



“SAPIENZA-UNIVERSITÀ di Roma”

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dottorato di ricerca in Biologia Cellulare e dello Sviluppo

XXII ciclo

**Coordinatore:** prof. Rodolfo Negri

**Metabolismo fermentativo nel lievito *Kluyveromyces lactis*:  
regolazione ossigeno-dipendente e autoregolazione  
del gene *KIPDC1***

**Dottoranda**

Chiara Micolonghi

**Docente guida:**  
Prof. Michele M. Bianchi

**Docente tutore:**  
Prof. Rodolfo Negri

*Anno accademico 2008-2009*

# INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	4
<b>1. Il lievito <i>Kluyveromyces lactis</i></b>	5
1.1. Caratteristiche generali	5
1.2. Genoma nucleare e mitocondriale	6
1.3. Plasmidi nucleari e citoplasmatici	7
1.4. Metabolismo del lattosio e del galattosio	9
1.5. Metabolismo del glucosio	11
1.6. Geni <i>RAG</i> e loro regolazione	13
1.7. <i>RAG3</i>	16
1.8. <i>RAG6 (PDC1)</i>	19
1.8.1. Autoregolazione del gene <i>PDC1</i>	23
1.8.2. Regolazione ossigeno-dipendente del gene <i>PDC1</i>	25
<b>2. L'ossigeno</b>	27
2.1. La risposta all'ossigeno nei batteri	28
2.2. La risposta all'ossigeno negli eucarioti superiori	30
2.3. La risposta all'ossigeno in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.3.1. L'eme e la risposta mediata da Hap1	33
2.3.2. Il complesso Hap2/3/4/5	37
2.3.3. Il repressore Rox1	38
2.3.4. Il repressore Mot3	41
2.3.5. Il regolatore Mga2	43
2.4. La risposta all'ossigeno in <i>K. lactis</i>	46
 <b>SCOPO DEL LAVORO</b>	 47
 <b>RISULTATI</b>	 49
<b>1. Autoregolazione</b>	50
1.1. Analisi della sequenza amminoacidica di Rag3	50
1.2. Sequenziamento del gene <i>RAG3</i> nel mutante dell'autoregolazione	50
1.3. Interazione tra Rag3 e Pdc1	51
1.4. Localizzazione di Rag3 e di Pdc1	52
1.4.1. Osservazione delle cellule al microscopio	52
1.4.2. Analisi western degli estratti citoplasmatico e nucleare	54
1.5. Espressione di <i>RAG3</i> in risposta a diverse fonti di carbonio	56
1.6. Espressione Rag3-dipendente id <i>KIPDC1</i> in glucosio e/o etanolo	57
1.7. Legame di Rag3 al promotore di <i>PDC1</i>	58
<b>2. Regolazione ossigeno-dipendente</b>	59
2.1. Costruzione dei ceppi CSK e GDK	59
2.2. Mutagenesi <i>random</i> e analisi dei mutanti. Il mutante CSK27	59
2.2.1. Analisi del ceppo CSK27	61
2.2.2. Espressione di <i>PDC1</i> in CSK27 e in PM6-7A/VV32	62
2.3. Caratterizzazione di <i>KIROX1</i> , <i>KIMOT3</i> e <i>KIMGA2</i>	63
2.3.1. Analisi computazionale	63
2.3.2. Costruzione dei ceppi deleti per <i>KIROX1</i> , <i>KIMOT3</i> e <i>KIMGA2</i>	65
2.3.3. Analisi fenotipica	66

2.3.4. Attività del promotore di <i>PDC1</i> nei mutanti $\Delta$ <i>KIROX1</i> , $\Delta$ <i>KIMOT3</i> e $\Delta$ <i>KIMG2</i>	68
2.3.5. Analisi quantitativa dei trascritti di <i>KIROX1</i> , <i>KIMOT3</i> e <i>KIMG2</i>	69
2.3.6. Analisi dei putativi geni bersaglio	70
<b>DISCUSSIONE</b>	72
1. Autoregolazione	73
2. Regolazione ossigeno-dipendente	76
<b>MATERIALI E METODI</b>	79
1. Ceppi e terreni di coltura	80
2. Plasmidi utilizzati	84
3. Estrazione e manipolazione del DNA	86
4. Trasformazione di cellule batteriche	89
5. Trasformazione di cellule di lievito mediante elettroporazione	90
6. Mutagenesi <i>random</i> e <i>screening</i> dei mutanti	92
7. Saggi di attività beta-galattosidasi	93
8. Separazione degli estratti proteici citoplasmatici e nucleoplasmatici	95
9. Western Blot	96
10. Estrazione e retrotrascrizione di RNA	97
11. Real-Time PCR	99
12. Northern Blot	102
13. DNA- <i>affinity capture</i>	104
14. Programmi utilizzati	106
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	107
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	121

# **INTRODUZIONE**

# 1. Il lievito *Kluyveromyces lactis*

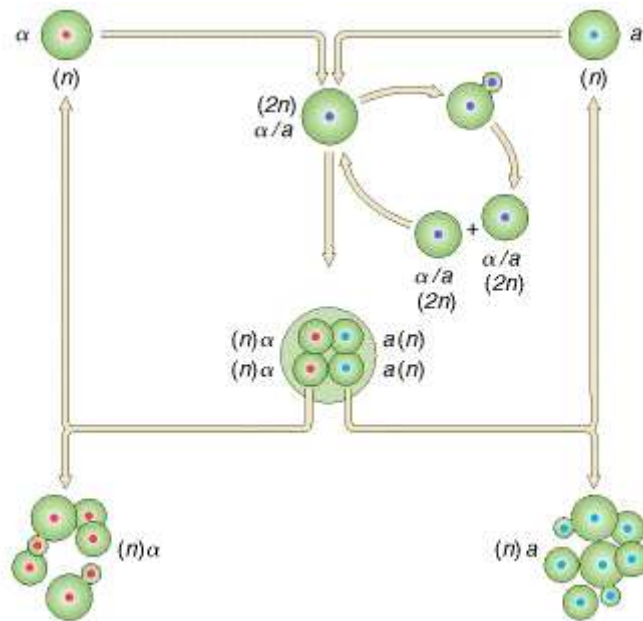
## 1.1. Caratteristiche generali

Il lievito *Kluyveromyces lactis*, inizialmente classificato come *Saccharomyces lactis* prima e come *Kluyveromyces fragilis* var. *lactis* poi, è oggi considerato una specie a sé, appartenente alla divisione degli ascomiceti (Schaffrath e Breunig, 2000).

*K. lactis*, dal punto di vista filogenetico, è strettamente correlato a *Saccharomyces cerevisiae*, ma appartiene al gruppo di lieviti in cui non si è verificata la cosiddetta duplicazione dell'intero genoma (*Whole Genome Duplication*, WGD) (Wolfe e Shields, 1997; Dietrich *et al.*, 2004; Kellis *et al.*, 2004).

Le cellule hanno una forma ovo-sferoidale di grandezza minore rispetto a quelle di *S. cerevisiae*. Il suo habitat naturale è vario, ma molti ceppi sono stati isolati da derivati del latte. La sua caratteristica principale, molto rara tra i lieviti, è infatti la capacità di crescere su lattosio come unica fonte di carbonio grazie alla presenza di una permeasi specifica che trasporta lo zucchero all'interno della cellula e una  $\beta$ -galattosidasi che lo scinde in glucosio e galattosio (Chang e Dickinson, 1988; Poch *et al.*, 1992).

*K. lactis* è un organismo eterotallico e il suo ciclo vitale (fig. I-1) è costituito da una fase aploide e una diploide. La riproduzione asessuata avviene per gemmazione, mentre quella sessuata inizia con la fusione per coniugazione di due cellule di tipo sessuale opposto ( $a$  e  $\alpha$ ). A differenza di molti lieviti, tra cui *S. cerevisiae*, nella maggior parte dei ceppi di *K. lactis* la fase diploide è solo transitoria (Herman e Halvorson, 1963); le cellule diploidi, soprattutto quando vi è scarsità di nutrienti nel mezzo di crescita, vanno incontro a meiosi e sporulazione spontanee generando un asco contenente quattro spore aploidi.



**Figura I-1** – Ciclo vitale del lievito: cellule aploidi (a e  $\alpha$ ) possono sia dividersi per mitosi, sia fondersi in una cellula diploide; quest'ultima potrà a sua volta o riprodursi per mitosi o sporulare formando aschi con quattro spore aploidi.

*K. lactis* possiede delle caratteristiche che lo rendono un ottimo ospite per la produzione di proteine eterologhe: è un organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Bonekamp e Oosterom, 1994) e possiede una buona stabilità mitotica dei vettori d'espressione; inoltre è caratterizzato da un'ottima efficienza di secrezione delle proteine nel terreno di coltura. Alcuni esempi di molecole prodotte utilizzando questo lievito sono la prochimosina, l'albumina serica umana, l'interleuchina 1- $\beta$  umana, la  $\beta$ -galattosidasi ovina, la glucoamilasi fungina e la xilanasi termostabile batterica (Van der Berg *et al.*, ; Fler *et al.*, 1991a; Fler *et al.*, 1991b; Rocha *et al.*, 1996; Bui *et al.*, 1997; Walsh, e Bergquist, 1997); tra queste, la prochimosina è l'unica ad essere prodotta a livello industriale e commercializzata.

## 1.2. Genoma nucleare e mitocondriale

Il sequenziamento del genoma di *K. lactis* è stato ultimato nel 2004 (Dujon *et al.*, 2004; EMBL codice CR382121-CR382126). Il genoma nucleare aploide ha un contenuto

in GC pari al 38,7%, paragonabile a quello di *S. cerevisiae*. Il cariotipo comprende sei cromosomi, formalmente indicati con una lettera: da A, il più piccolo (circa 1 Mb), ad F, il più grande (circa 3 Mb) (Sor e Fukuhara, 1989). Le dimensioni del genoma, pari a circa 12 Mb, non differiscono molto da quelle del genoma di *S. cerevisiae* ma il minor numero e le maggiori dimensioni dei cromosomi sono tipici dei cosiddetti lieviti non convenzionali (o non-*Saccharomyces*).

Il mtDNA è organizzato in una molecola circolare di circa 40 Kbp, mantenuto in circa 30 copie per cellula, corrispondenti al 10% del contenuto totale di DNA. Il suo sequenziamento ha rivelato che solo un terzo di esso è occupato da sequenze codificanti mentre la parte rimanente è caratterizzata da un elevato numero di sequenze ricche in AT e *clusters* ricchi in GC. Sono presenti 22 geni che codificano per i tRNA (Zivanovic *et al.*, 2005).

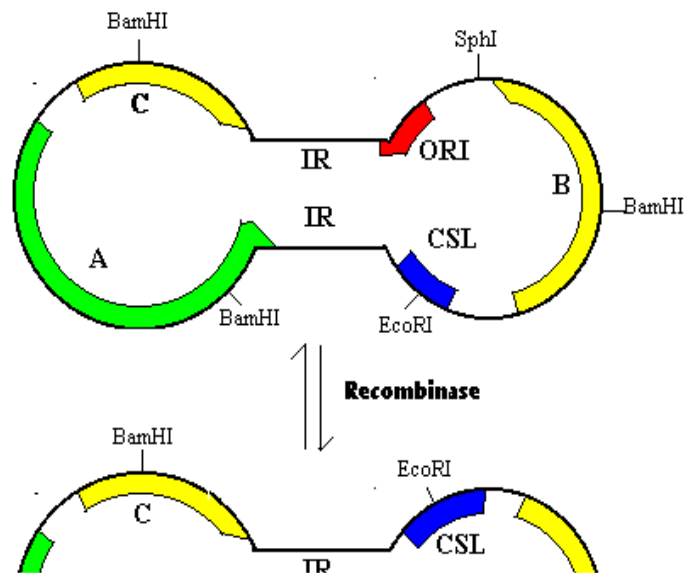
*S. cerevisiae* è vitale anche in seguito alla perdita dei mitocondri (cellule  $\rho^0$ ) o ad estese delezioni che interessano il genoma mitocondriale (cellule  $\rho^-$ ), pur avendo rispetto al ceppo selvatico una velocità di crescita ridotta che porta alla formazione di colonie più piccole (colonie *petite*); al contrario, *K. lactis* è un lievito "*petite*-negativo" in quanto totalmente incapace di sopravvivere se la funzionalità mitocondriale è alterata; tuttavia, se si introducono mutazioni specifiche in uno dei *loci MGI* (*Mitochondrial Genome Integrity*), il lievito può essere artificialmente convertito in un  $\rho^0$  vitale in seguito a trattamento con droghe che causano la perdita del DNA mitocondriale (Chen e Clark-Walker, 1995).

### 1.3. Plasmidi nucleari e citoplasmatici

Il plasmide nucleare pKD1 (fig. I-2), originariamente isolato in *K. drosophilorum*, appartiene, come il plasmide  $2\mu$  di *S. cerevisiae*, alla famiglia dei plasmidi circolari di lievito (Falcone *et al.*, 1986). pKD1 è mantenuto stabilmente in *K. lactis* (Chen *et al.*, 1989) e, come il  $2\mu$ , è un plasmide criptico che esiste in due isoforme in equilibrio tra loro. Nel plasmide sono presenti un'origine di replicazione, una ricombinasi sito-specifica della famiglia FLP (gene *A*), due geni (*B* e *C*) che codificano per fattori di partizione (Bianchi *et al.*, 1991; Bianchi, 1992) ed un *locus cis*-agente (*CSL*) che contribuisce a conferire al



plasmide una elevata stabilità durante la replicazione cellulare (Bianchi *et al.*, 1991). Data l'alta stabilità e l'alto numero di copie, pKD1 è stato utilizzato per la costruzione di vettori di espressione di geni eterologhi (Morlino *et al.*, 1999).



**Figura I-2.** Il plasmide naturale pKD1. La ricombinasi codificata dal gene *A* è responsabile dell'interconversione delle due forme in cui il plasmide si trova nella cellula. B e C codificano per fattori di partizione. IR, *Inverted Repeats*.

Alcuni ceppi di *K. lactis* contengono il cosiddetto "DNA killer", una coppia di plasmidi citoplasmatici (pGKL1 e pGKL2, o k1 e k2) che codificano per un complesso di tossine note come zimocina (Gunge *et al.*, 1981). La zimocina è tossica per alcuni lieviti tra cui quelli appartenenti ai generi *Saccharomyces*, *Candida* e *Kluyveromyces* ma non, ad esempio, per il genere *Schizosaccharomyces*. k1 e k2 rappresentano un modello per lo studio della replicazione e dell'espressione genica nei plasmidi lineari (Stark *et al.*, 1990).

Il plasmide k1 contiene, oltre ad un gene che codifica per un determinante d'immunità, i geni codificanti per le subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  della zimocina. k2, invece, è un plasmide *helper*, necessario per il mantenimento di k1 (Schaffrath *et al.*, 1995).

#### 1.4. Metabolismo del lattosio e del galattosio

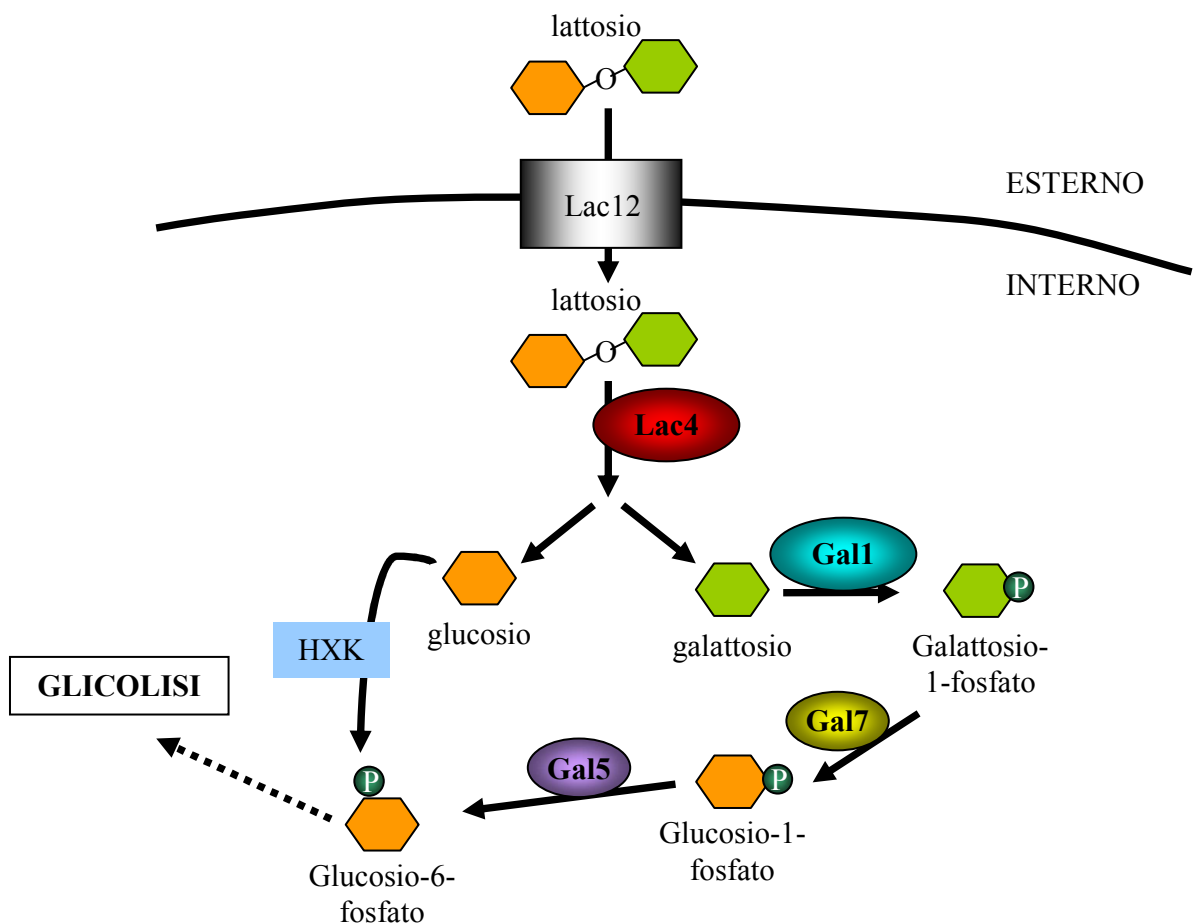
La gamma di substrati che *K. lactis* è in grado di utilizzare come fonte di carbonio è più vasta rispetto a *S. cerevisiae*. Ad esempio, il lattosio è uno dei composti che possono essere metabolizzati da *K. lactis* ma non da *S. cerevisiae* (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996). I geni *KILAC4* e *KILAC12*, codificanti rispettivamente per una  $\beta$ -galattosidasi e una lattosio-galattosio permeasi, sono indispensabili per la crescita su lattosio; il loro trasferimento in *S. cerevisiae* è sufficiente per far sì che tale organismo sia in grado di crescere su lattosio (Sreekishna e Dickson, 1988). La trascrizione di *KILAC4* e *KILAC12* è controllata in modo stringente a livello trascrizionale (Lacy e Dickson, 1981), e i due geni sono co-regolati con i geni *GAL* (Webster e Dickson, 1988), che codificano per gli enzimi del metabolismo del galattosio. Questa co-regolazione è mediata dall'attivatore trascrizionale *KIGal4* (*Lac9*), omologo in *K. lactis* della proteina Gal4 di *S. cerevisiae* (Salmeron e Johnston, 1986). Per l'attivazione di Gal4 mediata dal lattosio è necessario che lo zucchero entri nella cellula e venga idrolizzato a glucosio e galattosio dalla  $\beta$ -galattosidasi (Dickson e Barr, 1983). L'effettivo induttore del regulone è il galattosio (Cardinali *et al.*, 1997).

Il tasso di crescita di *K. lactis* su galattosio è maggiore rispetto a *S. cerevisiae*. Almeno in parte, questo è dovuto ad una maggiore concentrazione di *KIGal4* all'interno della cellula rispetto a *ScGal4*: in *K. lactis* si ha un'autoinduzione dell'espressione di *KIGAL4* che non si verifica in *S. cerevisiae*, e questo porta alla produzione di un'alta quantità di proteina (Czyz *et al.*, 1993; Zachariae *et al.*, 1993). L'attivazione di *KIGal4* è determinata dall'interazione di *KIGal1*, una galattokinasi, con *KIGal80*, un inibitore di *KIGal4*; in seguito a tale interazione *KIGal80* perde la sua funzione inibitoria (Zenke *et al.*, 1996).

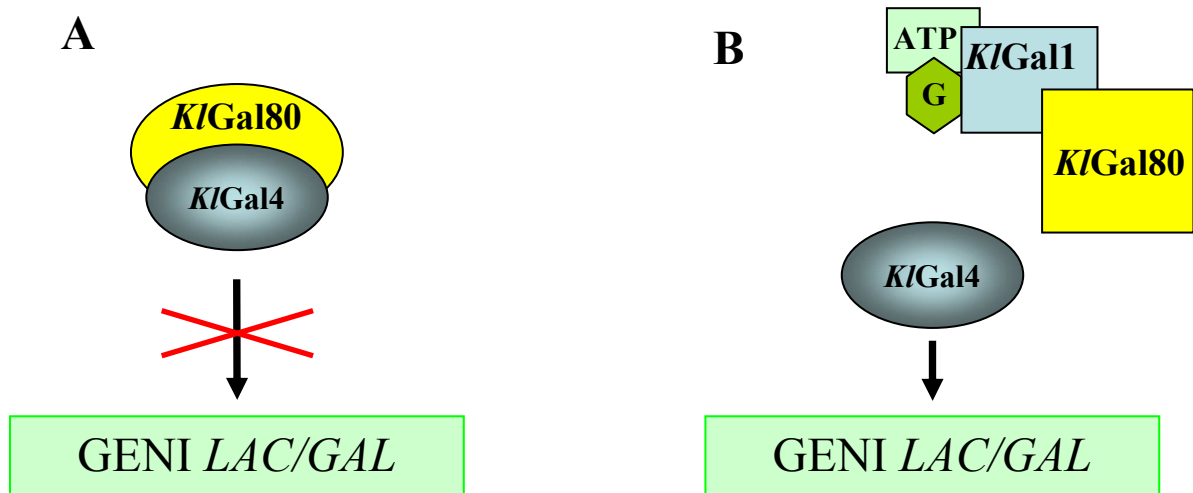
Gal1 è essenziale per l'attivazione di Gal4 in risposta al galattosio in *K. lactis*, ma non in *S. cerevisiae*. Questa differenza è data dalla ridondanza di molti dei geni di *S. cerevisiae*: mentre in *K. lactis* *KIGAL1* codifica per l'unica galattochinasi, infatti, in *S. cerevisiae* la stessa funzione è svolta dai prodotti genici di *GAL1* e *GAL3*, e l'assenza di uno dei due nella cellula non compromette l'attivazione di Gal4 (Meyer *et al.*, 1991).

La permeasi codificata dal gene *LAC12* è responsabile del trasporto attivo del lattosio e del galattosio attraverso la membrana (Cardinali *et al.*, 1997; Sreekishna *et al.*, 1987;

Chang e Dickinson, 1988); a differenza di ciò che avviene in *S. cerevisiae*, quindi, è possibile che la molecola di induttore si accumuli nella cellula contro il gradiente di concentrazione. In *K. lactis*, il trasporto mediato da *K/Lac12* è l'unica via di acquisizione del lattosio, mentre il galattosio viene trasportato all'interno della cellula anche da Hgt1, il trasportatore del glucosio ad alta affinità (Baruffini *et al.*, 2006; Billard *et al.*, 1996). Ciò significa che in un mutante *lac12* il regulone *LAC/GAL* può essere indotto in presenza di galattosio ma non in presenza di lattosio.



**Figura I-3.** Metabolismo del lattosio in *Kluyveromyces lactis*. La cellula assume il lattosio grazie all'attività della permeasi Lac12; la  $\beta$ -galattosidasi Lac4 scinde lo zucchero in glucosio e galattosio. Il glucosio viene fosforilato dall'esochinasi (HXK) ed entra nella via glicolitica come glucosio-6-fosfato; il galattosio viene prima fosforilato, poi convertito in glucosio-1-fosfato (in una reazione che impiega UDP-glucosio e libera UDP-galattosio) e infine in glucosio-6-fosfato. Il glucosio-6-fosfato così prodotto entra infine nella via glicolitica.



**Figura I-4.** Regolazione dei geni *LAC/GAL* mediata da *K/Gal4*. **A:** in assenza di galattosio, *K/Gal80* lega e inibisce l'attivatore *K/Gal4*. **B:** in presenza di galattosio (G) ed ATP, *K/Gal1* lega *K/Gal80*; in tal modo, *K/Gal80* non è più in grado di legare *K/Gal4* e l'induzione dell'espressione dei geni *LAC/GAL* può avere luogo.

### 1.5. Metabolismo del glucosio

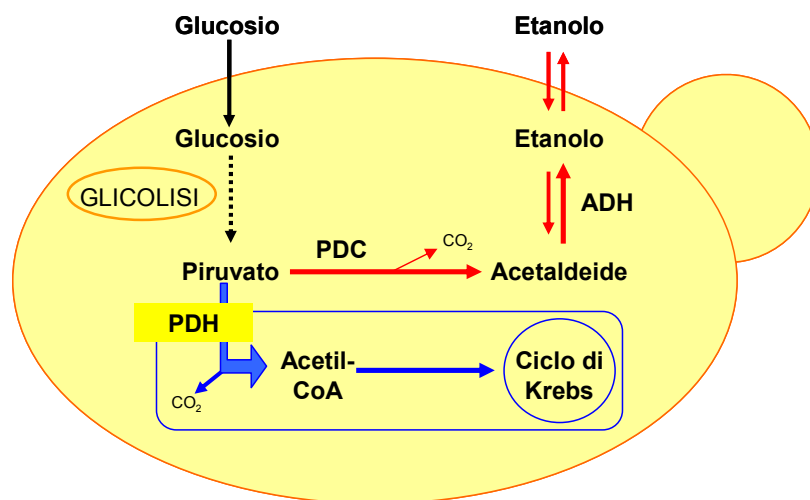
*K. lactis* è un organismo anaerobio facoltativo, ossia in grado di metabolizzare il glucosio in condizioni sia normossiche che ipossiche (Gancedo e Serrano, 1989). A differenza di *S. cerevisiae*, che è considerato un lievito “fermentativo” in quanto il metabolismo è prevalentemente di tipo fermentativo anche in condizioni normossiche, *K. lactis* viene definito un lievito “respiratorio”, poiché circa il 70% del glucosio che entra nella cellula segue la via respiratoria; nonostante sia in grado di fermentare, non può crescere in condizioni di stretta anaerobiosi (Kiers *et al.*, 1998; Snoek e Steensma, 2006).

Il trasporto del glucosio all'interno della cellula è mediato da due tipi di permeasi: una a bassa affinità codificata dal gene *RAG1* (Goffrini *et al.*, 1990; Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992a; Chen *et al.*, 1992) ed espressa quando il glucosio è disponibile in alte concentrazioni; l'altra ad alta affinità, codificata dal gene *HGT1*, che presenta un'identità del 26% con *RAG1* ed è espressa costitutivamente (Billard *et al.*, 1996), ma è insufficiente per supportare da sola la crescita fermentativa.

*K. lactis* non è soggetto all'effetto Crabtree, che consiste nella repressione della respirazione in presenza di alte concentrazioni di glucosio; inoltre, la respirazione non

inibisce la fermentazione, anzi i due processi coesistono e si può parlare quindi di un lievito “respiro-fermentativo” (González.Siso *et al.*, 1996; 2000).

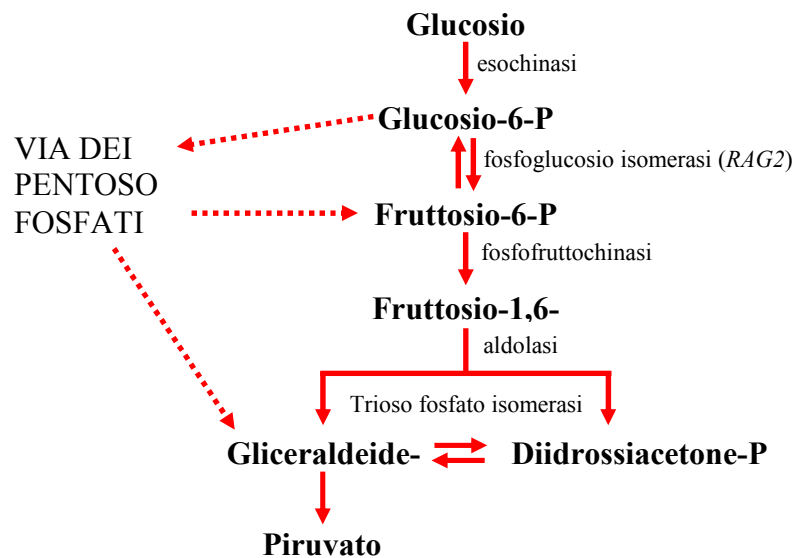
Il bivio tra respirazione e fermentazione si trova a livello del piruvato, il prodotto finale della glicolisi, che può essere fermentato ad etanolo e anidride carbonica grazie all’azione della piruvato decarbossilasi (PDC) e dell’alcool deidrogenasi (ADH), oppure può essere ossidato ad acetil-CoA dal complesso mitocondriale della piruvato deidrogenasi (PDH) ed entrare successivamente nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA o ciclo di Krebs) per essere infine ossidato completamente a CO<sub>2</sub> con produzione finale di ATP accoppiata al trasporto degli elettroni (Breunig *et al.*, 2000) (fig. I-5).



**Figura I-5.** Metabolismo del glucosio: il piruvato prodotto dalla glicolisi può seguire la via respiratoria (blu) o fermentativa (rosso). ADH, alcool deidrogenasi; PDC, piruvato decarbossilasi; PDH, piruvato deidrogenasi.

Una peculiarità di *K. lactis* è l’alta efficienza della via dei pentoso fosfati che produce intermedi a tre atomi di carbonio in modo alternativo alla via glicolitica quando le prime tappe di quest’ultima sono bloccate (Jacoby *et al.*, 1993) (fig. I-6). A prova di ciò vi sono studi sui mutanti del gene *RAG2* che codifica per la fosfoglucoisomerasi, enzima della via glicolitica che converte il glucosio 6-fosfato in fruttosio 6-fosfato. I mutanti *rag2* riescono a crescere su elevate concentrazioni di glucosio in condizioni respiratorie (Goffrini *et al.*, 1991) utilizzando unicamente la via dei pentosi, essendo la glicolisi interrotta e quindi la fermentazione impossibile. Quando la respirazione viene bloccata con droghe mitocondriali, come l’antimicina A, non vi è più crescita (fenotipo *Rag*<sup>-</sup>: si veda in seguito). Questo fenotipo si manifesta perché la catena respiratoria mitocondriale,

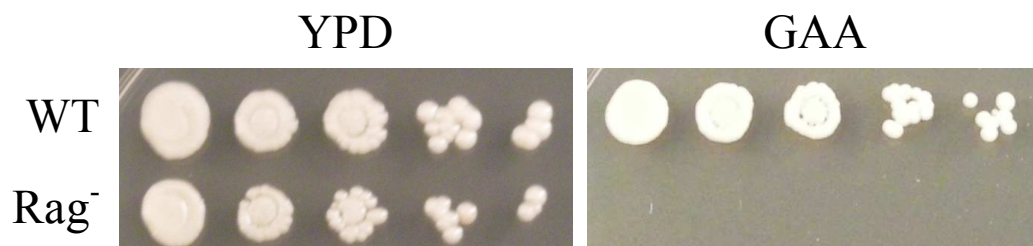
necessaria per riossidare il NADPH prodotto nella via dei pentoso fosfati, è bloccata dalla droga e il glucosio non può più essere metabolizzato neppure attraverso la via dei pentosi (González-Siso *et al.*, 1996).



