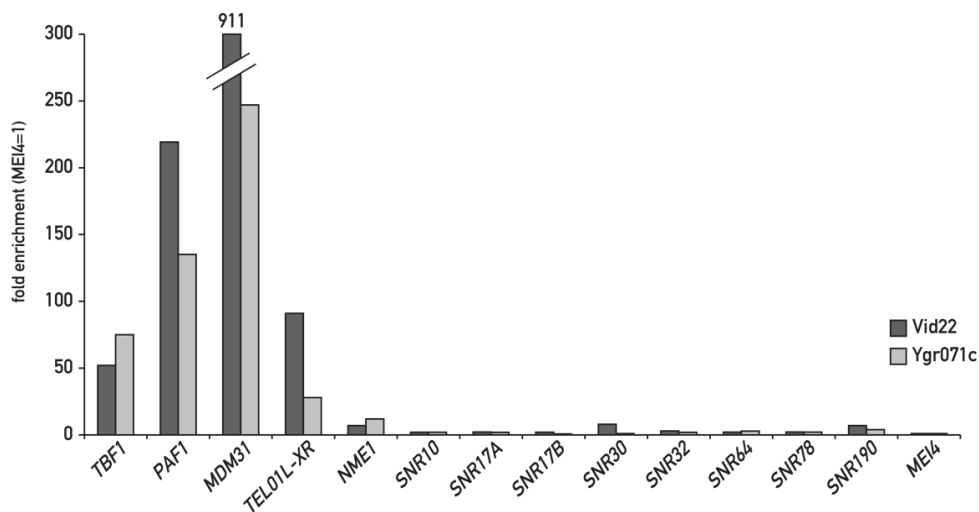


Figura 51 Associazione di Vid22 (grigio scuro) e Ygr071c (grigio chiaro) a promotori per geni non-sno e per geni snoRNA che sono associati a Tbf1. I valori di arricchimento sono calcolati in rapporto all’arricchimento nel gene MEI4, il cui promotore non è legato da Tbf1, arbitrariamente impostato a 1. Adattata da (Preti et al., 2010).

Conclusioni

Lo studio condotto nel nostro laboratorio in collaborazione con il gruppo di David Shore, ci ha permesso di definire la struttura tipica dei promotori dei geni per snoRNA indipendenti in *S. cerevisiae*. Tali promotori sono caratterizzati dalla presenza di una TATA box, un tratto poli(dA:dT), un sito di legame per Reb1 e un sito di legame per Tbf1 che, dopo la TATA box, è l'elemento più frequente. Inoltre, circa il 26% dei promotori contiene un motivo RRPE.

Gli esperimenti di mutagenesi nei promotori dei geni per *SNR32*, *SNR64*, *SNR5* e *SNR65*, indicano che, in generale, gli elementi conservati sono richiesti per un'efficiente espressione del gene. In particolare, la mutagenesi nel promotore di *SNR32* dimostra che il sito di legame per Tbf1, quello per Reb1 e l'elemento poli(dA:dT) sono richiesti per la funzionalità del promotore. Tra di essi il tratto poli(dA:dT) è il più importante e coopera con Reb1; il sito Tbf1, invece, ha un ruolo più ridotto e non agisce in sinergia con gli altri elementi. L'analisi del promotore di *SNR64* indica che sia l'elemento poli(dA:dT), sia il sito Tbf1, sono necessari per l'efficiente trascrizione del gene. Anche in questo caso, l'elemento più importante tra i due è il tratto poli(dA:dT) e non sembra esserci cooperatività tra i due motivi. Infine, l'esame dei livelli di espressione di *SNR5* e *SNR65* rivela che Tbf1 è richiesto per l'attività trascrizionale e per il raggiungimento dei massimi livelli di espressione di questi geni.

Nel loro insieme i dati confermano il ruolo di Tbf1 nella regolazione trascrizionale dei loci per snoRNA pur indicando che esso non è richiesto per la trascrizione basale.

Gli esperimenti di mappatura dei nucleosomi sui mutanti genomici di *SNR32* e *SNR64* e l'analisi dei dati estratti dal lavoro di Badis (Badis et al., 2008) dimostrano che Tbf1 è posizionata al confine della 5'NFR, al bordo del nucleosoma -1, ma non agisce sul posizionamento dei nucleosomi nel promotore dei geni per snoRNA. Invece, Tbf1 è coinvolta nell'organizzazione della cromatina degli altri promotori a cui si associa, quelli non-sno, nei quali co-localizza con le proteine Vid22 e Ygr071c.

Questi dati denotano il carattere multifunzionale di Tbf1 che, come gli altri fattori generali di regolazione, sembra poter agire in differenti modi nei vari loci cui si associa.

In particolare, nei promotori dei geni per snoRNA, Tbf1 sembra poter attivare la trascrizione attraverso un meccanismo diretto, sebbene quest'ultimo non sia ancora stato definito.

Infine, Tbf1 potrebbe anche servire a coordinare la trascrizione dei geni per snoRNA con le altre unità trascrizionali coinvolte nella biogenesi dei ribosomi; infatti, come detto in precedenza, i GRFs sono presenti a monte di tutti i geni che sono coinvolti in questo processo. Questa possibilità è suggerita anche dall'osservazione che Tbf1 è il secondo elemento più frequente nel promotore dei geni per snoRNA ma non è richiesto per la trascrizione basale bensì per la fine regolazione dei livelli di espressione. Un'ulteriore indicazione della possibile coregolazione con altre unità trascrizionali è la presenza, in certi promotori dei geni per snoRNA, di PAC e RRPE che, come noto, sono elementi *cis*-regolativi caratteristici dei promotori *ribi*.

Infine, il coinvolgimento di Tbf1 nella trascrizione dei geni per snoRNA in *S. cerevisiae* è interessante per il fatto che lo stesso regolatore trascrizionale in *Candida albicans* è coinvolto nella regolazione dei geni per le proteine ribosomiali, ruolo che in *S. cerevisiae* è invece svolto da Rap1. Il caso di Tbf1 è quindi un esempio della notevole flessibilità dei network di regolazione trascrizionale. Infatti, dal confronto tra *S. cerevisiae* e *C. albicans* emerge come nonostante il mantenimento della struttura generale dell'organizzazione trascrizionale di alcuni gruppi di geni (ad esempio i geni coinvolti nella biogenesi dei ribosomi o quelli implicati nella via glicolitica) si è verificata, nel corso dell'evoluzione, una completa riorganizzazione degli elementi *cis*- e *trans*-regolativi coinvolti (Lavoie et al., 2010). I fattori generali di regolazione sono i medesimi ma il numero e il tipo di geni controllati da ciascuno di essi, la loro posizione all'interno del network di regolazione, e la loro specificità di legame al DNA sono stati totalmente riorganizzati.

Materiali e Metodi

1. Ceppi utilizzati e plasmidi

Per le analisi di espressione dei geni *SNR32*, *SNR64*, *SNR5* e *SNR65* e per la creazione dei mutanti genomici dei geni *SNR32* e *SNR64*, sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Ceppo	Genotipo	Riferimento
YS670	<i>ade2-101, trp1-901, ura3-52, leu2-3,112, his3, SNR32::HIS3</i>	(Balakin et al., 1993)
YM4585 (Δ SNR64)	<i>Mat a, his3 Δ200, ura3-52, leu2-3,112, trp1-901, tyr1-501, URA3+, ADE+, CAN^S, SNR64::HIS3</i>	(Lowe and Eddy, 1999)
BP28(Δ SNR5)	<i>MAT a, ura3, lys2, ade2, trp1, his3, leu2, snr5::URA3</i>	(Fernandez et al., 2004)
YM4585 (Δ SNR65)	<i>Mat a, his3 Δ200, ura3-52, leu2-3,112, trp1-901, tyr1-501, URA3+, ADE+, CAN^S, SNR65::HIS3</i>	(Lowe and Eddy, 1999)
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
<i>TBF1-13xMyc</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-13xMyc::HIS3</i>	Questo studio
<i>SNR32 mutT</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-13xMyc::HIS3</i>	Questo studio
<i>SNR64 mutT</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBF1-13xMyc::HIS3</i>	Questo studio

Il plasmide utilizzato è pFL39, un plasmide centromerico derivato da pUC19. pFL39 è lungo 4354 bp e possiede il gene *Amp^r* come marcatore di selezione in batterio e il gene *TRP1* come marcatore di auxotrofia in lievito.

2. Realizzazione dei costrutti mutanti in pFL39

2.1 Amplificazione delle sequenze

I mutanti per lo studio del gene *SNR32*, *SNR64*, *SNR5*, *SNR65* *SNR32* sono stati preparati mediante PCR, secondo il metodo della “overlap extension” (vedere pag.83). Per tutte le reazioni di amplificazione delle porzioni “upstream” e “downstream” è stato adottato il medesimo protocollo, cambiando di volta in volta i primers e il DNA template. Le reazioni di amplificazione sono state allestite in 25 μ l finali ed è stato usato l’enzima Pfu DNA polimerasi (Promega) con il seguente mix di reazione: 1X Pfu Buffer (Promega), 0.3 mM dNTPs, 0.4 μ M primer forward, 0.4 μ M primer reverse, 0.2 ng/ μ l DNA plasmidico o 50 ng di DNA genomico, 0.03 U/ μ l Pfu DNA polimerasi (Promega).

Il programma utilizzato per amplificare le cassette di *SNR32* è: 94° C 5', 30 cicli di 94° C 45''- 50° C 45''- 72° C 2'30'' e poi 72° C 5'.

Il programma utilizzato per amplificare le cassette di *SNR64*, *SNR5* e *SNR65* è: 94° C 5', 30 cicli di 94° C 45''- 52° C 45''- 72° C 2' e poi 72° C 5'.

In tabella sono indicati i templati utilizzati nelle singole reazioni.

Costrutto	DNA templato
<i>SNR32</i> mut-T Upstream	<i>SNR32</i> wt in pFL39
<i>SNR32</i> mut-T Downstream	<i>SNR32</i> wt in pFL39
<i>SNR32</i> mut-R Upstream	<i>SNR32</i> wt in pFL39
<i>SNR32</i> mut-R Downstream	<i>SNR32</i> wt in pFL39
<i>SNR32</i> mut-A Upstream	<i>SNR32</i> wt in pFL39
<i>SNR32</i> mut-A Downstream	<i>SNR32</i> wt in pFL39
<i>SNR32</i> mut- RT Upstream	<i>SNR32</i> mut-T in pFL39
<i>SNR32</i> mut- RT Downstream	<i>SNR32</i> mut-T in pFL39
<i>SNR32</i> mut- AT Upstream	<i>SNR32</i> mut-A in pFL39
<i>SNR32</i> mut- AT Downstream	<i>SNR32</i> mut-A in pFL39
<i>SNR32</i> mut- AR Upstream	<i>SNR32</i> mut-A in pFL39
<i>SNR32</i> mut- AR Downstream	<i>SNR32</i> mut-A in pFL39
<i>SNR32</i> mut-ATR Upstream	<i>SNR32</i> mut-AR in pFL39
<i>SNR32</i> mut-ATR Downstream	<i>SNR32</i> mut-AR in pFL39
<i>SNR64</i> mut-T Upstream	<i>SNR64</i> wt in pFL39
<i>SNR64</i> mut-T Downstream	<i>SNR64</i> wt in pFL39
<i>SNR64</i> mut-A Upstream	<i>SNR64</i> wt in pFL39
<i>SNR64</i> mut-A Downstream	<i>SNR64</i> wt in pFL39
<i>SNR64</i> mut-AT Upstream	<i>SNR64</i> mut-T in pFL39
<i>SNR64</i> mut-AT Downstream	<i>SNR64</i> mut-T in pFL39
<i>SNR5</i> mut-T Upstream	DNA genomico di lievito
<i>SNR5</i> mut-T Downstream	DNA genomico di lievito
<i>SNR65</i> mut-T Upstream	DNA genomico di lievito
<i>SNR65</i> mut-T Downstream	DNA genomico di lievito

In tabella sono indicati i primers utilizzati nelle singole reazioni.

Costrutto	Nome Primer	Sequenza Primer
<i>SNR32</i> mut-T Upstream	<i>SNR32</i> _FW	CCTATCCATACCCGTTTCTAGACG
	<i>SNR32</i> mut-Tbf1(rev)	CCTACACTTGTTACTGTTCCCGCTTACCCT
<i>SNR32</i> mut-T Downstream	<i>SNR32</i> mut-Tbf1(fw)	CTTATTTTCGTGCTAGACAGACAACGGAACCC
	<i>SNR32</i> _REV	TAACTTTTTGTAAATTTTGC
<i>SNR32</i> mut-R Upstream	<i>SNR32</i> _FW	CCTATCCATACCCGTTTCTAGACG
	<i>SNR32</i> mut-Reb1(Rev)	TTTTTCCCGCTGACATTGGTGATTGATTTTTG
<i>SNR32</i> mut-R Downstream	<i>SNR32</i> mut-Reb1(fw)	CAAAAAATCAATCACCAATGTCAGCGGAAAAA
	<i>SNR32</i> _REV	TAACTTTTTGTAAATTTTGC
<i>SNR32</i> mut-A Upstream	<i>SNR32</i> _FW	CCTATCCATACCCGTTTCTAGACG
	<i>SNR32</i> mut-A ₁₁ (rev)	CCTACACTTGTTACTGTTCCCGCTTACCCT
<i>SNR32</i> mut-A Downstream	<i>SNR32</i> mut-A ₁₁ (fw)	AGGGTAAGCGGGAACAGTAACAAGGTAGGAACCGCACTATAAA

	<i>SNR32_REV</i>	TTAACTTTTTGTAAATTTTGC
<i>SNR32</i> mut- RT Upstream	<i>SNR32_FW</i>	CCTATCCATACCCGTTTCTAGACG
	<i>SNR32</i> mut-Reb1(Rev)	TTTTTCCCCTGACATTGGTGATTGATTTTTTG
<i>SNR32</i> mut- RT Downstream	<i>SNR32</i> mut-Reb1(fw)	CAAAAAATCAATCACCAATGTCAGCGGAAAAAA
	<i>SNR32_REV</i>	TTAACTTTTTGTAAATTTTGC
<i>SNR32</i> mut- AR Upstream	<i>SNR32_FW</i>	CCTATCCATACCCGTTTCTAGACG
	<i>SNR32</i> mut-A ₁₁ Reb1 (Rev)	CTGTTCCCCTGACATTGGTGATTGATTTTTTG
<i>SNR32</i> mut- AR Downstream	<i>SNR32</i> mut- A ₁₁ Reb1 (fw)	CAAAAAATCAATCACCAATGTCAGCGGGAACAG
	<i>SNR32_REV</i>	TTAACTTTTTGTAAATTTTGC
<i>SNR32</i> mut-ATR Upstream	<i>SNR32_FW</i>	CCTATCCATACCCGTTTCTAGACG
	<i>SNR32</i> mut-Tbf1(rev)	CCTACACTTGTACTGTTCCCGCTTACCCT
<i>SNR32</i> mut-ATR Downstream	<i>SNR32</i> mut-Tbf1(fw)	CTATTTTCGTGCTAGACAGACAACGGAACCC
	<i>SNR32_REV</i>	TTAACTTTTTGTAAATTTTGC
<i>SNR64</i> mut- T Upstream	<i>SNR64_FW</i>	TTCAATGATTACTACAAGAGGC
	<i>SNR64</i> mut-Tbf1(Rev)	GAACTATTTCTGTTCTGTCTTAAAGAAAGCGC
<i>SNR64</i> mut- T Downstream	<i>SNR64</i> mut-Tbf1(fw)	GCGCTTTCTTAAAGACAGAACAGAAAATAGTTC
	<i>SNR64_REV</i>	TTGTTTGCTTATATCCAGCG
<i>SNR64</i> mut- A Upstream	<i>SNR64_FW</i>	TTCAATGATTACTACAAGAGGC
	<i>SNR64</i> mut- A ₁₁ (Rev)	GGAGTATTCGTTTCGTATTCTTCACTTGTCTTGCTT CTTATAGG
<i>SNR64</i> mut- A Downstream	<i>SNR64</i> mut- A ₁₁ (fw)	CCTATAAGAAGCAAGACAAGTGAAGAATACGAA CGAATACTCC
	<i>SNR64_REV</i>	TTGTTTGCTTATATCCAGCG
<i>SNR64</i> mut-AT Upstream	<i>SNR64_FW</i>	TTCAATGATTACTACAAGAGGC
	<i>SNR64</i> mut- A ₁₁ (Rev)	GGAGTATTCGTTTCGTATTCTTCACTTGTCTTGCTT CTTATAGG
<i>SNR64</i> mut-AT Downstream	<i>SNR64</i> mut- A ₁₁ (fw)	CCTATAAGAAGCAAGACAAGTGAAGAATACGAA CGAATACTCC
	<i>SNR64_REV</i>	TTGTTTGCTTATATCCAGCG
<i>SNR5</i> mut-T Upstream	<i>SNR5_FW</i> (+Hind III)	CCAGTAAGCTTTAAAGAAATTTAAATGTAGAACG
	<i>SNR5</i> mut-Tbf1(rev)	TCGCTTTATCTCTTCGACGTCTACTGTCCGGTAG
<i>SNR5</i> mut-T Downstream	<i>SNR5</i> mut-Tbf1(fw)	CTACCGACAGTAGGACGTGGAAGATAAAGCG A
	<i>SNR5_REV</i> (+ Sac I)	CCAGTGAGCTCCTAGACATCTCTGAGCAAGG
<i>SNR65</i> mut-T Upstream	<i>SNR65_FW</i> (+ BamHI)	AGGATGGATCCATAATCATATACAAATATCACC
	<i>SNR65_REV</i> (EcoRI)	AGGATGAATTCTGTATTGTACTTGTATTGCCG
<i>SNR65</i> mut-T Downstream	<i>SNR65</i> mut-Tbf1(fw)	TTACTCCCCACTCACGTGGAAGCAATGTTCAAAT AG
	<i>SNR65</i> mut-Tbf1(rev)	CTATTTTGAACATTGCTTCGACGTGAGTGGGGAG TAA

I singoli ampliconi prodotti, separati mediante elettroforesi su gel di Agarosio 1%, sono stati eluiti da gel con il Kit NucleoSpin Extract® II (MN) e usati come template nelle PCR di fusione.

Le quantità dei due frammenti sono state calcolate tenendo conto delle rispettive dimensioni e facendo in modo che fossero presenti in rapporto equimolare, considerando

che sono stati usati sempre 5ng di cassetta upstream. In ogni PCR i primers considerati sono stati i due primers esterni usati per la creazione delle cassette upstream e downstream.

Le reazioni di amplificazione sono state allestite in 25 µl finali ed è stato usato l'enzima Pfu DNA polimerasi (Promega) con il seguente mix di reazione: 1X Pfu Buffer (Promega), 0.3 mM dNTPs, 0.4 µM primer forward, 0.4 µM primer reverse, 5 ng di cassetta upstream e quantità equimolare di cassetta downstream, 0.03 U/µl Pfu DNA polimerasi (Promega).

Il programma utilizzato per amplificare tutte le cassette è: 94° C 5', 30 cicli di 94° C 45'' - 50° C 45'' - 72° C 2'30'' e poi 72° C 5'.

Tutte le reazioni di PCR di fusione sono state interamente caricate su gel di agarosio 1% e gli ampliconi di taglia corretta sono stati eluiti da gel.

2.2 Clonaggio in pFL39

I costrutti completi contenenti mutazioni sito-specifiche a livello dei siti da analizzare sono stati clonati in pFL39 secondo il metodo descritto in (Bolchi et al., 2005). Le reazioni sono state allestite in un volume finale di 10µl con il seguente mix di reazione: 1X Buffer 4 (NEB), 0.1 mg/ml BSA, 1mM ATP, 2.5 U Smal (NEB), 2.5 U T4 DNA Ligasi (USB), 3 ng/µl pFL39 wt, inserito in quantità tali da avere un eccesso molare di 30-40 volte rispetto al plasmide. La reazione è stata incubata a 25°C per 3h e poi interrotta scaldando a 65°C per 10'.

Le reazioni sono state precipitate e usate per trasformare cellule di *E. coli* (ceppo XL1b). I plasmidi sono quindi stati estratti dalle cellule con il metodo della lisi alcalina, analizzati mediante digestione analitica e i plasmidi ricombinanti sono poi stati sottoposti a sequenziamento. I cloni risultati come veri positivi sono stati ulteriormente amplificati in *E. coli*, estratti e purificati mediante Miniprep di DNA plasmidico con il kit QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN®).

3. Trasformazione chimica di lievito e analisi dei trasformanti

I plasmidi ricombinanti sono quindi stati usati per trasformare le cellule di lievito mediante una protocollo di trasformazione chimica analogo a quello illustrato in precedenza (pag.82). I ceppi mutanti YS670 ($\Delta SNR32$), YM4585 ($\Delta SNR64$), BP28 ($\Delta SNR5$), YM4585 ($\Delta SNR65$) sono stati trasformati con 2 μg di plasmide ricombinante e le cellule trasformate sono state selezionate mediante crescita su terreno minimo (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 1% agar) supplementato con opportuni aminoacidi.

4. Creazione dei mutanti genomici del promotore di *SNR32* e *SNR64*

I mutanti genomici del promotore dei geni *SNR32* e *SNR64* sono stati creati con la procedura di mutagenesi già descritta per la creazione dei mutanti genomici dei promotori dei geni *ribi* (vedere pag. 79).

La cassetta di delezione *SNR32::URA3* è stata preparata mediante una singola reazione di amplificazione del gene *Ura3* di *K.lactis*, clonato nel plasmide pUG72, con la seguente coppia di primers:

- *SNR32::URA3* fw (la parte in blu si appaia al gene URA3):

TTTTGTTATAATCAAATTCCTTTTGGTTTTGTTTTAAAAAGGCCAGAGCTCGTTTTATTAGG

- *SNR32::URA3* rev (la parte in blu si appaia al gene URA3):

CTAAAGTACGTTACTAAGAACCAGTAAAAATAAATATGTATAAATGATCCCAATACAACAGATC

La reazione di amplificazione è stata allestita in 20 μl finali ed è stato usato l'enzima Phusion DNA Pol (Finnzyme) con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μM primer forward, 0.5 μM primer reverse, 0.25 ng/ μl DNA templato pUG72, 0.05 U/ μl Phusion DNA Pol (Finnzyme).

Il programma dei cicli è il seguente: 98°C 40'', 30 cicli di 98°C 10''- 53°C 10'' - 72°C 45'' e poi 72°C 5'.

La reazione è stata ripetuta fino a ottenere 2 μg di cassetta.

Invece la cassetta di delezione *SNR64::URA3* è stata preparata mediante due reazioni di amplificazione successive, in modo da ottenere una cassetta di delezione avente una

porzione di omologia con il gene SNR64 più estesa. La prima reazione di amplificazione è stata eseguita usando come template il vettore pUG72, con la seguente coppia di primers:

- *SNR64::URA3_FW* (la parte in blu si appaia al gene URA3):
 CAAAATGTAGTTGTGTGTACGCATCTCAAAGAAGAAAGAAGAACAGAGCTCGTTTTATTAGG

- *SNR64::URA3 rev* (la parte in blu si appaia al gene URA3):
 CTAAAGTACGTTACTAAGAACCAGTAAAAATAAATATGTATAAATGATCCCAATACAACAGATC

La reazione di amplificazione è stata allestita in 20 µl finali ed è stato usato l'enzima Phusion DNA Pol (Finnzyme) con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer forward, 0.5 µM primer reverse, 0.25 ng/µl DNA template pUG72, 0.05 U/µl Phusion DNA Pol (Finnzyme).

Il programma dei cicli è il seguente: 98°C 40", 35 cicli di 98°C 10"- 53.5°C 10" - 72°C 45" e poi 72°C 5'.

Sono poi state create due cassette (*SNR64 Up.* e *SNR64 down.*) aventi una porzione 3' che si appaia alla cassetta *SNR64::URA3* e al 5' una regione che corrisponde al locus da distruggere. Le due cassette sono state ottenute mediante PCR con il seguente mix di reazione: 1X Buffer GoTaq (Promega), 0.2 mM dNTPs, 1µM primer forward, 1µM primer reverse, 0.2 ng/µl *SNR64 wt* in pFL39, 0.04 U/µl DNA Pol. Go Taq (Promega).

Il programma dei cicli è il seguente: 95°C 5', 30 cicli di 95°C 30"- 53°C 30" - 72°C 45" e poi 72°C 5'.

I primers usati sono indicati in tabella:

Amplicone	Nome Primer	Sequenza Primer
<i>SNR64 Up.</i>	<i>SNR64_FW</i>	TTCAATGATTACTACAAGAGGC
	<i>SNR64+89_REV</i>	CCACTCCTTGTTAAGCTATGATC
<i>SNR64 down</i>	<i>SNR64-190_FW</i>	CTT TGAGATGCGTAACAACAC
	<i>SNR64_REV</i>	TTGTTTGCTTATATCCAGCG

I tre ampliconi (*SNR64::URA3*, *SNR64 Up.* e *SNR64 down*) sono stati uniti in un amplicone unico (*SNR64::URA3 ++*) attraverso una reazione di PCR di fusione effettuata usando i tre ampliconi come template e i due primers esterni (*SNR64_FW* e *SNR64_REV*). La reazione è stata eseguita con il seguente mix di reazione: 1X Buffer GoTaq (Promega), 0.2 mM dNTPs, 1µM primer forward, 1µM primer reverse, 0.2 ng/µl di ciascun template, 0.04 U/µl DNA Pol. Go Taq (Promega).

Il programma dei cicli è il seguente: 95°C 5', 30 cicli di 95°C 30'' - 53°C 10'' - 72°C 2'30'' e poi 72°C 5'.

La reazione è stata ripetuta fino a ottenere 2 µg di cassetta.

Le due cassette *SNR32::URA3* e *SNR64::URA3++* sono state trasformate nel ceppo di lievito *TBF1-13xMyc* usando il protocollo descritto a pagina 82. I ceppi trasformanti sono stati selezionati mediante crescita su terreno selettivo (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0.03mg/ml leucina, 0.025 mg/ml metionina, 0.02 mg/ml istidina, 1% agar).

Le colonie cresciute in terreno selettivo sono state analizzate mediante colony PCR nelle seguenti condizioni: 25 µl finali, 1X Go Taq Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer fw, 0.5 µM primer rev, 3 µl DNA template (colonia risospesa in 50 µl di NaOH 0.02 N e incubata per 40 minuti a 37°C), 0.04U/µl Taq. Il programma eseguito è il seguente: 95°C 5', 35 cicli di 95°C 30'' - 55°C 30'' - 72°C 2'30'' e 72°C 5'.

I cloni risultati positivi alla colony PCR sono stati ulteriormente analizzati mediante estrazione del DNA genomico e successiva PCR analitica di controllo. L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita secondo il metodo "Smash and Grab" e la PCR è stata effettuata nelle medesime condizioni della Colony PCR ad eccezione che sono stati usati 50ng di DNA genomico estratto come template.

Le due cassette per il "gene replacement" di *SNR32* e *SNR64* sono state costruite mediante PCR eseguita, rispettivamente, sui due costrutti plasmidici *SNR32 mut-T* in pFL39 e *SNR64 mut-T* in pFL39 e con le coppie di primers esterni (*SNR32_FW* e *SNR32_REV* per *SNR32 mut-T* e *SNR64_FW* e *SNR64_REV* per *SNR64 mut-T*). Le reazioni di amplificazione sono state allestite in 20 µl finali ed è stato usato l'enzima Phusion DNA Pol (Finnzyme) con il seguente mix di reazione: 1X Buffer HF, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer forward, 0.5 µM primer reverse, 0.25 ng/µl DNA plasmidico, 0.05 U/µl Phusion DNA Pol. Il programma dei cicli per le cassette upstream dei mutanti dei geni *YKL143W*, *YOL041C*, *YDR496C* è stato il seguente: 98°C 40'', 35 cicli di 98°C 10'' - 53°C 10'' - 72°C 45'' e poi 72°C 5'.