**Figura I-6.** Importanza della via dei pentoso fosfati nella produzione di intermedi utilizzabili nella glicolisi.

## 1.6. Geni *RAG* e loro regolazione

Come già accennato nel paragrafo 1, *K. lactis* appartiene al gruppo dei lieviti “non-*WGD*”, il cui livello di ridondanza dei geni è estremamente basso rispetto a *S. cerevisiae*. In particolare, mentre in *S. cerevisiae* la maggior parte degli enzimi responsabili dei vari passaggi della glicolisi è codificata da più di un gene, in *K. lactis* tutti i geni necessari per il metabolismo del glucosio sono unici e la perdita di funzione di uno di essi compromette il metabolismo fermentativo (Goffrini *et al.*, 1989), dando origine a mutanti con fenotipo rag- (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992b). Il fenotipo rag- (fig. I-7) è definito come l’incapacità di crescere su terreno contenente un’alta concentrazione (5%) di glucosio e la droga antimicina A, che blocca la catena respiratoria a livello del passaggio Cyt b-Cyt c ed obbliga la cellula ad utilizzare esclusivamente il metabolismo fermentativo .



**Figura I-7.** Crescita di un ceppo wt ed un mutante rag<sup>-</sup> su terreno ricco contenente glucosio al 2% (YPD), e su terreno contenente glucosio al 5% e antimicina A (GAA).

Fino ad oggi sono stati identificati più di 20 geni la cui mutazione determina un fenotipo Rag<sup>-</sup>, e tutti sono risultati essere geni necessari per la glicolisi, la fermentazione o il trasporto del glucosio, oppure loro regolatori.

**Tabella I-1.** Alcuni dei geni *RAG* identificati in *K. lactis*.

<b>Gene <i>K. lactis</i></b>	<b>Funzione del prodotto genico</b>	<b>Omologo in <i>S. cerevisiae</i></b>
<i>RAG1</i>	Permeasi del glucosio a bassa affinità	<i>HXT1</i>
<i>RAG2</i>	Fosfoglucoisomerasi (Goffrini <i>et al.</i> , 1991)	<i>PGI</i>
<i>RAG3</i>	Regolatore trascrizionale del gene <i>RAG6</i> (Prior <i>et al.</i> , 1996)	<i>PDC2</i>
<i>RAG4</i>	Sensore del glucosio (Betina <i>et al.</i> , 2001)	<i>SNF3, RGT2</i>
<i>RAG5</i>	Esochinasi (Prior <i>et al.</i> , 1993)	<i>HXK2</i>
<i>RAG6 (KIPDC1)</i>	Piruvato decarbossilasi (Bianchi <i>et al.</i> , 1996)	<i>PDC1</i>
<i>RAG8</i>	Casein chinasi I (Lemaire <i>et al.</i> , 2002)	<i>YCK1, YCK2</i>
<i>RAG16 (SCK1)</i>	Regolatore trascrizionale di geni glicolitici (Neil <i>et al.</i> , 2007)	
<i>RAG17 (KIENO)</i>	Enolasi (Neil <i>et al.</i> , 2004)	<i>ENO</i>

Il gene *RAG1*, già menzionato nel paragrafo 1.5, codifica per la permeasi a bassa affinità del glucosio (Goffrini *et al.*, 1990); la sua trascrizione è indotta da alte concentrazioni di glucosio, oltre che da fruttosio ed altri zuccheri (Chen *et al.*, 1992; Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992a), ed è un gene indispensabile per il metabolismo fermentativo in presenza di alte concentrazioni di glucosio quando la respirazione è bloccata. L'espressione di *RAG1* è regolata positivamente da altri geni *RAG* (Prior *et al.*,

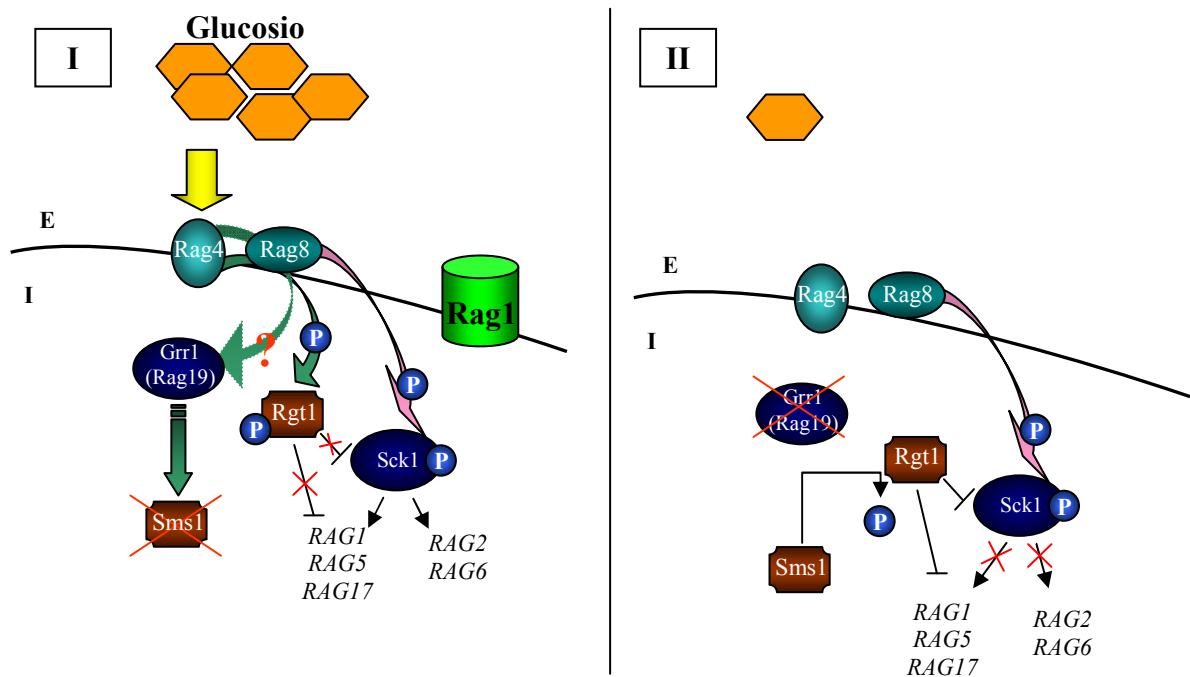
1993; Blaisonneau *et al.*, 1997; Betina *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2002; Lemaire e Wésolowski-Louveol, 2004; Rolland *et al.*, 2006; Neil *et al.*, 2007; Hnatova *et al.*, 2008).

La presenza di alte concentrazioni di glucosio viene rilevata attraverso Rag4, una proteina transmembrana che appartiene alla stessa famiglia delle proteine Snf3/Rgt2 di *S. cerevisiae*, membri dell'apparato per il rilevamento del glucosio (Ozcan *et al.*, 1999); Rag4 è l'unico sensore del glucosio in *K. lactis*, ed interagisce con la casein kinasi di membrana Rag8 (Blaisonneau *et al.*, 1997) attivando una via di trasduzione del segnale che porta all'induzione dell'espressione di *RAG1* e di altri geni del metabolismo del glucosio (Rolland *et al.*, 2006). Rag8 presenta un'alta omologia con le casein kinasi di *S. cerevisiae* Yck1 e Yck2; le casein kinasi sono coinvolte in molteplici meccanismi regolativi, come la morfogenesi (Robinson *et al.*, 1993), il trasporto delle vescicole (Wang *et al.*, 1996; Panek *et al.*, 1997), la fosforilazione dell'H<sup>+</sup>/ATPasi della membrana plasmatica (Estrada *et al.*, 1996) e l'ubiquitinazione delle proteine (Marchal *et al.*, 2000). In seguito all'interazione con Rag4, Rag8 fosforila la proteina Rgt1 (*Repressor of Glucose Transporter*); Rgt1 nella sua forma defosforilata reprime direttamente la trascrizione dei *RAG1*, *RAG5* (esokinasi) e *RAG17* (enolasi), e indirettamente i geni *RAG2* e *RAG6*; in seguito alla fosforilazione mediata da Rag8 viene invece inattivato (Rolland *et al.*, 2006). I geni *RAG2* e *RAG6* sono regolati positivamente da un'altra proteina, Sck1 (codificata dal gene *RAG16*), la cui trascrizione è repressa dalla forma defosforilata di Rgt1 (Neil *et al.*, 2007).

La proteina Sck1, oltre a far parte della rete di regolazione finora descritta (la rete Rag4-dipendente), viene attivata da Rag8 anche in modo Rag4-indipendente per fosforilazione (Lemaire *et al.*, 2002; Neil *et al.*, 2007).

Recentemente (Hnatova *et al.*, 2008) sono stati individuati altri due regolatori coinvolti nella via Rag4-dipendente: il primo è Rag19 (Grr1), una proteina che presenta un alto livello di omologia con i regolatori che fanno parte dei complessi di ubiquitinazione; il secondo è Sms1, che è in grado di interagire fisicamente sia con Rag4 a livello della membrana, che con Rgt1 all'interno del nucleo: il suo ruolo sembra quello di defosforilare Rgt1 in assenza di glucosio in modo da ripristinare la sua attività di repressore. Rag19 sembra essere attivato attraverso la via Rag4-dipendente, e probabilmente regola Sms1 a livello post-traduzionale, degradandolo in presenza di alte concentrazioni di glucosio.





**Figura I-8.** Regolazione della risposta al glucosio mediata dai geni *RAG*. **I.** In presenza di alte concentrazioni di glucosio, il sensore Rag4 interagisce con la casein kinasi Rag8 attivandola. Rag8 è responsabile di due tipi di vie del segnale: le vie Rag4-dipendenti (freccie verdi) e la via Rag4-indipendente (freccia rosa). Le vie Rag4-dipendenti consistono nella fosforilazione e conseguente inattivazione del repressore Rgt1 e nell'attivazione (secondo un meccanismo non ancora caratterizzato) di Grr1, responsabile dell'inattivazione della defosforilasi Sms1. La via Rag4-indipendente porta alla fosforilazione e conseguente attivazione del regolatore Sck1, coinvolto nella regolazione dell'espressione di diversi geni *RAG*, tra cui il trasportatore a bassa affinità *RAG1*. **II:** Quando il glucosio è limitante o assente, le vie del segnale Rag4-dipendenti non sono attive: di conseguenza, la proteina Grr1 non è attiva ed Sms1 non viene degradata; Rgt1 può quindi essere defosforilata da Sms1 ed esercitare il suo ruolo di repressore di Sck1 e dei geni *RAG*. E' tuttavia attiva la cascata del segnale Rag4-indipendente, che porta alla fosforilazione delle basse quantità di Sck1 prodotte nella cellula; viene quindi mantenuto un livello basale, seppure basso, di espressione dei geni *RAG*.

I, interno della cellula; E, esterno della cellula.

### 1.7. *RAG3*

Il gene *RAG3* è stato clonato a partire da una *library* genomica di *K. lactis*, per complementazione della mutazione *rag3-1* che conferiva alla cellula una velocità di crescita molto ridotta su glucosio ed antimicina A (Prior *et al.*, 1996). La mutazione *rag3* è risultata essere la più frequente tra i gruppi di complementazione *rag*: dei 58 mutanti *rag*-ottenuti in seguito a mutagenesi, 16 erano alleli di *RAG3* (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1992b).

Il prodotto proteico di *RAG3* è composto da 765 amminoacidi e mostra un'alta omologia di sequenza con la proteina Pdc2 di *S. cerevisiae* (fig. I-9), un regolatore positivo dei geni codificanti per la piruvato decarbossilasi (*PDC*) (Hohmann, 1993; Raghuram *et al.*, 1994). Il livello di omologia è molto alto nella porzione N-terminale delle due proteine, che presentano il 61% di identità e l'80% di positività con un E-value pari a 0, mentre diminuisce nella porzione C-terminale (26% di identità e 53% di positività con un E-value pari a 4e-14). Confrontando un ceppo *wild-type* di *K. lactis* con un ceppo in cui *RAG3* è deletato o mutato, si rilevano una riduzione dell'espressione del gene *KIPDC1*, codificante per l'unica piruvato decarbossilasi, ed una minore produzione di etanolo: Rag3 svolge in *K. lactis* la stessa funzione di Pdc2 in *S. cerevisiae* (Tizzani *et al.*, 2007). Tuttavia, la proteina Pdc2 non è in grado di complementare il fenotipo rag- conferito dalla delezione (o mutazione) di *RAG3*, e viceversa la proteina Rag3 non è in grado di ripristinare i livelli di espressione dei geni *PDC* che si hanno nel *wild-type* di *S. cerevisiae* (Prior *et al.*, 1996), probabilmente a causa di differenze strutturali derivanti dalla scarsa omologia di sequenza tra le porzioni C-terminali delle due proteine.

```

Pdc2      -MLSIQQRYNICLMAERHPKWTQLELAKWAYETFQLPKIPSQGTISRLLARKSTYMNCKE 59
Rag3      MGLSIEQKYNICLMAEKHPKWTQAELAQWAYQVYQLPSKPSQGTISRLLAKKSEFMNSKE 60
          ***:*:*****:***** ***:***:..:***.*****:***:*:*.*

Pdc2      HEKDANRLRKPNNLLVRKILQEWISQSLSWNGIPITSPPIIQDTAQAVVHRIPAEHREGNGS 119
Rag3      HEKDSNRLRRPNNLLVHKILQEWVSQSIWNGIPVSLPIIQDTAQSVVHKIPAEYREGKGS 120
          ***:*:***:*****:*****:***:*****:..*****:***:***:***:***

Pdc2      FSYKVISNFLSKMDVNISVLDEELPKTPKVWTFEERDVLKAYFSKIPPKDLFTLDEAFLS 179
Rag3      FSHKVVANFLSRMNLSTHIIIEHDMPKHPKVWYFDERTLLKQFIAQIPEDSLFTLDETFLA 180
          **:*:..:***:*:..:..:..:*** ***:**:*:*:*:..:***.*****:***:

Pdc2      YNLPLDYAQYEASSIQRRIEVATVMLCSNLDGSEKLPVVVGKYDSYKSFERNYFPNEPND 239
Rag3      YNLPLDYAQYETNSIQKRLEVITVMLCANLSGTEKMNPLVIGRYENYNTFKNYMGEDSHI 240
          *****:..***:*:* * *****:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:..:

Pdc2      PVSQSMGLGTMMAKFFDISYHSNRKAWLTSNLFHNWLVWRDKRLVAVNRKIWIIVLDDSCCH 299
Rag3      GTNDVHLGKTKRFGIVYQSNRKSFLTSTVFHDWLVAFDKRLVSDNRKIWIIVLDDSCSH 300
          ..: ** * .*:.* * *:*****:*****:***:***:*****:*****:*****.*

Pdc2      RIINLRLQNIKLVYTSSNSKFLPFNWGVWDEFKTRYRIQQYQALIDLQNRISKNIQNKNK 359
Rag3      RIVNLNLQNIILLIYTSANSRFLPFNWGVLEEFKARYRVQQYKALIDLQKNISQSLTDFK- 359
          **:*:* ***:**:*:*:*****:***:***:***:*****:..**:*:..:

Pdc2      SERNECIPNGKKCLISFEQSQLTMSNAFKFIKAWDDIPVDAIKANWKSGLLPPEMIHL 419
Rag3      -----LLTYEQSCLTMTNAFKFIKIAWDAIPKERINSNWKNSGILPSSYLHQ 406
          *:::*** ***:***** *** ** :*::***.*:*:*..:*

Pdc2      NENVSMFAFKKNEVLESVLNRLCDEYYCVKKWEYEMLLDLNIENKNTNFLSTEELVESAIIV 479
Rag3      DKMKHNTFKKNKVLEANLNDLCNTYMCMKKWDYSMLLNLNIENKNSFLSLEEIIESSIV 466
          : : :*****:***: ** **:* * *:***:*.* *****:*****.*** ***:***:***

```

```

Pdc2  EPCEPDFDTAPKGNVEVHDDNFDVSVFANEDDNNQNHLSMSQASHNPDYNSNHSNNAIENT  539
Rag3  DQWEP-----ETNDDAFL-----DDMDDLNFNSFNTPSIKP-----  497
      :  **                *.:** * :                ** :. * :. * : *
Pdc2  NNFGSNNNNNNGSSNNINDNDSSVKYLQQNTVDNSTKTGNPGQPNISSMESQRNSSTTD  599
Rag3  -----VIPLENSVVQNGSKLISEQLPANPSFPT-----  525
                        * * :. . * : * : * . * . * : :
Pdc2  LVVDGNYDVNFENGLLNDPYNTMKQPGPLDYNVSTLIDKPNLFLSPDLLSTVGVDMLQPS  659
Rag3  -IVPGNNEN-----SGVKISTVSELI DN-----NTEDIFGNMLD  558
      : * ** :                . *                . ** *** :                . * . : : .
Pdc2  SEYFSEVVFSSAIRN--NEKAASDQNKSTDELPSS TAMANSNSIT TALLESRNQAQPFVDP  717
Rag3  NNFFPDDMLTGINNAISEKANPGAVETNVSLPSADVSEESN-----  599
      . : * . : : : . * . * . *** . . : : . . *** : . : **
Pdc2  HMNGLLSDTSKSGHVSNSNAISQNSLNNFQHNSASVAEASSPSITPSPVAINSTGAPAR  777
Rag3  -----NNTPYSEHEN-----QTAFN-----APPIVTSQNSSYNTREQPSS  634
      . : * . * * .                * . : *                : . * : * . . : * : * :
Pdc  SII SAPIDSNSSASSPSALEHLEGAVSGMSPSSTTILSNLQTNINI AKSLSTIMKHAESN  837
Rag3  TVLSNYVNEILSNPTPAGLDNEK-----LVIMTTLQTNLELAKAMG TILKHSEVQ  684
      : : * : : . * . : * : * : : :                . * : : . * * * : : * * : : * * : * :
Pdc2  EISLTKETINELNFNYLTLLKRIKKTTRKQLNSESIKINSKNAQDHLETLLSGAAAAAATS  897
Rag3  EVGLSEDSLSEMRNGYQNCIKRISKAKHFLSS----IDKRRQKHIEQQLLGSHSVSPQ-  739
      * : * : : : : * : . * . : * * * . * : : * . *                * : * . * * : * * : : : .
Pdc2  ANNLDLPTGGSNLPDSNNLHLPNGTGGFF  925
Rag3  -DSISSINIDNSFFENFAENASSTSST-  765
      : : . . . . : : : : : : :

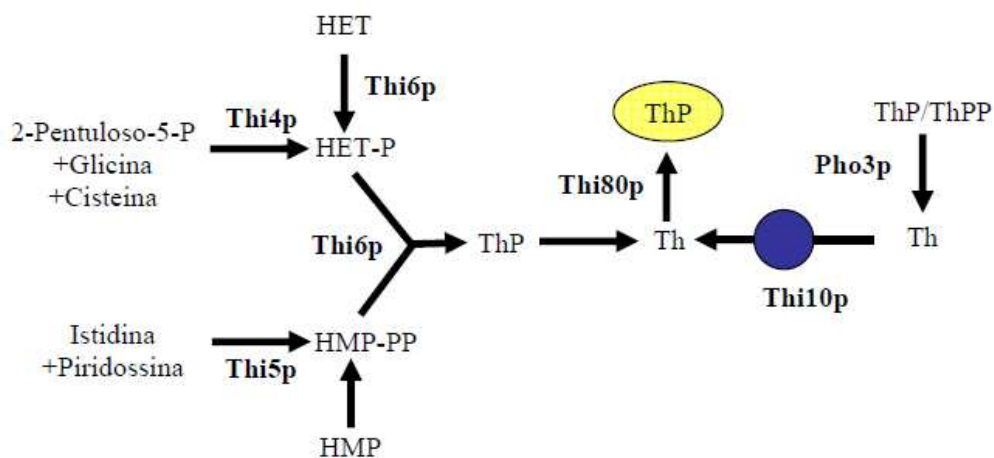
```

**Figura I-9.** Allineamento delle sequenze aminoacidiche di Rag3 e ScPdc2. Le due proteine presentano un’alta identità di sequenza nella porzione N-terminale e maggiori differenze nella porzione C-terminale. L’asterisco evidenzia aminoacidi identici, i due punti una mutazione conservativa ed il punto una mutazione semiconservativa (da [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)).

Oltre che nella regolazione dell’espressione di *KIPDC1*, Rag3 è coinvolto anche in altri meccanismi: come Pdc2 di *S. cerevisiae* (Hohmann e Meacock, 1998; Mojzita e Hohmann, 2006), è un regolatore positivo della trascrizione dei geni *THI4*, che codifica per una tiazolo sintasi, e *THI5*, codificante per un enzima necessario per la biosintesi dell’idrossimetilpirimidina; questi due geni appartengono al regulone *THI* codificante gli enzimi per la biosintesi della tiamina. I mutanti *rag3* di *K. lactis* risultano auxotrofi per la tiamina, mentre i ceppi selvatici sono in grado di sintetizzare tale cofattore quando non è disponibile nel mezzo di crescita (Tizzani *et al.*, 1998; fig. I-10) Inoltre, in terreni contenenti glucosio, Rag3 funge da repressore del gene *PDA1*, codificante per la subunità E1 $\alpha$  della piruvato deidrogenasi di *K. lactis*; la piruvato deidrogenasi è il complesso

enzimatico responsabile della conversione del piruvato in acetil-coenzima A e, come la piruvato decarbossilasi, necessita del cofattore TPP (tiamina pirofosfato), che viene sintetizzato nella cellula a partire dalla tiamina (Hohmann e Meacock, 1998).

Rag3 sembra quindi esercitare un controllo positivo sulla via fermentativa, fungendo da regolatore positivo dell'espressione di *PDC1* e dei geni per la biosintesi per il suo cofattore, e un controllo negativo sull'ossidazione del piruvato in presenza di un substrato fermentabile come il glucosio, fungendo da repressore di *PDA1* (Tizzani *et al.*, 1998).



**Figura I-10.** Metabolismo della tiamina. Th, tiamina; ThP, tiamina fosfato; ThPP, tiamina pirofosfato; HET, idrossil-etiltiazolo; HET-P, idrossil-etiltiazolo fosfato; HM-P, idrossimetilpirimidina; HMP-PP, idrossimetilpirimidina difosfato.

### 1.8. *RAG6 (PDC1)*

Il gene *RAG6* di *K. lactis* (d'ora in avanti *PDC1* o *KIPDC1*) è situato sul cromosoma E e codifica per l'unica piruvato decarbossilasi, enzima responsabile della conversione del piruvato in acetaldeide nella via della fermentazione alcolica. *PDC1* è stato isolato a partire da una *library* genomica utilizzando come sonda una sequenza conservata nei tre geni *PDC* di *S. cerevisiae*. L'assenza in *K. lactis* di altri geni codificanti per una piruvato decarbossilasi funzionale è dimostrata dalla totale assenza di attività PDC e di produzione di etanolo nei ceppi *pdcl* $\Delta$  (Bianchi *et al.*, 1996). Poiché è un gene non ridondante ed essenziale per la fermentazione, la sua delezione conferisce alla cellula il fenotipo rag-; in particolare, è stato dimostrato che il gene *PDC1* è in grado di complementare la mutazione *rag6* (Wésolowski-Louvel e Fukuhara, 1995).

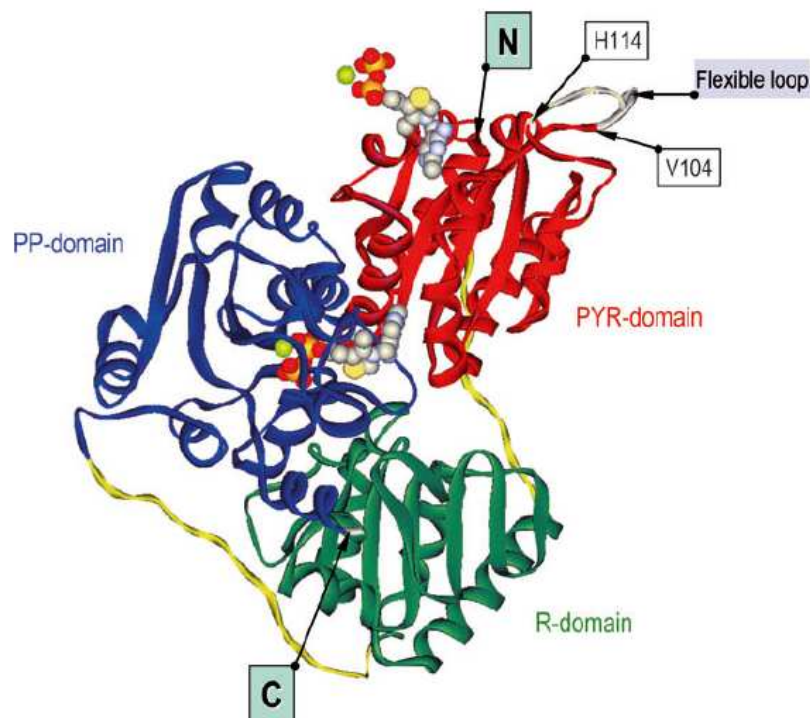
La proteina *KIPdc1*, composta da 563 aminoacidi, mostra un'alta omologia di sequenza con le piruvato decarbossilasi dei lieviti *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* e del batterio *Zymomonas mobilis* (Tab. I-2).

Destruelle *et al.* (1999) hanno dimostrato che il gene *PDC1* di *S. cerevisiae*, inserito in un ceppo *pdcl* $\Delta$  di *K. lactis*, è in grado di ripristinare il fenotipo Rag<sup>+</sup>.

**Tabella I-2.** Omologia di *KIPdc1* con altre PDC microbiche (da: Bianchi *et al.*, 1996).

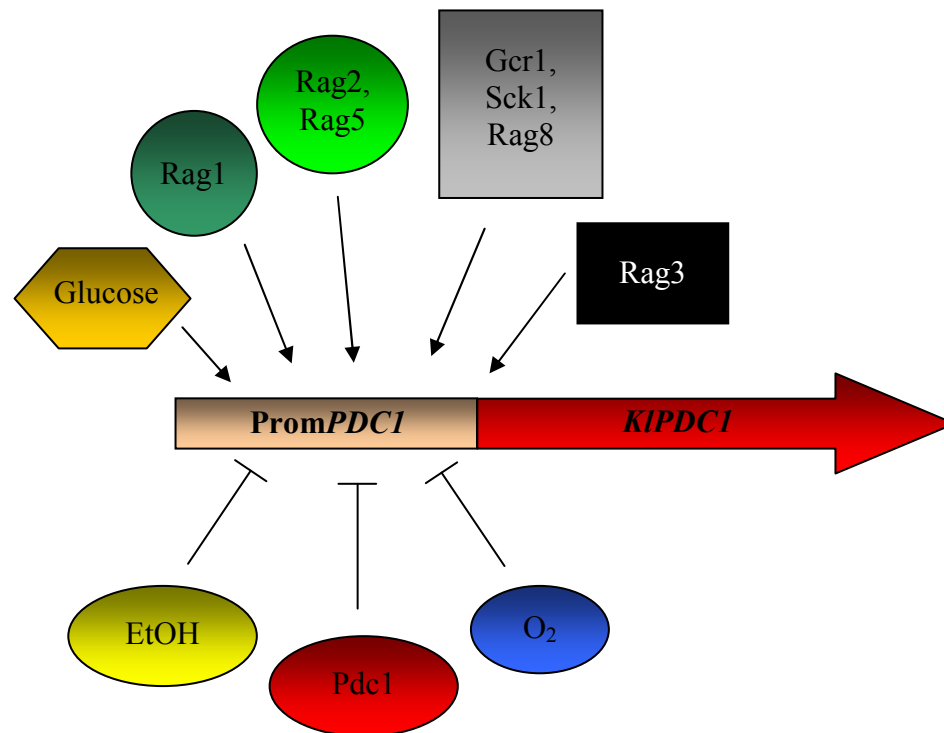
	Identità (%)	Similarità (%)
<i>K. marxianus</i> Pdc	91,1	94,3
<i>S. cerevisiae</i> Pdc1	86,3	90,0
<i>S. cerevisiae</i> Pdc5	80,1	88,4
<i>S. cerevisiae</i> Pdc6	79	86,7
<i>H. uvarum</i> Pdc	75,8	84,5
<i>Z. mobilis</i> Pdc	30,4	52

La forma cataliticamente attiva della piruvato decarbossilasi è un omotetramero, funzionale soltanto in presenza dei cofattori Mg<sup>2+</sup> e tiamina pirofosfato (TPP), che sono legati in modo non covalente a ciascuno dei due dimeri che formano il tetramero (Kutter *et al.*, 2006). Ciascuna subunità consiste di tre domini: il dominio PYR, che lega l'anello amminopirimidinico della TPP; il dominio PP, che lega il residuo difosfato della TPP; e il dominio R, che lega i regolatori allosterici (Muller *et al.*, 1993; Kutter *et al.*, 2006).



**Figura I-11.** Rappresentazione del monomero della piruvato decarbossilasi di *K. lactis*. In rosso è rappresentato il dominio N-terminale PYR; in verde, il dominio R intermedio; in blu, il dominio C-terminale PP; in giallo, i loop che connettono i domini tra loro (da: Kutter *et al.*, 2006).

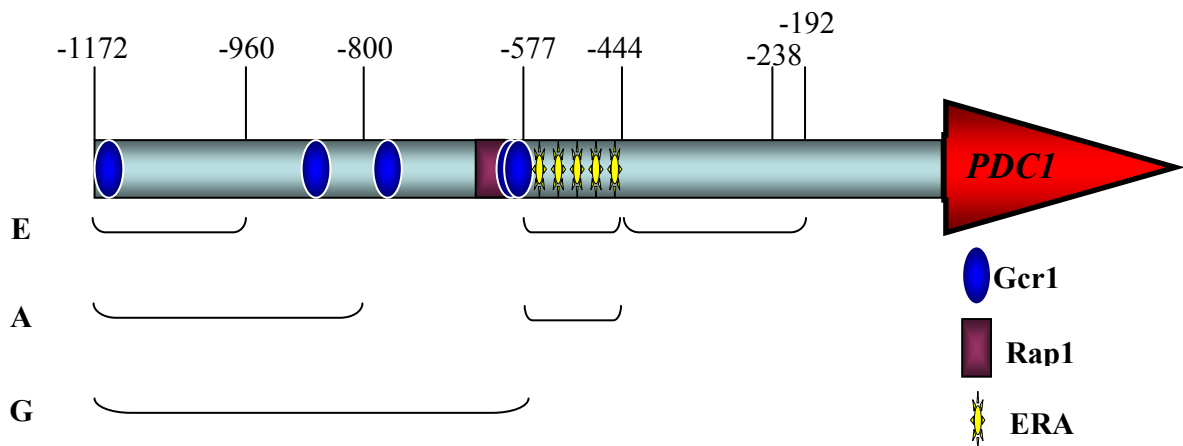
L'espressione di *KIPDC1* è indotta dagli zuccheri glucosio, galattosio e fruttosio e dall'ipossia (Destruelle *et al.*, 1999; Camattari *et al.*, 2006), ed è repressa dall'etanolo (Bianchi *et al.*, 1996; Destruelle *et al.*, 1999); inoltre, è stato rilevato un decremento dell'espressione del gene nei mutanti *rag1*, *rag2*, *rag5* e *rag8* e nel mutante *sck1Δ* (Breunig *et al.*, 2000). Infine, *KIPDC1* è soggetto ad un meccanismo di autoregolazione trascrizionale attraverso il quale la proteina Pdc1 è in grado di reprimere la propria espressione; in ceppi *pdc1Δ* recanti la fusione tra il promotore di *PDC1* ed il gene reporter *lacZ*, infatti, si osserva un livello di attività del promotore molto più elevato rispetto al ceppo *wild-type* (Destruelle *et al.*, 1999).