Le PCR sono state replicate nelle medesime condizioni fino ad ottenere un quantitativo di costrutti pari a 2µg. Le due cassette sono poi state trasformate nei rispettivi ceppi deleti (*SNR32::URA3* e *SNR64::URA3*) con il protocollo usato in precedenza (vedere pag. 82). I due costrutti sono stati cotrasformati con il plasmide pRS315 e le cellule sono state selezionate prima su terreno selettivo privo di leucina (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0.025

mg/ml metionina, 0.02 mg/ml istidina, 1% agar) e poi su terreno minimo costituito da 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucosio, 0.025 mg/ml metionina, 0.02mg/ml uracile, 1 mg/ml 5'FOA (Acido 5'-Fluoroorotico). Le cellule cresciute sono state poi sottoposte a screening mediante colony PCR come descritto in precedenza, e, sui cloni risultati positivi, si è proceduto con l'estrazione del DNA genomico e successiva PCR analitica. Infine i cloni sono stati analizzati mediante sequenziamento della porzione di DNA genomico relativa al promotore in modo da poter confermare l'introduzione delle mutazioni desiderate nei siti d'interesse.

5. Estrazione degli RNA

L'estrazione degli RNA è stata effettuata con due differenti protocolli in base al tipo di tecnica che è stata poi usata per valutare i livelli di espressione nei mutanti.

Per i ceppi la cui espressione è stata analizzata mediante Northern blot (mutanti episomici di *SNR32* e *SNR64*) il protocollo usato è il seguente: le cellule sono state cresciute in 100 ml di terreno liquido fino al raggiungimento della fase logaritmica e poi è stata raccolta una quantità di cellule pari a 10 OD₆₀₀. Le cellule sono quindi state lavate con H₂O DEPC e suddivise in due aliquote di cui una è stata conservata a -80°C come riserva. L'altra aliquota invece è stata risospesa in 400 µl di AE buffer (50 mM sodio acetato pH 5, 10 mM EDTA) a cui si è aggiunto SDS 1% finale e le cellule sono agitate sul vortex. Si è quindi proceduto con una prima estrazione mediante aggiunta di 500 µl di fenolo acido/cloroformio 5:1 e agitazione per 2' sul vortex, poi il campione è stato incubato a 65°C per 4 minuti e successivamente in ghiaccio secco, fino al suo completo congelamento. I campioni sono stati centrifugati per 5 minuti e il surnatante recuperato; si è proceduto quindi con una seconda estrazione mediante aggiunta di 1 volume di fenolo acido/cloroformio 1:1 e ulteriore passaggio sul vortex. I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 8 minuti, il surnatante è stato quindi recuperato e l'RNA totale è stato precipitato mediante aggiunta di 1/10 di volume di sodio acetato 3 M (pH 5.2) e 2.5 volumi totali di etanolo 100% freddo l'RNA. I pellet sono stati lavati con 1 ml di etanolo 70% freddo e infine l'RNA è stato risospeso in 50 µl di H₂O DEPC. Gli RNA sono stati quantificati allo spettrofotometro e 2 µg sono stati caricati su gel di acrilammide 6%, 7 M urea per valutarne l'integrità.

Per i ceppi la cui espressione è stata analizzata mediante Real Time qPCR (mutanti episomici di *SNR5* e *SNR65* e mutanti genomici di *SNR32* e *SNR64*) le cellule per l'estrazione degli RNA sono state inoculate in 20 ml di YPD a OD_{600} pari a 0.16 - 0.2 e lasciati crescere fino a OD_{600} pari a 0.5 - 0.6. Le cellule sono quindi state raccolte mediante centrifugazione, lavate due volte con H_2O trattata con DEPC e gli RNA totali sono stati estratti utilizzando il kit commerciale RNeasy MiniKit (Qiagen®) seguendo il protocollo della casa produttrice. Il metodo di lisi cellulare usato è quello di lisi meccanica ed è stato effettuato il trattamento con DNasi opzionale suggerito nel protocollo.

Gli RNA estratti sono stati quantificati allo spettrofotometro e l'integrità degli RNA estratti è stata valutata mediante caricamento su gel di Acrilammide/Bisacrilammide 19:1 6% Urea 7M, TBE TXN 1x.

6. Northern blot

10 μ g di RNA totale sono stati risospesi in Denaturing Sample Buffer per RNA (1 mg/ml Xylene Cianolo, 1 mg/ml Blu di Bromofenolo, 10mM EDTA, 95% Formammide) e denaturati a 65°C per 5 minuti. Gli RNA sono quindi stati caricati su gel di acrilammide 6%, 7 M urea e la corsa è stata effettuata a 20-25 Ma. Al termine della corsa elettroforetica l'RNA è trasferito sulla membrana di nitrocellulosa GeneScreen Plus (PerkinElmer), mediante "semi-dry blotting" a 400mA per 1h30'. Gli RNA sono stati poi fissati su filtro mediante riscaldamento in stufa a 80°C per 30 minuti e in fornello a UV con scansione da Energy 700 a 0. Si è proceduto con la preibridazione che è stata effettuata per 1 ora e 30 minuti a 28°C in una soluzione 5X SSC, 5X Denhardt solution, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA, 0.5% SDS.

I filtri sono stati poi ibridati con la sonda radioattive costituite da un oligonucleotide marcato in 5' con ^{32}P . La reazione di marcatura delle sonde è stata effettuata in un volume finale di 20 μ l con il seguente mix di reazione: 1X T4 polinucleotide Kinasi Buffer (Promega), 0.5 μ M sonda (10pmol), 10 U T4 polinucleotide Kinasi, 30 μ Ci (γ ^{32}P) ATP (GE Healthcare).

La reazione è stata incubata a 37°C per 30', e interrotta mediante riscaldamento a 65°C per 10'. Al termine la reazione è stata diluita 1:2 con H_2O ultrapura e le sonde sono state purificate su colonnina Micro Bio-Spin (Bio-Rad). Si è proceduto con la misurazione della radioattività delle sonde al β counter e con la sua denaturazione a 90°C per 5'. La sonde

sono postate aggiunte alla soluzione di pre-ibridazione e lasciate o/n, alla stessa temperatura della preibridazione.

I filtri sono poi stati lavati a 28°C per 10' con una soluzione costituita da SSC 2X, SDS 0.1% e poi a 28°C per 7' con una soluzione di SSC 1X, SDS 0.1%.

La rivelazione dei filtri è stata ottenuta mediante esposizione al Phosphorimager e successiva scannerizzazione della lastra.

Le sonde utilizzate per lo studio di SNR32 sono:

SNR32 probe: GTGGGCTTTTAGTCATTCCTG

tRNAAla(AGC)probe (standard interno): GGAGACCTCTCCCATGCTAAGGGAGCGCGC

Le sonde utilizzate per lo studio di SNR64 sono:

SNR64 probe GAGAATCTGTTGCCCTATCTGG

U3 probe (standard interno): CTCCAAAGGAAAAACTACAAATGCAACGGCAAAG

7. Analisi dei livelli di trascrizione genica mediante Real Time qPCR

Il livello di espressione dei geni *SNR5* e *SNR65* e dei mutanti genomici del promotore di *SNR32* e *SNR64* è stato valutato mediante Real Time qPCR.

Per questa analisi 500ng di RNA totale estratto dalle cellule sono stati retro-trascritti utilizzando il Kit "iScript cDNA Synthesis Kit" (Biorad). I cDNA ottenuti dalla retro-trascrizione sono stati usati come template in reazioni di PCR quantitative con lo strumento "LightCycler 480" (Roche).

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con coppie di primers specifici per i geni di interesse e per lo standard interno *ADH1*. Tutti i primers sono stati disegnati con il programma Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) in modo da avere una T_m tra 58°C e 63°C e tali da ottenere ampliconi di taglia simile (100-120 bp). Le concentrazioni finali di reazione in qPCR sono state decise a seguito di prove di efficienza dei primers effettuate usando come template diluizioni seriali del cDNA di Tbf1_TAP (vedere anche pag.76).

La reazione di amplificazione per la valutazione dei livelli di espressione è stata eseguita in 10 µl finali con il seguente mix di reazione: 2µl DNA template (cDNA diluito 1:10), 1X

LightCycler 480 SYBR green Master 1 mix (Roche), XnM primer fw e rev (vedere tabelle per sequenza e quantità). Il programma impostato prevede una fase di amplificazione di 95°C per 10', 45 cicli a 95°C per 15" e 62°C per 30" e poi 72°C per 30". Tutte le reazioni sono state allestite in triplicato.

Le coppie di primers usate sono:

Gene target	Nome Primer	Sequenza Primer	C.finale
SNR5	SNR5_FW	TCTTCCGGATTACCATGCTT	250nM
	SNR5_REV	CACCTAGAGCGAACCAATGA	250nM
SNR32	RT_SNR32_FW	CCCACGTTTTTCCCACTTTT	250nM
	RT_SNR32_REV	CAGCTGATTCCCAATATCTCA	250nM
SNR64	RT_SNR64_FW	TGAGGAACCAGATAGGGACAA	250nM
	RT_SNR64_REV	AAAGGCGCCCTAAGCTCTACT	250nM
SNR65	RT_SNR65_FW	GATGATTTTTTTAAACACAATTTATG	250nM
	RT_SNR65_REV	GAGATTTAAACTGTGCGAAAACAC	250nM
ADH1	ADH1_FW	GAAGGTGCCGGTGTCTGTT	250nM
	ADH1_REV	ACCGATCTTCCAGCCCTTAAC	250nM

I dati sono stati analizzati in Excel, secondo il metodo di Livak (Livak and Schmittgen, 2001) (vedere anche pag.88).

8. Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Per valutare l'associazione di Tbf1 *in vivo* ai promotori dei geni *SNR32*, *SNR64*, *SNR5* nei ceppi mutanti e il legame di Vid22 e Ygr071C ai promotori è stata effettuata un'immunoprecipitazione cromatinica rispettivamente nei ceppi *TBF1-13xMyc*, nei mutanti *SNR32 mut_T* e *SNR64 mut-T* e Vid22-13xMyc and Ygr071c-13xMyc. Il protocollo seguito è quello descritto in (Bianchi and Shore, 2007); la frammentazione della cromatina è stata ottenuta mediante 2 cicli di 1' di sonicazione (30" di sonicazione e 30" di pausa) con lo strumento Bioruptor e la immunoprecipitazione è stata effettuata con l' anticorpo M280 sheep anti-mouse IgG Dynabeads (Dyna). Il DNA purificato è stato quantificato in PCR quantitativa con lo strumento "LightCycler 480" (Roche). La reazione di amplificazione è stata eseguita in 25 µl finali con il seguente mix di reazione: 2µl DNA template (INPUT diluito 1:100 e IP non diluito), 1X LightCycler 480 SYBR green Master 1 mix (Roche), 250nM primer fw e rev (vedere tabelle per sequenza e quantità). Il programma impostato prevede

una fase di amplificazione di 95°C per 10', 45 cicli a 95°C per 15" e 62°C per 30" e poi 72°C per 30". Tutte le reazioni sono state allestite in triplicato. La quantificazione è stata eseguita secondo il metodo di Livak, come descritto a pagina 78. I primers utilizzati per l'analisi sono elencati in tabella:

Primer	Sequenza
<i>TBF1A</i>	GATGGGACAGCCACAATCTT
<i>TBF1B</i>	ATATTCTCGACCGTGCCTA
<i>PAF1A</i>	CATACACGCAATGAGAACCCTA
<i>PAF1B</i>	TCATCCAATGTTACAGTCGTC
<i>MDM31A</i>	TATGTGGGTGTGTGGTTGCT
<i>MDM31B</i>	TTTGCCCTTTTGTAGGTCTG
<i>TEL01L-XRA</i>	AGGTCATGGTGGATGGTAGG
<i>TEL01L-XRB</i>	AATCTAACCTGGCCAACCT
<i>NME1A</i>	TCAGATGCCTTATCGCTCTTC
<i>NME1B</i>	AAATCCACGGAAAAACATCG
<i>SNR10A</i>	ACAACCTTAGCACGCCAAAC
<i>SNR10B</i>	GCTGCATTGATCTGCCTTTT
<i>SNR17AA</i>	AACCACCATGGATGGGTAAA
<i>SNR17AB</i>	GGTAGACGGGCAATCAGAAT
<i>SNR17BA</i>	GAATTCTCCGCTCAATGGAA
<i>SNR17BB</i>	AGCGAATATTTGCCAAACG
<i>SNR30A</i>	ACCTGCAATGCCATATCAT
<i>SNR30B</i>	CCGCTGATGTTTTAGGGTTA
<i>SNR32A</i>	GAAGTCGGCAAAGAAAGGTG
<i>SNR32B</i>	CGCTTACCCTGGTGATTGAT
<i>SNR64A</i>	CCAGCGGAGGAGTATAAAAGG
<i>SNR64B</i>	TTTCTGCTGGACAGAGACA
<i>SNR78A</i>	TGCCTCGAAAGGAGTCTGAT
<i>SNR78B</i>	TGGGTTTTCAGGCACGTAAT
<i>SNR190A</i>	GTGCAATGCTGAAGTCGAAA
<i>SNR190B</i>	ACACGCTGCCCTAAGAAAAA
<i>MEI4A</i>	ATTTAGCCGCCAGCAATA
<i>MEI4B</i>	GGGAGATCCAAATCCAGT

9. Mappatura dei nucleosomi

5 ml di coltura cresciuta in on a 30°C sono stati inoculati in 200ml di YPD e lasciati crescere per 3h a 30°C. Al termine della crescita le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 6', sono quindi state lavate con sorbitolo 1M e risospese in 1ml di "spheroplasting buffer" (1 M sorbitolo , 1 mM β -mercaptoetanol, 10 mg/ml Zymoliasi 100T della USB) per 8' a temperatura ambiente (25°C) invertendo i tubi delicatamente. Gli sferoplasti sono stati raccolti mediante centrifugazione a 12000 rpm per 10'' a 4°C e lavati due volte con sorbitolo 1 M sorbitolo. Il pellet è quindi stato risposeso in 1ml di buffer di digestione (1M sorbitolo, 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1mM β -mercaptoetanol, 0.5 mM spermidina, 0.075% NP-40) e diviso in quattro aliquote da 250 μ l. Le aliquote sono state trattate con 0, 1, 1.5 o 2 U di Nucleasi da Micrococco (MNase) per 30' a 37°C. La reazione è poi stata interrotta mediante aggiunta di EDTA a concentrazione finale di 25mM e SDS a concentrazione finale di 0.5%. I campioni sono stati trattati con 0.5 mg/ml di ProteinasiK per 2-3h a 37°C per degradare le proteine e poi estratti in fenolo-cloroformio 1:1 e precipitati con Ammonio acetato ed etanolo. Il pellet è quindi stato risospeso in 30 μ l di H₂O e trattato con RNasiA a concentrazione finale di 0.1mg/ml per 30' a 37°C. I campioni sono stati caricati su gel di agarosio al 3% e le bande corrispondenti a DNA da mononucleosomi (150 bp) sono state eluite da gel (BIONEER gel purification kit). Il DNA mononucleosomiale purificato da gel e il DNA di controllo (DNA non digerito estratto fenolo:cloroformio 1:1 e precipitato con ammonio acetato e etanolo) sono stati diluiti 1:10 e usati come template in reazione di PCR quantitativa. I primers usati sono coppie di primers che si sovrappongono e che coprono una regione del promotore di circa 500 bp rispetto al sito di inizio della trascrizione. I primers sono stati disegnati con Primer3 in modo da ottenere ampliconi di 102 \pm 2 bp centrati ogni 25-30 bp. Le reazioni di PCR sono state eseguite con lo strumento "LightCycler 480" (Roche). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite in 10 μ l finali con il seguente mix di reazione: 2 μ l DNA template, 1X LightCycler 480 SYBR green Master 1 mix (Roche), 250nM primer fw e rev (vedere tabelle per sequenza e quantità). Il programma impostato è stato di 10' a 95°C, seguiti da 45 cicli di 15'' a 95°C, 30'' a 62°C e 30'' a 72°C.

Primer	Sequenza
SNR32_1_FW	TGCATGGCTCATTGTAACC
SNR32_2-REV	TAGAAACGGGTATGGATAGGC
SNR32_3_FW	GCATTTTCATATTTTCAATATTTAGC
SNR32_4-REV	TCGACTTGTACGGCTCGTT
SNR32_5_FW	CTGATAGATGCGGGGCAAG
SNR32_6-REV	ACGTAATAGTAGCAACAACAACAAA
SNR32_7_FW	CAAGCCTATCCATACCCGTTT
SNR32_8-REV	GATAAAATACATAATAAGCCCACGTAA
SNR32_9_FW	CGTGAACGAGCCGTACAAGT
SNR32_10-REV	CTTGATGTATTTTGGCGGAAAC
SNR32_11_FW	ATATTTGTTGTTGTTGCTACTATTACG
SNR32_12-REV	TCTTATCACCTTTCTTTGCCGACT
SNR32_13_FW	GTGGGCTTATTATGTATTTTATC
SNR32_14-REV	AGTAGTATACTAGTAGTAATGC
SNR32_15_FW	GTTCCGCCAAAATACATCAA
SNR32_16-REV	CTCACTTTACATACAAAAGAGCTTAAA
SNR32_17_FW	CGGCAAAGAAAGGTGATAAGA
SNR32_18-REV	GAATTAAGTAGCAAAAATTTGAGAT
SNR32_19_FW	GCATTACTACTAGTATACTAC
SNR32_20-REV	CCGTTGTAGGGCTAGCACG
SNR32_21_FW	GCTCTTTGTATGTAAAGTGAGCAA
SNR32_22-REV	TTACCCTGGTGATTGATTTT
SNR32_23_FW	CTACTTAATTCTTATTTTCGTGCT
SNR32_24-REV	TTTTTATAGTGGGTTCTACA
SNR32_25_FW	CCCTACAACGGAACCCAAA
SNR32_26-REV	GAAAATTAATACAAACCTTCGAC
SNR32_27_FW	ACCAGGGTAAGCGGGAAA
SNR32_28-REV	TTGATTATAACAAAATAAGAGG
SNR32_29_FW	AGTGTAGGAACCGCACTATAAAA
SNR32_30-REV	TTTTAAAACAAAACAAAAGGA
SNR32_31_FW	TCGAAGGTTTGTATTAATTTTCC
SNR32_32-REV	CGCGATATAATTATGATGTTGG
SNR64_1_FW	TCTTACTTTTATGGCGTTCTATG
SNR64_2-REV	AGCAGATATTAAGGTACGCAAAAA
SNR64_3_FW	CCAAACAGATTTGGTAATGTGTTAAT
SNR64_4-REV	AATGGCTCGTTGACTCATTCT
SNR64_5_FW	CCAGCTCCTTGTCGAACITTT
SNR64_6-REV	TGCCTCTGTAGTAATCATTGAA
SNR64_7_FW	TTTGCGTACCTTAATATCTGCT
SNR64_8-REV	TATCACTGACGACGGAAAATG
SNR64_9_FW	AGTCAACGAGCCATTGATGA
SNR64_10-REV	CCTACTATCTCTTCTGGACCTCACC
SNR64_11_FW	CAATGATTACTACAAGAGGCATTTTC
SNR64_12-REV	ATGCCTTTGAGCCAGTATTAACCTTC
SNR64_13_FW	CCGTCGTCAGTGATATGAATAG
SNR64_14-REV	TTTGCCTTAGCTTGTCGAT
SNR64_15_FW	GGTGAGGTCCAGAAGAGATAGT
SNR64_16-REV	GCTGATGATGTACCACAAAGT
SNR64_17_FW	GGAAGTTTAATACTGGCTCAAAGG

<i>SNR64_18-REV</i>	ATGCTGTTTTCTCGAAAGCAATG
<i>SNR64_19_FW</i>	CTTATATCGACAAGCTAAGCGCAAA
<i>SNR64_20-REV</i>	AGAAAGCGCAGCAAATGG
<i>SNR64_21_FW</i>	TACTACTTTGTGGTACATCATCAGCA
<i>SNR64_22-REV</i>	TGAACTATTTCTGTTAGGGCTTAAA
<i>SNR64_23_FW</i>	CATCAGCATTGCTTTCGAG
<i>SNR64_24-REV</i>	TTTGCTTCTTATAGGCCTTTT
<i>SNR64_25_FW</i>	AGCATTTAAAATCAGCCATTTG
<i>SNR64_26-REV</i>	TTTTTCGTATTTTCACTTTT
<i>SNR64_27_FW</i>	TTTGCTGCGCTTCTTTAAGC
<i>SNR64_28-REV</i>	ACTCCTCCGCTGGAGTATTTT
<i>SNR64_29_FW</i>	CAGAAAATAGTTCAAAAAGGCCTATAA
<i>SNR64_30-REV</i>	ACATTTTGTATTTTCTCCCTTT
<i>SNR64_31_FW</i>	AAGGCCTATAAGAAGCAAAAA
<i>SNR64_32-REV</i>	TGCGTAACAACACAACACTACATTT
<i>SNR64_33_FW</i>	ACTCCAGCGGAGGAGTATAAAA
<i>SNR64_34-REV</i>	TGCGACGTCCTCTTCTTCTT

Bibliografia

- Ansari, S.A., He, Q. and Morse, R.H. (2009) Mediator complex association with constitutively transcribed genes in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16734-16739.
- Bachellerie, J.P., Cavaille, J. and Huttenhofer, A. (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie*, **84**, 775-790.
- 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., Li Yeo, A., Yeo, Z.X., Clarke, N.D., Lieb, J.D., Ansari, A.Z., Nislow, C. and Hughes, T.R. (2008) A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell*, **32**, 878-887.
- Bai, L., Charvin, G., Siggia, E.D. and Cross, F.R. (2010) Nucleosome-depleted regions in cell-cycle-regulated promoters ensure reliable gene expression in every cell cycle. *Dev Cell*, **18**, 544-555.
- Bailey, T.L. and Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **2**, 28-36.
- Balakin, A.G., Schneider, G.S., Corbett, M.S., Ni, J. and Fournier, M.J. (1993) SnR31, snR32, and snR33: three novel, non-essential snRNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5391-5397.
- Balakin, A.G., Smith, L. and Fournier, M.J. (1996) The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*, **86**, 823-834.
- Basehoar, A.D., Zanton, S.J. and 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.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. 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. and Gadal, O. (2007) Hmo1 is required for TOR-dependent regulation of ribosomal protein gene transcription. *Mol Cell Biol*, **27**, 8015-8026.
- Berthiau, A.S., Yankulov, K., Bah, A., Revardel, E., Luciano, P., Wellinger, R.J., Geli, V. and Gilson, E. (2006) Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. *Embo J*, **25**, 846-856.
- Bianchi, A. and Shore, D. (2007) Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev*, **21**, 1726-1730.
- Bolchi, A., Ottonello, S. and Petrucco, S. (2005) A general one-step method for the cloning of PCR products. *Biotechnol Appl Biochem*, **42**, 205-209.
- Boorsma, A., Lu, X.J., Zakrzewska, A., Klis, F.M. and Bussemaker, H.J. (2008) Inferring condition-specific modulation of transcription factor activity in yeast through regulon-based analysis of genomewide expression. *PLoS One*, **3**, e3112.
- Bortolin, M.L., Ganot, P. and Kiss, T. (1999) Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs. *Embo J*, **18**, 457-469.
- Boscheron, C., Maillet, L., Marcand, S., Tsai-Pflugfelder, M., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1996) Cooperation at a distance between silencers and proto-silencers at the yeast HML locus. *Embo J*, **15**, 2184-2195.
- Brigati, C., Kurtz, S., Balderes, D., Vidali, G. and Shore, D. (1993) An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 1306-1314.
- Buchman, A.R., Kimmerly, W.J., Rine, J. and Kornberg, R.D. (1988) Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **8**, 210-225.
- Caffarelli, E., Fatica, A., Prislei, S., De Gregorio, E., Fragapane, P. and Bozzoni, I. (1996) Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved C and D boxes control both the processing reaction and the stability of the mature snoRNA. *Embo J*, **15**, 1121-1131.
- 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. and Young, R.A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*, **12**, 323-337.

- Cavaille, J. and Bachellerie, J.P. (1996) Processing of fibrillarin-associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochimie*, **78**, 443-456.
- Challice, J.M. and Segall, J. (1989) Transcription of the 5 S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *J Biol Chem*, **264**, 20060-20067.
- Chang, D.T., Huang, C.Y., Wu, C.Y. and Wu, W.S. (2011) YPA: an integrated repository of promoter features in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **39**, D647-652.
- Chen, J.C. and Powers, T. (2006) Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr Genet*, **49**, 281-293.
- Cherry, J.M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S.A., Dwight, S.S., Hester, E.T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S. and Botstein, D. (1998) SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res*, **26**, 73-79.
- Cockell, M.M., Lo Presti, L., Cerutti, L., Cano Del Rosario, E., Hauser, P.M. and Simanis, V. (2009) Functional differentiation of *tbf1* orthologues in fission and budding yeasts. *Eukaryot Cell*, **8**, 207-216.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T. and Sogo, J.M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, **57**, 753-761.
- Costanzo, G., Camier, S., Carlucci, P., Burderi, L. and Negri, R. (2001) RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes in vivo: TFIIB occupancy and promoter opening. *Mol Cell Biol*, **21**, 3166-3178.
- Daugeron, M.C. and Linder, P. (1998) Dbp7p, a putative ATP-dependent RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for 60S ribosomal subunit assembly. *Rna*, **4**, 566-581.
- de Turris, V., Di Leva, G., Caldarola, S., Loreni, F., Amaldi, F. and Bozzoni, I. (2004) TOP promoter elements control the relative ratio of intron-encoded snoRNA versus spliced mRNA biosynthesis. *J Mol Biol*, **344**, 383-394.
- Decatur, W.A. and Fournier, M.J. (2002) rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci*, **27**, 344-351.

- Decatur, W.A. and Fournier, M.J. (2003) RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem*, **278**, 695-698.
- Deng, Y., Singer, R.H. and Gu, W. (2008) Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev*, **22**, 1037-1050.
- Dieci, G., Bosio, M.C., Fermi, B. and Ferrari, R. (2012) Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochim Biophys Acta*.
- Dieci, G., Preti, M. and Montanini, B. (2009a) Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*, **94**, 83-88.
- Dieci, G., Ruotolo, R., Braglia, P., Carles, C., Carpentieri, A., Amoresano, A. and Ottonello, S. (2009b) Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **379**, 489-493.
- Durocher, D. and Jackson, S.P. (2002) The FHA domain. *FEBS Lett*, **513**, 58-66.
- Elion, E.A. and Warner, J.R. (1984) The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream. *Cell*, **39**, 663-673.
- Elion, E.A. and Warner, J.R. (1986) An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **6**, 2089-2097.
- Fedor, M.J., Lue, N.F. and Kornberg, R.D. (1988) Statistical positioning of nucleosomes by specific protein-binding to an upstream activating sequence in yeast. *J Mol Biol*, **204**, 109-127.
- Fernandez, C.F., Pannone, B.K., Chen, X., Fuchs, G. and Wolin, S.L. (2004) An Lsm2-Lsm7 complex in *Saccharomyces cerevisiae* associates with the small nucleolar RNA snR5. *Mol Biol Cell*, **15**, 2842-2852.
- Field, Y., Kaplan, N., Fondufe-Mittendorf, Y., Moore, I.K., Sharon, E., Lubling, Y., Widom, J. and Segal, E. (2008) Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol*, **4**, e1000216.
- Fingerman, I., Nagaraj, V., Norris, D. and Vershon, A.K. (2003) Sfp1 plays a key role in yeast ribosome biogenesis. *Eukaryot Cell*, **2**, 1061-1068.