**Figura I-12.** Meccanismi di regolazione positiva e negativa che agiscono sull'espressione di *PDC1*. L'espressione del gene è indotta da glucosio (ed altri zuccheri), dal trasportatore del glucosio a bassa affinità Rag1, dagli enzimi glicolitici Rag2 e Rag5 e dai regolatori Gcr1, Sck1, Rag8 e Rag3; i meccanismi di regolazione negativa comprendono invece la repressione da etanolo, l'autoregolazione e la repressione da ossigeno. Quest'ultima, come si vedrà più avanti, in realtà consiste sia in una repressione mediata da ossigeno che un'induzione ipossica

Per caratterizzare i vari meccanismi di regolazione che agiscono sull'espressione di *KIPDC1*, la regione di 1,2 kilobasi a monte del gene è stata sequenziata (EMBL Nucleotide Sequence Database; codice Y15435), e l'analisi della sequenza nucleotidica ha rivelato la presenza di diverse *consensus* per fattori di trascrizione conservati in tutti i funghi (Quandt *et al.*, 1995): sono stati identificati tre siti di legame per *KIGcr1*, un regolatore trascrizionale che induce l'espressione di vari geni glicolitici in risposta alla presenza di glucosio (Neil *et al.*, 2004; Holland *et al.*, 1987), rispettivamente nelle posizioni -766, -865 e -1172 (Destruelle *et al.*, 1999); altre due *consensus* per *KIGcr1* si trovano nelle posizioni -585 e -591 e formano una  $UAS_{RPG}$ , necessaria per l'induzione da glucosio (Larson *et al.*, 1994), insieme con il sito di legame putativo per *KIRap1*, che si trova nella posizione -623 (Destruelle *et al.*, 1999). A valle delle *consensus* per Gcr1 e Rap1, nella porzione tra -577 e -444, sono state identificate cinque sequenze ripetute, T/GGAAATGG/T, che presentano un alto livello di omologia con le sequenze ERA (*Ethanol Repression and Autoregulation*)

del gene *PDC1* di *Saccharomyces cerevisiae* (Destruelle *et al.*, 1999). L'analisi di porzioni delete del promotore ha permesso di identificare le regioni a livello delle quali si esplicano i diversi meccanismi di regolazione: per la repressione da etanolo sono necessarie sia la porzione compresa tra -1172 e -960 che quella tra -444 e -192, oltre alle sequenze ERA (tra -577 e -444); l'autoregolazione comprende la regione tra -1172 e -800, e le ERA; per l'induzione da glucosio, infine, sono necessarie le tre porzioni contenenti le *consensus* per il legame di Gcr1 e la UAS<sub>RPG</sub> (Destruelle *et al.*, 1999).



**Figura I-13.** Schema rappresentativo della regione di 1172 paia di basi che si trova a monte del gene *KIPDC1*. In blu sono indicate le *consensus* per il legame di *K/Gcr1*, in viola la *consensus* per *K/Rap1*. **E**, regioni coinvolte nella repressione da etanolo; **A**, regioni coinvolte nell'autoregolazione; **G**, regione coinvolta nell'induzione da glucosio.

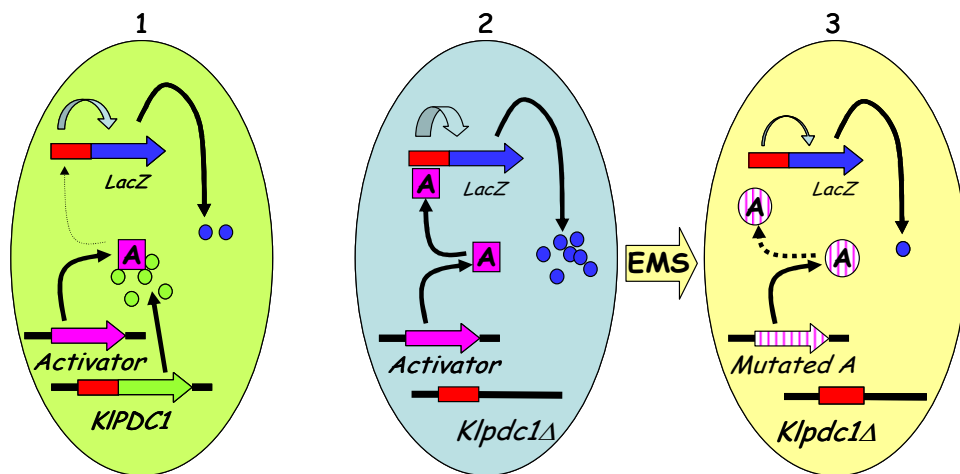
### 1.8.1. Autoregolazione del gene *PDC1*

Il ruolo della PDC come repressore della propria espressione è stato dimostrato per la prima volta in *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann e Cederberg, 1990). In questo lievito vi sono tre geni codificanti per la piruvato decarbossilasi: *PDC1*, *PDC5* e *PDC6*; di questi, solo il primo è costitutivamente espresso. L'autoregolazione si esplica a livello della trascrizione di *PDC1* e *PDC5*, i cui promotori presentano una maggiore attività in assenza della proteina Pdc1 (Schaaff *et al.*, 1989), mentre non coinvolge *PDC6*, che è invece indotto solamente in presenza di alte concentrazioni di zolfo (Hohmann, 1991). Ad oggi, il meccanismo dell'autoregolazione in *S. cerevisiae* non è ancora stato caratterizzato, né sono noti i fattori che vi prendono parte insieme a Pdc1.

In *K. lactis* è presente un meccanismo di autoregolazione dell'espressione di *PDC1* analogo a quello osservato in *S. cerevisiae* (Destruelle *et al.*, 1999). Secondo il modello



proposto, la proteina Pdc1 sequestra un attivatore trascrizionale, impedendone il legame al promotore di *PDC1* e reprimendo così la propria espressione; in assenza di Pdc1, invece, vi sarebbe nel nucleo una maggiore disponibilità di attivatore libero e quindi un maggior livello di espressione di *PDC1*. Al fine di identificare tale fattore, un ceppo  $\Delta pdc1$  di *K. lactis* è stato sottoposto a mutagenesi *random* (Protani, 1998; fig. I-14). Il ceppo, mancando dell'autoregolazione, presentava alti livelli di attività del promotore di *PDC1* (Destruelle *et al.*, 1999). In seguito alla mutagenesi è stato possibile individuare un mutante, denominato FP245, i cui livelli di attività del promotore risultavano più bassi di quelli rilevati nel ceppo selvatico; questo ceppo recava verosimilmente una mutazione nell'attivatore trascrizionale che ne impediva l'attività di regolatore positivo di *PDC1*.



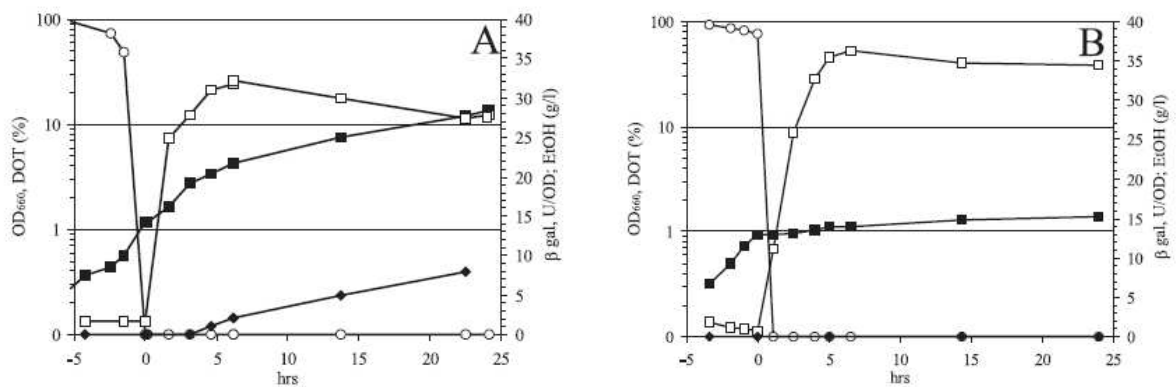
**Figura I-14.** Per la ricerca del fattore coinvolto, insieme a Pdc1, nel meccanismo dell'autoregolazione sono stati usati ceppi che contenevano il plasmide pMD12 (Destruelle *et al.*, 1999), recante la fusione tra il promotore di *PDC1* e il gene reporter *lacZ*. Secondo il modello proposto, i livelli *wild-type* di espressione di *PDC1* (1) sono dovuti al sequestro, da parte di Pdc1, di un attivatore della trascrizione (A); in assenza di autoregolazione (2), i livelli di attivatore libero sono maggiori e l'attività del promotore di *PDC1* è più elevata. In seguito a mutagenesi *random* del ceppo 2 è stato ottenuto un mutante con livelli di attività promotore molto bassi, in cui verosimilmente l'attivatore, mutato, non era più in grado di indurre la trascrizione di *PDC1*. EMS, etilmetansulfonato.

Al fine di identificare tale regolatore, il mutante è stato incrociato con vari mutanti *rag* di *K. lactis*, e la mutazione è risultata essere allelica al gene *RAG3*.

Ad oggi, quindi, è noto che al meccanismo di autoregolazione di *PDC1* prendono parte la proteina Pdc1 stessa e il regolatore trascrizionale Rag3, già descritto nel paragrafo 2.7.

### 1.8.2. Regolazione ossigeno-dipendente del gene *PDC1*

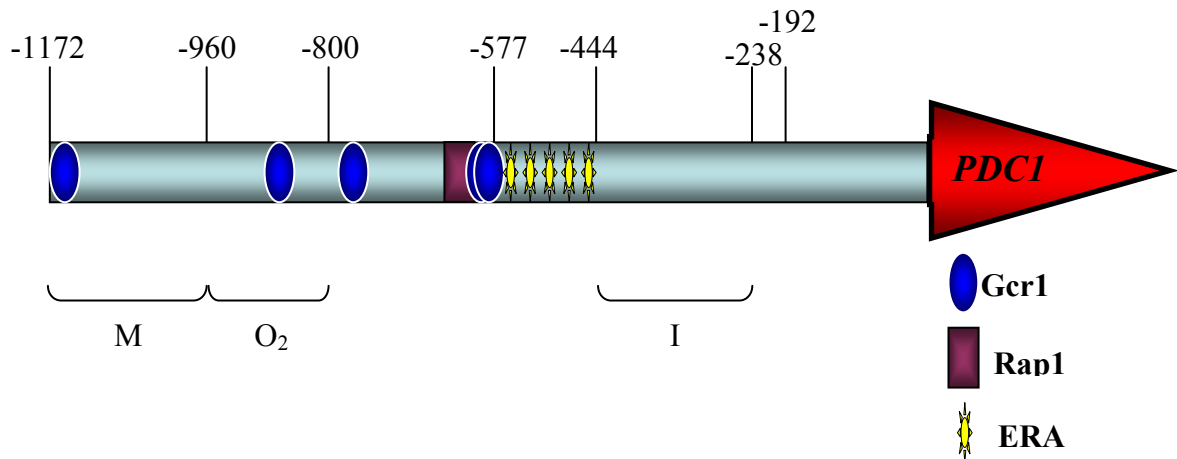
Sia l'attività enzimatica della piruvato decarbossilasi che l'espressione del gene *KIPDC1* dipendono dalla disponibilità di ossigeno (Kiers *et al.*, 1998; Destruelle *et al.*, 1999; Camattari *et al.*, 2007; Micolonghi *et al.*, 2007). Nella fig. I-15 è rappresentato l'andamento in bioreattore di due colture di *K. lactis* contenenti un plasmide che reca la fusione tra il promotore di *PDC1* ed il gene reporter *lacZ*; le cellule sono state coltivate in terreno ricco YP con (A) o senza glucosio (B). Il rapido decremento dell'ossigeno disciolto (circa 10 minuti) a livelli limitanti è accompagnato da un forte aumento dell'attività  $\beta$ -galattosidasi. L'induzione ipossica è indipendente dalla presenza del glucosio che d'altra parte, consente una maggiore produzione di biomassa (figura I-15 A) anche dopo la chiusura dell'afflusso di aria nel bioreattore (Camattari *et al.*, 2007).



**Figura I-15.** A: induzione ipossica di una coltura in YPD (terreno ricco contenente glucosio) di *K. lactis* contenente la fusione tra il promotore di *PDC1* e *lacZ*. Le cellule sono state coltivate in condizioni aerobiche fino ad OD<sub>660</sub>=1 (tempo 0), poi l'afflusso di aria è stato bloccato e la coltura ha iniziato a crescere in condizioni anaerobiche. B: induzione ipossica dello stesso ceppo in terreno YP. Anche in questo caso l'induzione ipossica è iniziata dopo che la coltura ha raggiunto una OD<sub>660</sub>=1. Legenda: (○) ossigeno disciolto; (●) etanolo prodotto; (□) attività beta-galattosidasi; (■) densità ottica della coltura. (da: Camattari *et al.*, 2007).

Anche nel caso della regolazione ossigeno-dipendente, l'analisi dell'attività di forme delete del promotore di *PDC1* ha portato all'identificazione delle zone necessarie per l'induzione ipossica o per la repressione da ossigeno (Camattari *et al.*, 2007). In particolare, come indicato nella fig. I-16, la regione compresa tra -960 e -1172 è necessaria per il massimo tasso di induzione ipossia/ossigeno; la regione tra -800 e -960 è coinvolta nella repressione da ossigeno, in quanto forme del promotore in cui tale zona è assente

mostrano livelli di attività superiori al *wild-type* in condizioni normossiche; la regione tra -238 e -444, infine, sembra essere quella responsabile dell'induzione ipossica dell'attività promotore (Camattari *et al.*, 2007; Micolonghi *et al.*, 2007).



**Figura I-16.** Porzioni del promotore di *KIPDC1* coinvolte nella regolazione ossigeno-dipendente. M, regione necessaria per il massimo tasso d'induzione ipossia/ossigeno; O<sub>2</sub>, regione necessaria per la repressione da ossigeno; I, regione necessaria per l'induzione ipossica. (Camattari *et al.*, 2007; figura modificata da: Micolonghi *et al.*, 2007).

Ad oggi non sono noti fattori coinvolti nella regolazione ossigeno-dipendente dell'attività del promotore di *PDC1*. Una caratterizzazione di tale regolazione risulta tuttavia interessante sia per la ricerca di base che per scopi applicativi: nel primo ambito, verrebbe chiarito un meccanismo di regolazione che non è presente nei lieviti convenzionali come *Saccharomyces cerevisiae*, in cui la piruvato decarbossilasi è espressa in modo costitutivo; nel secondo, l'utilizzo del promotore di *PDC1* (o di sue forme ottimizzate) per l'espressione di proteine eterologhe fornirebbe un'alternativa poco costosa ai comuni sistemi d'espressione "two-step", in cui è necessario utilizzare un induttore che comporta inevitabilmente dei costi; al contrario, utilizzando il promotore di *PDC1* sarebbe sufficiente bloccare l'afflusso di aria nel bioreattore per ottenere l'induzione del sistema (Camattari *et al.*, 2007).

## 2. L'ossigeno

Tutti gli organismi viventi, ad eccezione degli anaerobi obbligati, dipendono dall'ossigeno per la produzione di energia metabolica e per molte reazioni biosintetiche. Ciò è dovuto all'alto potenziale ossidoriduttivo del composto, che permette la massima conservazione dell'energia ricavata dall'ossidazione dei substrati ridotti. Nonostante l'ossigeno molecolare sia chimicamente inerte esso può, in presenza di appropriati attivatori paramagnetici, generare le cosiddette specie reattive dell'ossigeno (ROS), estremamente dannose per le cellule (Cadenas, 1989). Gli organismi aerobi, quindi, pur essendo strettamente legati alla presenza di ossigeno nel proprio *habitat* devono anche difendere se stessi dai suddetti ROS.

E' oggi nota la correlazione esistente tra le specie reattive dell'ossigeno, l'invecchiamento cellulare e le malattie degenerative (Ames *et al.*, 1993; Shigenaga *et al.*, 1994; Irani *et al.*, 1997); appare dunque di notevole importanza la comprensione dei meccanismi cellulari di percezione dell'ossigeno e di risposta alle sue variazioni di concentrazione.

L'adattamento di cellule ed organismi a differenti concentrazioni di ossigeno richiede un complesso programma biochimico che regoli il livello intracellulare e l'attività di un gran numero di proteine (Bunn e Poyton, 1996; Hochachka *et al.*, 1996). Quando gli organismi sono sottoposti ad una diminuzione della tensione di ossigeno nell'ambiente che li circonda, condizione nota come ipossia, essi possono esibire una risposta a breve termine ed una a lungo termine. La prima, definita anche risposta acuta, è immediata e non richiede l'espressione di nuovi geni; è durante questa fase che le cellule percepiscono la variazione di concentrazione di ossigeno e avviano quelle vie di trasduzione del segnale che consentiranno loro di reagire adeguatamente alla nuova condizione ambientale. La risposta a lungo termine (o acclimatazione) richiede tempi più lunghi e, nella maggior parte dei casi, l'espressione di nuovi geni (Hochachka, 1998).

I meccanismi di percezione dell'ossigeno nei batteri, nei funghi, nei metazoi e nelle piante sono molteplici e constano sia di vie di trasduzione del segnale in cui sono coinvolti proteine o ligandi che interagiscono direttamente con l'ossigeno molecolare (*sensing*

diretto), sia di vie che riconoscono le perturbazioni dell'omeostasi cellulare, tra cui alterati livelli energetici o stati ossidoriduttivi (Bailey-Serres e Chang, 2005; Cash *et al.*, 2007).

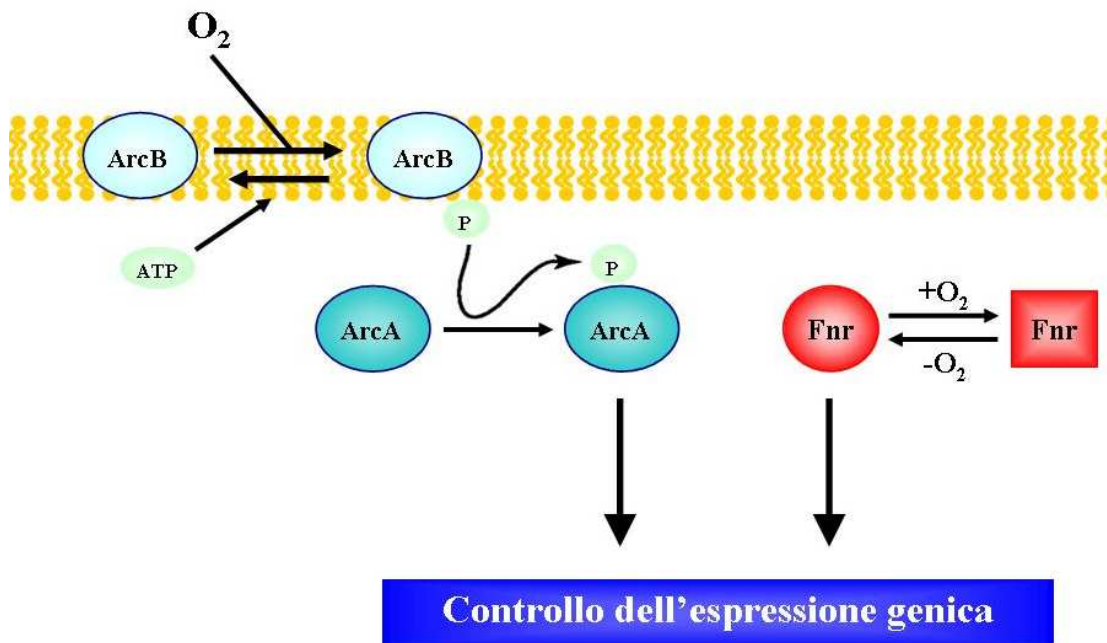
## 2.1. La risposta all'ossigeno nei batteri

Nei batteri *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., la disponibilità di ossigeno determina se l'energia sarà prodotta mediante la respirazione aerobica, la respirazione anaerobica o la fermentazione. Ciò è possibile perché questi microrganismi dispongono di diverse catene respiratorie, le quali usano differenti accettori di elettroni e ossidoreduttasi terminali (Lin *et al.*, 1991; Bunn e Poyton, 1996).

In presenza di ossigeno, *E. coli* utilizza una ossidasi terminale, il citocromo bo oppure il citocromo bd, a seconda della concentrazione di ossigeno. Il citocromo bo è attivo in condizioni normossiche ed è sostituito dal citocromo bd quando l'ossigeno diventa limitante. In condizioni anossiche ed in presenza un adeguato accettore di elettroni, *E. coli* può utilizzare una di cinque ossidoreduttasi alternative. Quando ha a disposizione diversi accettori di elettroni, la scelta ricade preferenzialmente su quello caratterizzato dal maggior potenziale di ossidoriduzione standard ( $E'_0$ ), massimizzando in tal modo il recupero di energia presente nei substrati ridotti. Per esempio, *E. coli* usa preferenzialmente come accettore di elettroni l'ossigeno molecolare ( $E'_0 = +820$  mV) rispetto al nitrato ( $E'_0 = +430$  mV) e quest'ultimo rispetto al fumarato ( $E'_0 = +30$  mV). Tale abilità di scegliere il *pathway* più favorevole per la produzione di energia è resa possibile dalla modulazione trascrizionale operata dall'ossigeno e dalla conseguente repressione e derepressione dei geni codificanti le differenti ossidoreduttasi. La regolazione della trascrizione dipendente dalla concentrazione di ossigeno è mediata da due fattori trascrizionali, Fnr e ArcA (fig. I-17) (Bunn e Poyton, 1996). Fnr è un regolatore globale e controlla l'espressione di un gran numero di geni (Spiro e Guest, 1991). Questa proteina è attiva come omodimero in cellule cresciute in condizioni anaerobiche; è in grado di reprimere la trascrizione di geni richiesti per il metabolismo aerobio, mentre promuove l'espressione dei geni coinvolti nel trasporto anaerobico degli elettroni. Il meccanismo di regolazione di FNR necessita della presenza di un centro ferro-zolfo dinamico,  $[4Fe-4S]^{++}$ , in ciascun omodimero attivato. Quando invece la concentrazione di  $O_2$  torna a livelli

ottimali il centro ferro-zolfo è rapidamente convertito a  $[2Fe-2S]^{++}$  promuovendo un cambiamento conformazionale nelle subunità e la rottura del dimero con conseguente rilascio del legame al DNA (Crack *et al.*, 2008).

ArcA è invece il regolatore di un tipico sistema a due componenti batterico (Iuchi *et al.*, 1992). Il sensore, ovvero il componente a monte di questo sistema, è ArcB, una chinasi che si autofosforila in condizioni normossiche (Kato *et al.*, 1997); una volta fosforilato, ArcB transfosforila ArcA, il quale è così attivato e può agire sia da attivatore che da repressore trascrizionale. Il segnale che attiva ArcB non sembra essere l'ossigeno di per sé, bensì lo stato ossidoriduttivo del citosol.



**Figura I-17.** Schema del funzionamento dei meccanismi batterici Fnr ed ArcAB (modificato da Webster *et al.*, 2003)

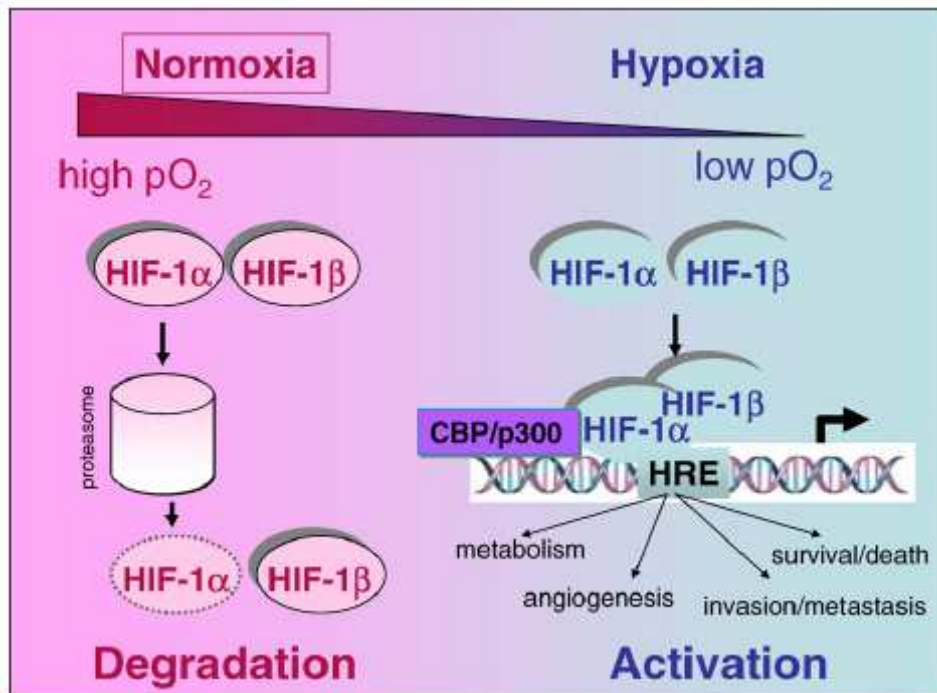
Un altro esempio di regolazione dell'espressione genica nei procarioti mediata dalla concentrazione di ossigeno ci viene offerto dal sistema a due componenti FixL-FixJ in *Rhizobium meliloti* (Agron *et al.*, 1994). FixL è il sensore di questo sistema regolativo; questa proteina è una emochinasi che fosforila il fattore trascrizionale FixJ in condizioni microaerofiliche. Una volta fosforilato, FixJ attiva la trascrizione di due geni, *nifA* e *fixK*. L'attività chinastica di FixL è strettamente regolata dal suo gruppo eme e dallo stato di ossidazione dell'atomo di ferro in esso contenuto (Bertolucci *et al.*, 1996).

## 2.2. La risposta all'ossigeno negli eucarioti superiori

Nei mammiferi un aumento dell'altitudine ha come conseguenza una risposta fisiologica che aumenta la frequenza e la profondità del respiro. Questa risposta fisiologica è seguita da una risposta adattativa a livello molecolare che coinvolge il fattore di trascrizione indotto dall'ipossia HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*). Questa proteina modula l'espressione di moltissimi geni, incluso quello codificante l'eritropoietina (EPO), responsabile di un incremento del numero di globuli rossi nel sangue e, di conseguenza, della quantità di ossigeno trasportato ai tessuti.

Bassi livelli di ossigeno nei tessuti, si riscontrano anche come conseguenza di diverse condizioni patologiche caratterizzate da una diminuzione nell'apporto di ossigeno dovuto a difetti di vascolarizzazione. Tra queste patologie si trovano disordini ischemici (cerebrali o cardiovascolari), il diabete, l'aterosclerosi, le malattie infiammatorie, la psoriasi, le patologie polmonari croniche ostruttive e il cancro. In queste condizioni il fattore di trascrizione HIF dà il via al processo di angiogenesi, una risposta adattativa che promuove la neo-vascolarizzazione nelle zone in cui vi è bisogno di un maggior apporto di ossigeno, promuovendo la trascrizione dei due fattori angiogenetici VEGF-A e Ang-2 (Ferrara e Kerbel, 2005).

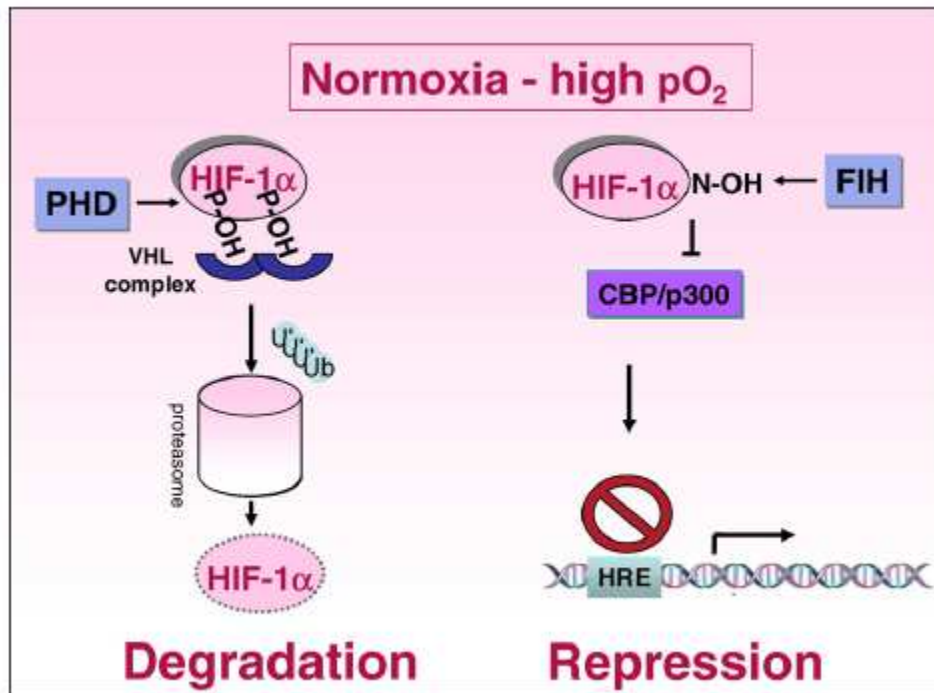
HIF è composto da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ . L'espressione di HIF- $\beta$  è indipendente dalla quantità di ossigeno atmosferico e quindi costitutiva; HIF- $\alpha$  è invece espresso solo in condizioni ipossiche. La fig. I-18 illustra il meccanismo di regolazione cui è sottoposto questo fattore trascrizionale. In condizioni normossiche, la proteina HIF- $\alpha$  viene rapidamente degradata in un processo mediato dal proteasoma; in questa condizione è dunque impossibile la formazione del complesso trascrizionalmente attivo costituito dalle due subunità HIF- $\alpha$  e HIF- $\beta$ . In ipossia, d'altro canto, HIF- $\alpha$  è stabile, interagisce con il suo partner HIF- $\beta$  ed insieme possono legare gli elementi responsivi all'ipossia (HRE, *Hypoxia-Response Element*) sui promotori dei geni bersaglio, in associazione con i co-attivatori CBP e p300, e attivare o reprimere la trascrizione di almeno 70 geni implicati nelle più svariate funzioni.



**Figura I-18.** Meccanismo di regolazione del fattore di trascrizione HIF- $\alpha$  in condizioni normossiche ed ipossiche (da Brahim-Horn *et al.*, 2007).

Il meccanismo molecolare responsabile dell'effimera natura di HIF- $\alpha$  è rimasto un mistero per molti anni, fin quando non è stata definita la funzione di alcune idrossilasi, la cui attività catalitica richiede ossigeno molecolare, implicate nella regolazione di questa proteina. In condizioni normossiche, la prolil-idrossilasi PHD idrossila HIF- $\alpha$  a livello di due proline; questa modificazione post-traduzionale fa sì che tale subunità sia riconosciuta dalla ubiquitina E3 ligasi, poliubiquitinata ed infine degradata dal proteasoma (fig. I-19). Esistono tre isoforme della idrossilasi PHD e l'espressione di due dei tre corrispettivi geni è regolata da HIF. Le PHD sono dunque soggette ad un meccanismo di autoregolazione che porta ad un aumento di queste proteine in ipossia. In questo modo la cellula può rispondere in modo rapido ed efficace nel degradare HIF- $\alpha$  durante il ritorno da una condizione ipossica ad una normossica. Un'altra idrossilasi, FIH-1, idrossila un residuo di asparagina ammino-terminale di HIF- $\alpha$ ; questa modificazione post-traduzionale inattiva HIF impedendo al regolatore di interagire con i co-attivatori CBP e p300, interazione necessaria per la formazione di un complesso trascrizionalmente attivo (Brahimi-Horn e Pouyssegur, 2007).