- Fourel, G., Boscheron, C., Revardel, E., Lebrun, E., Hu, Y.F., Simmen, K.C., Muller, K., Li, R., Mermod, N. and Gilson, E. (2001) An activation-independent role of transcription factors in insulator function. *EMBO Rep*, **2**, 124-132.
- Fourel, G., Miyake, T., Defosse, P.A., Li, R. and Gilson, E. (2002) General regulatory factors (GRFs) as genome partitioners. *J Biol Chem*, **277**, 41736-41743.
- Fourel, G., Revardel, E., Koering, C.E. and Gilson, E. (1999) Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *Embo J*, **18**, 2522-2537.
- Freckleton, G., Lippman, S.I., Broach, J.R. and Tavazoie, S. (2009) Microarray profiling of phage-display selections for rapid mapping of transcription factor-DNA interactions. *PLoS Genet*, **5**, e1000449.
- Furey, T.S. (2012) CHIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet*, **13**, 840-852.
- Ganapathi, M., Palumbo, M.J., Ansari, S.A., He, Q., Tsui, K., Nislow, C. and 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 Res*, **39**, 2032-2044.
- Ganot, P., Bortolin, M.L. and Kiss, T. (1997a) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell*, **89**, 799-809.
- Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M. and Kiss, T. (1997b) The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes Dev*, **11**, 941-956.
- Gao, M. and Kaiser, C.A. (2006) A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nat Cell Biol*, **8**, 657-667.
- Garbett, K.A., Tripathi, M.K., Cencki, B., Layer, J.H. and Weil, P.A. (2007) Yeast TFIID serves as a coactivator for Rap1p by direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol*, **27**, 297-311.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, **11**, 4241-4257.

- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. and Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
- Goetze, H., Wittner, M., Hamperl, S., Hondele, M., Merz, K., Stoeckl, U. and 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. *Mol Cell Biol*, **30**, 2028-2045.
- Granneman, S. and Baserga, S.J. (2004) Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res*, **296**, 43-50.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D. and Singer, R.H. (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev*, **18**, 1452-1465.
- Guffanti, E., Ferrari, R., Preti, M., Forloni, M., Harismendy, O., Lefebvre, O. and Dieci, G. (2006) A minimal promoter for TFIIC-dependent in vitro transcription of snoRNA and tRNA genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem*, **281**, 23945-23957.
- Ha, C.W., Sung, M.K. and Huh, W.K. (2012) Nsi1 plays a significant role in the silencing of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **40**, 4892-4903.
- Hall, D.B., Wade, J.T. and Struhl, K. (2006) An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 3672-3679.
- Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.B., 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, D.K., Fraenkel, E. and Young, R.A. (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature*, **431**, 99-104.
- Harismendy, O., Gendrel, C.G., Soularue, P., Gidrol, X., Sentenac, A., Werner, M. and Lefebvre, O. (2003) Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *Embo J*, **22**, 4738-4747.
- Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, **16**, 7351-7367.

- Hockman, D.J. and Schultz, M.C. (1996) Casein kinase II is required for efficient transcription by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*, **16**, 892-898.
- Hogues, H., Lavoie, H., Sellam, A., Mangos, M., Roemer, T., Purisima, E., Nantel, A. and Whiteway, M. (2008) Transcription factor substitution during the evolution of fungal ribosome regulation. *Mol Cell*, **29**, 552-562.
- Hornung, G., Oren, M. and Barkai, N. (2012) Nucleosome organization affects the sensitivity of gene expression to promoter mutations. *Mol Cell*, **46**, 362-368.
- Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R. and Loewith, R. (2009) Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev*, **23**, 1929-1943.
- Huber, A., French, S.L., Tekotte, H., Yerlikaya, S., Stahl, M., Perepelkina, M.P., Tyers, M., Rougemont, J., Beyer, A.L. and Loewith, R. (2011) Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *Embo J*, **30**, 3052-3064.
- 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*. *Mol Cell*, **13**, 573-585.
- Humphrey, E.L., Shamji, A.F., Bernstein, B.E. and Schreiber, S.L. (2004) Rpd3p relocation mediates a transcriptional response to rapamycin in yeast. *Chem Biol*, **11**, 295-299.
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H. and Kobayashi, T. (2010) Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science*, **327**, 693-696.
- Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J. and Barkai, N. (2005) Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science*, **309**, 938-940.
- Ioshikhes, I.P., Albert, I., Zanton, S.J. and Pugh, B.F. (2006) Nucleosome positions predicted through comparative genomics. *Nat Genet*, **38**, 1210-1215.
- Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., Albermann, K., Andre, B., Ansorge, W., Benes, V., Bruckner, M., Delius, H., Dubois, E., Dusterhoft, A., Entian, K.D., Floeth, M., Goffeau, A., Hebling, U., Heumann, K., Heuss-Neitzel, D., Hilbert, H., Hilger, F., Kleine, K., Kotter, P., Louis, E.J., Messenguy, F., Mewes, H.W., Hoheisel, J.D. and et

- al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*, **387**, 87-90.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Bretkreutz, B.J. and Tyers, M. (2002) Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science*, **297**, 395-400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R. and Tyers, M. (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev*, **18**, 2491-2505.
- Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A.J., Tillo, D., Field, Y., LeProust, E.M., Hughes, T.R., Lieb, J.D., Widom, J. and Segal, E. (2009) The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, **458**, 362-366.
- Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K. and Kokubo, T. (2007) Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **27**, 6686-6705.
- Kasahara, K., Ohya, Y. and Kokubo, T. (2010) Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Res*, **39**, 4136-4150.
- Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H. and 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*, **60**, 235-245.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B. and Lander, E.S. (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, **423**, 241-254.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M. and Kiss, T. (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, **85**, 1077-1088.
- Koering, C.E., Fourel, G., Binet-Brasselet, E., Laroche, T., Klein, F. and Gilson, E. (2000) Identification of high affinity Tbf1p-binding sites within the budding yeast genome. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2519-2526.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P. and Silver, P.A. (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*, **131**, 557-571.

- Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. and Rhodes, D. (1996) The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell*, **85**, 125-136.
- Kornberg, R.D. and Stryer, L. (1988) Statistical distributions of nucleosomes: nonrandom locations by a stochastic mechanism. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6677-6690.
- Kulkens, T., van der Sande, C.A., Dekker, A.F., van Heerikhuizen, H. and Planta, R.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. *Embo J*, **11**, 4665-4674.
- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 514-520.
- Lam, F.H., Steger, D.J. and O'Shea, E.K. (2008) Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature*, **453**, 246-250.
- Lange, T.S., Borovjagin, A., Maxwell, E.S. and Gerbi, S.A. (1998) Conserved boxes C and D are essential nucleolar localization elements of U14 and U8 snoRNAs. *Embo J*, **17**, 3176-3187.
- Lascaris, R.F., Groot, E., Hoen, P.B., Mager, W.H. and Planta, R.J. (2000) Different roles for abf1p and a T-rich promoter element in nucleosome organization of the yeast RPS28A gene. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1390-1396.
- Lascaris, R.F., Mager, W.H. and Planta, R.J. (1999) DNA-binding requirements of the yeast protein Rap1p as selected in silico from ribosomal protein gene promoter sequences. *Bioinformatics*, **15**, 267-277.
- Lavoie, H., Hogues, H., Mallick, J., Sellam, A., Nantel, A. and Whiteway, M. (2010) Evolutionary tinkering with conserved components of a transcriptional regulatory network. *PLoS Biol*, **8**, e1000329.
- Lee, J., Moir, R.D. and Willis, I.M. (2009) Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *J Biol Chem*, **284**, 12604-12608.
- 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.B., Volkert, T.L., Fraenkel, E.,

- Gifford, D.K. and Young, R.A. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **298**, 799-804.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., Davis, R.W., Hughes, T.R. and Nislow, C. (2007) A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet*, **39**, 1235-1244.
- Lempiainen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R. and Shore, D. (2009) Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. *Mol Cell*, **33**, 704-716.
- Li, B., Nierras, C.R. and Warner, J.R. (1999) Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. *Mol Cell Biol*, **19**, 5393-5404.
- Li, H., Tsang, C.K., Watkins, M., Bertram, P.G. and Zheng, X.F. (2006) Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature*, **442**, 1058-1061.
- Li, Z., Lee, I., Moradi, E., Hung, N.J., Johnson, A.W. and Marcotte, E.M. (2009) Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics. *PLoS Biol*, **7**, e1000213.
- Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D. and Brown, P.O. (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*, **28**, 327-334.
- Liko, D., Conway, M.K., Grunwald, D.S. and Heideman, W. (2010) Stb3 plays a role in the glucose-induced transition from quiescence to growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **185**, 797-810.
- Liko, D., Slattery, M.G. and Heideman, W. (2007) Stb3 binds to ribosomal RNA processing element motifs that control transcriptional responses to growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **282**, 26623-26628.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 19928-19933.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lowe, T.M. and Eddy, S.R. (1999) A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science*, **283**, 1168-1171.

- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N. and O'Shea, E.K. (2004) Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14315-14322.
- Martin, D.E., Soulard, A. and Hall, M.N. (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell*, **119**, 969-979.
- Matera, A.G., Terns, R.M. and Terns, M.P. (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 209-220.
- Mauro, V.P. and Edelman, G.M. (2002) The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12031-12036.
- Mavrich, T.N., Ioshikhes, I.P., Venters, B.J., Jiang, C., Tomsho, L.P., Qi, J., Schuster, S.C., Albert, I. and Pugh, B.F. (2008) A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res*, **18**, 1073-1083.
- Mencia, M., Moqtaderi, Z., Geisberg, J.V., Kuras, L. and Struhl, K. (2002) Activator-specific recruitment of TFIID and regulation of ribosomal protein genes in yeast. *Mol Cell*, **9**, 823-833.
- Miyake, T., Reese, J., Loch, C.M., Auble, D.T. and Li, R. (2004) Genome-wide analysis of ARS (autonomously replicating sequence) binding factor 1 (Abf1p)-mediated transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 34865-34872.
- Moir, R.D., Lee, J., Haeusler, R.A., Desai, N., Engelke, D.R. and Willis, I.M. (2006) Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15044-15049.
- Morrow, B.E., Johnson, S.P. and Warner, J.R. (1989) Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer. *J Biol Chem*, **264**, 9061-9068.
- Morrow, B.E., Ju, Q. and Warner, J.R. (1993) A bipartite DNA-binding domain in yeast Reb1p. *Mol Cell Biol*, **13**, 1173-1182.
- Morse, R.H. (2000) RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. *Trends Genet*, **16**, 51-53.
- Moss T. and Stefanovsky V., At the center of eukaryotic life. *Cell* 109 (2002), 545-548.

- Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., Smagowicz, W.J., Gonzalez de Peredo, A., Boguta, M., Sentenac, A. and Lefebvre, O. (2006) General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Mol Cell*, **22**, 623-632.
- Oler, A.J. and Cairns, B.R. (2012) PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *Embo J*, **31**, 1440-1452.
- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J.F., Wellinger, R.J., Chabot, B. and 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 5'-terminal oligopyrimidine gene family. *Mol Cell Biol*, **18**, 4509-4518.
- Philippi, A., Steinbauer, R., Reiter, A., Fath, S., Leger-Silvestre, I., Milkereit, P., Griesenbeck, J. and 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 Res*, **38**, 5315-5326.
- Pina, B., Fernandez-Larrea, J., Garcia-Reyero, N. and Idrissi, F.Z. (2003) The different (sur)faces of Rap1p. *Mol Genet Genomics*, **268**, 791-798.
- Planta, R.J. (1997) Regulation of ribosome synthesis in yeast. *Yeast*, **13**, 1505-1518.
- Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N.C., Smagowicz, W.J., Stanford, D.R., Ellis, S.R., Hopper, A.K., Sentenac, A. and Boguta, M. (2001) Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21**, 5031-5040.
- Preti, M., Ribeyre, C., Pascali, C., Bosio, M.C., Cortelazzi, B., Rougemont, J., Guarnera, E., Naef, F., Shore, D. and Dieci, G. (2010) The telomere-binding protein Tbf1 demarcates snoRNA gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **38**, 614-620.
- Qu, L.H., Henras, A., Lu, Y.J., Zhou, H., Zhou, W.X., Zhu, Y.Q., Zhao, J., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M. and Bachellerie, J.P. (1999) Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 1144-1158.

- Raue, H.A., Mager, W.H. and Planta, R.J. (1991) Structural and functional analysis of yeast ribosomal proteins. *Methods Enzymol*, **194**, 453-477.
- Reid, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Struhl, K. (2000) Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol Cell*, **6**, 1297-1307.
- Reiter, A., Hamperl, S., Seitz, H., Merkl, P., Perez-Fernandez, J., Williams, L., Gerber, J., Nemeth, A., Leger, I., Gadai, O., Milkereit, P., Griesenbeck, J. and Tschochner, H. (2012) The Reb1-homologue Ydr026c/Nsi1 is required for efficient RNA polymerase I termination in yeast. *Embo J*, **31**, 3480-3493.
- 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.
- Rhode, P.R., Elsasser, S. and Campbell, J.L. (1992) Role of multifunctional autonomously replicating sequence binding factor 1 in the initiation of DNA replication and transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**, 1064-1077.
- Richmond, T.J. and Davey, C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423**, 145-150.
- Roberts, D.N., Wilson, B., Huff, J.T., Stewart, A.J. and Cairns, B.R. (2006) Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression. *Mol Cell*, **22**, 633-644.
- Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **21**, 327-335.
- Rohde, J.R. and Cardenas, M.E. (2003) The tor pathway regulates gene expression by linking nutrient sensing to histone acetylation. *Mol Cell Biol*, **23**, 629-635.
- Rozowsky, J., Euskirchen, G., Auerbach, R.K., Zhang, Z.D., Gibson, T., Bjornson, R., Carriero, N., Snyder, M. and Gerstein, M.B. (2009) PeakSeq enables systematic scoring of ChIP-seq experiments relative to controls. *Nat Biotechnol*, **27**, 66-75.