**Figura I-19.** Schema del meccanismo di regolazione post-traduzionale mediato dall'ossigeno che regola la stabilità e l'attività di HIF- $\alpha$  (da Brahimi-Horn *et al.* 2007).

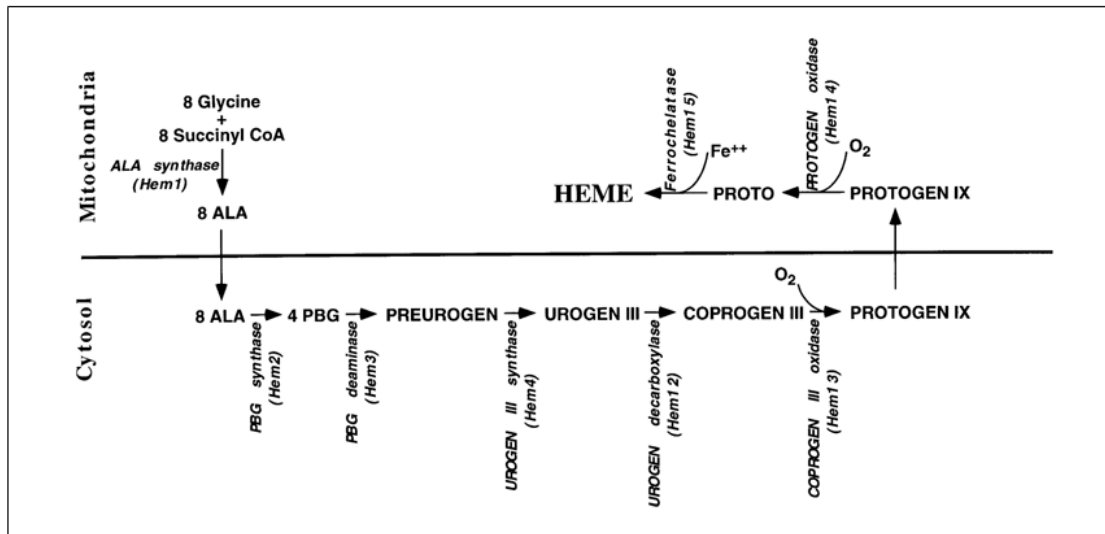
### 2.3. La risposta all'ossigeno in *Saccharomyces cerevisiae*

Come i procarioti e gli eucarioti superiori, anche i lieviti hanno bisogno di meccanismi efficienti di adattamento alle variazioni della disponibilità di ossigeno. *Saccharomyces cerevisiae* è l'organismo modello in cui la risposta alle variazioni di ossigeno è stata maggiormente studiata e su cui abbiamo il maggior numero di informazioni per quanto riguarda la regolazione ossigeno-dipendente del metabolismo. Questo lievito ha un metabolismo di tipo respiro-fermentativo, con prevalenza della fermentazione sulla respirazione; in condizioni ipossiche o anossiche, è tuttavia in grado di crescere grazie al solo metabolismo fermentativo (Poyton, 1999). I livelli intracellulari e spesso anche l'attività di un vasto numero di proteine in *S. cerevisiae* dipendono dall'ossigeno (Poyton e Burke, 1992; Zitomer e Lowry, 1992; Kwast *et al.*, 1998). Tra queste vi sono diversi enzimi e regolatori della catena respiratoria e proteine coinvolte nella sintesi di eme, steroli ed acidi grassi insaturi. Inoltre, l'ossigeno regola i livelli degli enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e il livello dei fattori d'inizio della traduzione (Poyton, 1999). La regolazione ossigeno-dipendente di queste proteine si

esplica principalmente attraverso meccanismi di regolazione dell'espressione genica. La maggior parte dei geni regolati dall'ossigeno in *S. cerevisiae* può essere suddivisa in due gruppi: i geni aerobici, la cui trascrizione è indotta in condizioni normossiche, ed i geni ipossici, la cui espressione è viceversa indotta in condizioni di microaerofilia o anossia stretta. L'ossigeno può anche regolare la produzione di proteine attraverso il controllo della traduzione, soprattutto nel caso di proteine codificate dal DNA mitocondriale. Infine, l'ossigeno può avere effetti indiretti sull'espressione di alcune proteine: ad esempio, poiché l'ossigeno è richiesto per la biosintesi dell'eme negli eucarioti (Labbe-Bois e Labbe, 1990), la disponibilità di ossigeno modifica il *folding* o l'assemblaggio delle emoproteine attraverso variazioni nella disponibilità o nello stato ossidoriduttivo dei gruppi prostetici in esse contenuti.

### **2.3.1. L'eme e la risposta mediata da Hap1**

L'eme è una molecola essenziale per il rilevamento dell'ossigeno negli esseri viventi (Mense e Zhang, 2006). Un legame diretto tra i livelli di eme intracellulare e la concentrazione di ossigeno non sono stati ancora stabiliti, anche se è noto che due enzimi coinvolti nel *pathway* biosintetico dell'eme necessitano dell'ossigeno come substrato. Questi sono la coproporfirinogeno III ossidasi (Hem13) e la protoporfirinogeno ossidasi (Hem14), che catalizzano rispettivamente la reazione di conversione del coproporfirinogeno in protoporfirinogeno IX e di quest'ultimo in protoporfirinogeno. Nella fig. I-20 è mostrata la cascata di reazioni che portano alla biosintesi dell'eme a partire da glicina e succinil-CoA.



**Figura I-20.** La via biosintetica dell'eme nel lievito *S. cerevisiae* (da Zhang *et al.* 1999).

La biosintesi dell'eme richiede otto enzimi: 5-aminolevulinato (ALA) sintetasi, porfobilinogeno (PBG) sintasi, porfobilinogeno deaminasi, uroporfirinogeno (UROGEN) III sintasi, uroporfirinogeno decarbossilasi, coproporfirinogeno (COPROGEN) III ossidasi, protoporfirinogeno (PROTOGEN) IX ossidasi e ferrochelatasi, codificati rispettivamente dai geni *HEM1*, *HEM2*, *HEM3*, *HEM4*, *HEM12*, *HEM13*, *HEM14* e *HEM15*. I tre enzimi 5-aminolevulinato sintetasi, protoporfirinogeno ossidasi e ferrochelatasi sono localizzati nei mitocondri mentre i restanti cinque svolgono la loro azione catalitica nel citosol. In condizioni normossiche, l'ossigeno reagisce con Hem13 e Hem14 ed influenza la via metabolica spingendo verso la biosintesi dell'eme.

Il meccanismo eme-dipendente più studiato per la risposta alle variazioni di ossigeno in lievito è quello in cui è coinvolta la proteina Hap1. Hap1 è un regolatore trascrizionale necessario per l'espressione di numerosi geni aerobici, compresi quelli necessari per la respirazione e per la risposta allo stress ossidativo (Becerra *et al.*, 2002; Kwast *et al.*, 1998; Ter Linde e Steensma, 2002; Zhang e Hach, 1999); inoltre, è un attivatore trascrizionale di *ROX1*, che codifica per un repressore di diversi geni ipossici (Becerra *et al.*, 2002; Kwast *et al.*, 2002; Ter Linde e Steensma, 2002). Hap1, quindi, induce in modo diretto la trascrizione dei geni aerobici e reprime in modo indiretto l'espressione dei geni ipossici. In condizioni ipossiche, quando l'eme non è sintetizzato ed è presente nella cellula in basse

quantità, Hap1 non funge da attivatore ed i geni aerobici, incluso *ROX1*, non vengono trascritti. Il legame all'eme induce nella proteina un transizione conformazionale che ne permette il legame alle sequenze *consensus* a monte dei geni aerobici. In assenza del cofattore, invece, Hap1 agisce da repressore trascrizionale dei geni aerobici *ERG2*, *ERG5* eg *ERG11*, che codificano per enzimi necessari per la biosintesi dell'ergosterolo, oltre a reprimere la propria trascrizione (Hon *et al.*, 2005; Hickman e Winston, 2007).

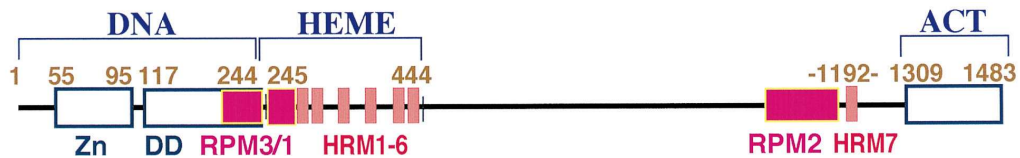
La prova che Hap1 non interagisce direttamente con l'ossigeno ma è attivata dalla presenza di eme intracellulare è stata fornita da esperimenti condotti da Hon *et al.* (2003). In condizioni di crescita ipossica Hap1 viene attivata fornendo alla cellula eme dell'esterno, dimostrazione del fatto che Hap1 risponde direttamente all'eme la cui biosintesi è legata alla presenza di ossigeno. Dati ottenuti da esperimenti di *MicroArray* mostrano inoltre che l'espressione trascrizionale di *HAP1* non varia in cellule cresciute con differenti concentrazioni di ossigeno, indicando ancora una volta che *HAP1* non è un gene direttamente responsivo all'ossigeno, mentre diminuisce fino a zero in assenza di eme.

Quando le cellule crescono in ipossia con il precursore dell'eme, la deuteroporfirina IX che si trova a valle della coproporfirinogeno III ossidasi e della protoporfirinogeno ossidasi, si "scavalcano" gli enzimi Hem13 e Hem14 che utilizzano come substrato l'ossigeno. In questo caso l'eme viene sintetizzato anche in carenza di ossigeno e Hap1 viene attivato. La ferrochelatasi catalizza l'ultimo passaggio nella biosintesi dell'eme: risiede nel mitocondrio, non usa l'ossigeno come substrato ma potrebbe essere influenzata indirettamente dall'ossigeno. Nel mitocondrio risiede il  $Fe^{3+}$  che deve essere ridotto per l'incorporazione nell'eme mediata dalla ferrochelatasi. L'assorbimento del ferro nel mitocondrio dipende dal potenziale di membrana che lo dirige all'interno del mitocondrio. Sia lo stato ridotto del ferro che il suo assorbimento sono processi influenzati dalla concentrazione di ossigeno. Quindi la ferrochelatasi è influenzata dall'ossigeno anche se non lo utilizza direttamente come substrato e in presenza di deuteroporfirina IX, l'eme viene sintetizzato a bassi livelli e Hap1 viene attivato debolmente.

L'eme attiva Hap1 legando i motivi HRM (*Heme-Responsive Motif*). Motivi HRM sono stati identificati in diversi altri attivatori trascrizionali responsivi all'eme di *S. cerevisiae* oltre ad Hap1 (Hach *et al.*, 1999).

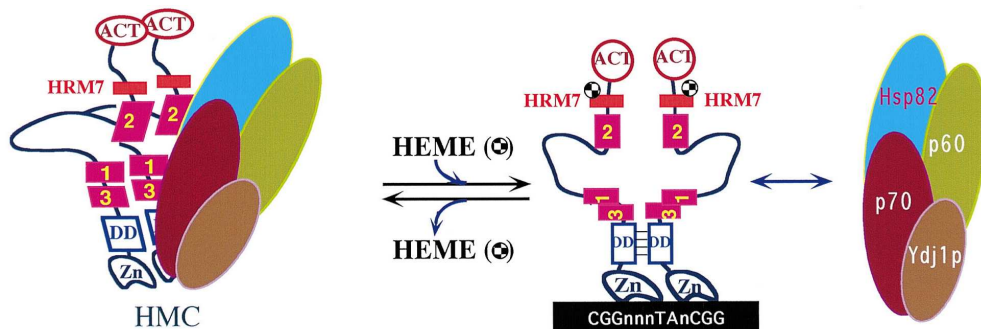
Hap1 contiene cinque domini funzionali conosciuti: il primo è uno  $Zn_2$ -Cys6 *cluster*, che è responsabile del legame al DNA ed è necessario per l'omodimerizzazione di

Hap1, necessaria per la trascrizione di un complesso trascrizionalmente attivo (Timmerman *et al.*, 1996; Pfeifer *et al.*, 1989); il dominio HEME che contiene sei motivi HRM, il dominio HRM7 e il dominio di attivazione (ACT) ( fig. I-21).



**Figura I-21.** Domini funzionali conosciuti in Hap1. **Zn**, dominio Zn<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub>; **DD**, dominio di dimerizzazione; **RPM**, moduli di repressione; **HRM**, motivi responsivi all'eme; **ACT**, dominio di attivazione. (Modificato da Zhang *et al.*, 1999).

La delezione del dominio HEME rende Hap1 costitutivamente attiva e non responsiva all'eme. Come mostrato nella fig. I-22, nel dominio HEME oltre ai sei motivi HRM è presente il motivo di repressione RPM che è indispensabile per l'inibizione di Hap1 in assenza di eme. L'attivazione di Hap1 mediata dall'eme prevede il disassemblaggio della proteina da un complesso ad alto peso molecolare (HMC, *High Molecular weight Complex*). Quando l'eme cellulare diminuisce, Hap1 è legata al complesso HCM costituito da Hsp90 (Hsp82/Hsc82), Hsp70, Ydj1 (co-chaperonina di Hsp70) e una proteina non nota avente una massa di 60 kDa. Il complesso HMC è solo debolmente legato al DNA, ma quando Hap1 viene liberata dal complesso è in grado di legare le *consensus* dei geni bersaglio con un'alta affinità fungendo da attivatore della trascrizione (Zhang *et al.*, 1999). (fig. I-22).



**Figura I-22.** Equilibrio tra la forma inattiva intrappolata nel complesso HMC e quella attiva di Hap1 (da Zhang *et al.* 1999).

### 2.3.2. Il complesso Hap2/3/4/5.

Il complesso Hap2/3/4/5, anche chiamato CBF (CCAAT binding factor), è uno dei regolatori trascrizionali responsabili dell'induzione di molti geni coinvolti nel metabolismo respiratorio e lega la *consensus* 5'-CCAAT-3' all'interno dei promotori dei geni bersaglio (Forsburg e Guarente, 1988). È costituito da tre subunità eterologhe Hap2, Hap3, Hap5 che sembrano sufficienti per il legame al DNA, ma non per espletare la funzione di attivatore trascrizionale. Tale attivazione è mediata da una quarta subunità Hap4. Hap2 è una proteina di 265 amminoacidi contenente un sito di legame al DNA; Hap3 è una proteina di 144 amminoacidi anch'essa necessaria per il legame al DNA; Hap4 è una proteina di 554 amminoacidi che contiene un dominio acido di attivazione; infine, Hap5 è una proteina di 216 amminoacidi la cui presenza è richiesta sia per il corretto assemblaggio del complesso sia per la sua attività di legame al DNA (McNabb e Pinto, 2005).

Il gene *HAP4* è soggetto alla repressione da glucosio, mentre l'espressione dei geni *HAP2*, *HAP3*, *HAP5* è costitutiva. Si ha l'induzione ossica dei geni bersaglio solo in assenza di glucosio quando Hap4 viene sintetizzato e interagisce con Hap2/3/5. Mutazioni che sopprimono la funzione di una qualsiasi delle quattro subunità Hap risultano nella incapacità del lievito di crescere su fonti di carbonio non fermentabili. Ciascuna delle subunità contiene una regione *core* essenziale che risulta evolutivamente conservata dal lievito all'uomo, con Hap3 e Hap5 che mostrano sequenze amminoacidiche simili al motivo degli istoni H2B e H2A, rispettivamente.

Ad oggi, il meccanismo biochimico che media l'assemblaggio del complesso non è stato ancora descritto. Nei mammiferi il complesso è formato dalle subunità CBF-A (Hap3), CBF-B (Hap2), CBF-C (Hap5) nel ratto, o NFY-A (Hap2), NFY-B (Hap3), NFY-C (Hap5) nel topo e nell'uomo, che si assembla con un modello a due stadi in cui inizialmente si forma un eterodimero stabile CBF-A con CBF-C e in un secondo stadio si lega CBF-B a formare un complesso trimerico. Nel lievito, invece, c'è una differenza, poiché non si osserva un eterodimero stabile Hap3-Hap5: il complesso stabile si forma in presenza di tutte e tre le subunità e il legame al DNA richiede l'interazione con Hap4 (McNabb *et al.*, 1995).

A differenza di Hap1, per il complesso Hap2/3/4/5 sembra non essere necessario il legame con l'eme per poter agire da attivatore trascrizionale dei molti geni bersaglio coinvolti nel metabolismo respirativo, nonostante nell'omologo umano di Hap2/3/4/5, il

complesso NFYA/B/C, l'attività sia regolata dal livello intracellulare di eme (Marziali *et al.*, 1997).

### 2.3.3. Il repressore Rox1

*ROX1* è un gene la cui trascrizione è mediata dal fattore trascrizionale Hap1 in presenza di eme. Nei precedenti paragrafi è stato descritto come l'eme sia coinvolto nel monitoraggio della tensione di ossigeno e come regoli l'attività di Hap1. Tra i geni Hap1-regolati, *ROX1* è quello che ha un ruolo predominante nel reprimere i geni ipossici in presenza di ossigeno.

*ROX1* è posizionato sul cromosoma XVI e codifica per una proteina di 368 amminoacidi. La proteina può essere suddivisa in 3 regioni principali: dal residuo 1 al residuo 90 contiene un dominio HMG per il legame specifico sul DNA dei geni bersaglio; dal residuo 103 al 123 contiene una sequenza ripetuta ricca di glutammine il cui ruolo deve essere ancora investigato (fig. I-23). La restante parte al C-terminale contiene un dominio noto di repressione tramite il quale Rox1 riesce a reprimere i suoi bersagli ipossici in condizioni aerobiche grazie all'interazione con il complesso Ssn6/Tup1 (Deckert *et al.*, 1995).



Figura I-23. Schema dei principali domini noti della proteina Rox1

La repressione dei geni ipossici è direttamente correlata con i livelli di Rox1 presenti nella cellula: quando la concentrazione di ossigeno diminuisce drasticamente in condizioni ipossiche, l'eme non viene più sintetizzato, Hap1 non viene attivato e la trascrizione di *ROX1* viene repressa; Rox1 scompare rapidamente essendo la proteina altamente labile.

Rox1 insieme al complesso Ssn6/Tup1 reprime circa 40 geni ipossici. Tup1 e Ssn6 formano un complesso di repressione che agisce mediante due meccanismi: nel primo Tup1 lega il dominio aminotermine, ricco di residui di lisina, degli istoni H3 e H4 richiamando l'istone deacetilasi Hda1 che in ultimo blocca il legame dell'RNA polimerasi II sulla regione TATA-box silenziando così il gene; il secondo è invece un meccanismo cromatina-indipendente ancora poco caratterizzato. Il complesso Tup1/Ssn6, che non ha

attività intrinseca di legame al DNA, viene attirato da proteine che interagiscono con specifiche sequenze di DNA; per i geni ipossici l'interazione è mediata da Rox1 che possiede il dominio HMG. Rox1 attira Tup1/Ssn6 mediante un'interazione con il dominio TPR (*tetratricopeptide repeat*) di Ssn6.

Un gene ipossico, bersaglio di Rox1, è *ANBI*, il quale è pienamente represso in condizioni normossiche (Lowry e Lieber, 1986). *ANBI* codifica per eIF-5a, una subunità del fattore d'inizio della sintesi proteica negli eucarioti. In *S. cerevisiae* esistono due geni che codificano per tale subunità: *ANBI* che è espresso in condizioni ipossiche, e *HYP2*, espresso esclusivamente in condizioni normossiche. La regione regolativa a monte del gene *ANBI* contiene due operatori, A e B, ciascuno dei quali presenta un sito di legame per Rox1. La repressione di *ANBI* è mediata, in condizioni aerobiche, da Rox1 in cooperazione con il complesso Tup1/Ssn6 e con Mot3, un'altra proteina responsabile della repressione dei geni ipossici. Il meccanismo di azione su *ANBI* del complesso Tup1/Ssn6, insieme a Mot3, in questo caso prevede il silenziamento mediante il blocco della TATA box. In assenza di Mot3, la repressione è mantenuta dai soli Rox1 e Ssn6/Tup1 mediante il meccanismo cromatina-indipendente.

Esperimenti condotti in ceppi deleti per *ROX1* dimostrano che *ANBI* è espresso costitutivamente (Klinkenberg *et al.*, 2005). Alcuni dei geni che Rox1 reprime sono unici nel genoma e sarebbero completamente repressi se non ci fosse un meccanismo che ne media l'espressione basale. *ROX1* è regolato dal suo stesso prodotto genico, permettendo così l'espressione basale a questi geni target in condizioni normossiche.

L'intero trascrittoma di *S. cerevisiae* è stato analizzato da Steensma *et al.* (2002) per individuare altri geni bersaglio di Rox1. Sono stati individuati 40 geni i cui livelli di espressione sono maggiori nel mutante  $\Delta rox1$  rispetto al selvatico, e di questi 25 contengono un sito di legame per Rox1. La sequenza *consensus* di legame per Rox1 è YYYATTGTTCTC, altamente conservata, in cui ATTGTT rappresenta il *core*. Nella tabella I-3 sono indicati i geni regolati da Rox1. Per alcuni di questi geni è già stato descritto il meccanismo di regolazione mediato da Rox1 (*AAC3*, *ANBI*, *DANI*, *HEM13*, *COX5B*) (Ter Linde e Steensma, 2002). In generale da questa analisi si evidenzia il ruolo regolativo di Rox1 per geni funzionalmente importanti nella biosintesi dell'eme e degli steroli, per geni che codificano per mannoproteine di parete e per geni coinvolti nella mobilizzazione del ferro.



**Tabella I-3.** Elenco dei geni la cui espressione risulta essere maggiore nel ceppo *rox1* (da Ter Linde e Steensma, 2002).

Gene/ORF	Putative Rox1-binding site <sup>6</sup>			Description	
AAC3	-145	TCC	ATTGTC	CTT -134	ADP/ATP translocator
FUN57	-197	TTC	ATTGTT	TGG -186	Strong similarity to subtelomerically encoded proteins
	-210	CTC	ATTGTA	AGC -199	
	-474	TCT	ATTGTT	TGG -485	
FET4	-522	TCT	ATTGTT	GCG -511	Low affinity Fe(II) transporter
	-777	CTT	ATTGTT	TAT -788	
	-798	GCT	ATTGTT	CAT -787	
ANB1	-865	CTT	TTTGTT	CAC -854	Translation initiation factor eIF-5A
	-196	CTC	ATTGTT	GCT -185	
	-217	TCC	ATTGTT	CTC -206	
	-284	CCT	ATTGTT	CTC -273	
DAN1	-315	TCC	ATTGTT	CGT -304	Cell wall mannoprotein
	-231	TGT	ATTGTT	TTA -242	
	-668	ACT	ATTGTC	AAA -679	
	-721	TAT	TTTGTT	TGC -710	
HEM13	-891	TAG	ATTGTA	AGC -880	Coproporphyrinogen III oxidase
	-903	GCA	ATTGTT	CAT -914	
	-185	CCC	ATTGTT	CTC -174	
	-238	TGC	TTTGTT	CAA -249	
	-474	TCA	ATTGTT	TAG -463	
COX5B	-582	CGT	ATTGTT	TTT -593	Cytochrome c oxidase subunit Vb
	-227	TGT	ATTGTT	CGA -216	
	-378	TGA	ATTGTT	TTA -367	
OYE2	-240	CGT	ATTGTT	CGA -229	NADPH dehydrogenase
	-267	GCC	ATTGTT	TGG -256	
	-572	CGT	ATTGTG	CTA -583	
	-727	TCG	TTTGTT	GCA -716	
	-759	TTA	ATTGTT	CTC -770	
LAC1	-198	GCT	ATTGTA	TTC -187	Required for ER-to-Golgi transport of GPI-anchored proteins
	-212	TTT	ATTGTT	ATT -201	
	-264	CGT	TTTGTT	TTA -253	
	-296	TCT	ATTGTT	TCC -285	
	-381	GGC	ATTGTA	CCT -370	
YMR252C YHR048W	-108	CCT	ATTGTT	CTC -119	Unknown function
	-569	GCT	TTTGTT	TCC -580	Member of multidrug resistance 12-spanner family
FRD51	-815	CAT	TTTGTT	AGC -826	Fumarate reductase, cytoplasmic
	-174	TCT	ATTGTT	TCA -185	
	-498	TTC	TTTGTT	CCC -487	
	-671	TGT	TTTGTT	ATT -660	
	-747	ATT	ATTGTA	ATG -758	
SUR2	-811	TGT	ATTGTT	AGG -800	Hydroxylase involved in sphingolipid metabolism
	-347	CCT	ATTGTC	TTA -336	
	-270	TTT	TTTGTT	ACC -259	
SML1	-366	TCT	ATTGTT	CTT -377	Negatively affects dNTP pools, binds ribonucleotide reductase and inhibits its activity
	-241	CCC	TTTGTT	CTT -252	Unknown function
YNR014W YAL028W	-175	TTC	ATTGTG	TAC -164	Unknown function
	-376	GCA	ATTGTA	ATA -387	
	-486	CTT	ATTGTT	CTA -497	
	-504	AAC	ATTGTT	ACC -515	
	-550	CCT	TTTGTT	CTT -561	

Gene/ORF	Putative Rox1-binding site <sup>c</sup>					Description
TIR2	-94	CTC	ATTGTT	CGA	-105	Cold shock-induced protein
	-255	AAC	ATTGTG	GTG	-244	
	-684	TCT	ATTGTG	TAT	-695	
	-984	TGG	ATTGTT	TTA	-995	
YGR035C	-114	AGT	ATTGTG	GAC	-125	Unknown function
	-426	CCG	ATTGTT	CCA	-415	
YAR028W	-124	CGT	ATTGTT	GCA	-135	Strong similarity to subtelomerically encoded proteins
	-180	TCT	ATTGTG	ATG	-191	
DIP5	-613	ATG	TTTGTT	TTT	-602	Dicarboxylic amino acid permease
	-649	TCT	ATTGTT	TCC	-638	
ISU2	-203	TCT	ATTGTT	TCA	-192	Similarity to iron-sulphur cluster nitrogen fixation proteins
	-418	CCT	TTTGTT	TTT	-429	
	-695	GCC	ATTGTA	TAT	-706	
EUG1	-90	TCT	ATTGTC	TTA	-101	Protein disulphide isomerase
HEM14	-74	TCT	ATTGTT	CTC	-85	Protoporphyrinogen oxidase
	-139	CAC	TTTGTT	GCT	-128	
PIS1	-143	CCT	ATTGTT	TTT	-132	Phosphatidylinositol synthase
ERG26	-161	TTT	ATTGTT	CTC	-150	C-3 sterol dehydrogenase, C-4 decarboxylase
	-218	TTT	ATTGTC	GGT	-207	
	-447	ATT	TTTGTT	TTT	-436	
	-600	TTA	ATTGTA	CTA	-589	

### 2.3.4. Il repressore Mot3

Il gene *MOT3* codifica per una proteina nucleare di 490 aminoacidi caratterizzata da un'elevata composizione in asparagine, glutammine, alanine, proline e serine; questi residui costituiscono il 60% dell'intera proteina. Dal punto di vista strutturale, gli unici motivi che è possibile predire sulla base della sequenza amminoacidica sono due *zinc finger* C2-H2 (fig. I-24) che conferiscono a Mot3 la capacità di legare il DNA sulla sequenza degenerata (C/A/T)AGG(T/C)A (Hongay *et al.*, 2002)



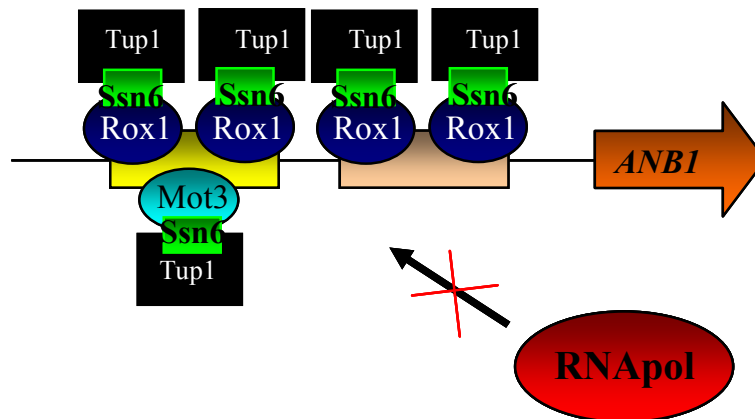
Figura I-24. Schema dei principali domini noti della proteina Mot3.

I motivi *zinc finger* di Mot3 sono altamente omologhi a quelli trovati in Msn2 e Msn4, due proteine di *S. cerevisiae* coinvolte nel *pathway* di risposta agli stress. *MOT3* fu originariamente identificato come soppressore genetico del doppio mutante letale *spt3Δ mot1-24Δ* e di recente è stato dimostrato reprimere la trascrizione di due geni durante la crescita aerobica: *ANB1*, che codifica per la subunità ipossica del fattore di inizio della

trascrizione eucariotica e bersaglio anche di Rox1, e *DANI*, che codifica per una mannoproteina di parete cellulare. Mot3 esplica la sua funzione anche attivando la trascrizione di *CWP2*, un gene codificante per una proteina di parete. Questo regolatore presenta quindi una certa versatilità sia come attivatore che come repressore, intervenendo nei processi di rimodellamento della parete cellulare, nei quali proteine aerobiche e anaerobiche si esprimono alternativamente in risposta alla concentrazione di ossigeno.

L'espressione di *MOT3* diminuisce in condizioni ipossiche e la variazione dei livelli di trascritto sembra essere, come per *ROX1*, Hap1-dipendente, ma in questo caso Hap1 sembrerebbe essere coinvolto nella sua repressione in assenza di eme, insieme al complesso Tup1/Ssn6; il meccanismo d'interazione che coinvolge l'eme, Hap1 e Tup1/Ssn6 nella repressione di *MOT3* non è ancora stato caratterizzato (Sertil *et al.*, 2003).

Il meccanismo di azione di Mot3 nella regolazione del gene ipossico *ANBI* è stato investigato, ma ancora non dimostrato (Klinkenberg *et al.*, 2005). Tuttavia la presenza di entrambi i fattori Rox1 e Mot3 determina una completa repressione del gene. *ANBI* presenta a monte del gene due operatori OpA e OpB, ciascuno contenente due siti di legame per Rox1, mentre un solo sito di legame per Mot3 è presente in OpA. In assenza di Mot3, la repressione di *ANBI* risulta essere elevata e in sua presenza è completa; in assenza di Rox1, il gene *ANBI* è derepresso. Esperimenti di delezione di uno solo dei due geni o di entrambi portano alla conclusione che Mot3 è un fattore supplementare per la repressione dei geni ipossici. Non media il legame di Rox1 sul DNA bensì coopera con Rox1 per il reclutamento del complesso Tup1/Ssn6 attraverso una interazione diretta, in quanto anche in assenza di Rox1 si ha una modesta repressione di *ANBI*. Quindi Mot3, legandosi sull'OpA, potrebbe agire reclutando direttamente Tup1/Ssn6 o interagendo esso stesso con il DNA alterandone la topologia con il fine ultimo di reprimere il gene.



**Figura I-25.** Meccanismo cromatina-indipendente per la repressione, mediata da Rox1 e Mot3, del gene ipossico *ANB1* in presenza di ossigeno. La formazione di due complessi Rox1/Ssn6/Tup1 sull'operatore OpB (in rosa) e di altri due complessi Rox1/Ssn6/Tup1, oltre ad un complesso Mot3/Ssn6/Tup1, sull'operatore OpA (in giallo) impedisce il legame della RNA polimerasi al promotore e quindi la formazione del complesso d'inizio della trascrizione.

### 2.3.5. Il regolatore Mga2

*MGA2* è un gene espresso costitutivamente, codificante per una proteina che in condizioni ipossiche viene attivata, svolgendo il proprio ruolo di regolatore positivo di geni ipossici (Hoppe *et al.*, 2000).

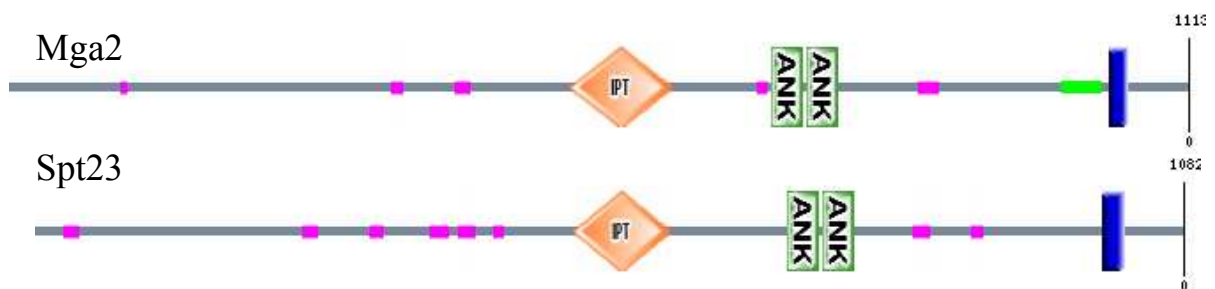
*MGA2* è stato identificato durante la ricerca di soppressori multicopia della delezione del gene *SNF2* (Zhang *et al.*, 1997), codificante per una proteina coinvolta nel rimodellamento dei nucleosomi e responsabile quindi della regolazione trascrizionale di diversi geni (Kornberg e Lorch, 1999; Travers, 1999); in seguito è stato scoperto che Mga2 è necessario per l'induzione del gene *OLE1* (Zhang *et al.*, 1999). Questo gene codifica per una  $\Delta 9$ -desaturasi che catalizza la formazione di un doppio legame tra il nono ed il decimo atomo di carbonio del palmitoil-CoA (16:0) o dello stearoil-CoA (18:0) utilizzando l'ossigeno molecolare come accettore di elettroni e formando, rispettivamente, l'acido palmitoleico (16:1) e l'acido oleico (18:1). Questi acidi grassi insaturi sono essenziali per il mantenimento di un'ottimale fluidità della membrana plasmatica durante il processo di accrescimento cellulare, e costituiscono uno dei principali componenti dei lipidi delle cellule in fase stazionaria.

La trascrizione di *OLE1* è indotta in condizioni ipossiche e, in condizioni normossiche, dalla presenza dei metalli di transizione nickel e cobalto, che mimano la

carezza di ossigeno (Kwast *et al.*, 1999). L'analisi dettagliata del promotore di questo gene ha condotto all'identificazione di una sequenza di circa 20 nucleotidi responsabile della sua induzione ipossica: questa sequenza, chiamata LORE (*Low Oxygen Response Element*, 5'-GAACACTCAACAAACCTTAT-3'), è stata poi identificata anche in altri geni di *S. cerevisiae* tra cui *ATF1*, *TRX2*, *SUT1* e *TIR1* (Vasconcelles *et al.*, 2001).

L'espressione di *OLE1* è sotto il controllo di due fattori trascrizionali, Mga2 e Spt23. Queste due proteine, funzionalmente e geneticamente correlate, condividono un'identità di sequenza aminoacidica pari al 43% mentre il livello di similarità raggiunge il 60%. L'assenza di uno solo di questi due regolatori ha solo un modesto effetto sulla crescita cellulare mentre la delezione di entrambi risulta letale per la cellula (Zhang *et al.*, 1997). Mga2 e Spt23 sono presenti all'interno della cellula come precursori inattivi, ancorati con la loro coda carbossi-terminale alla membrana del reticolo endoplasmatico; la loro attivazione avviene attraverso un processo di ubiquitinazione mediato da Rsp5 e dal conseguente taglio proteolitico operato dal proteasoma che libera le porzioni ammino-terminali, le quali migrano nel nucleo modulando l'espressione dei geni bersaglio. Ciò che differenzia queste due proteine è lo stimolo necessario alla loro attivazione: mentre entrambe sono attivate dalla carenza di acidi grassi insaturi, solo Mga2 è in grado di rispondere all'ipossia (Jiang *et al.*, 2001).

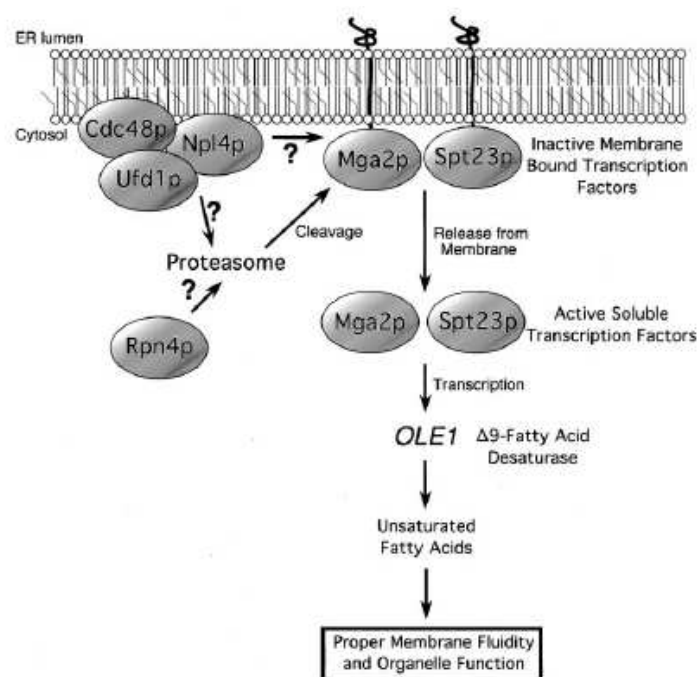
*MGA2* codifica per una proteina di 1152 aminoacidi che contiene un dominio della famiglia IPT, deputato all'interazione con il DNA; due domini motivi ripetuti *ankyrin*, necessari per l'interazione proteina-proteina; e, infine, un dominio transmembrana attraverso il quale è ancorata al reticolo endoplasmatico quando si trova nella forma inattiva (fig. I-26)



**Figura I-26.** Schema dei principali domini noti delle proteine Mga2 e Spt23: IPT, dominio di legame al DNA; ANK, domini deputati all'interazione proteina-proteina; in blu, in prossimità dell'estremità carbossi-terminale, il dominio transmembrana (da: <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Non è ancora chiaro il meccanismo molecolare che è responsabile dell'attivazione di Mga2 in condizioni ipossiche. Tuttavia è noto che Mga2 non è in grado di legare direttamente il DNA e per svolgere la sua funzione di attivatore della trascrizione è necessario che interagisca con altre proteine in grado di legare le sequenze LORE (Chellappa *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001).

Uno studio recente (Kelley e Ideker, 2009) mostra il coinvolgimento di Mga2 anche nella risposta adattativa al perossido di idrogeno. Mga2 è coinvolta nella fase precoce della risposta a tale stress ossidativo: in presenza di basse concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel mezzo di crescita, la proteina induce l'espressione di geni responsabili della biosintesi di ergosterolo, determinando così un aumento di tale molecola tra i componenti della membrana cellulare; ciò determina un indurimento della membrana che impedisce l'ingresso nella cellula di altre molecole di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il meccanismo di attivazione di Mga2 in questo tipo di risposta non è ancora chiaro, ma è probabilmente lo stesso che determina la risposta allo stress ipossico.



**Figura I-27.** Schema del modello proposto per l'attivazione proteasoma-dipendente di Mga2. Il ruolo dei vari regolatori che concorrono all'attivazione della proteina non è ancora stato caratterizzato. (da: Hitchcock *et al.*, 2001).

## 2.4. La risposta all'ossigeno in *K. lactis*

*Kluyveromyces lactis*, a differenza di *S. cerevisiae*, non è in grado di crescere in condizioni di stretta anossia. Ciò sembra essere dovuto alla mancanza, nel suo genoma, dei geni necessari per l'assorbimento di ergosterolo dall'esterno in anaerobiosi (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2006; Snoek e Steensma, 2006). Tuttavia, in *K. lactis* sono presenti diversi geni la cui espressione varia a seconda della disponibilità di ossigeno (González-Dominguez, 2000; Blanco *et al.*, 2007). La trascrizione in condizioni ipossiche di alcuni di questi geni aumenta in seguito all'aggiunta di emina o di acido 5-aminolevulinico (ALA), precursori biosintetici dell'eme, nel mezzo di crescita (Freire-Picos *et al.*, 1995; Gonzalez-Dominguez *et al.*, 2000), e ciò fa supporre l'esistenza, come per *S. cerevisiae*, di uno o più meccanismi di regolazione eme-dipendenti; anche in *K. lactis*, infatti, la biosintesi di eme richiede ossigeno (Gonzalez-Dominguez *et al.*, 2000), e la disponibilità di eme nella cellula è proporzionale alla quantità di ossigeno presente nel mezzo di crescita. Ad oggi, però, non è ancora chiaro in che modo si espliciti la regolazione eme-dipendente della risposta alle variazioni della disponibilità di ossigeno. Sono stati già caratterizzati gli omologhi funzionali di alcuni regolatori trascrizionali eme-dipendenti di *S. cerevisiae*: i componenti del complesso *K/Hap2/3/4/5* non sono risultati essere coinvolti nella regolazione ossigeno-dipendente del metabolismo (Mulder *et al.*, 1994; Bourgarel *et al.*, 1999); la proteina *K/Hap1*, che presenta gli stessi domini funzionali di *Hap1*, è in grado di complementare la mutazione  $\Delta hap1$  in *S. cerevisiae* e di legare la *consensus* CGGN(6)CGG presente nei promotori del gene *CYCI* e del suo omologo in *K. lactis*, *KICYCI*; tuttavia, il suo ruolo in *K. lactis* sembra legato alla regolazione della risposta al cadmio ed allo stress ossidativo, e non alla regolazione dei geni coinvolti nella respirazione mitocondriale come in *S. cerevisiae* (Lamas-Maceiras *et al.*, 2007).

# **SCOPO DEL LAVORO**



In *Kluyveromyces lactis*, l'enzima piruvato decarbossilasi è codificato dal gene non ridondante *PDC1*, che mostra un alto grado di conservazione rispetto ai tre geni *ScPDC1*, *ScPDC5* e *ScPDC6*, codificanti per le tre piruvato decarbossilasi di *S. cerevisiae*. La regolazione di *PDC1* dipende da diversi meccanismi di regolazione, non completamente caratterizzati.

Questo lavoro ha avuto un duplice scopo: da una parte la definizione di un modello che descrivesse il meccanismo dell'autoregolazione di *PDC1*; dall'altra l'identificazione di fattori responsabili della regolazione ossigeno-dipendente dell'espressione del gene.

Per quanto riguarda l'autoregolazione, esperimenti preliminari avevano permesso di dimostrare il coinvolgimento di Rag3 nel meccanismo regolativo. Il lavoro svolto ha avuto come obiettivi la conferma della funzione regolativa di Rag3 e la definizione di alcuni particolari del meccanismo regolativo non ancora chiari: il verificarsi di un'interazione tra Rag3 e Pdc1; il legame diretto di Rag3 al promotore di *KIPDC1*; la localizzazione nucleare o citoplasmatica delle due proteine.

Per lo studio della regolazione ossigeno-dipendente dell'espressione di *PDC1* sono stati seguiti due diversi approcci: il primo ha previsto la mutagenesi *random* di ceppi selvatici ed il conseguente *screening* volto ad identificare mutanti della regolazione ossigeno-dipendente di *PDC1*; il secondo è consistito nell'analisi di ciascuno dei tre geni, codificanti per proteine omologhe a regolatori della risposta all'ossigeno in *S. cerevisiae*, non ancora caratterizzati in *K. lactis*, al fine di verificare un loro eventuale coinvolgimento nella regolazione di *PDC1* e di altri *target* putativi in *K. lactis*.

# RISULTATI

# 1. Autoregolazione

## 1.1. Analisi della sequenza amminoacidica di Rag3

Un'analisi SMART della sequenza amminoacidica di Rag3 ha rivelato la presenza di due domini putativi di legame al DNA nella porzione N-terminale della proteina: un dominio di tipo CEN-PB (*e-value* 1,05e-12), composto dai residui 70-139, ed un dominio DDE (*e-value* 1,60e-94) di cui fanno parte i domini dal 166 al 393. Nella porzione centrale della proteina si trovano due regioni a bassa complessità (residui 455-465 e 474-491), ricche in residui di serina ed asparagina. Infine, nella porzione C-terminale si rilevano varie regioni di *intrinsic disorder*, che sono deputate all'interazione proteina-DNA o proteina-proteina.



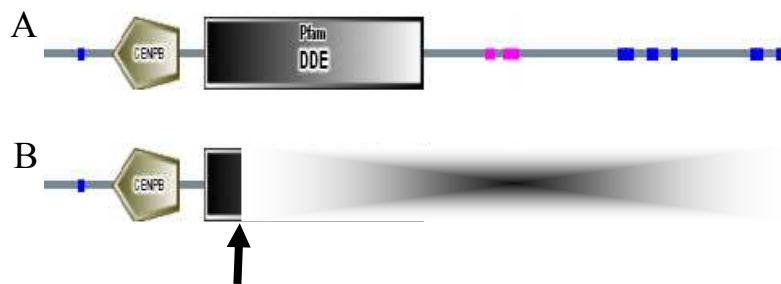
**Figura R-1.** Schema dell'organizzazione dei domini di Rag3 ricavato attraverso il programma SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). La proteina contiene, nella porzione N-terminale, due domini deputati al legame del DNA, il primo appartenente alla famiglia CEN-PB ed il secondo di tipo DDE. In rosa sono evidenziate le regioni a bassa complessità, mentre in blu sono indicate le regioni di *intrinsic disorder*, generalmente coinvolte nell'interazione proteina-DNA o proteina-proteina (Singh e Dash, 2007).

L'analisi della sequenza di Rag3 con il *software* Scansite (<http://scansite.mit.edu/>) ha confermato i risultati di SMART per quanto riguarda la predizione dei domini; inoltre, Scansite rileva un alto grado di accessibilità ("*surface accessibility*") a livello delle putative regioni di *intrinsic disorder* definite da SMART; ciò suggerisce che la porzione C-terminale di Rag3 possa essere deputata all'interazione con altre proteine.

## 1.2. Sequenziamento del gene *RAG3* nel mutante dell'autoregolazione

Il ceppo FP245, già descritto nel paragrafo 1.8.1. dell'Introduzione, è stato ottenuto per mutagenesi *random* a partire dal ceppo MM1-12D (Destruelle *et al.*, 1999), delecto per

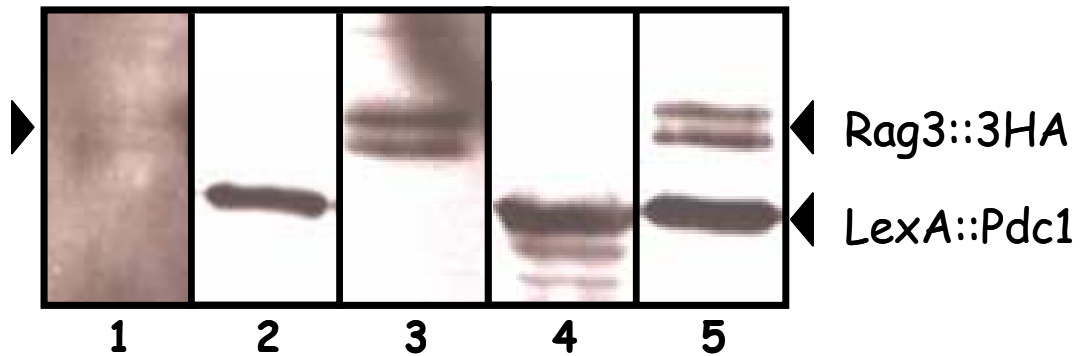
il gene *KIPDC1*. La sequenza di DNA codificante per Rag3 in questo ceppo è stata amplificata e sequenziata su entrambi i filamenti; è stato così possibile identificare una mutazione *nonsense* (CAG→TAG) che porta alla produzione di una proteina Rag3 tronca, composta soltanto dai residui 1-188 e mancante, quindi, sia del putativo dominio DDE, sia delle putative regioni di *intrinsic disorder* situate nella metà C-terminale della proteina.



**Figura R-2.** **A**, organizzazione dei domini di Rag3. **B**, domini presenti nella proteina Rag3 di FP245. La freccia indica il punto in cui si trova la mutazione non senso. La presenza del solo dominio putativo CEN-PB non è sufficiente perché Rag3 conservi la funzione di attivatore trascrizionale di *PDC1*.

### 1.3. Interazione tra Rag3 e Pdc1

Il ceppo MWK14F trasformato con i plasmidi pML2[*KIPDC1::lexA*] e pCXJ22[*RAG3::3xHA*] è stato utilizzato per un esperimento di co-immunoprecipitazione. Tale esperimento ha permesso di evidenziare che all'interno della cellula le proteine Rag3 e *KIPdc1* interagiscono fisicamente: il western blot condotto con anticorpi anti-HA sull'immunoprecipitato ottenuto con anticorpi anti-LexA ha evidenziato la presenza della proteina chimerica Rag3::3HA nell'immunoprecipitato (fig. R-3). L'intensità del segnale corrispondente a Rag3::3HA è risultata essere molto bassa (fig. R-3, *lane* 1): la bassa quantità di proteina Rag3 presente nell'immunoprecipitato potrebbe essere la conseguenza di una interazione debole tra Rag3 e *KIPdc1*.



**Figura R-3.** Western Blot condotto in seguito ad immuno-precipitazione di un estratto proteico contenente le fusioni LexA::Pdc1 e Rag3::3HA. **1**, immunoprecipitazione con anticorpi anti-LexA e western blot con anticorpi anti-HA; **2**, immunoprecipitazione con anti-LexA e western blot con anti-LexA (controllo dell'avvenuta immunoprecipitazione di Pdc1); **3**, **4** e **5**, western blot dell'estratto totale non sottoposto ad immunoprecipitazione con anticorpi anti-HA, anti-LexA e anti-HA + anti-LexA, rispettivamente.

#### 1.4. Localizzazione di Rag3 e di Pdc1

Per la localizzazione di Rag3 e Pdc1 sono stati seguiti in parallelo due diversi approcci: il primo è consistito nell'osservazione diretta, al microscopio a fluorescenza, delle cellule contenenti Rag3 o *KlPdc1* fuse all'estremità C-terminale con la GFP; il secondo ha previsto l'analisi separata, per Western Blot, degli estratti nucleare e citoplasmatico delle cellule.

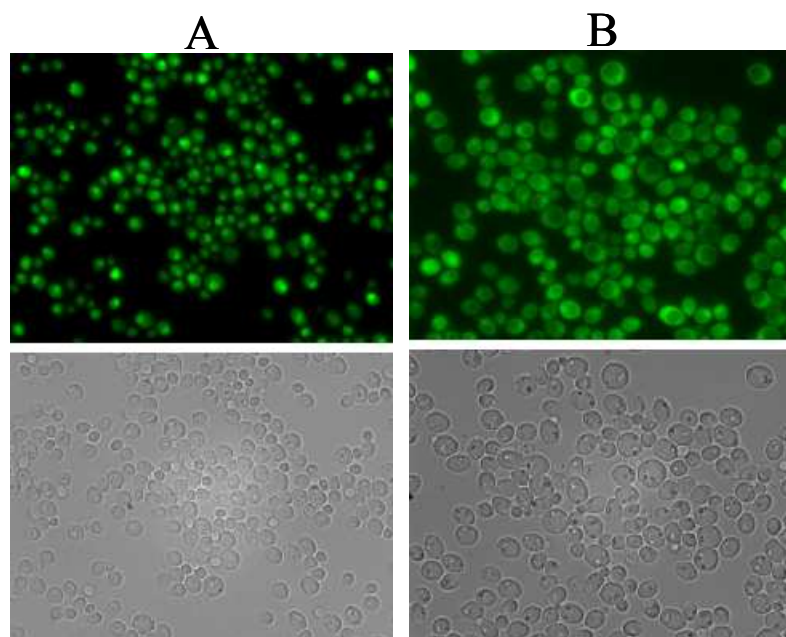
##### 1.4.1. Osservazione delle cellule al microscopio

Per la localizzazione di Rag3 e *KlPdc1* *in vivo* sono stati costruiti due plasmidi replicativi, rispettivamente pFF15 e pDN1, recanti una fusione trascrizionale tra il gene d'interesse e l'ORF codificante per la GFP di *Aequorea victoria*; le cellule trasformate con tali plasmidi producono proteine chimeriche, la cui funzionalità è dimostrata dal fenotipo Rag<sup>+</sup> del ceppo  $\Delta rag3$  trasformato con pFF15 e del ceppo  $\Delta KlPdc1$  trasformato con pDN1, e che sono rilevabili al microscopio a fluorescenza attraverso l'illuminazione con luce UV.

I ceppi (selvatico,  $\Delta rag3$ ,  $\Delta pdc1$  e  $\Delta rag3\Delta pdc1$ ) appartenenti al contesto genetico MW270-7B sono stati trasformati con ciascuno dei due plasmidi, pDN1 e pFF15. I trasformanti ottenuti, coltivati in terreno selettivo -URA, sono stati poi osservati al

microscopio a fluorescenza . I dati al momento disponibili sono quelli relativi alle localizzazioni di *KIPdc1* nel ceppo selvatico e di *Rag3* nel ceppo  $\Delta rag3$ .

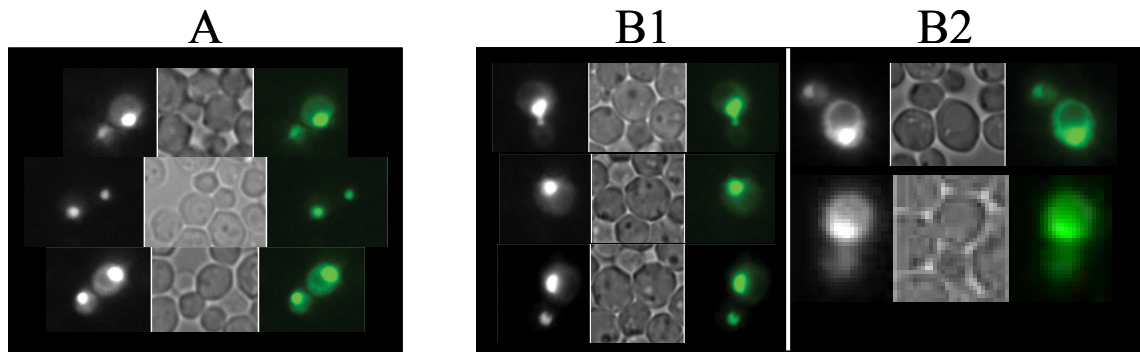
Nelle cellule *wild-type* coltivate in terreno selettivo con l'aggiunta di glucosio, *KIPdc1* sembra localizzata prevalentemente nel nucleo, anche se una fluorescenza diffusa e meno intensa è rilevabile anche nel citoplasma (fig. R-4A). In presenza di etanolo, le cellule mostrano in generale una fluorescenza meno intensa rispetto al glucosio, e la localizzazione di *KIPdc1* sembra essere esclusivamente citoplasmatica (fig. R-6B).



**Figura R-4.** Localizzazione di *KIPdc1::GFP*. In alto, cellule illuminate con lampada UV e fotografate con filtro GFP. In basso, cellule alla luce visibile fotografate in contrasto di fase. **A**, terreno selettivo contenente glucosio. La proteina sembra localizzata prevalentemente nel nucleo, ma al microscopio è rilevabile anche una fluorescenza diffusa e meno intensa nel citoplasma. **B**, terreno selettivo contenente etanolo. In questo caso *KIPdc1* sembra localizzata esclusivamente nel citoplasma.

L'osservazione delle cellule contenenti la chimera *Rag3::GFP* è stata più difficoltosa: innanzitutto è stato necessario utilizzare un ceppo  $\Delta rag3$  per fare in modo che tutto il pool cellulare di *Rag3* fosse fuso alla GFP e quindi osservabile; inoltre, anche in queste condizioni solo il 5% delle cellule risulta fluorescente (nonostante il terreno di coltura sia selettivo), e di questo 5% soltanto il 30% mostra una fluorescenza intensa. Nelle cellule coltivate in terreno selettivo contenente glucosio, la fluorescenza è localizzata esclusivamente nel nucleo (fig. R-5A). In terreno contenente etanolo, invece, è possibile

distinguere due popolazioni: la prima, composta da cellule che presentano una fluorescenza poco intensa e circoscritta al nucleo; la seconda, composta da cellule che presentano in generale una maggiore fluorescenza, intensa nel nucleo e debole nel citoplasma (fig. R-5B)



**Figura R-5.** Localizzazione di Rag3::GFP. Nei blocchi A, B1 e B2 le cellule sono state fotografate con filtro DAPI (sinistra), in contrasto di fase (al centro) e con filtro GFP (destra). **A**, terreno selettivo contenente glucosio: la fluorescenza è localizzata esclusivamente nel nucleo. **B**, terreno selettivo contenente etanolo: una popolazione (**B1**) mostra nettamente una localizzazione nucleare di Rag3::GFP; una seconda popolazione (**B2**) mostra anche una fluorescenza meno intensa localizzata nel citoplasma.

#### 1.4.2. Analisi Western degli estratti citoplasmatico e nucleare

Non essendo disponibili anticorpi anti-*KIPdc1* e anti-Rag3, per le analisi western è stato necessario utilizzare proteine chimeriche, composte dalla fusione tra l'estremità carbossi-terminale della proteina d'interesse ed un *tag* di piccole dimensioni per il quale sono disponibili in commercio anticorpi monoclonali.

Per la localizzazione della proteina *KIPdc1* all'interno della cellula è stato utilizzato il plasmide replicativo pDN1 inserito nel ceppo selvatico PM6-7A e nel ceppo  $\Delta rag3$  DN9, da esso derivato; i trasformanti ottenuti sono stati coltivati in terreno selettivo  $-URA$  contenente glucosio.

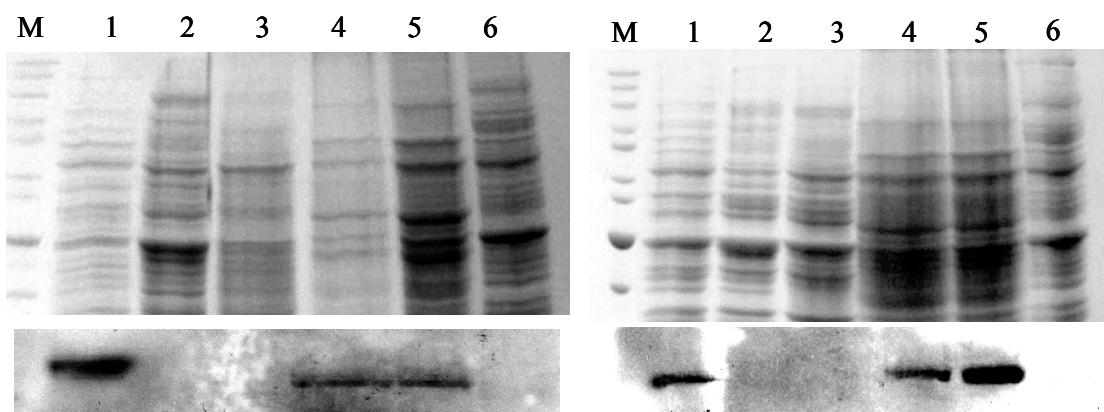
Per la localizzazione della proteina Rag3 all'interno della cellula è stato inizialmente utilizzato il plasmide multicopia pFF15, tuttavia non è stato possibile ottenere risultati soddisfacenti poiché nei Western Blot il segnale corrispondente alla fusione Rag3::GFP è estremamente basso, a prescindere che siano usati ceppi selvatici,  $\Delta rag3$  o  $\Delta Klpdc1$ . Probabilmente ciò è dovuto, oltre al basso livello di espressione di *RAG3* nella cellula (Prior *et al.*, 1996), alla bassa stabilità di pFF15 anche in terreno selettivo. Sono stati quindi utilizzati il ceppo *Rag+* MWLK1021 ed il ceppo  $\Delta Klpdc1$  MWLK1083. Entrambi i ceppi recano nel proprio genoma la fusione *RAG3::3HA* e possono quindi essere coltivati

in terreno non selettivo YPD. La presenza del *tag* costituito dalle tre molecole di emoagglutinina consente di rilevare la proteina Rag3 contenuta nella cellula con anticorpi anti-HA.

Una volta raccolte le cellule, queste sono state trattate in modo da poter separare l'estratto proteico citoplasmatico da quello nucleare. Poiché l'estratto nucleare contiene soltanto la frazione solubile del nucleoplasma, è stato conservato ed analizzato anche il *pellet* rimasto alla fine del trattamento, corrispondente alla frazione insolubile del nucleo (proteine associate alla membrana nucleare ed agli organelli citoplasmatici e complessi insolubili).

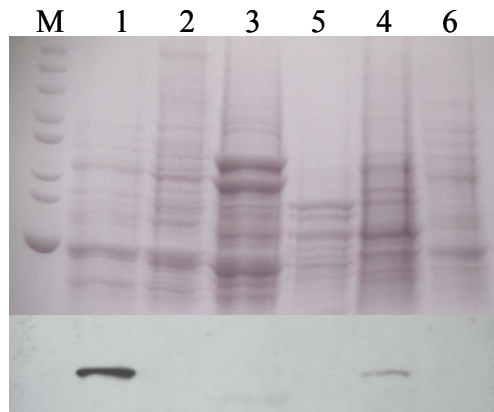
I dati disponibili ad oggi sono quelli relativi alle localizzazioni di Pdc1::GFP nel ceppo *wild-type* PM6-7A e di Rag3::3HA nei ceppi Rag+ (*wild-type*) MWLK1021 e rag- MWLK1086 ( $\Delta Klpdc1$ ).

Come è possibile vedere nelle figg. R-4 ed R-5, i segnali relativi a Rag3::3HA ed a Pdc1::GFP vengono rilevati solamente nella frazione insolubile che rimane come residuo alla fine della separazione degli estratti. Ciò porta alla formulazione di due ipotesi: la prima prevede che sia *KIPdc1* che Rag3 interagiscano, *in vivo*, con altre proteine per formare un complesso che tende a precipitare nei *buffer* utilizzati per il trattamento; la seconda prevede che le due proteine, *in vivo*, siano complessate con proteine associate alla membrana nucleare o agli organelli, e di conseguenza vengano raccolte nel residuo insolubile alla fine della separazione.



**Fig. R-6.** Estratti cellulari citoplasmatici e nucleari di MWLK1021 (a sinistra) e MWLK 1086 sottoposti a Western Blot con anticorpi anti-HA. **M**, marcatore di peso molecolare; **1**, estratto cellulare totale; **2**, estratto citoplasmatico; **3**, estratto nucleare; **4**, residuo insolubile precipitato alla fine della procedura di estrazione delle proteine nucleari; **5**, frazione del residuo 4 solubilizzata in seguito a trattamento del precipitato con NaOH 0,2M; **6**, estratto cellulare totale di MW270-7B non trasformato.