- Samarsky, D.A., Fournier, M.J., Singer, R.H. and Bertrand, E. (1998) The snoRNA box C/D motif directs nucleolar targeting and also couples snoRNA synthesis and localization. *Embo J*, **17**, 3747-3757.
- Sandelin, A., Alkema, W., Engstrom, P., Wasserman, W.W. and Lenhard, B. (2004) JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, **32**, D91-94.
- Sandmeier, J.J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W.L., Gallo, C.M., Beyer, A.L. and Smith, J.S. (2002) RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *Embo J*, **21**, 4959-4968.
- Schawalder, S.B., Kabani, M., Howald, I., Choudhury, U., Werner, M. and Shore, D. (2004) Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature*, **432**, 1058-1061.
- Schlecht, U., Erb, I., Demougin, P., Robine, N., Borde, V., van Nimwegen, E., Nicolas, A. and Primig, M. (2008) Genome-wide expression profiling, in vivo DNA binding analysis, and probabilistic motif prediction reveal novel Abf1 target genes during fermentation, respiration, and sporulation in yeast. *Mol Biol Cell*, **19**, 2193-2207.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D.E. and Hall, M.N. (2004) Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol*, **24**, 338-351.
- Schneider, D.A. 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 Dev*, **16**, 2593-2620.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thastrom, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.P. and Widom, J. (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, **442**, 772-778.
- Seiser, R.M., Sundberg, A.E., Wollam, B.J., Zobel-Thropp, P., Baldwin, K., Spector, M.D. and Lycan, D.E. (2006) Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **174**, 679-691.
- Shandilya, J. and Roberts, S.G. (2012) The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta*, **1819**, 391-400.

- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H. and Deshaies, R.J. (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*, **97**, 233-244.
- 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 Dev*, **23**, 1944-1958.
- Slattery, M.G. and Heideman, W. (2007) Coordinated regulation of growth genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle*, **6**, 1210-1219.
- Steitz, T.A. (2008) A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 242-253.
- Straight, A.F., Shou, W., Dowd, G.J., Turck, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D. and Moazed, D. (1999) Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell*, **97**, 245-256.
- Swamy, K.B., Chu, W.Y., Wang, C.Y., Tsai, H.K. and Wang, D. (2011) Evidence of association between nucleosome occupancy and the evolution of transcription factor binding sites in yeast. *BMC Evol Biol*, **11**, 150.
- Tirosh, I. and Barkai, N. (2008) Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res*, **18**, 1084-1091.
- Tollervey, D. (1996) Trans-acting factors in ribosome synthesis. *Exp Cell Res*, **229**, 226-232.
- Tycowski, K.T., Smith, C.M., Shu, M.D. and Steitz, J.A. (1996) A small nucleolar RNA requirement for site-specific ribose methylation of rRNA in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14480-14485.
- Tycowski, K.T. and Steitz, J.A. (2001) Non-coding snoRNA host genes in *Drosophila*: expression strategies for modification guide snoRNAs. *Eur J Cell Biol*, **80**, 119-125.
- Upadhyaya, R., Lee, J. and Willis, I.M. (2002) Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Mol Cell*, **10**, 1489-1494.

- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, **88**, 243-251.
- Venema, J. and Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **33**, 261-311.
- Venters, B.J. and Pugh, B.F. (2009) How eukaryotic genes are transcribed. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **44**, 117-141.
- Venters, B.J., Wachi, S., Mavrich, T.N., Andersen, B.E., Jena, P., Sinnamon, A.J., Jain, P., Rollerli, N.S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C. and Pugh, B.F. (2011) A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell*, **41**, 480-492.
- Villa, T., Ceradini, F. and Bozzoni, I. (2000) Identification of a novel element required for processing of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **20**, 1311-1320.
- Vu, L., Siddiqi, I., Lee, B.S., Josaitis, C.A. and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4390-4395.
- Wade, C., Shea, K.A., Jensen, R.V. and 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. *Mol Cell Biol*, **21**, 8638-8650.
- Wade, C.H., Umbarger, M.A. and McAlear, M.A. (2006) The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. *Yeast*, **23**, 293-306.
- Wade, J.T., Hall, D.B. and Struhl, K. (2004) The transcription factor Ifh1 is a key regulator of yeast ribosomal protein genes. *Nature*, **432**, 1054-1058.
- Wang, K.L. and Warner, J.R. (1998) Positive and negative autoregulation of REB1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 4368-4376.
- Wapinski, I., Pfiffner, J., French, C., Socha, A., Thompson, D.A. and Regev, A. (2010) Gene duplication and the evolution of ribosomal protein gene regulation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 5505-5510.

- Warner, J.R. (1989) Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **53**, 256-271.
- Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, **24**, 437-440.
- Weinstein, L.B. and Steitz, J.A. (1999) Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 378-384.
- Whitehouse, I., Rando, O.J., Delrow, J. and Tsukiyama, T. (2007) Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature*, **450**, 1031-1035.
- Willis, I.M. (1993) RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur J Biochem*, **212**, 1-11.
- Willis, I.M. and Moir, R.D. (2007) Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends Biochem Sci*, **32**, 51-53.
- Wolfe, K.H. and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, **387**, 708-713.
- Wu, K., Wu, P. and Aris, J.P. (2001) Nucleolar protein Nop12p participates in synthesis of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2938-2949.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F. and Schultz, P. (2004) Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell*, **15**, 199-208.
- Xu, Z. and Norris, D. (1998) The SFP1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* regulates G2/M transitions during the mitotic cell cycle and DNA-damage response. *Genetics*, **150**, 1419-1428.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Munster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W. and Steinmetz, L.M. (2009) Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature*, **457**, 1033-1037.
- Xue, S. and Barna, M. (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 355-369.
- Yarragudi, A., Miyake, T., Li, R. and Morse, R.H. (2004) Comparison of ABF1 and RAP1 in chromatin opening and transactivator potentiation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **24**, 9152-9164.

Bibliografia

- Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. and Rando, O.J. (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, **309**, 626-630.
- Zawadzki, K.A., Morozov, A.V. and Broach, J.R. (2009) Chromatin-dependent transcription factor accessibility rather than nucleosome remodeling predominates during global transcriptional restructuring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **20**, 3503-3513.
- Zhao, Y., McIntosh, K.B., Rudra, D., Schawalder, S., Shore, D. and Warner, J.R. (2006) Fine-structure analysis of ribosomal protein gene transcription. *Mol Cell Biol*, **26**, 4853-4862.
- Zhu, C., Byers, K.J., 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. and Bulyk, M.L. (2009) High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res*, **19**, 556-566.
- Zurita-Martinez, S.A. and Cardenas, M.E. (2005) Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth. *Eukaryot Cell*, **4**, 63-71.

Appendice

Lista dei geni associati *in vivo* a Abf1:

YAL003W	YBL044W	YBR197C	YCR024C-B	YDL061C	YDR001C	YDR266C
YAL005C	YBL045C	YBR209W	YCR025C	YDL063C	YDR002W	YDR267C
YAL007C	YBL063W	YBR213W	YCR035C	YDL070W	YDR034C	YDR278C
YAL023C	YBL064C	YBR214W	YCR036W	YDL071C	YDR071C	YDR280W
YAL038W	YBL073W	YBR222C	YCR053W	YDL072C	YDR077W	YDR283C
YAL041W	YBL074C	YBR223W-A	YCR063W	YDL081C	YDR083W	YDR284C
YAL042C-A	YBL079W	YBR230C	YCR064C	YDL122W	YDR094W	YDR285W
YAL042W	YBL080C	YBR230W-A	YCR065W	YDL125C	YDR095C	YDR295C
YAL043C	YBL091C-A	YBR231C	YCR067C	YDL129W	YDR096W	YDR296W
YAL053W	YBL092W	YBR283C	YCR068W	YDL131W	YDR099W	YDR306C
YAL054C	YBL099W	YBR284W	YCR081C-A	YDL133C-A	YDR144C	YDR307W
YAR035C-A	YBR011C	YBR290W	YCR082W	YDL136W	YDR145W	YDR310C
YAR035W	YBR029C	YBR293W	YCR083W	YDL138W	YDR184C	YDR311W
YAR042W	YBR030W	YCL010C	YCR084C	YDL139C	YDR186C	YDR312W
YAR075W	YBR031W	YCL011C	YCR085W	YDL143W	YDR187C	YDR326C
YBL005W	YBR050C	YCL031C	YCR086W	YDL144C	YDR188W	YDR327W
YBL006C	YBR051W	YCL034W	YCR108C	YDL145C	YDR194C	YDR328C
YBL006W-A	YBR068C	YCL035C	YDL004W	YDL147W	YDR194W-A	YDR329C
YBL007C	YBR076C-A	YCL040W	YDL005C	YDL148C	YDR195W	YDR330W
YBL011W	YBR077C	YCL041C	YDL010W	YDL159C-B	YDR207C	YDR338C
YBL012C	YBR078W	YCL042W	YDL011C	YDL159W	YDR208W	YDR339C
YBL013W	YBR080C	YCL043C	YDL012C	YDL159W-A	YDR211W	YDR340W
YBL015W	YBR101C	YCL045C	YDL013W	YDL160C	YDR215C	YDR348C
YBL029C-A	YBR105C	YCL046W	YDL014W	YDL189W	YDR222W	YDR359C
YBL030C	YBR106W	YCL057C-A	YDL015C	YDL190C	YDR226W	YDR361C
YBL032W	YBR109C	YCL057W	YDL017W	YDL191W	YDR233C	YDR363W-A
YBL033C	YBR109W-A	YCL058C	YDL018C	YDL207W	YDR234W	YDR365C
YBL037W	YBR110W	YCL058W-A	YDL020C	YDL208W	YDR245W	YDR365W-A
YBL038W	YBR118W	YCL059C	YDL028C	YDL209C	YDR261C-C	YDR365W-B
YBL039C	YBR119W	YCR011C	YDL034W	YDL215C	YDR261C-D	YDR381C-A
YBL039C-A	YBR122C	YCR012W	YDL035C	YDL221W	YDR262W	YDR382W
YBL041W	YBR129C	YCR015C	YDL047W	YDL222C	YDR264C	YDR384C
YBL043W	YBR196C-B	YCR024C-A	YDL060W	YDL229W	YDR265W	YDR385W

Appendice

YDR397C	YDR526C	YER090C-A	YFL039C	YGL124C	YGR144W	YGR282C
YDR398W	YDR527W	YER090W	YFL047W	YGL125W	YGR146C-A	YHL002W
YDR404C	YDR543C	YER091C	YFL048C	YGL126W	YGR147C	YHL004W
YDR405W	YDR544C	YER091C-A	YFR009W	YGL127C	YGR148C	YHL005C
YDR407C	YEL008C-A	YER092W	YFR009W-A	YGL169W	YGR161C	YHL006C
YDR408C	YEL008W	YER110C	YFR010W	YGL170C	YGR161C-C	YHL006W-A
YDR409W	YEL009C	YER111C	YFR017C	YGL189C	YGR161C-D	YHL007C
YDR410C	YEL017C-A	YER112W	YFR018C	YGL222C	YGR162W	YHL008C
YDR422C	YEL017W	YER122C	YFR028C	YGL223C	YGR175C	YHL009C
YDR423C	YEL027W	YER123W	YFR029W	YGL225W	YGR176W	YHL023C
YDR430C	YEL032C-A	YER124C	YFR032C-A	YGL228W	YGR181W	YHL024W
YDR431W	YEL032W	YER137C	YFR032C-B	YGL229C	YGR182C	YHL025W
YDR432W	YEL033W	YER137W-A	YFR033C	YGL234W	YGR183C	YHL026C
YDR434W	YEL034C-A	YER145C-A	YFR034C	YGL236C	YGR184C	YHL027W
YDR454C	YEL034W	YER146W	YFR034W-A	YGL250W	YGR185C	YHL028W
YDR455C	YEL035C	YER158C	YFR035C	YGL251C	YGR186W	YHL029C
YDR456W	YEL036C	YER158W-A	YFR036W	YGL253W	YGR189C	YHL034C
YDR461C-A	YEL037C	YER159C	YFR057W	YGL254W	YGR192C	YHR005C-A
YDR461W	YEL045C	YER165C-A	YGL006W-A	YGL256W	YGR202C	YHR007C
YDR462W	YEL046C	YER165W	YGL007C-A	YGL257C	YGR203W	YHR007C-A
YDR463W	YEL053W-A	YER166W	YGL007W	YGR031C-A	YGR204W	YHR008C
YDR464W	YEL071W	YER184C	YGL008C	YGR032W	YGR221C	YHR009C
YDR472W	YER007C-A	YER185W	YGL036W	YGR050C	YGR222W	YHR010W
YDR476C	YER017C	YER188C-A	YGL037C	YGR053C	YGR231C	YHR027C
YDR481C	YER018C	YFL017C	YGL039W	YGR054W	YGR232W	YHR041C
YDR482C	YER019C-A	YFL017W-A	YGL054C	YGR056W	YGR240C	YHR042W
YDR483W	YER019W	YFL018C	YGL055W	YGR059W	YGR240C-A	YHR049W
YDR487C	YER034W	YFL021W	YGL056C	YGR060W	YGR251W	YHR050W-A
YDR508C	YER035W	YFL022C	YGL063W	YGR067C	YGR252W	YHR051W
YDR509W	YER036C	YFL023W	YGL064C	YGR068W-A	YGR253C	YHR052W
YDR510W	YER037W	YFL024C	YGL088W	YGR105W	YGR264C	YHR061C
YDR524C	YER055C	YFL031W	YGL101W	YGR106C	YGR265W	YHR064C
YDR524C-A	YER056C	YFL032W	YGL102C	YGR117C	YGR267C	YHR070C-A
YDR524C-B	YER064C	YFL033C	YGL121C	YGR118W	YGR268C	YHR071W
YDR524W-C	YER071C	YFL036W	YGL122C	YGR121C	YGR269W	YHR077C
YDR525W	YER072W	YFL037W	YGL123C-A	YGR121W-A	YGR270C-A	YHR078W
YDR525W-A	YER089C	YFL038C	YGL123W	YGR122W	YGR270W	YHR080C