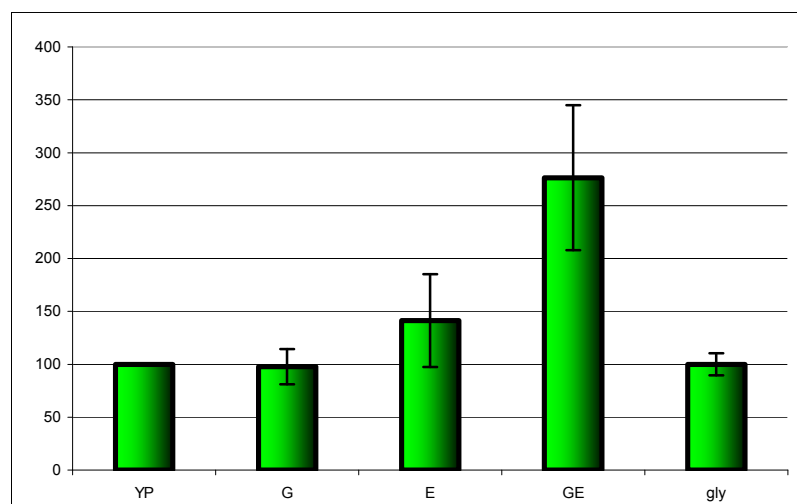




**Figura R-7.** Estratti citoplasmatici e nucleari di PM6-7A contenente il vettore pDN1, sottoposti a Western Blot con anticorpi anti-GFP. **M**, marcatore di peso molecolare; **1**, estratto cellulare totale; **2**, estratto citoplasmatico; **3**, estratto nucleare; **4**, residuo insolubile precipitato alla fine della procedura di estrazione delle proteine nucleari; **5**, frazione del residuo 4 solubilizzata in seguito a trattamento del precipitato con NaOH; **6**, estratto cellulare totale di PM6-7A trasformato con il plasmide di controllo pFFV.

### 1.5. Espressione di *RAG3* in risposta alle diverse fonti di carbonio

Al fine di verificare se *RAG3* sia o meno un gene costitutivo, la sua espressione in risposta a varie fonti di carbonio è stata analizzata attraverso esperimenti di *real-time* PCR (fig. R-8). Come è possibile notare, l'espressione del gene rimane pressoché invariata in glucosio, glicerolo ed in terreno ricco YP senza l'aggiunta di fonti di carbonio; si rileva però una netta induzione sia in etanolo che in compresenza di glucosio ed etanolo.

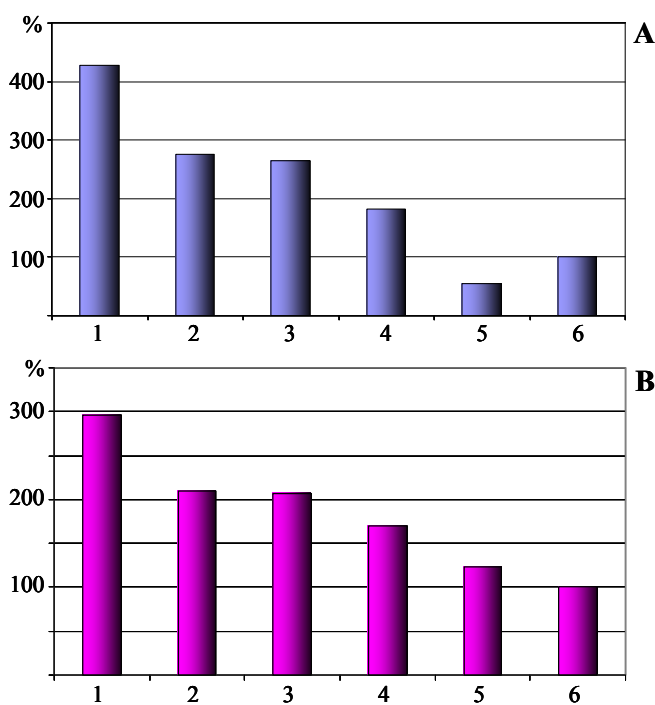


**Figura R- 8.** Espressione di *RAG3* in terreno ricco con e senza l'aggiunta di fonti di carbonio. **G**, glucosio; **E**, etanolo; **GE**, glucosio + etanolo; **gly**, glicerolo. i vari livelli di espressione sono normalizzati rispetto all'espressione in terreno YP, assunto come 100%.

### 1.6. Espressione Rag3-dipendente di *KIPDC1* in glucosio e/o etanolo

L'incremento dell'espressione di *RAG3* in presenza di glucosio ed etanolo lascia supporre un ruolo di *Rag3* nella regolazione etanolo-dipendente dell'espressione di *KIPDC1*. Per questo motivo l'espressione di *KIPDC1* è stata saggiata attraverso Northern Blot in un ceppo selvatico ed in un ceppo  $\Delta rag3$ , entrambi appartenenti al contesto genetico PM6-7A. Nella fig. R-9 sono riportati i grafici ottenuti quantificando l'intensità delle bande che corrispondono al trascritto di *KIPDC1*, normalizzate rispetto al trascritto dell'actina.

L'assenza di repressione da etanolo nel ceppo  $\Delta rag3$  suggerisce un coinvolgimento di *Rag3* nella regolazione etanolo-dipendente dell'espressione di *PDC1*.



**Figura R-9.** Espressione di *PDC1* in risposta all'aggiunta di glucosio, etanolo o entrambi a colture cresciute in terreno ricco YP. **A:** risultato del Northern Blot condotto su RNA estratti da PM6-7A (ceppo *wild-type*); **B:** risultato del Northern Blot condotto su RNA estratti da un ceppo  $\Delta rag3$  appartenente allo stesso contesto genetico. **1,** glucosio 2%; **2,** glucosio 1,2% + etanolo 0,8%; **3,** glucosio 1% + etanolo 1%; **4,** glucosio 0,8% + etanolo 1,2%; **5,** etanolo 2%; **6,** YP (assunto come riferimento: 100% dell'espressione di *PDC1*).

## 1.7. Legame di Rag3 al promotore di *PDC1*

Secondo il modello proposto per il meccanismo dell'autoregolazione, l'espressione di *PDC1* è regolata da un attivatore trascrizionale, identificato poi come Rag3. Ciò che non è ancora stato chiarito è se Rag3 legghi direttamente il promotore di *PDC1* o se altri fattori siano coinvolti nel meccanismo di induzione dell'espressione. Per verificare l'eventuale interazione di Rag3 con il promotore di *PDC1* sono stato effettuati degli esperimenti di DNA *affinity capture*, incubando sonde corrispondenti alle porzioni distale, centrale e prossimale del promotore con l'estratto proteico del ceppo MWLK1021, che contiene nel genoma la fusione *RAG3::3HA* ed analizzando per Western Blot gli eluati. Il segnale corrispondente a Rag3::3HA è stato riscontrato nel *flow-through* (frazione dell'estratto che non lega la sonda di DNA), mentre non è stato rilevato nell'eluato; ad oggi è quindi ancora impossibile affermare se Rag3 interagisca direttamente con il promotore di *PDC1* o se sia necessaria l'interazione con altri fattori.

## 2. Regolazione ossigeno-dipendente

### 2.1. Costruzione dei ceppi CSK e GDK

Per lo studio della risposta all'ipossia si è deciso di utilizzare dei ceppi che recassero nel loro genoma la fusione tra il promotore di *PDC1* e il gene reporter *lacZ*; tale costrutto, inserito in modo stabile nelle cellule, permette di misurare l'attività del promotore di *PDC1* in qualsiasi tipo di terreno attraverso il saggio della beta-galattosidasi, o su piastra attraverso il rilevamento colorimetrico con X-Gal.

I ceppi CSK e GDK, di *mating type* opposto, sono stati ottenuti per integrazione omologa del vettore integrativo KpPLF, recante la fusione Prom*PDC1*::*lacZ*, rispettivamente nei ceppi CSK1/1 e HNK20 (si veda Materiali e Metodi per i dettagli). A partire da CSK1/1 e HNK20 sono stati costruiti anche i ceppi di controllo CSK-Rv e GDK-Rv, per integrazione omologa del vettore integrativo KpPLR, in cui il promotore di *PDC1* e *lacZ* sono orientati in modo divergente.

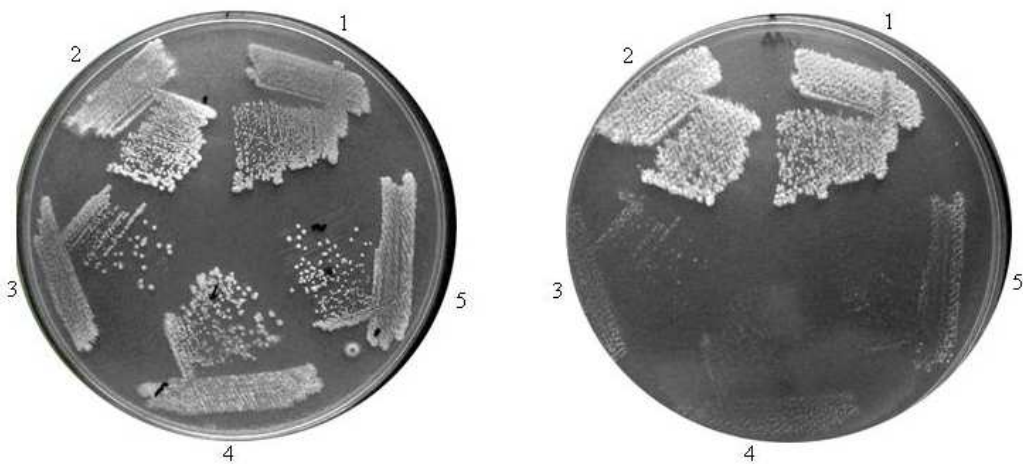
Sia la colorazione delle colonie con X-Gal su piastra che il saggio della beta-galattosidasi *in vitro* hanno dimostrato che nei ceppi di controllo CSK-Rv e GDK-Rv non vi è alcuna attività del promotore di *PDC1* orientato a rovescio, mentre nei ceppi CSK e GDK l'attività beta-galattosidasi è presente e subisce un incremento in condizioni ipossiche.

### 2.2. Mutagenesi *random* e analisi dei mutanti. Il mutante CSK27

Per la mutagenesi dei ceppi CSK e GDK era stato inizialmente previsto l'utilizzo di mutageni fisici (raggi UV), ma l'ottimizzazione delle condizioni di mutagenesi ha presentato dei problemi: la quantità di energia ottimale per la mutagenesi risultava estremamente variabile (tra i 5 e i 20 mJ/cm<sup>2</sup>), in quanto il tasso di mortalità delle cellule, a parità di condizioni, oscillava tra il 30% e l'80%.

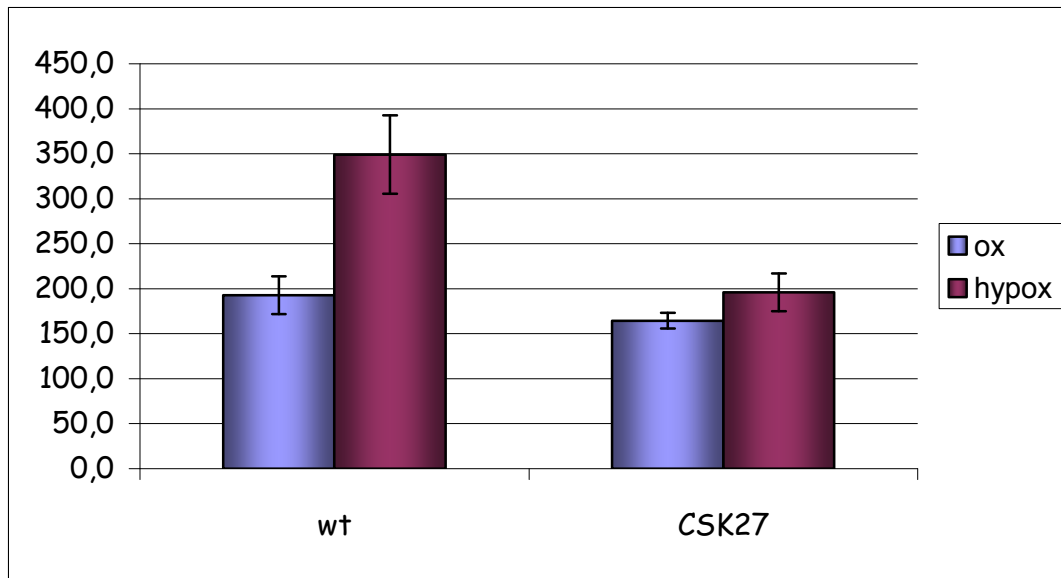
E' stato quindi necessario optare per un altro tipo di mutageno: l'etilmetansulfonato (EMS), un mutageno chimico che induce mutazioni puntiformi con una frequenza che oscilla tra  $5 \cdot 10^{-4}$  e  $5 \cdot 10^{-2}$  per gene. L'incubazione delle cellule per 30 minuti con EMS al 2% determinava un tasso di sopravvivenza delle cellule tra il 60% e il 70% e, poiché i dati sulla vitalità delle cellule erano riproducibili, è stato possibile procedere con lo *scale-up* dell'esperimento.

Circa  $10^4$  cloni per ciascun ceppo ( $\alpha$  ed  $\alpha$ ) sono stati sottoposti a *screening* colorimetrico su piastra, sia in condizioni normossiche che dopo l'incubazione in giara da anaerobiosi, al fine di identificare eventuali mutanti sia dell'induzione ipossica che della repressione normossica del promotore di *PDC1*. Mentre il primo *screening* è stato sufficientemente agevole ed ha consentito di escludere il 99% dei cloni, l'analisi colorimetrica dei circa 200 cloni ritenuti più interessanti ha presentato delle difficoltà: non è stato possibile, a questo punto, rilevare differenze significative nella colorazione con X-Gal delle diverse colonie. Ipotizzando che un mutante dell'induzione ipossica di *KIPDC1* possa avere anche un difetto del metabolismo fermentativo, i cloni sono stati quindi replicati su piastre contenenti antimicina A, al fine di operare una ulteriore selezione in base al fenotipo Rag. Il ceppo denominato CSK27, l'unico che mostrava un fenotipo di tipo rag- (fig. R-10), è stato scelto per essere sottoposto ad ulteriori analisi.



**Figura R-10.** I ceppi cresciuti su piastre di terreno ricco YPD (a sinistra) sono stati replicati su piastre GAA e fotografati dopo 24 ore di incubazione a 28°C (a destra). Il mutante CSK27 mostra chiaramente un fenotipo di tipo rag-. **1**, CSK (*wild-type*); **2**, PM6-7A (*wild-type*); **3**, PM6-7A/ $\Delta$ rag3; **4**, PMI-C1 (PM6-7A/ $\Delta$ pdc1); **5**, CSK27.

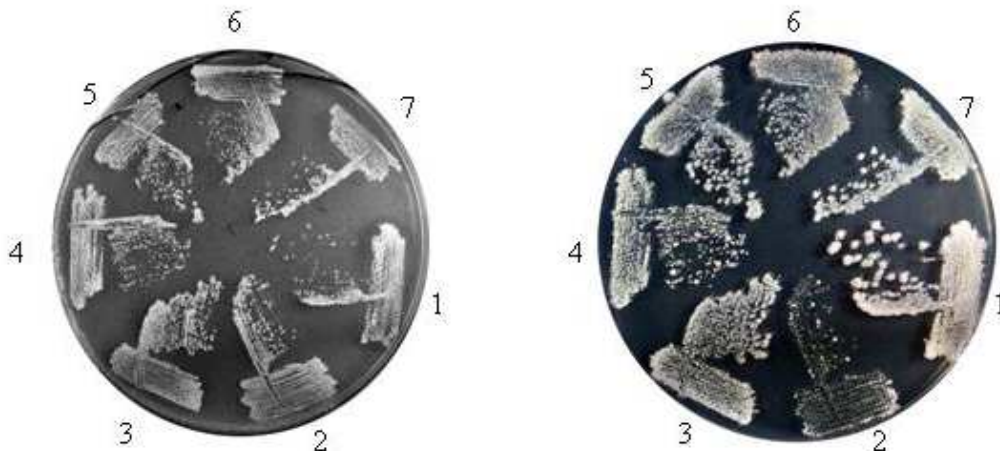
Confrontando l'attività del promotore di *PDC1* di CSK27 con quella del ceppo *wild-type* di riferimento, CSK, si nota che nel mutante l'attività del promotore è paragonabile al ceppo selvatico in condizioni normossiche, mentre manca completamente dell'induzione ipossica (fig. R-11)



**Figura R-11.** Confronto dell'attività del promotore di *PDC1* (espressa in unità arbitrarie di attività beta-galattosidasi) tra il ceppo *wild-type* CSK ed il mutante da esso derivante, CSK27. I due ceppi mostrano un'attività simile in condizioni normossiche (ox), mentre in CSK27 non vi è un incremento dell'attività promotore in ipossia (hypox).

### 2.2.1. Analisi del ceppo CSK27

Il mutante CSK27 è stato incrociato con la maggior parte dei mutanti *rag* ad oggi noti; di questi, l'unico incapace di complementare il fenotipo *rag*- è stato il ceppo PM6-7A/VV32, che reca una mutazione nel gene *RAG4* (fig. R-12)

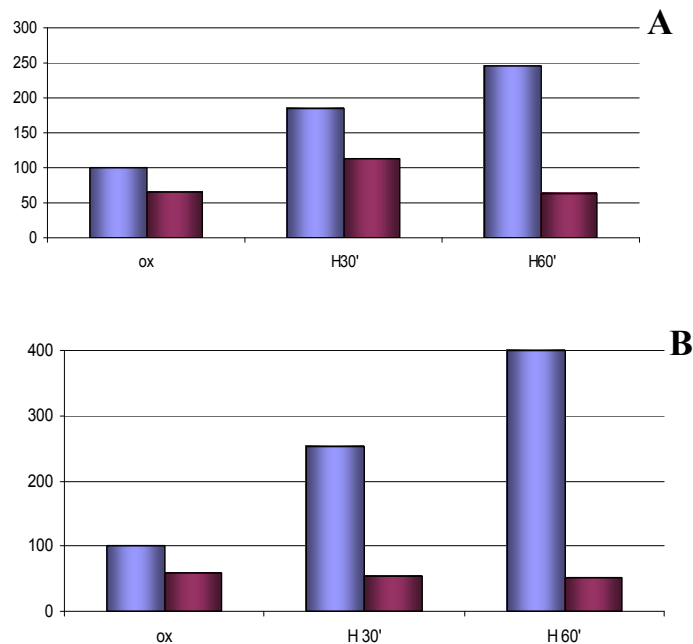


**Figura R-12.** A sinistra, una piastra di terreno selettivo contenente alcuni dei diploidi ottenuti incrociando il mutante CSK27 con vari mutanti *rag* noti. I ceppi sono stati replicati su piastra GAA e fotografati dopo 2 giorni di incubazione a 28°C (foto a destra). Incroci con: **1**, PM6-7A/VV23 (*rag3mut*); **2**, PM6-7A/VV32 (*rag4mut*); **3**, PM6-7A/ $\Delta$ *rag2*); **4**, PMI-C1 ( $\Delta$ *pdcl*); **5**, MW109-8C/FA42 (*rag8mut*); **6**, PM6-7A/VV41 (*rag5mut*); **7**, PM6-7A.

### 2.2.2. Espressione di *KIPDC1* in CSK27 e in PM6-7A/VV32

E' noto che il gene *RAG4* codifica per il sensore del glucosio in *K. lactis* (paragrafo 1.6 dell'Introduzione), ma non vi sono dati in letteratura circa un suo possibile ruolo nella regolazione ossigeno-dipendente dell'espressione di *PDC1*.

Per verificare i risultati del saggio di attività del promotore mostrato nel paragrafo 2.2, la variazione ossigeno-dipendente dell'espressione di *PDC1* in CSK27 è stata analizzata anche attraverso Northern Blot; lo stesso esperimento è stato condotto anche per il ceppo VV32, ed i risultati preliminari ottenuti sono rappresentati in fig. R-13.



**Figura R-13.** Espressione di *PDCI* nei ceppi appartenenti ai contesti genetici CSK (**A**) e PM6-7A (**B**) in condizioni normossiche (**ox**) e dopo 30 e 60 minuti di incubazione ipossica (**H30'**, **H60'**). In ciascun grafico, il ceppo selvatico è indicato in blu ed il mutante in rosso.

### 2.3. Caratterizzazione di *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2*

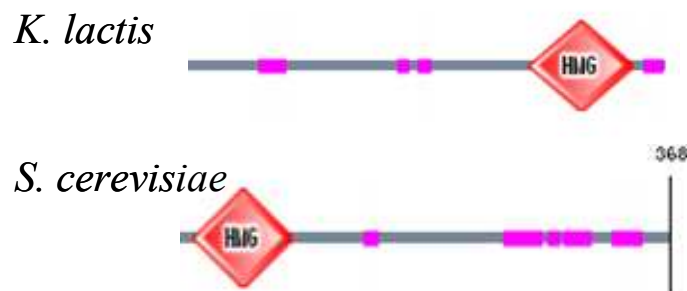
Gli omologhi in *K. lactis* dei regolatori di *S. cerevisiae* *ROX1*, *MOT3* e *MGA2* sono stati identificati attraverso una ricerca nella banca dati Génolevures, che ha portato all'identificazione dei tre geni *KIROX1*(KLLA0B11495g), *KIMGA2* (KLLA0E18029g) e *KIMOT3* (KLLA0E18645g).

#### 2.3.1. Analisi computazionale

L'analisi BLAST ha mostrato che le proteine *KIRox1* e *Rox1* presentano il 40% di identità di sequenza e il 57% di positività. Le due sequenze amminoacidiche sono state poi analizzate usando la banca dati SMART (fig. R-14). In *KIRox1* si rileva la presenza di un dominio putativo HMG (*High Mobility Group*, *e-value* 1,16e-17), appartenente ad una famiglia di componenti non istonici a basso peso molecolare che legano specifiche sequenze di DNA dei geni bersaglio. Mentre nella proteina di *S. cerevisiae* tale dominio è

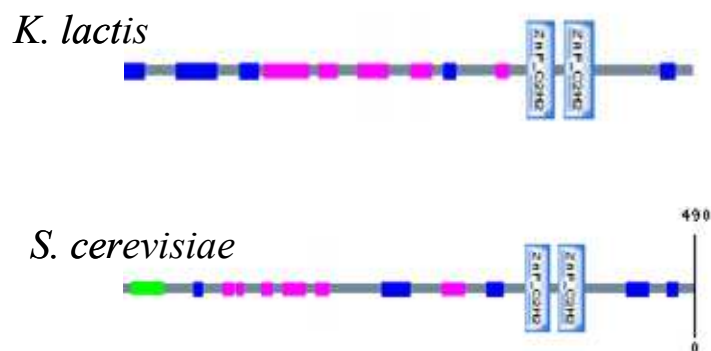


presente nella regione ammino-terminale, in *K. lactis* risulta essere nella regione carbossi-terminale. L'analisi BLAST non rileva in Rox1 il dominio di repressione la cui presenza è invece attestata da evidenze sperimentali (si veda il paragrafo 2.3.3 dell'Introduzione); risulta quindi impossibile ipotizzare sulla base dell'analisi predittiva se la porzione N-terminale di *K/Rox1* contenga o meno un dominio simile.



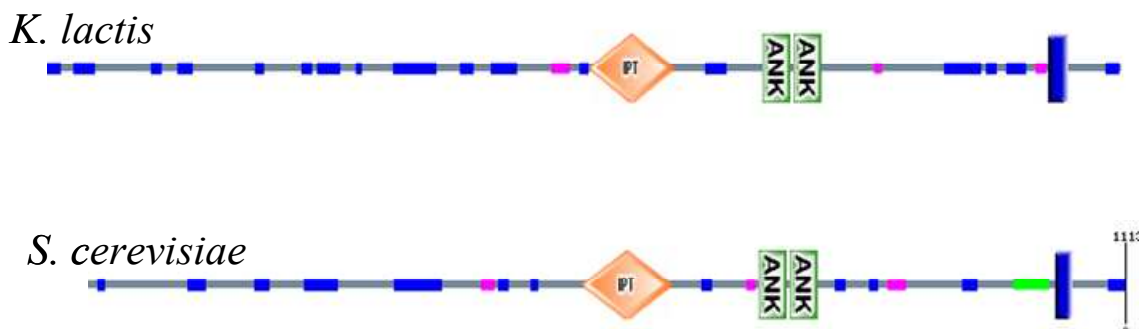
**Figura R-14:** Confronto tra *K/Rox1* e *Rox1*. Il putativo dominio HMG si trova nella porzione C-terminale di *K/Rox1* e nella porzione N-terminale di *Rox1*. In rosa sono evidenziate le regioni a bassa complessità.

La proteina *K/Mot3* mostra, in base all'analisi BLAST, il 26% di identità di sequenza e il 40% di positività con l'omologo di *S. cerevisiae*. L'omologia tra le due proteine è estremamente elevata nella zona che comprende il dominio *Zinc-Finger*, mentre è pressoché nulla nel resto della sequenza, fatta eccezione per una zona ricca di asparagine nella porzione N-terminale. L'organizzazione dei domini ottenuta attraverso l'analisi predittiva SMART è indicata nella fig. R-15.



**Figura R-15.** Confronto tra *Mot3* e *K/Mot3*. In entrambe le proteine il dominio *Zinc finger* si trova nella porzione C-terminale. In verde è indicato il dominio *coiled-coil* composto da due  $\alpha$ -eliche superavvolte, in rosa i domini a bassa complessità e in blu le regioni di *intrinsic disorder*.

Infine, l'allineamento tra la proteina *KIMga2* ed *Mga2* di *S. cerevisiae* ha evidenziato un'identità di sequenza pari al 39% ed una positività del 54%. L'analisi predittiva SMART evidenzia un'organizzazione dei domini identica tra le due proteine: sono presenti un dominio IPT responsabile del legame al DNA, due domini ANK responsabili dell'interazione proteina-proteina e un dominio transmembrana per l'ancoraggio alla membrana del reticolo endoplasmatico (Fig. R-16).



**Figura R-16.** Organizzazione dei domini di *KIMga2* e *Mga2*: in verde è evidenziato il dominio *coiled-coil* di *Mga2*, in rosa i domini a bassa complessità e in blu le zone di *intrinsic disorder*. Entrambe le proteine, in base all'analisi SMART, presentano un dominio IPT coinvolto nel legame con il DNA, un motivo ripetuto ANK di interazione proteina-proteina ed un dominio transmembrana (in blu) situato all'estremità C-terminale.

### 2.3.2. Costruzione dei ceppi deleti per *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2*

Il primo passo per la caratterizzazione dei geni *KIROX1*, *KIMGA2* e *KIMOT3* è stato quello di costruire dei mutanti di GDK in cui questi geni fossero deleti.

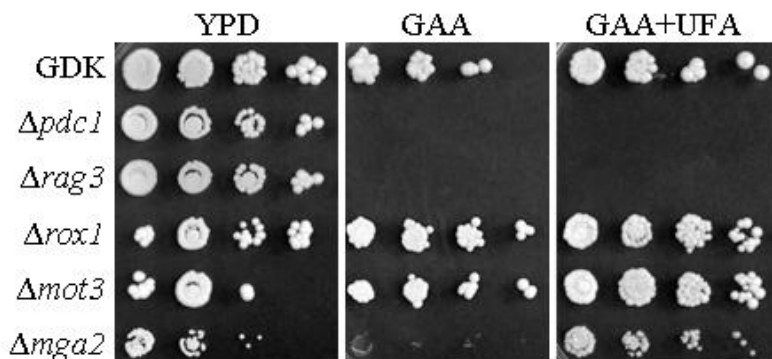
I mutanti sono stati ottenuti per inserzione di una cassetta di delezione, contenente il marcatore di resistenza alla droga G418, nel gene bersaglio attraverso un evento di ricombinazione omologa (v. materiali e Metodi). I ceppi ottenuti sono riassunti in tab. R-1; per questo lavoro sono stati utilizzati GDK/ $\Delta$ *rox1*#4, GDK/*mot3*#7 e GDK/ $\Delta$ *mga2*#4, che d'ora in avanti verranno indicati con  $\Delta$ *rox1*,  $\Delta$ *mot3* e  $\Delta$ *mga2*.

**Tabella R-1.** Elenco dei mutanti ottenuti.

Ceppo	Descrizione
GDK / $\Delta$ <i>rox1</i> #4	Mat a, <i>uraA1-1</i> , <i>leu2</i> , <i>metA1-1</i> , <i>lac4::ura3</i> , PromPDC1:: <i>LacZ</i> , <i>rox1::KanMX4</i>
GDK / $\Delta$ <i>rox1</i> #6	Mat a, <i>uraA1-1</i> , <i>leu2</i> , <i>metA1-1</i> , <i>lac4::ura3</i> , PromPDC1:: <i>LacZ</i> , <i>rox1::KanMX4</i>
GDK / $\Delta$ <i>mga2</i> #5	Mat a, <i>uraA1-1</i> , <i>leu2</i> , <i>metA1-1</i> , <i>lac4::ura3</i> , PromPDC1:: <i>LacZ</i> , <i>mga2::KanMX4</i>
GDK / $\Delta$ <i>mot3</i> #7	Mat a, <i>uraA1-1</i> , <i>leu2</i> , <i>metA1-1</i> , <i>lac4::ura3</i> , PromPDC1:: <i>LacZ</i> , <i>mot3::KanMX4</i>
GDK / $\Delta$ <i>mot3</i> #12	Mat a, <i>uraA1-1</i> , <i>leu2</i> , <i>metA1-1</i> , <i>lac4::ura3</i> , PromPDC1:: <i>LacZ</i> , <i>mot3::KanMX4</i>

### 2.3.3. Analisi fenotipica

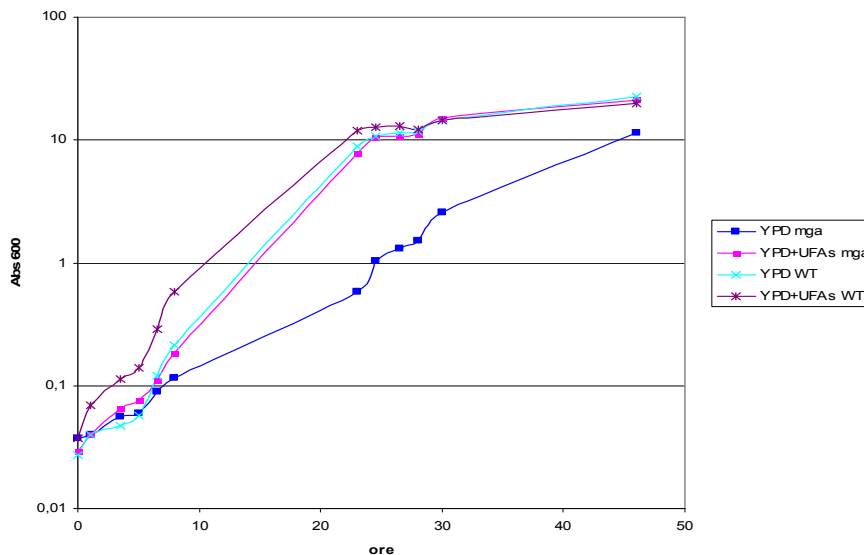
Osservando la crescita su piastra dei tre mutanti GDK  $\Delta rox1$ ,  $\Delta mot3$  e  $\Delta mga2$  si nota come il mutante  $\Delta mga2$  sia l'unico ad avere un fenotipo visibile: la crescita appare stentata in terreno ricco contenente glucosio (YPD); inoltre, seminando le cellule su terreno contenente glucosio ed antimicina A (GAA) è stato possibile osservare come tale mutante mostri una ridottissima capacità di crescere utilizzando esclusivamente il metabolismo fermentativo (fig. R-17). Nonostante il fenotipo del mutante  $\Delta mga2$  non sia definibile come rag- in senso stretto, è comunque chiaro che la proteina Mga2 è indispensabile quando le cellule di *K. lactis* sono obbligate a trarre energia dal solo metabolismo fermentativo. Poiché in *S. cerevisiae* Mga2 è coinvolto nella regolazione del gene ipossico *OLE1*, necessario per la biosintesi degli acidi grassi insaturi (UFA), la crescita del mutante  $\Delta mga2$  è stata saggiata anche su piastre GAA contenenti acido oleico e palmitoleico. Come mostra la fig. R-17, la presenza degli acidi grassi sopprime il fenotipo di crescita stentata del  $\Delta mga2$  dovuto alla presenza dell'antimicina A, ma non ha alcun effetto sul fenotipo rag- dei ceppi  $\Delta pdc1$  e  $\Delta rag3$ .