YHR081W	YILO53W	YJL069C	YJR045C	YKL007W	YKL190W	YLL011W
YHR090C	YILO54W	YJL076W	YJR046W	YKL008C	YKL191W	YLL012W
YHR114W	YILO55C	YJL077C	YJR047C	YKL014C	YKL192C	YLL013C
YHR115C	YILO57C	YJL077W-A	YJR048W	YKL019W	YKL195W	YLL028W
YHR116W	YILO78W	YJL077W-B	YJR055W	YKL020C	YKL196C	YLL029W
YHR136C	YILO79C	YJL078C	YJR062C	YKL022C	YKL198C	YLL033W
YHR137W	YILO90W	YJL104W	YJR063W	YKL028W	YKL207W	YLL034C
YHR158C	YILO91C	YJL111W	YJR077C	YKL029C	YKL209C	YLL044W
YHR159W	YIL102C	YJL112W	YJR078W	YKL030W	YKL210W	YLL045C
YHR161C	YIL102C-A	YJL133C-A	YJR085C	YKL031W	YKL211C	YLL046C
YHR162W	YIL128W	YJL133W	YJR086W	YKL032C	YKL217W	YLL047W
YHR163W	YIL129C	YJL140W	YJR087W	YKL053C-A	YKL218C	YLL063C
YHR165C	YIL134C-A	YJL141C	YJR088C	YKL053W	YKR015C	YLL065W
YHR165W-A	YIL134W	YJL148W	YJR089W	YKL054C	YKR016W	YLR023C
YHR173C	YIL135C	YJL149W	YJR093C	YKL056C	YKR029C	YLR024C
YHR174W	YIR010W	YJL150W	YJR094W-A	YKL057C	YKR030W	YLR025W
YHR180C-B	YIR015W	YJL151C	YJR104C	YKL060C	YKR038C	YLR027C
YHR180W-A	YIR016W	YJL152W	YJR105W	YKL062W	YKR042W	YLR029C
YHR181W	YIR021W-A	YJL153C	YJR115W	YKL063C	YKR045C	YLR030W
YHR199C	YIR022W	YJL159W	YJR116W	YKL068W-A	YKR046C	YLR051C
YHR199C-A	YIR023W	YJL161W	YJR117W	YKL078W	YKR047W	YLR052W
YHR200W	YJL007C	YJL162C	YJR119C	YKL094W	YKR056W	YLR055C
YHR210C	YJL008C	YJL174W	YJR120W	YKL095W	YKR057W	YLR056W
YHR217C	YJL011C	YJL175W	YJR121W	YKL106C-A	YKR059W	YLR059C
YILO03W	YJL014W	YJL176C	YJR123W	YKL106W	YKR068C	YLR060W
YILO04C	YJL015C	YJL177W	YJR125C	YKL110C	YKR069W	YLR095C
YILO25C	YJL028W	YJL183W	YJR127C	YKL112W	YKR072C	YLR096W
YILO26C	YJL029C	YJL184W	YJR128W	YKL113C	YKR073C	YLR110C
YILO31W	YJL042W	YJL201W	YJR137C	YKL143W	YKR074W	YLR111W
YILO32C	YJL053W	YJL202C	YJR138W	YKL144C	YKR075C	YLR112W
YILO33C	YJL062W	YJL203W	YJR145C	YKL165C	YKR076W	YLR117C
YILO41W	YJL062W-A	YJL204C	YJR146W	YKL172W	YKR081C	YLR118C
YILO42C	YJL063C	YJR005C-A	YJR147W	YKL182W	YKR082W	YLR119W
YILO46W	YJL064W	YJR006W	YJR151W-A	YKL183C-A	YKR098C	YLR131C
YILO46W-A	YJL065C	YJR017C	YJR162C	YKL183W	YKR099W	YLR139C
YILO48W	YJL067W	YJR018W	YKL004W	YKL186C	YLL009C	YLR140W
YILO49W	YJL068C	YJR025C	YKL005C	YKL189W	YLL010C	YLR141W

Appendice

YLR174W	YLR332W	YML014W	YMR145C	YNL105W	YNL288W	YOL068C
YLR179C	YLR333C	YML015C	YMR194C-A	YNL106C	YNL302C	YOL076W
YLR180W	YLR334C	YML016C	YMR194C-B	YNL112W	YNL306W	YOL077C
YLR185W	YLR335W	YML038C	YMR195W	YNL113W	YNL307C	YOL077W-A
YLR186W	YLR347C	YML048W	YMR203W	YNL114C	YNL321W	YOL086C
YLR192C	YLR348C	YML049C	YMR204C	YNL115C	YNL322C	YOL086W-A
YLR193C	YLR349W	YML081C-A	YMR205C	YNL116W	YNR001W-A	YOL100W
YLR197W	YLR355C	YML081W	YMR206W	YNL117W	YNR017W	YOL109W
YLR222C	YLR364C-A	YML100W	YMR216C	YNL118C	YNR020C	YOL110W
YLR222C-A	YLR365W	YML100W-A	YMR217W	YNL119W	YNR021W	YOL111C
YLR225C	YLR366W	YML101C	YMR225C	YNL120C	YNR035C	YOL116W
YLR226W	YLR367W	YML101C-A	YMR235C	YNL121C	YNR036C	YOL120C
YLR228C	YLR370C	YML120C	YMR236W	YNL144C	YNR037C	YOL125W
YLR229C	YLR371W	YMR001C	YMR237W	YNL147W	YNR038W	YOL126C
YLR230W	YLR373C	YMR001C-A	YMR246W	YNL148C	YNR046W	YOR020C
YLR249W	YLR374C	YMR002W	YMR260C	YNL149C	YNR047W	YOR020W-A
YLR250W	YLR375W	YMR003W	YMR267W	YNL150W	YNR052C	YOR026W
YLR257W	YLR396C	YMR030W-A	YMR280C	YNL179C	YNR053C	YOR027W
YLR259C	YLR399C	YMR033W	YMR281W	YNL180C	YNR054C	YOR030W
YLR260W	YLR399W-A	YMR060C	YMR296C	YNL183C	YNR074C	YOR044W
YLR264C-A	YLR400W	YMR061W	YMR297W	YNL186W	YNR075W	YOR045W
YLR264W	YLR401C	YMR062C	YMR302C	YNL189W	YNR077C	YOR056C
YLR278C	YLR402W	YMR063W	YMR309C	YNL209W	YOL013W-A	YOR057W
YLR279W	YLR403W	YMR064W	YMR326C	YNL210W	YOL019W-A	YOR058C
YLR280C	YLR406C-A	YMR069W	YNL004W	YNL212W	YOL025W	YOR063W
YLR281C	YLR407W	YMR070W	YNL005C	YNL213C	YOL026C	YOR072W-B
YLR282C	YLR421C	YMR078C	YNL036W	YNL230C	YOL034W	YOR073W
YLR283W	YLR422W	YMR079W	YNL037C	YNL231C	YOL035C	YOR077W
YLR291C	YLR438C-A	YMR083W	YNL043C	YNL243W	YOL036W	YOR078W
YLR292C	YLR439W	YMR086W	YNL044W	YNL244C	YOL040C	YOR082C
YLR293C	YLR441C	YMR092C	YNL059C	YNL245C	YOL041C	YOR083W
YLR294C	YLR453C	YMR093W	YNL063W	YNL251C	YOL051W	YOR086C
YLR295C	YLR454W	YMR129W	YNL064C	YNL254C	YOL052C	YOR087W
YLR296W	YML001W	YMR130W	YNL071W	YNL255C	YOL055C	YOR089C
YLR314C	YML012C-A	YMR142C	YNL085W	YNL267W	YOL059W	YOR092W
YLR315W	YML012W	YMR143W	YNL086W	YNL268W	YOL060C	YOR098C
YLR331C	YML013W	YMR144W	YNL103W	YNL287W	YOL067C	YOR099W

YOR108W	YOR204W	YOR290C	YPL016W	YPL228W	YPR052C	YPR169W-A
YOR116C	YOR207C	YOR291W	YPL017C	YPL230W	YPR053C	YPR170C
YOR117W	YOR208W	YOR292C	YPL036W	YPL237W	YPR054W	YPR170W-A
YOR122C	YOR209C	YOR293W	YPL037C	YPL238C	YPR063C	YPR170W-B
YOR141C	YOR210W	YOR302W	YPL050C	YPL239W	YPR064W	YPR181C
YOR142W	YOR213C	YOR310C	YPL061W	YPL242C	YPR065W	YPR182W
YOR145C	YOR214C	YOR316C-A	YPL062W	YPL249C-A	YPR080W	YPR183W
YOR146W	YOR224C	YOR317W	YPL081W	YPL250C	YPR104C	YPR184W
YOR147W	YOR225W	YOR322C	YPL082C	YPL250W-A	YPR110C	YPR186C
YOR148C	YOR226C	YOR324C	YPL111W	YPR010C-A	YPR111W	YPR187W
YOR157C	YOR227W	YOR326W	YPL112C	YPR017C	YPR128C	YPR190C
YOR158W	YOR231W	YOR343C	YPL129W	YPR018W	YPR129W	YPR191W
YOR163W	YOR234C	YOR343W-A	YPL135C-A	YPR033C	YPR130C	YPR202W
YOR164C	YOR235W	YOR343W-B	YPL135W	YPR034W	YPR132W	
YOR167C	YOR236W	YOR344C	YPL137C	YPR035W	YPR136C	
YOR168W	YOR237W	YOR348C	YPL146C	YPR036W	YPR137W	
YOR194C	YOR261C	YOR354C	YPL156C	YPR045C	YPR144C	
YOR195W	YOR262W	YOR357C	YPL160W	YPR046W	YPR145W	
YOR201C	YOR267C	YOR358W	YPL161C	YPR047W	YPR148C	
YOR202W	YOR268C	YPL012W	YPL177C	YPR050C	YPR159W	
YOR203W	YOR269W	YPL013C	YPL222C-A	YPR051W	YPR165W	

Lista dei geni associati *in vivo* a Reb1:

YAL017W	YBL083C	YBR171W	YCR067C	YDL155W	YDR041W	YDR211W
YAL018C	YBL084C	YBR173C	YCR068W	YDL161W	YDR050C	YDR214W
YAL025C	YBR017C	YBR174C	YCR094W	YDL162C	YDR059C	YDR219C
YAL028W	YBR034C	YBR175W	YCR095C	YDL163W	YDR060W	YDR220C
YAL029C	YBR035C	YBR179C	YCR095W-A	YDL164C	YDR072C	YDR221W
YAL030W	YBR036C	YBR180W	YCR108C	YDL172C	YDR073W	YDR231C
YAL031C	YBR049C	YBR182C-A	YDL004W	YDL173W	YDR090C	YDR232W
YAL053W	YBR051W	YBR183W	YDL005C	YDL174C	YDR092W	YDR238C
YAL054C	YBR053C	YBR198C	YDL007W	YDL175C	YDR094W	YDR257C
YBL011W	YBR056W-A	YBR199W	YDL025C	YDL184C	YDR095C	YDR271C
YBL012C	YBR065C	YBR209W	YDL029W	YDL186W	YDR099W	YDR272W
YBL013W	YBR076C-A	YBR218C	YDL031W	YDL187C	YDR101C	YDR298C
YBL014C	YBR077C	YBR219C	YDL032W	YDL188C	YDR102C	YDR299W
YBL029C-A	YBR081C	YBR222C	YDL033C	YDL207W	YDR103W	YDR303C
YBL032W	YBR090C	YBR223W-A	YDL045W-A	YDL208W	YDR122W	YDR306C
YBL033C	YBR091C	YBR229C	YDL046W	YDL209C	YDR143C	YDR307W
YBL036C	YBR095C	YBR236C	YDL047W	YDL212W	YDR144C	YDR313C
YBL043W	YBR096W	YBR237W	YDL068W	YDL213C	YDR145W	YDR323C
YBL044W	YBR112C	YBR252W	YDL070W	YDL215C	YDR151C	YDR328C
YBL045C	YBR114W	YBR253W	YDL071C	YDL221W	YDR152W	YDR333C
YBL046W	YBR126C	YCL017C	YDL072C	YDL222C	YDR153C	YDR334W
YBL047C	YBR126W-A	YCL040W	YDL085C-A	YDL224C	YDR154C	YDR359C
YBL050W	YBR126W-B	YCL041C	YDL085W	YDL225W	YDR155C	YDR360W
YBL051C	YBR127C	YCL042W	YDL086W	YDL226C	YDR156W	YDR389W
YBL052C	YBR130C	YCL043C	YDL087C	YDL232W	YDR157W	YDR451C
YBL054W	YBR131W	YCL054W	YDL095W	YDL235C	YDR158W	YDR452W
YBL055C	YBR133C	YCL057C-A	YDL096C	YDR003W	YDR161W	YDR457W
YBL058W	YBR134W	YCL057W	YDL097C	YDR016C	YDR173C	YDR465C
YBL059C-A	YBR135W	YCL058C	YDL127W	YDR028C	YDR174W	YDR466W
YBL059W	YBR143C	YCR011C	YDL132W	YDR029W	YDR187C	YDR477W
YBL073W	YBR162W-A	YCR012W	YDL137W	YDR032C	YDR188W	YDR496C
YBL074C	YBR163W	YCR015C	YDL139C	YDR034C-C	YDR190C	YDR498C
YBL076C	YBR164C	YCR031C	YDL140C	YDR034C-D	YDR191W	YDR499W
YBL077W	YBR165W	YCR032W	YDL147W	YDR036C	YDR207C	YDR508C
YBL078C	YBR170C	YCR042C	YDL148C	YDR037W	YDR208W	YDR510C-A