**Figura R-17.** Fenotipi di crescita dei mutanti  $\Delta rox1$ ,  $\Delta mot3$  e  $\Delta mga2$  confrontati con il ceppo selvatico GDK e con i ceppi rag- PMI-C1 ( $\Delta pdc1$ ) e PM6-7A/ $\Delta rag3$ . YPD, terreno ricco contenente glucosio; GAA, terreno contenente glucosio ed antimicina A; GAA+UFA, terreno contenente antimicina A, acido oleico ed acido palmitoleico.

Al fine di comprendere l'effetto degli acidi grassi insaturi, la crescita del ceppo  $\Delta mga2$  e del ceppo selvatico sono state seguite in terreno liquido ricco con e senza l'aggiunta di UFA. Come si può vedere dalle curve riportate in fig. R-18, l'aggiunta degli acidi grassi determina un aumento generalizzato della velocità di crescita: nel ceppo

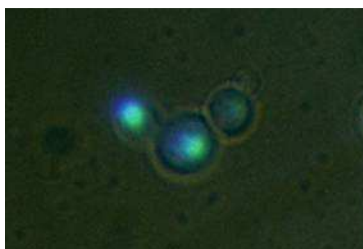
$\Delta mga2$  in presenza di UFA viene ripristinata la velocità di crescita del ceppo selvatico, ma il ceppo selvatico stesso in presenza di UFA cresce più velocemente che in YPD.



**Figura R-18.** Curve di crescita, in terreno ricco YPD e YPD+ acidi grassi (UFA), del ceppo  $\Delta mga2$  e del ceppo selvatico GDK.

Il mutante  $\Delta mga2$  mostra un'altra peculiare caratteristica fenotipica. In fase di crescita stazionaria una frazione della popolazione cellulare presenta un fenotipo di gemmazione incompleta, in cui le cellule figlie non si separano completamente dalla madre (*multi-bud*). Tale fenotipo si manifesta in fase stazionaria nelle cellule *wild-type* del contesto GDK con una frequenza del 7% ( $\pm 2\%$ ) in terreno ricco YPD e del 2,5% ( $\pm 1,9\%$ ) in terreno GAA, mentre nel mutante  $\Delta mga2$  le frequenze sono del 14% ( $\pm 2\%$ ) in terreno YPD e dello 0% (totale assenza) in terreno GAA. Se la crescita viene condotta in presenza di UFA, nel caso del ceppo selvatico non si hanno variazioni nella percentuale di colonie *multi-bud*, mentre nel caso del mutante  $\Delta mga2$  la popolazione di *multi-bud* scende al 4,6% ( $\pm 1,8\%$ ).

Le cellule *multi-bud* sono state osservate al microscopio a fluorescenza in seguito a colorazione DAPI, ed è stato possibile verificare che ciascuna gemma contiene il DNA nucleare (fig. R-19). Inoltre, separando meccanicamente le gemme attraverso l'utilizzo di un micromanipolatore è stato possibile verificare che sia la cellula madre che le sono in grado di dare origine a colonie.

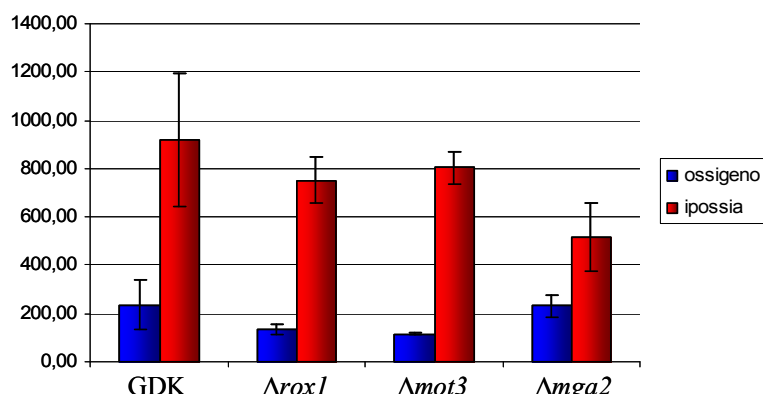


**Figura R-19.** Cellule in fase stazionaria del ceppo mutante  $\Delta mga2$ , colorate con DAPI e fotografate al microscopio a fluorescenza.

#### 2.3.4. Attività del promotore di *PDC1* nei mutanti $\Delta Klrox1$ , $\Delta Klmot3$ e $\Delta Klmga2$

Il ceppo di riferimento GDK ed i tre mutanti ottenuti a partire da esso sono stati coltivati in condizioni normossiche ed in seguito incubati per 2 ore in ipossia; gli estratti proteici ricavati dalle colture sono stati impiegati per condurre dei saggi di attività beta-galattosidasi al fine di quantificare l'attività del promotore di *PDC1* in ciascuno dei mutanti oggetto di studio.

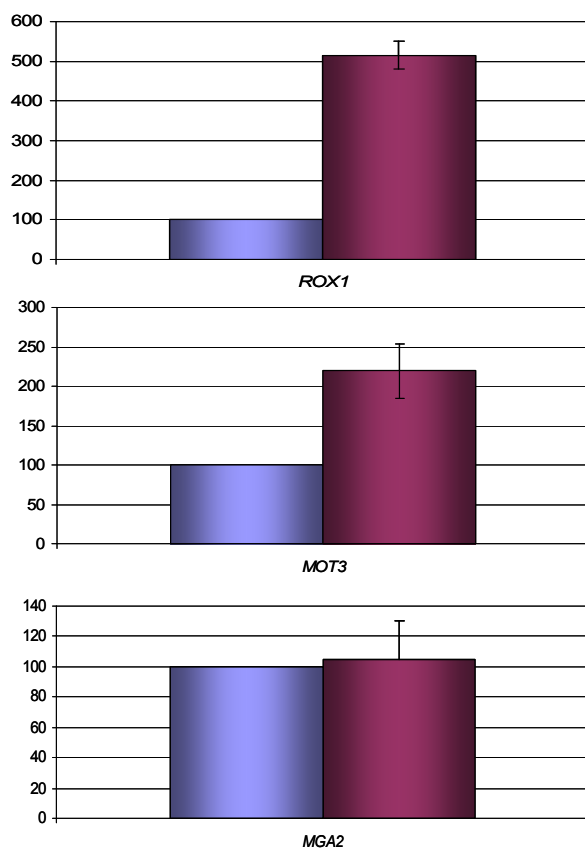
In fig. R-20 è riportato il risultato dei saggi, che mostra come l'attività del promotore nei due mutanti  $\Delta rox1$  e  $\Delta mot3$  sia paragonabile al ceppo selvatico, sia nella condizione normossica che in quella ipossica; per quanto riguarda l'attività del promotore nel ceppo  $\Delta mga2$ , invece, si rileva un'induzione ipossica leggermente più bassa rispetto al ceppo selvatico.



**Figura R-20.** Attività del promotore di *PDC1*, misurata in unità arbitrarie di attività beta-galattosidasi, nel ceppo selvatico GDK e nei mutanti da esso derivanti  $\Delta rox1$ ,  $\Delta mot3$  e  $\Delta mga2$ . I quattro ceppi recano nel loro genoma la fusione trascrizionale tra il promotore di *PDC1* ed il gene reporter *lacZ*.

### 2.3.5. Analisi quantitativa dei trascritti di $\Delta KIROX1$ , $\Delta KIMOT3$ e $\Delta KIMGA2$

I livelli di espressione normossica ed ipossica dei tre geni *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2* sono stati analizzati tramite *real-time* PCR. I grafici riportati nella fig. R-21 rappresentano i dati relativi all'espressione di *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2* nel ceppo selvatico GDK in condizioni normossiche e dopo 20 minuti di incubazione ipossica. I dati mostrano che, mentre la carenza di ossigeno determina un incremento dell'espressione di *KIROX1* e *KIMOT3*, l'espressione del gene *KIMGA2* non subisce variazioni. L'analisi dei trascritti estratti dopo 2 ore di incubazione in assenza di ossigeno, non mostrata nelle figure, ha evidenziato invece una diminuzione dell'espressione di *KIROX1* e *KIMOT3* rispetto alla condizione normossica, mentre la quantità di trascritto del gene *KIMGA2* continua a rimanere invariata.

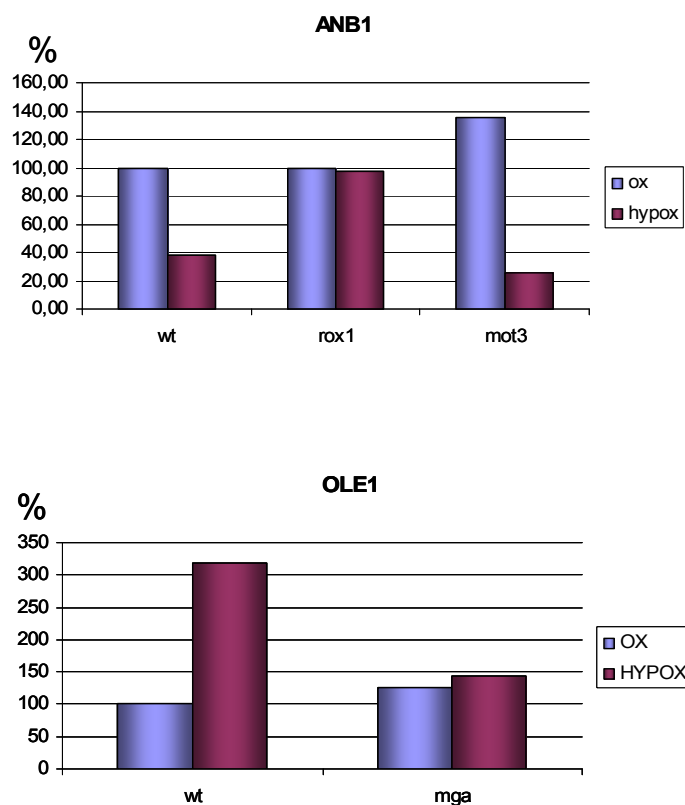


**Figura R-21.** Espressione dei geni *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2* in condizioni normossiche (blu) e dopo 20 minuti di incubazione ipossica (rosso).

### 2.3.6. Analisi dell'espressione dei putativi geni bersaglio

In *Kluyveromyces lactis* sono presenti i geni *KIANB1* e *KIOLE1*, omologhi rispettivamente del gene *ANB1* e del gene *OLE1* di *S. cerevisiae* (descritti nei par. 2.3.3 e 2.3.5 dell'Introduzione). Poiché in *S. cerevisiae* *ANB1* è regolato, in risposta all'ossigeno, da Rox1 e Mot3 ed *OLE1* è indotto in ipossia dalla forma attiva di Mga2, l'espressione ossigeno-dipendente dei loro omologhi in *K. lactis* è stata analizzata per verificare se i geni bersaglio dei tre regolatori oggetto di studio siano gli stessi nei due lieviti.

L'espressione di *KIANB1* e *KIOLE1* nel ceppo selvatico GDK e nei ceppi deleti da esso derivanti è stata analizzata per *real-time* pcr, utilizzando come riferimento il gene *ACT1*. Il risultato degli esperimenti è riportato nella fig. R22.



**Figura R22.** In alto: espressione ossigeno-dipendente del gene *KIANB1* nel ceppo selvatico GDK (**wt**) e nei mutanti  $\Delta rox1$  e  $\Delta mot3$ . In basso: espressione ossigeno-dipendente del gene *KIOLE1* nel ceppo selvatico GDK (**wt**) e  $\Delta mga2$ . Le colture sono state incubate 20 minuti in ipossia prima di raccogliere le cellule ed estrarre l'RNA.

A differenza di *ANBI* di *S. cerevisiae*, il gene *KIANBI* risulta essere represso in condizioni ipossiche; la delezione di *MOT3* non sembra avere effetti significativi sulla regolazione del gene, mentre la delezione di *ROXI* comporta la perdita della repressione ipossica del gene bersaglio.

Il secondo bersaglio putativo analizzato, *KIOLE1*, risulta essere un gene ipossico come il suo omologo di *S. cerevisiae*; l'assenza del regolatore Mga2 non comporta variazioni nell'espressione di *KIOLE1* in condizioni normossiche, ma non consente l'induzione ipossica dell'espressione del gene.



# **DISCUSSIONE**

Il lievito *Kluyveromyces lactis* è uno dei cosiddetti “lieviti non convenzionali” o non-*Saccharomyces*; ciò significa che, nonostante abbia delle caratteristiche in comune con l’organismo modello *S. cerevisiae*, presenta alcune peculiarità dal punto di vista genetico, fisiologico e metabolico. Ad esempio, il metabolismo di *K. lactis* è di tipo respiro-fermentativo con prevalenza della respirazione sulla fermentazione, ed il microrganismo non è in grado di crescere in condizioni di stretta anaerobiosi.

A differenza di *S. cerevisiae* inoltre, *K. lactis* contiene un unico gene *PDC* codificante per l’enzima piruvato decarbossilasi, che è soggetto a diversi meccanismi di regolazione, tra cui l’autoregolazione e l’induzione ipossica.

Il meccanismo di autoregolazione di *PDC1* è descritto da un modello che prevede l’interazione tra Pdc1 e Rag3 e che gli esperimenti condotti hanno contribuito a definire.

La regolazione ossigeno-dipendente in *K. lactis* è ad oggi scarsamente caratterizzata, e nulla era noto circa l’induzione ipossica dell’espressione di *PDC1*. Per quanto riguarda la risposta all’ipossia è stato fatto riferimento a quanto già noto per *S. cerevisiae*, effettuando una ricerca in banca dati degli omologhi di sequenza amminoacidica dei regolatori Rox1, Mot3 e Mga2 e cercando di caratterizzarli tramite *reverse genetics*; un approccio di *forward genetics* ha invece permesso di identificare un regolatore coinvolto nell’induzione ipossica di *KIPDC1*.

## 1. Autoregolazione

L’analisi predittiva della sequenza amminoacidica ha rilevato un’organizzazione dei domini di Rag3 identica a quella di Pdc2, la proteina che in *S. cerevisiae* è indispensabile per l’espressione dei geni *PDC1* e *PDC5*, codificanti per due delle tre piruvato decarbossilasi di *S. cerevisiae*: sono presenti due domini putativi di legame al DNA nella porzione N-terminale ed una zona probabilmente deputata all’interazione proteina-proteina nella porzione C-terminale. Ciò è in accordo con quello che il modello dell’autoregolazione prevede, ovvero che Rag3 sia in grado di interagire con un’altra

proteina (*KIPdc1*), e di fungere da attivatore trascrizionale (di *KIPDC1*). L'interazione tra Rag3 e *KIPdc1* in effetti è stata dimostrata da esperimenti di co-immunoprecipitazione, e confermata da saggi *two-hybrid* condotti dal gruppo della prof.ssa Wésolowski-Louvel (dati non ancora pubblicati); tali saggi sono stati effettuati utilizzando sia la proteina Rag3 intera, sia la sua porzione N-terminale, contenente entrambi i putativi domini di legame al DNA, sia infine la sua porzione C-terminale, ed hanno evidenziato come per l'interazione tra Rag3 e *KIPdc1* sia necessaria l'intera sequenza di Rag3, mentre nessuna interazione può aver luogo tra *KIPdc1* e le forme troncate di Rag3.

In base ai risultati della microscopia a fluorescenza, in terreno contenente glucosio *KIPdc1* sembra localizzata prevalentemente nel nucleo, mentre si osserva una fluorescenza di intensità piuttosto bassa nel citoplasma. Nello stesso tipo di terreno, Rag3 mostra una localizzazione esclusivamente nucleare. Per quanto riguarda le cellule cresciute in presenza di etanolo, i dati sono di più difficile interpretazione: in questo caso la fluorescenza corrispondente a *KIPdc1*, oltre che nel nucleo, risulta diffusa anche nel citoplasma, nonostante l'etanolo sia un substrato non fermentabile e di conseguenza nella cellula vi sia (almeno in teoria) una minore attività piruvato decarbossilasi; osservando al microscopio le cellule contenenti la chimera Rag3::GFP, inoltre, sono state individuate due popolazioni distinte: una composta da cellule che mostrano la fluorescenza nettamente localizzata nel nucleo, ed un'altra le cui cellule presentano anche una fluorescenza diffusa a livello del citoplasma. Al momento risulta difficile formulare delle ipotesi che spieghino sia la maggiore localizzazione citoplasmatica di *KIPdc1* che la presenza delle due popolazioni di cellule contenenti Rag3::GFP in terreno contenente etanolo.

I risultati dei Western Blot effettuati sugli estratti cellulari separati di cellule cresciute in glucosio hanno fornito ulteriori informazioni sulla localizzazione di Rag3 e *KIPdc1*: entrambe le proteine vengono rilevate nella frazione insolubile residua che si recupera alla fine della separazione. Tale frazione contiene sia membrane nucleari che organelli citoplasmatici, oltre a complessi proteici che tendono a precipitare durante il trattamento. L'ipotesi formulata è che, per quanto riguarda Rag3, essa si trovi associata a proteine del complesso del poro nucleare, come è stato osservato per il suo omologo in *S. cerevisiae*, Pdc2 (Mojzita e Hohmann, 2006), pertanto è verosimile che, durante la procedura di separazione, essa precipiti insieme alle altre proteine associate alla membrana nucleare. Per quanto riguarda *KIPdc1*, la sua assenza nella frazione citoplasmatica dell'estratto cellulare

potrebbe essere dovuta alla probabile associazione dell'enzima ai mitocondri, mentre a livello del nucleo potrebbe anch'essa trovarsi in associazione con le proteine del poro nucleare come Pdc1 di *S. cerevisiae* (Mojzita e Hohmann, 2006). In futuro verrà determinata, sia per osservazione al microscopio a fluorescenza che attraverso analisi Western Blot di estratti cellulari separati, la localizzazione di *KIPdc1* in ceppi deleti per *RAG3*, al fine di verificare che la localizzazione nucleare della piruvato decarbossilasi è collegata al ruolo che la proteina ha nel meccanismo dell'autoregolazione.

*RAG3* viene espresso maggiormente nei terreni contenenti etanolo (circa 1,5 volte quella del glucosio) e soprattutto in presenza di etanolo e glucosio (circa 2,5 volte quella del glucosio), una condizione quest'ultima che mima la composizione del terreno in fase fermentativa (trasformazione del glucosio in etanolo). Questo dato fa presupporre un possibile ruolo di *Rag3* nella repressione di *KIPDC1* in risposta alla regolazione da etanolo.

Dai dati ricavati dall'analisi Northern di *KIPDC1*, è infatti rilevante notare come nel mutante  $\Delta Klr\text{rag}3$  non sia più riscontrabile la repressione da etanolo. D'altra parte, è evidente come *KIPDC1* in presenza di etanolo e glucosio sia sempre indotto, nonostante la presenza del repressore (etanolo). L'espressione di *KIPDC1* su fonte mista (glucosio ed etanolo) nel mutante  $Kl\Delta\text{rag}3$  è sempre su un livello paragonabile a quella del selvatico, fenomeno che non ci aspetteremmo se *Rag3* agisse solamente e semplicemente nella repressione da etanolo. Se ne conclude che il ruolo di *Rag3* nella regolazione di *KIPDC1* è tutt'altro che semplice, avendo funzioni sia di attivatore che di repressore trascrizionale e probabilmente in modo dipendente dalla fonte di carbonio (glucosio o etanolo).

Infine, non è ancora stato possibile verificare sperimentalmente se *Rag3* legghi direttamente il promotore di *KIPDC1*: gli esperimenti di DNA *affinity capture*, condotti nell'ambito di questo lavoro, non hanno permesso di rilevare alcun legame della proteina al DNA; anche esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina, condotti in passato nel nostro laboratorio, e saggi EMSA condotti dal gruppo della professoressa Wésolowski Louvel (dati non pubblicati) hanno avuto lo stesso esito. Ciò porta alla formulazione di due ipotesi: la prima, secondo la quale il legame tra *Rag3* e il promotore di *KIPDC1* è estremamente labile e di conseguenza difficilmente osservabile attraverso i suddetti esperimenti; la seconda, secondo la quale *Rag3* non lega direttamente il promotore di

*KIPDC1* e che prevede quindi un meccanismo di autoregolazione più complesso di quello descritto dall'attuale modello, in cui siano coinvolti altri fattori trascrizionali.

## 2. Regolazione ossigeno-dipendente

La ricerca di mutanti della regolazione ossigeno-dipendente di *KIPDC1* ha portato all'identificazione di uno dei regolatori coinvolti nell'induzione ipossica di questo gene: la proteina Rag4, già caratterizzata per la sua funzione di sensore del glucosio. Rag4 è risultata indispensabile per l'induzione ipossica di *KIPDC1* sia in presenza che in assenza di glucosio nel terreno di coltura. Ciò fa supporre il coinvolgimento della proteina in una via del segnale ad oggi completamente sconosciuta, distinta da quella Rag8-dipendente, che è già stata parzialmente caratterizzata e attraverso la quale viene regolata l'espressione genica in risposta alla presenza di glucosio.

La ricerca di omologhi di sequenza amminoacidica dei regolatori di *S. cerevisiae* Rox1, Mot3 ed Mga2 ha portato all'identificazione di tre prodotti genici putativi; mentre *KIMga2* mostra un alto livello di omologia con Mga2 ed un'identica organizzazione dei domini funzionali, per *KIRox1* e *KIMot3* l'omologia con i regolatori di *S. cerevisiae* è circoscritta principalmente alla porzione che contiene il putativo dominio di legame al DNA. Un lavoro di recente pubblicazione (Fang *et al.*, 2009), tuttavia, indica le stesse proteine da noi identificate come probabili omologhi dei due regolatori di *S. cerevisiae*. Sono stati costruiti i ceppi deleti per ciascuno dei tre geni *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2*; nessuno dei tre mutanti mostra gravi alterazioni nell'induzione ipossica di *KIPDC1*: i tre regolatori putativi non risultano, quindi, coinvolti nella regolazione ossigeno-dipendente del gene.

Dei tre mutanti, soltanto il ceppo  $\Delta KImga2$  possiede un fenotipo riconoscibile, con colonie traslucide ed una crescita fortemente stentata su terreno contenente antimicina A. Non si può parlare di fenotipo rag- in senso stretto, dal momento che la crescita non è completamente bloccata dall'antimicina; inoltre, l'aggiunta di acidi grassi insaturi al terreno ripristina una crescita paragonabile a quella del mutante su terreno ricco YPD, cosa

che non avviene per i mutanti rag- propriamente detti. Il mutante *ΔKlmg2* presenta anche un'alta percentuale di cellule con fenotipo *multi-bud*, in cui la gemmazione è incompleta ma sia la cellula madre che le gemme contengono il DNA nucleare e possono dare origine a colonie se separate meccanicamente; il difetto sembra quindi riguardare la membrana cellulare e non la parete o il meccanismo di partizione della cellula. Tutti questi dati portano a supporre che *KlMga2*, come *Mga2* di *S. cerevisiae*, sia coinvolto nella biosintesi degli acidi grassi insaturi di membrana, e che sia indispensabile quando il metabolismo respirativo è bloccato.

L'analisi quantitativa dei trascritti di *KIROX1*, *KIMOT3* e *KIMGA2* ha evidenziato che l'espressione dei primi due geni è indotta in condizioni ipossiche, contrariamente a ciò che avviene per i rispettivi omologhi di *S. cerevisiae*, in cui l'espressione di *ROX1* è indotta in condizioni normossiche e quella di *MOT3* è repressa in condizioni ipossiche/anossiche. *KIMGA2* è invece espresso costitutivamente, come *MGA2* di *S. cerevisiae*.

Infine, è stata effettuata l'analisi dell'espressione dei *target* putativi dei tre regolatori. In base ai risultati il gene *KLANBI*, omologo del gene ipossico *ANBI* di *S. cerevisiae*, sembra essere un bersaglio di *KlRox1*, che verosimilmente ne reprime l'espressione in ipossia, mentre *KlMot3* non sembra coinvolto nella regolazione di questo gene. La proteina *KlMga2*, invece, è risultata essere necessaria per l'induzione ipossica dell'espressione di *KIOLE1*, omologo del gene *OLE1* di *S. cerevisiae* e codificante per una desaturasi coinvolta nella biosintesi degli acidi grassi insaturi.

I dati finora ottenuti riguardo *KlRox1*, *KlMot3* e *KlMga2* suggeriscono una sostanziale differenza tra *K. lactis* e *S. cerevisiae* per quanto riguarda la regolazione ossigeno-dipendente mediata da *Rox1* e *Mot3* nei due lieviti: in *S. cerevisiae* i due regolatori sono maggiormente espressi in condizioni normossiche e fungono da repressori di geni ipossici, mentre in *K. lactis* la loro espressione è indotta in condizioni ipossiche e, almeno per quanto riguarda la regolazione di *KLANBI* da parte di *KlRox1*, la funzione che svolgono sembra essere quella di repressori di geni normossici in condizioni ipossiche. L'ipotesi appare fondata se si considera che, a differenza di *S. cerevisiae*, *K. lactis* non è in grado di crescere in assenza di ossigeno e l'ipossia comporta uno stress per la cellula: di conseguenza geni come *KLANBI*, codificante per un fattore di traduzione, vengono repressi per rallentare il metabolismo cellulare e non disperdere inutilmente energia. Sarà

comunque necessario analizzare altri bersagli putativi dei due regolatori al fine di caratterizzare meglio questo meccanismo di regolazione ossigeno-dipendente.

La proteina *KIMga2* sembra svolgere lo stesso ruolo di *Mga2* in *S. cerevisiae*; il fatto che il gene *KIMGA2* sia costitutivo lascia supporre che il regolatore sia soggetto allo stesso meccanismo di regolazione post-traduzionale di *Mga2*. Sono in corso esperimenti volti a verificare il ruolo di *KIMga2* in condizioni che mimano lo stress ipossico (ad esempio la presenza di cobalto) e l'eventuale capacità di *Mga2* di *S. cerevisiae* di ripristinare il fenotipo selvatico nel mutante  $\Delta Klmga2$ .

# **MATERIALI E METODI**



# 1. Ceppi e terreni di coltura

I ceppi di lievito utilizzati in questo lavoro sono elencati nella tabella M1. Le cellule sono state coltivate a 28°C in terreno ricco o terreni sintetici selettivi. Il terreno ricco YP è composto da 1% estratto di lievito, 2% peptone. I terreni selettivi utilizzati per selezionare i trasformati sono composti da 0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio e le auxotrofie necessarie.

Il terreno utilizzato per lo *screening* dei mutanti della regolazione ipossica è composto da sali (diluiti a partire da due soluzioni concentrate 10 volte, la prima contenente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13,6%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1%,  $\text{KOH}$  3% e la seconda contenente  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  20,4% e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5,8%), elementi in tracce (diluiti a partire da una soluzione concentrata 1000 volte ottenuta sciogliendo, in 50 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ , 25 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 3 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg  $\text{KI}$ , 10 mg  $\text{FeCl}_3$ , 20 mg  $\text{MnSO}_4$ , 11,5 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 35,5 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e vitamine (diluite a partire da una soluzione concentrata 1000 volte ottenuta sciogliendo in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  1 mg biotina, 20 mg piridossina, 0,5 g inositolo, 0,1 g pantotenato, 0,1 mg nicotinammide, 10 mg riboflavina, 10 mg acido parabenzico, 20 mg niacina), con l'aggiunta di tiamina 2  $\mu\text{M}$  e le auxotrofie adeguate, oltre a casaminoacidi al 2%. La soluzione utilizzata per la colorazione blu-bianco delle colonie è composta da una mix A (5 ml di agarosio 1%) che, in seguito a bollitura, viene unita ad una soluzione B (5 ml tampone fosfato di sodio, pH 7, 0,4 ml N,N-dimetilformammide, 0,1 ml SDS 10%, 100  $\mu\text{l}$  X-Gal 40 mg/ml; incubare 10 minuti a 65°C).

Il terreno 5-FOA, utilizzato per selezionare i mutanti spontanei ura-, è stato ottenuto unendo la mix 1 (50 ml agar 4% in acqua, autoclavata) alla mix 2 (in 46 ml: uracile 0,2 g, auxotrofie al doppio della concentrazione standard, yeast nitrogen base 1,4%, 5-FOA 100 mg; dopo filtrazione viene aggiunto glucosio al 4% e la soluzione viene incubata 10 minuti a 42°C) e colando velocemente il terreno nelle piastre.

Il terreno solido utilizzato per incrociare o indurre la sporulazione delle cellule di lievito è composto da estratto di malto 5% e agar al 3%.

Le cellule batteriche utilizzate per i clonaggi (*E. coli* DH5 $\alpha$ F', *recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169[ $\phi$ 80dlacZ  $\Delta$ M15] Nd<sup>R</sup> ) sono state coltivate in terreno ricco Luria-Bertani (LB, 1% triptone, 1% NaCl, 0,5% estratto di lievito).*

A seconda dei casi, al terreno di crescita è stato aggiunta una fonte di carbonio al 2% (glucosio, etanolo, glicerolo). Quando necessario, sono stati aggiunti ampicillina (100  $\mu$ g/ml), G418 (100  $\mu$ g/ml) o antimicina A (5  $\mu$ M).

La sterilizzazione dei terreni è stata ottenuta per autoclavatura; le soluzioni contenenti miscele di sali, vitamine, antibiotici, droghe o aminoacidi sono state sterilizzate per filtrazione.

I terreni solidi sono stati ottenuti aggiungendo, prima dell'autoclavatura, agar al 2%.