YDR510W	YER020W	YER156C	YGL066W	YGL240W	YGR147C	YHL006C
YDR511W	YER021W	YER157W	YGL068W	YGL244W	YGR148C	YHL006W-A
YDR520C	YER025W	YER159C	YGL069C	YGL247W	YGR156W	YHL007C
YDR521W	YER033C	YER176W	YGL070C	YGL248W	YGR172C	YHL015W
YDR524C-A	YER034W	YER178W	YGL086W	YGR002C	YGR173W	YHL030W
YDR524C-B	YER036C	YER188C-A	YGL087C	YGR003W	YGR178C	YHL030W-A
YDR525W	YER037W	YFL005W	YGL088W	YGR009C	YGR179C	YHL031C
YDR525W-A	YER039C	YFL007W	YGL089C	YGR010W	YGR184C	YHR006W
YDR543C	YER039C-A	YFL014W	YGL097W	YGR011W	YGR194C	YHR022C-A
YDR544C	YER040W	YFL015C	YGL098W	YGR012W	YGR195W	YHR023W
YEL001C	YER048W-A	YFL015W-A	YGL119W	YGR024C	YGR199W	YHR026W
YEL012W	YER050C	YFL016C	YGL120C	YGR025W	YGR202C	YHR039C
YEL013W	YER051W	YFL021W	YGL125W	YGR026W	YGR203W	YHR039C-A
YEL014C	YER055C	YFL022C	YGL126W	YGR037C	YGR204W	YHR040W
YEL022W	YER062C	YFL023W	YGL139W	YGR038W	YGR218W	YHR054C
YEL023C	YER063W	YFL024C	YGL140C	YGR043C	YGR220C	YHR054W-A
YEL026W	YER064C	YFL037W	YGL151W	YGR044C	YGR231C	YHR055C
YEL027W	YER065C	YFL038C	YGL152C	YGR045C	YGR232W	YHR075C
YEL032W	YER066C-A	YFL039C	YGL160W	YGR046W	YGR235C	YHR083W
YEL033W	YER067C-A	YFR001W	YGL161C	YGR053C	YGR236C	YHR086W
YEL034C-A	YER067W	YFR002W	YGL166W	YGR054W	YGR241C	YHR126C
YEL038W	YER068W	YFR018C	YGL167C	YGR056W	YGR242W	YHR127W
YEL039C	YER070W	YFR019W	YGL181W	YGR060W	YGR243W	YHR135C
YEL042W	YER087C-A	YFR028C	YGL182C	YGR067C	YGR264C	YHR136C
YEL051W	YER087C-B	YFR032C-B	YGL183C	YGR078C	YGR265W	YHR153C
YEL059C-A	YER091C	YFR033C	YGL191W	YGR079W	YGR266W	YHR154W
YEL059W	YER091C-A	YFR050C	YGL198W	YGR080W	YGR267C	YHR162W
YEL060C	YER092W	YFR051C	YGL199C	YGR084C	YGR268C	YHR170W
YEL062W	YER094C	YFR052W	YGL200C	YGR114C	YGR269W	YHR203C
YEL063C	YER095W	YGL006W-A	YGL202W	YGR116W	YGR280C	YHR204W
YER002W	YER105C	YGL036W	YGL205W	YGR130C	YGR281W	YHR206W
YER012W	YER106W	YGL037C	YGL206C	YGR132C	YGR284C	YHR217C
YER013W	YER111C	YGL043W	YGL215W	YGR133W	YGR285C	YIL002W-A
YER017C	YER136W	YGL044C	YGL225W	YGR134W	YGR288W	YIL022W
YER018C	YER145C	YGL055W	YGL237C	YGR135W	YGR296W	YIL023C
YER019C-A	YER145C-A	YGL056C	YGL238W	YGR141W	YHL004W	YIL061C
YER019W	YER146W	YGL058W	YGL239C	YGR145W	YHL005C	YIL062C

Appendice

YIL075C	YJL039C	YJR097W	YKL121W	YKR096W	YLR150W	YLR356W
YIL096C	YJL043W	YJR098C	YKL122C	YLL008W	YLR161W	YLR357W
YIL105C	YJL044C	YJR099W	YKL125W	YLL009C	YLR162W	YLR358C
YIL106W	YJL051W	YJR115W	YKL142W	YLL010C	YLR162W-A	YLR359W
YIL107C	YJL076W	YJR122W	YKL145W	YLL012W	YLR168C	YLR378C
YIL108W	YJL077C	YJR127C	YKL145W-A	YLL013C	YLR169W	YLR379W
YIL109C	YJL077W-A	YJR128W	YKL146W	YLL014W	YLR170C	YLR380W
YIL112W	YJL089W	YJR137C	YKL147C	YLL021W	YLR171W	YLR388W
YIL113W	YJL090C	YJR138W	YKL148C	YLL022C	YLR174W	YLR389C
YIL116W	YJL106W	YJR162C	YKL182W	YLL027W	YLR195C	YLR390W
YIL118W	YJL107C	YKL009W	YKL190W	YLL029W	YLR196W	YLR390W-A
YIL121W	YJL111W	YKL010C	YKL202W	YLL030C	YLR197W	YLR401C
YIL125W	YJL124C	YKL024C	YKL203C	YLL031C	YLR212C	YLR402W
YIL126W	YJL143W	YKL025C	YKR001C	YLL039C	YLR223C	YLR412W
YIL127C	YJL144W	YKL030W	YKR002W	YLL040C	YLR224W	YLR426W
YIL128W	YJL149W	YKL034W	YKR006C	YLL049W	YLR229C	YLR455W
YIL129C	YJL150W	YKL045W	YKR007W	YLL050C	YLR230W	YLR466C-B
YIL145C	YJL151C	YKL046C	YKR011C	YLL065W	YLR249W	YML001W
YIL148W	YJL158C	YKL051W	YKR015C	YLR010C	YLR255C	YML007C-A
YIL149C	YJL187C	YKL052C	YKR016W	YLR025W	YLR256W	YML007W
YIL151C	YJL194W	YKL053C-A	YKR028W	YLR026C	YLR261C	YML008C
YIL159W	YJL196C	YKL053W	YKR033C	YLR027C	YLR262C	YML010W
YIL160C	YJL198W	YKL057C	YKR035W-A	YLR033W	YLR262C-A	YML011C
YIR002C	YJL199C	YKL058W	YKR040C	YLR082C	YLR275W	YML030W
YIR003W	YJR007W	YKL059C	YKR041W	YLR093C	YLR277C	YML039W
YIR013C	YJR047C	YKL063C	YKR048C	YLR094C	YLR279W	YML040W
YIR014W	YJR048W	YKL064W	YKR049C	YLR111W	YLR280C	YML041C
YIR015W	YJR052W	YKL065C	YKR063C	YLR112W	YLR281C	YML042W
YIR016W	YJR065C	YKL072W	YKR064W	YLR113W	YLR283W	YML043C
YJL001W	YJR066W	YKL080W	YKR068C	YLR114C	YLR297W	YML052W
YJL002C	YJR076C	YKL081W	YKR069W	YLR115W	YLR298C	YML053C
YJL006C	YJR085C	YKL082C	YKR075C	YLR129W	YLR299W	YML058W-A
YJL019W	YJR086W	YKL086W	YKR075W-A	YLR139C	YLR307C-A	YML059C
YJL020C	YJR087W	YKL087C	YKR076W	YLR140W	YLR308W	YML081C-A
YJL028W	YJR090C	YKL104C	YKR079C	YLR141W	YLR309C	YML081W
YJL029C	YJR091C	YKL111C	YKR080W	YLR149C	YLR351C	YML082W
YJL033W	YJR092W	YKL117W	YKR095W	YLR149C-A	YLR352W	YML083C

YML084W	YMR139W	YMR311C	YNL158W	YNR017W	YOR025W	YOR199W
YML085C	YMR140W	YMR312W	YNL159C	YNR036C	YOR044W	YOR200W
YML102W	YMR146C	YMR326C	YNL161W	YNR037C	YOR046C	YOR203W
YML103C	YMR147W	YNL006W	YNL168C	YNR038W	YOR048C	YOR204W
YML113W	YMR148W	YNL007C	YNL169C	YNR039C	YOR063W	YOR223W
YML114C	YMR149W	YNL008C	YNL177C	YNR040W	YOR071C	YOR226C
YML119W	YMR153W	YNL016W	YNL184C	YNR052C	YOR072W	YOR227W
YML120C	YMR182C	YNL017C	YNL185C	YNR077C	YOR072W-A	YOR236W
YML121W	YMR182W-A	YNL048W	YNL186W	YOL004W	YOR072W-B	YOR237W
YML122C	YMR183C	YNL049C	YNL190W	YOL005C	YOR073W	YOR246C
YML123C	YMR184W	YNL065W	YNL197C	YOL006C	YOR073W-A	YOR247W
YML124C	YMR185W	YNL066W	YNL198C	YOL011W	YOR074C	YOR259C
YML129C	YMR186W	YNL075W	YNL199C	YOL012C	YOR075W	YOR260W
YMR001C	YMR188C	YNL078W	YNL220W	YOL020W	YOR076C	YOR265W
YMR001C-A	YMR189W	YNL079C	YNL221C	YOL021C	YOR077W	YOR268C
YMR002W	YMR190C	YNL080C	YNL228W	YOL023W	YOR093C	YOR269W
YMR003W	YMR191W	YNL089C	YNL229C	YOL038C-A	YOR094W	YOR271C
YMR013C	YMR194C-A	YNL090W	YNL232W	YOL039W	YOR100C	YOR272W
YMR013C-A	YMR194C-B	YNL091W	YNL243W	YOL051W	YOR101W	YOR275C
YMR015C	YMR205C	YNL103W	YNL244C	YOL052C	YOR116C	YOR276W
YMR017W	YMR206W	YNL104C	YNL245C	YOL086W-A	YOR117W	YOR285W
YMR019W	YMR207C	YNL110C	YNL262W	YOL092W	YOR122C	YOR287C
YMR039C	YMR208W	YNL111C	YNL263C	YOL100W	YOR123C	YOR290C
YMR040W	YMR214W	YNL112W	YNL271C	YOL101C	YOR128C	YOR291W
YMR047C	YMR221C	YNL113W	YNL279W	YOL109W	YOR148C	YOR298C-A
YMR048W	YMR222C	YNL114C	YNL280C	YOL110W	YOR149C	YOR299W
YMR049C	YMR257C	YNL115C	YNL281W	YOL111C	YOR150W	YOR302W
YMR076C	YMR265C	YNL117W	YNL284C	YOL123W	YOR151C	YOR303W
YMR107W	YMR266W	YNL118C	YNL301C	YOL124C	YOR152C	YOR318C
YMR108W	YMR280C	YNL124W	YNL304W	YOL129W	YOR157C	YOR319W
YMR117C	YMR281W	YNL125C	YNL305C	YOL139C	YOR158W	YOR324C
YMR118C	YMR290C	YNL126W	YNL308C	YOL142W	YOR186C-A	YOR325W
YMR121C	YMR290W-A	YNL132W	YNL330C	YOL143C	YOR186W	YOR326W
YMR122C	YMR291W	YNL133C	YNR011C	YOL148C	YOR187W	YOR335C
YMR122W-A	YMR292W	YNL144C	YNR012W	YOR021C	YOR196C	YOR336W
YMR123W	YMR296C	YNL149C	YNR013C	YOR023C	YOR197W	YOR349W
YMR124W	YMR306W	YNL157W	YNR014W	YOR024W	YOR198C	YOR353C

Appendice

YOR361C	YPL075W	YPL161C	YPL207W	YPL266W	YPR067W	YPR134W
YOR371C	YPL077C	YPL168W	YPL211W	YPL267W	YPR072W	YPR144C
YOR372C	YPL078C	YPL169C	YPL212C	YPL269W	YPR074C	YPR149W
YOR373W	YPL111W	YPL170W	YPL215W	YPR016C	YPR074W-A	YPR156C
YOR394C-A	YPL116W	YPL171C	YPL218W	YPR016W-A	YPR080W	YPR157W
YPL016W	YPL117C	YPL178W	YPL225W	YPR025C	YPR091C	YPR163C
YPL017C	YPL120W	YPL180W	YPL231W	YPR026W	YPR098C	YPR164W
YPL027W	YPL121C	YPL181W	YPL237W	YPR029C	YPR099C	YPR181C
YPL036W	YPL126W	YPL183C	YPL238C	YPR030W	YPR100W	YPR182W
YPL037C	YPL127C	YPL189C-A	YPL249C-A	YPR035W	YPR101W	YPR183W
YPL054W	YPL143W	YPL189W	YPL250C	YPR036W	YPR102C	YPR202W
YPL055C	YPL152W	YPL190C	YPL250W-A	YPR042C	YPR103W	
YPL059W	YPL152W-A	YPL204W	YPL255W	YPR043W	YPR119W	
YPL067C	YPL155C	YPL205C	YPL260W	YPR055W	YPR133C	
YPL068C	YPL160W	YPL206C	YPL261C	YPR066W	YPR133W-A	

Pubblicazioni:

- Preti, M., Ribeyre, C., Pascali, C., Bosio, M.C., Cortelazzi, B., Rougemont, J., Guarnera, E., Naef, F., Shore, D. and Dieci, G. (2010) The telomere-binding protein Tbf1 demarcates snoRNA gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 38, 614-620.
- Bosio MC, Negri R, Dieci G. (2011) Promoter architectures in the yeast ribosomal expression program. *Transcription*. 2, 71-77.
- Dieci, G., Bosio, M.C., Fermi, B. and Ferrari, R. (2012) Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochim Biophys Acta*.

Eccoci finalmente alla conclusione della tesi...incredibile ci sono riuscita anche se non so ancora bene come. Anzi no in realtà lo so.. grazie a tutte le persone che mi sono state accanto durante il dottorato e in questi ultimi mesi che mi hanno spinto a tenere duro e continuato a ripetere “dai che ce la fai, ce la puoi fare, ce la devi fare”.

Grazie al Prof. Dieci che mi ha permesso di continuare a cimentarmi in questo lavoro tanto difficile quanto magnetico e intrigante. Grazie al mitico tutto fare Roberto F. per le ChIP-seq, i consigli, l'aiuto, la carica e l'entusiasmo nel fare ricerca.

Grazie a Mamma e Papà a cui dedico tutto il buono che posso aver fatto fino a ora e che cercherò di fare in futuro. Siete un grande esempio e vi ringrazio per tutto ciò che fate, per avermi permesso di studiare, per la vostra fiducia e per la spinta a cercare di dare il meglio nella consapevolezza dei miei limiti. Insieme a voi grazie anche a Chiara e Andrea, le altre due colonne della mia famiglia, per gli insegnamenti, i consigli, il sostegno. Grazie a Giulio e Erica che vi prendete cura di loro e dei vostri gioielli Stella e Rachele.

Grazie a Jack, la mano tesa che mi solleva da terra, l'abbraccio, il filo che tiene la Cri legata alla vita vera, grazie per il silenzioso aiuto nei momenti più difficili e perché rendi tutto speciale.

Grazie agli Amici (i ringraziamenti singoli ve li faccio personalizzati a parte) che, soprattutto in questo ultimo anno, mi sono stati vicini in tanti modi diversi, la vostra presenza mi riempie di gratitudine e mi fa rendere conto di essere davvero, davvero fortunata.

A tutti auguro tutta la felicità possibile!!!!