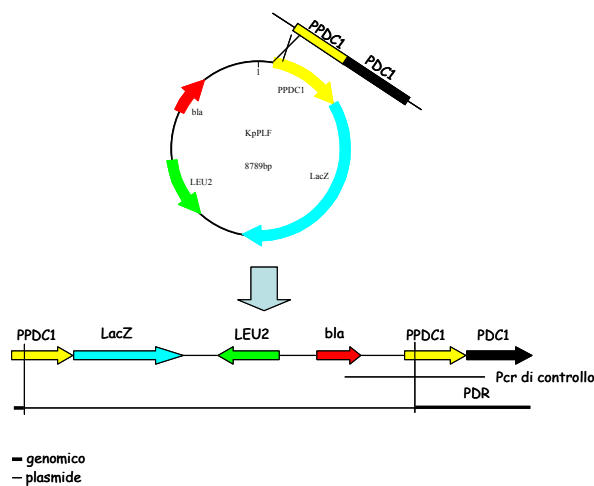
**Tabella M1.** Ceppi di *K. lactis* utilizzati

Nome	Descrizione	Provenienza
<b>CSK</b>	integrazione di KpPLFin CSK1/1, per ricombinazione omologa a livello del prom <i>PDC1</i> . <i>LEU2</i> , Prom <i>PDC1::lacZ</i>	presente lavoro
<b>CSK1/1</b>	Mata $\alpha$ , uraA1-1, leu2, lac4::ura3. Ottenuto per incrocio HNK2 x PM4-4B, selezione di ceppo Mata $\alpha$ , uraA1-1, leu2, lac4::URA3 e successiva selezione di mutanti spontanei ura3- su terreno 5-FOA	presente lavoro
<b>CSK-Rv</b>	integrazione di KpPLR in CSK1/1, per ricombinazione omologa a livello del prom <i>PDC1</i> . <i>LEU2</i> , Prom <i>PDC1(reverse)::lacZ</i>	presente lavoro
<b>MM1-12D</b>	MATa, adeT-600, lac4-8, leu2, ura3, pdc1::ura3 (da PMI/C1xMW341-5)	Destruelle <i>et al.</i> , 1999
<b>FP245</b>	MATa, adeT-600, lac4-8, leu2, ura3, pdc1::ura3; <i>rag3</i> mut. Ottenuto per mutagenesi <i>random</i> di MM1-12D	Protani, 1998
<b>GDK</b>	integrazione di KpPLFin HNK20, per ricombinazione omologa a livello del prom <i>PDC1</i> . <i>LEU2</i> , Prom <i>PDC1::lacZ</i>	presente lavoro
<b>GDK-Rv</b>	integrazione di KpPLR in HNK20, per ricombinazione omologa a livello del prom <i>PDC1</i> . <i>LEU2</i> , Prom <i>PDC1(reverse)::lacZ</i>	presente lavoro
<b>GDK/<i>Arox1</i></b>	inserzione omologa in GDK di cassetta delezione <i>rox1::KanMX4</i>	presente lavoro
<b>GDK/<i>Amot3</i></b>	inserzione omologa in GDK di cassetta delezione <i>mot3::KanMX4</i>	presente lavoro
<b>GDK/<i>Amga2</i></b>	inserzione omologa in GDK di cassetta delezione <i>mga2::KanMX4</i>	presente lavoro
<b>HNK2</b>	Mata $\alpha$ , uraA1-1, leu2, metA1-1, lac4::URA3	Wésolowski-Louvel
<b>HNK20</b>	Mata $\alpha$ , uraA1-1, leu2, metA1-1, lac4::ura3	Wésolowski-Louvel
<b>MW270-7B</b>	Mata $\alpha$ , uraA1-1, leu2, metA1-1	Billard <i>et al.</i> , 1996
<b>MWK14F</b>	Mata $\alpha$ , uraA1-1, leu2, metA1-1, $\Delta$ <i>rag3::ura3</i> . Da MW270-7B per inserzione di cassetta URA3 in <i>RAG3</i> e selezione su 5-FOA.	Wésolowski-Louvel
<b>MWK6</b>	MATa uraA1 leu2 metA1 $\Delta$ <i>rag4::LEU2</i>	Rolland <i>et al.</i> , 2006
<b>MWLK1021</b>	Mata $\alpha$ , lysA1-1, trp1, leu2, metA1-1, uraA1-1, nej1::LEU2, <i>RAG3::3HA::KanMX4</i>	Wésolowski-Louvel

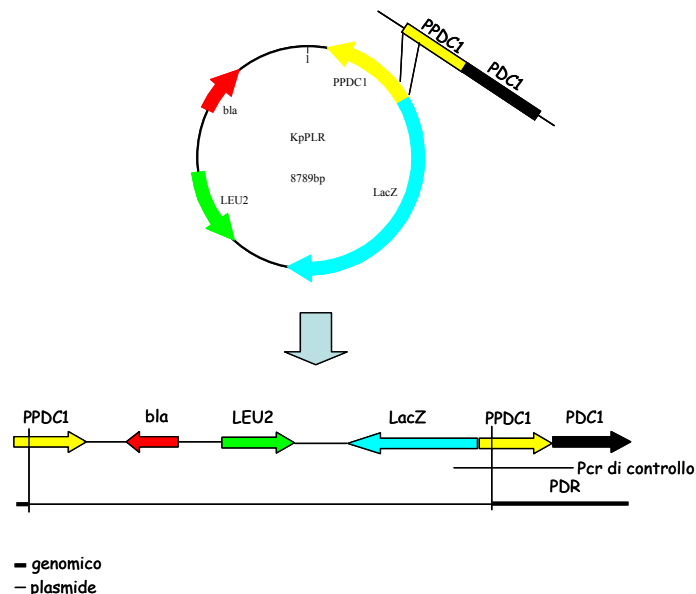
<b>MWLK1086</b>	MAT $\alpha$ uraA1, leu2, metA1, hisA2 $\Delta$ pdc1::ura3, Rag3::3HA::kanMX4	Wésolowski-Louvel
<b>PM4-4B</b>	Mata, uraA1-1, ade2-1	Bianchi
<b>PM6-7A</b>	MATa uraA1-1 adeT-600	Chen <i>et al.</i> , 1992
<b>PM6-7A/VV32</b>	MATa uraA1-1 adeT-600, rag4-1	Wésolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1992
<b>PM6-7A/<math>\Delta</math>rag3</b>	MATa uraA1-1 adeT-600, $\Delta$ rag3::ura3	Wésolowski Louvel
<b>PMI-C1</b>	MATa uraA1-1 adeT-600, $\Delta$ pdc1::ura3	Bianchi <i>et al.</i> , 1996

Il ceppo HNK2 è stato incrociato con il ceppo PM4-4B, ed in seguito a dissezione degli aschi ed analisi delle tetradi è stato possibile selezionare il ceppo CSK1; in seguito a piastramento di tale ceppo su terreno solido contenente 5-FOA, è stato possibile isolare il mutante *ura3* spontaneo CSK1/1. Attraverso l'integrazione nel genoma di CSK1/1 dei vettori KpPLF e KpPLR, per ricombinazione omologa a livello del promotore di *PDC1*, sono stati ottenuti rispettivamente il ceppo CSK ed il ceppo CSK-Rv.

Allo stesso modo, i ceppi GDK e GDK-Rv sono stati ottenuti per integrazione omologa nel genoma di HNK20 dei vettori KpPLF e KpPLR, rispettivamente.

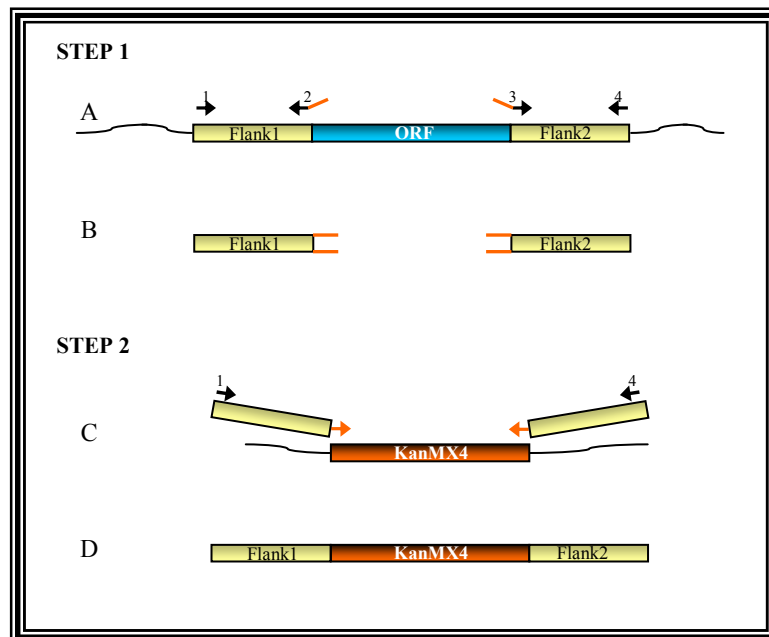


**Figura M-1.** Schema dell'integrazione omologa del plasmide KpPLF nei genomi di CSK1/1 e HNK20. Il singolo evento di ricombinazione a livello del promotore di *KIPDC1* ha portato alla costruzione di ceppi lac<sup>+</sup>, prototrofi per la leucina e recanti una duplicazione del promotore di *KIPDC1*. In questi ceppi la produzione di beta-galattosidasi è sotto il controllo del promotore di *KIPDC1*.



**Figura M-2.** Schema dell'integrazione omologa del plasmide KpPLR nei genomi di CSK1/1 e HNK20. Il singolo evento di ricombinazione a livello del promotore di *KIPDC1* ha portato alla costruzione di ceppi prototrofi per la leucina e recanti una duplicazione del promotore di *KIPDC1*. In questi ceppi non si ha produzione di beta-galattosidasi poiché il gene *lacZ* è sotto il controllo del promotore di *KIPDC1* orientato in modo divergente rispetto al gene.

I ceppi *GDK/Δrox1::KanMX4*, *GDK/Δmot3::KanMX4* e *GDK/Δmga2::KanMX4* sono stati ottenuti in a partire da *GDK* per trasformazione con cassette di delezione contenenti il gene *KanMX4* (Wach *et al.*, 1994), costruite mediante due reazioni di PCR: in un primo passaggio sono state amplificate le regioni fiancheggianti il gene da disrompere; le due regioni fiancheggianti ottenute vengono utilizzate per il passaggio successivo, in cui fungeranno esse stesse da *primers*, insieme ai *primers* esterni utilizzati nel primo passaggio di PCR, per l'amplificazione della cassetta *KanMX4* (fig. M-1); il plasmide pFA6-*KanMX4* digerito con l'enzima di restrizione *NotI* è stato utilizzato come template.



**Figura M-3** Fasi della costruzione delle cassette delezione *KanMX4*. **STEP 1**: amplificazione delle regioni fiancheggianti (*flanking*) il gene d'interesse (A). I due *primers* interni contengono una porzione (in arancione) complementare alla sequenza del gene *KanMX4*, non presente nel DNA genomico di lievito. I prodotti del primo *step* di PCR sono le due *flanking* fuse con una breve sequenza complementare al gene *KanMX4* (B). **STEP 2**: utilizzando come template il plasmide pFA6-*KanMX4*, viene effettuata una nuova PCR con i *primers* 1 e 4 e le due *flanking* ottenute nello *step* 1 (C); il prodotto finale che si ottiene è una cassetta contenente il gene *KanMX4* fusa con le *flanking* del gene d'interesse (D).

## 2. Plasmidi utilizzati

I plasmidi utilizzati in questo lavoro sono elencati nella tab. M-2.

Il plasmide pFFV è stato ottenuto a partire dal vettore pUG35 (Guldener e Hegemann, 1998), per eliminazione (SacI-BamHI) del promotore MET25-P ed inserzione (BamHI) del frammento contenente l'origine di replicazione A15 del plasmide pKD1 di *K. lactis*. Il plasmide pFF15 è stato ottenuto inserendo nel sito ClaI di pFFV il frammento BstBI di pCM23-1 (Prior *et al.*, 1993) contenente il gene *RAG3* ed il suo promotore, in *frame* con la sequenza codificante per la GFP. Il plasmide pDN1 è stato ottenuto clonando (HindIII-ClaI), in *frame* con la sequenza codificante per la GFP, il gene *PDC1* con il suo promotore, amplificando la sequenza a partire dal DNA genomico di MW270-7B

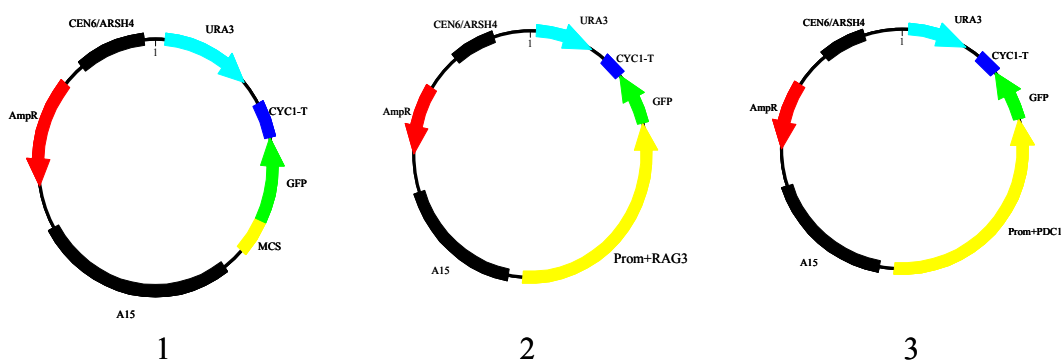
(oligonucleotidi II-12 e II-13) e digerendo l'amplificato con gli enzimi di restrizione HindIII e ClaI.

Il plasmide pFA6a-KanMX4 è stato gentilmente fornito dal professor Steensma (università di Leiden).

Il plasmide YCplac111 è stato utilizzato per la costruzione dei vettori integrativi KpPLF e KpPLR. Le sequenze ARS e CEN di YCplac111 sono state eliminate per digestione con BglIII-BamHI e successiva circolarizzazione del plasmide per ligazione delle estremità coesive; è stato così ottenuto il plasmide Yplac111, che è stato successivamente digerito per SallI-XbaI e ligato con un frammento SallI-NheI, contenente la fusione tra il promotore di *PDC1* e *lacZ*, del plasmide pMD12. Dal plasmide KpPLF così ottenuto, il promotore di *PDC1* è stato escisso (HindIII) e reinserito in posizione divergente rispetto a *lacz*. Il vettore risultante è stato denominato KpPLR.

**Tabella M-2.** Elenco dei plasmidi utilizzati

Nome	Descrizione	Provenienza
pMD12	CEN2/S11, URA3, Amp <sup>r</sup> , Prom <i>PDC1</i> :: <i>lacZ</i>	Destruelle <i>et al.</i> , 1999
pFF15	CEN6/ARSH4, oriA15, URA3, Amp <sup>r</sup> , <i>RAG3</i> ::GFP::CYC1-T	Salani, 2005
pFFV	CEN6/ARSH4, oriA15, URA3, Amp <sup>r</sup> , GFP::CYC1-T.	Salani, 2005
pDN1	CEN6/ARSH4, oriA15, URA3, Amp <sup>r</sup> , <i>PDC1</i> ::GFP::CYC1-T	presente lavoro
pFA6a	Amp <sup>r</sup> , KanMX4	Wach <i>et al.</i> , 1994
YCplac111	lac-prom, Amp <sup>r</sup> , LEU2, ARS1, CEN4	ATCC
KpPLF	Amp <sup>r</sup> , prom <i>PDC1</i> :: <i>lacZ</i> , LEU2	presente lavoro
KpPLR	Amp <sup>r</sup> , prom <i>PDC1</i> (reverse):: <i>lacZ</i> , LEU2	presente lavoro



**Figura M-4.** Mappe dei plasmidi derivati da pUG35 utilizzati in questo lavoro: **1**, pFFV; **2**, pFF15; **3**, pDN1.

### 3. Estrazione e manipolazione del DNA

La prima fase per l'estrazione di DNA genomico da *K. lactis* è la preparazione di una coltura cellulare di 5 ml. Dopo aver raccolto le cellule mediante centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti, il pellet viene trasferito in un tubo da 1,5 ml e risospeso in una miscela costituita da 200 µl di *lysis buffer* (10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 2% Triton X-100) e 200 µl di una miscela 1:1 di fenolo e cloroformio. Questa sospensione, dopo l'aggiunta di 300 µl (circa 0,3 g) di sfere di vetro del diametro di 425-600 µm, viene agitata mediante vortex per 2 minuti. Dopo l'aggiunta di 200 µl di TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0), la sospensione viene nuovamente agitata mediante vortex per pochi secondi e dunque centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti. Il supernatante, ovvero il lisato cellulare, viene infine trasferito in un nuovo tubo da 1,5 ml, cui vengono aggiunti 3 volumi di etanolo 96% e 0,1 volume di Na-Acetato 3M pH 5,2. La soluzione viene incubata per un'ora a -20° C e dunque centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti; eliminato il supernatante, al tubo da 1,5 ml vengono aggiunti 0,5 ml di etanolo 70% avendo cura di non risospesare il pellet. Dopo essere stato centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti, il campione viene lasciato per circa 20 minuti a temperatura ambiente per far evaporare completamente l'etanolo; il pellet risultante viene infine risospeso in un volume adeguato di H<sub>2</sub>O sterile.

Per l'estrazione rapida di DNA plasmidico è stato utilizzato un protocollo elaborato da Birnboim (Birnboim & Doly, 1979) e modificato da Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

Si inocula il ceppo batterico in LB con gli eventuali antibiotici selettivi, e si lascia crescere per 14-16 ore, in agitazione, a 37°C. Si prelevano e centrifugano (temperatura ambiente, 12000 rpm, 3 minuti) 1,5 ml di coltura e si risospesano il sedimento batterico in 100 µl di tampone glucosio (glucosio 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 25 mM, EDTA 10 mM) freddo. Si prepara la soluzione di lisi (NaOH 0,2 M, SDS 1% p/V) e se ne aggiungono 200 µl al campione posto in ghiaccio, incubando per 3-5 minuti. Le membrane e il DNA cromosomale si precipitano aggiungendo 150 µl di acetato di potassio 5 M preraffreddato,

ed incubando in ghiaccio per 10 minuti. Dopo centrifugazione a + 4°C per almeno 10 minuti a 12000 rpm si recupera il chiarolisato contenente il DNA plasmidico.

Si aggiungono quindi ad ogni campione 10 µg di RNAasi, incubando a 37°C per 30 minuti. Si elimina la porzione proteica mediante ripartizione di fase acqua-PCIA (fenolo:cloroformio:alcol isoamilico=25:24:1). Si precipita il DNA contenuto nella fase acquosa con 2 volumi di etanolo al 95% e si lava con 1 isovolume di etanolo al 70%. Infine si risospende il DNA precipitato in 20 µl di H<sub>2</sub>O (Sambrook *et al.*, 1989).

Per l'estrazione di grandi quantitativi di DNA è stato utilizzato il kit Nucleobond AX-100 (Macherey-Nagel).

Per identificare e quantificare i frammenti d'interesse, il DNA plasmidico è stato sottoposto a restrizione enzimatica, e successivamente sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio 1% (p/V), utilizzando come tampone per la preparazione del gel e per la corsa il TAE [Tris-HCl pH 7,5 40 mM; CH<sub>3</sub>COOH 40 mM; EDTA 2 mM (Sambrook *et al.*, 1989)].

Come marcatori di peso molecolare sono stati usati il DNA del fago λ digerito con l'enzima di restrizione Hind III ed i preparati commerciali "DNA ladder plus" (Fermentas).

L'eluizione di specifici frammenti di DNA da gel d'agarosio è stata eseguita utilizzando il kit commerciale Nucleospin extract (Macherey-Nagel).

Le reazioni di ligazione sono state eseguite aggiungendo l'enzima T4 DNA ligasi (Takara) ad una miscela di ligazione contenente vettore e inserto in rapporto 1:3, e tampone della DNA ligasi (Takara), e seguendo le specifiche del produttore.

Le reazioni di PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reazione a catena della DNA polimerasi) sono state condotte utilizzando la Taq polimerasi Amplibiotherm (Fisher Molecular Biology) o la Phusion DNA polimerasi (Finnzymes) nell'appropriato tampone di reazione, e seguendo le specifiche della casa produttrice. I desossiribonucleotidi e gli oligonucleotidi sono stati utilizzati alle concentrazioni finali rispettivamente di 0,2 mM e 0,5 µM. Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati come *primers* per le reazioni di amplificazione sono riportate in tabella M-3.



**Tabella M-3.** Oligonucleotidi utilizzati.

Nome	Sequenza	Utilizzo
I-1	AATGCATATATTGTCCCAGGT	Fw. Per sequenziamento prom <i>PDC1</i>
I-2	AATCGCATCAACTGATCCGA	Rv. Per sequenziamento prom <i>PDC1</i>
I-3	CAGACATCCTCCAAGCCGTAT	Fw. Per sequenziamento prom <i>PDC1</i>
I-4	TATACCACAGAAACCGCACCA	Rv. Per sequenziamento prom <i>PDC1</i>
I-5	TGCGTGCTCTGTATTTTGCA	Fw. Per sequenziamento prom <i>PDC1</i>
I-6	TGTTTGGCTTTAGTGGATGG	Rv. Per sequenziamento prom <i>PDC1</i>
I-21	CCCCGCCGGGTCACCCGGCC CCTTGACTTCAGCAAAGCAC	Fw per amplificazione gene KanMX e Rv per <i>flanking</i> 3' di <i>MGA2</i>
I-22	CGATACTAACGCCGCCATCC CAGAATGAAGGCTGCGTTTATG	Rv per amplificazione gene KanMX e Fw per <i>flanking</i> 5' di <i>MGA2</i>
I-25	GACGAGGCAAGCTTGATATC CACGCACAAGCCGGAACAAA	Fw per amplificazione gene KanMX e Rv per <i>flanking</i> 3' di <i>ROX1</i>
I-26	GCCGCCATCCAGTGTGAC GTACTGGTTGGATCTAGCCA	Rv per amplificazione gene KanMX e Fw per <i>flanking</i> 5' di <i>ROX1</i>
I-29	GACGAGGCAAGCTTGATATC GGGAACCCACAATCGATCG	Fw per amplificazione gene KanMX e Rv per <i>flanking</i> 3' di <i>MOT3</i>
I-30	GCCGCCATCCAGTGTGAC CCCTCAACAACCATCAGAGAC	Rv per amplificazione gene KanMX e Fw per <i>flanking</i> 5' di <i>MOT3</i>
I-33	TATGGAAAAGATCTGGCAT	(Fw) Amplificazione <i>ACT1</i> in real-time PCR
I-34	AACAAAAGTGGGTGTTCTT	(Rv) Amplificazione <i>ACT1</i> in real-time PCR
I-37	GAAAAAGCAATAGAGACCGAT	Fw. Per real-time PCR di <i>ROX1</i>
I-39	CACGAATCGCATCACTCGT	Fw. Per real-time PCR di <i>MOT3</i>
I-41	GTACTCCAGAAGGACTACC	Fw. Per real-time PCR di <i>MGA2</i>
I-44	GGAACGCACGTAGAAAATCTT	Fw. Per amplificazione <i>flanking</i> cassetta delezione <i>ROX1</i>
I-45	AACCAATGTCATGCAGAAGG	Rv. Per amplificazione <i>flanking</i> cassetta delezione <i>ROX1</i>
I-46	CCGGGGAACAACCTGTTATAT	Fw. Per amplificazione <i>flanking</i> cassetta delezione <i>MGA2</i>
I-47	TCGCCACACATACTTCTCTG	Rv. Per amplificazione <i>flanking</i> cassetta delezione <i>MGA2</i>
I-48	GCCTTGGTACTACGGAAAC	Fw. Per amplificazione <i>flanking</i> cassetta delezione <i>MOT3</i>
I-49	TAACGTTTCAGGCATGGTAG	Rv. Per amplificazione <i>flanking</i> cassetta delezione <i>MOT3</i>
I-71	CGTATCGAGTTTTTTTTGTTGCC	Fw. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-72	TTTCAGTGCCACTCAAGTTTGC	Rv. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-73	CCTTCCTTTAGATTATGCGCAGT	Fw. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-74	GGGTAAAAATCCAGAATTCTTCC	Rv. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-75	CATTAAAAATGTCATGGGATGC	Fw. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-76	TTGATTCTTCCGATACATCAGC	Rv. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-77	TCCTGATGATATGTTGACTGGAA	Fw. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
I-78	TCTGCATGAGAGTTGCTTGATAA	Rv. Per sequenziamento <i>RAG3</i>
II-12	CCATCGATGGCGTAGATTAAGAGAATCC AC	Fw. Per amplificazione di <i>KIPDC1</i> con aggiunta di un sito ClaI al 5'
II-13	ACCATCGATGGACTTAGCGTTGGTAGCA GCAG	Rv. Per amplificazione di <i>KIPDC1</i> con aggiunta di un sito ClaI al 3'
II-22	GGCTGAAGAAGAACACACTT	Fw. Per real-time PCR di <i>KIANB1</i>
II-33	CTCAAAGCAGAACATTGCATT	Rv. Per real-time PCR di <i>KIANB1</i>
II-34	GTATATGCTGCTGTTGTGGT	Rv. Per real-time PCR di <i>KIROX1</i>
II-35	CGGTGACCTTGTTCTTGCT	Rv. Per real-time PCR di <i>KIMGA2</i>
II-36	CAGAAGATGTCTCTTTAACCA	Rv. Per real-time PCR di <i>KIMOT3</i>
II-37	GTGGATTTAGTGAACGCTAAT	Fw. Per real-time PCR di <i>KIOLE1</i>
II-38	CAATGACCCAAGCCCGTTA	Rv. Per real-time PCR di <i>KIOLE1</i>
II-41	GGGTTTCTCAGTCCATATGG	Fw. Per real-time PCR di <i>RAG3</i>

II-42	GGTATCTTATGCCAAACAGAT	Rv. Per real-time PCR di <i>RAG3</i>
II-69	CGCCAATGCCATTCAACAAG	Rv. Per amplificazione sonda D (DNA affinity capture)
II-70	CATAATCTATCCCATGGTTCT	Rv. Per amplificazione sonda P (DNA affinity capture)
II-71	CTTCGTTTCCTGCAGGTTTT	Rv. Per amplificazione sonda U (DNA affinity capture)
II-72	[Btn] CTTGTTGAATGGCATTGGCG	Fw. per amplificazione sonda P biotinilata (DNA affinity capture)
II-73	[Btn] GCTTCCAGTCACATGACCT	Fw. Per amplificazione sonda D biotinilata (DNA affinity capture)
II-74	[Btn] GCGCCAATTGATGACAATAC	Fw. Per amplificazione sonda U biotinilata (DNA affinity capture)
II-75	CCTGGAAGGGTATTGCCAG	Fw. Per amplificazione e sequenziamento di <i>RAG4</i>
II-76	CTGAATCCTTAACTATTAATTCT	Rv. Per amplificazione e sequenziamento di <i>RAG4</i>
II-77	CACTTCAATCGCATTTAACTTG	Fw. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
II-78	CTGGTATGAGTGTTGGACTA	Fw. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
II-79	GCAGTAAATGTTGCGTTTAAC	Fw. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
II-80	CCTATTCAAGTACAGATGCC	Fw. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
II-81	CTATCATAAATACCACGAACG	Rv. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
III-1	GGAAACCAAATAGCTTTTCGC	Rv. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
III-2	GGGTTCATTATAGCTGGA	Rv. Per sequenziamento di <i>RAG4</i> .
III-3	CCGGTAAGCGTCATTCAAC	Rv. Per amplificazione e sequenziamento di <i>RAG4</i>
III-4	TGACAGGCCTATTGTTGAGT	Fw. per amplificazione e sequenziamento del promotore di <i>RAG4</i> .

## 4. Trasformazione di cellule batteriche

Le cellule di *E. coli* sono state rese competenti alla trasformazione secondo il protocollo descritto di seguito: una coltura viene inoculata in LB liquido con gli eventuali antibiotici opportuni, e lasciata crescere in agitazione per una notte a 37°C. Quindi si esegue una diluizione 1:50 in 50 ml di LB contenente gli stessi antibiotici, e si lascia crescere a 37°C in agitazione, finché la coltura non ha raggiunto una densità ottica a 600 nm pari a 0,3. A questo punto si preleva la coltura e si lascia in ghiaccio per almeno 30 minuti. Le cellule vengono raccolte centrifugando la coltura per 10 minuti a 4000 rpm, a 4°C, e risospese in 25 ml di CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, quindi incubate in ghiaccio per 30 minuti. Vengono poi nuovamente raccolte centrifugando per 10 minuti a 4000 rpm, 4°C, e risospese in 2,5 ml di una soluzione contenente CaCl<sub>2</sub> 1M e glicerolo al 15%. Aliquote di

300 µl vengono conservate a -80°C. Tutte le operazioni descritte sono effettuate mantenendo le cellule sempre in ghiaccio e utilizzando soluzioni preraffreddate.

Per la trasformazione si aggiunge ad un'aliquota di cellule competenti la quantità di DNA appropriato (80-150 ng) e si incuba 45 minuti in ghiaccio. La miscela di trasformazione viene quindi posta a 42°C per 2 minuti, poi si aggiunge 1 ml di LB e si incuba 1 ora a 37°C. Infine, si semina su piastre contenenti LB con l'antibiotico selettivo (Sambrook *et al.*, 1989).

## **5. Trasformazione di cellule di lievito mediante elettroporazione**

L'elettroporazione è una tecnica che consiste nell'esporre le cellule a campi elettrici pulsanti, che destabilizzano la membrana plasmatica ed inducono la formazione di pori transienti del diametro di alcuni nanometri; il DNA presente nella soluzione che circonda le cellule può penetrare attraverso questi pori nel citoplasma e nel nucleo. I principi alla base di questa tecnica siano sempre gli stessi, indipendentemente dall'organismo che si sta manipolando; nonostante ciò, parametri quali l'intensità e la durata dell'impulso elettrico devono essere ottimizzati per massimizzare l'efficienza della tecnica sull'organismo con il quale si lavora.

Il giorno prima del saggio, si utilizza una precoltura in fase stazionaria per inoculare 100 ml di YPD. Quando ha raggiunto una OD<sub>600</sub> compresa tra 0,6 e 1, la coltura viene divisa in due volumi da 50 ml ognuna e le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti a +4°. I pellets vengono risospesi in 25 ml di H<sub>2</sub>O sterile, quindi nuovamente centrifugati per 10 minuti a 4000 rpm a 4° C. Dopo questo lavaggio, i due pellets iniziali vengono riuniti e risospesi in un buffer di reazione costituito da 10 ml di YPD, 250 µl di DTT 1M e 200 µl di HEPES 1M. Dopo una incubazione di 30 minuti a 30° C, le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti a 4° C. Da questo momento in avanti è molto importante mantenere le cellule in

ghiaccio. I pellets vengono risospesi in un volume di EP buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 270 mM saccarosio; 1 mM LiAc) compreso tra 10 e 20 ml, a seconda della biomassa presente. Le cellule vengono quindi raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti a 4° C. I pellets vengono risospesi in 400-700 µl di EP buffer in un tubo da 1,5 ml; 50 µl di questa sospensione vengono quindi trasferiti in una cuvetta da elettroporazione, precedentemente mantenuta alla temperatura di -20° C, cui vengono aggiunti 300 ng del DNA con il quale si vogliono trasformare le cellule. Viene preparata anche una seconda cuvetta, contenente la sospensione cellulare priva di DNA esogeno, costituisce il controllo negativo dell'esperimento. A questo punto le cuvette vengono sottoposte all'azione dell'elettroporatore (Bio-rad gene pulser), il quale deve essere impostato con i seguenti parametri: un voltaggio di 1000 V, una capacità elettrica 25 µF ed una resistenza pari a 400 Ω. Subito dopo la scarica elettrica, ad ogni campione viene aggiunto 1 ml di YPD mantenuto precedentemente in ghiaccio. Dopo una incubazione di 15 minuti in ghiaccio ed una successiva incubazione di 1 ora a 30° C, le cellule vengono infine piastrate su terreno selettivo.

## 6. Mutagenesi *random* e screening dei mutanti

Per la mutagenesi *random* con raggi UV (tramite Spectrolinker XL100, Spectronics Corporations,  $\lambda = 254$  nm), le cellule sono state coltivate in terreno ricco YPD fino a fase tardo-esponenziale; sono state diluite e seminate su piastre YPD in modo da avere all'incirca 300 CFU per piastra. Le piastre sono state poi irraggiate con dosi diverse di raggi UV (5, 10, 20, 30, 45 mJ/cm<sup>3</sup>) e incubate, al buio, a 28°C. E' stata incubata nelle stesse condizioni anche una piastra di controllo non irraggiata con radiazioni UV. Una volta ottenute le colonie, è stata effettuata una conta al fine di stimare la percentuale di mortalità indotta dalle radiazioni UV. Per verificarne la riproducibilità, le prove di mutagenesi sono state ripetute prima di procedere allo *scale-up*.

Poiché però la mutagenesi UV non è risultata riproducibile a parità di condizioni, si è passati alla mutagenesi con il mutagene chimico EMS. Le cellule sono state coltivate per 24 ore in terreno ricco YP, fino al raggiungimento della fase tardo-esponenziale. Per ogni mutagenesi, 10<sup>8</sup> cellule sono state raccolte per centrifugazione (5 minuti a 5000 rpm) e lavate 2 volte con 2 ml di tampone Na-fosfato, pH 7. Infine, le cellule sono state risospese in 1 ml di tampone Na-fosfato. Per procedere alla mutagenesi, sono stati preparati dei tubi contenenti 4,2 ml di acqua sterile, 0,5 ml della sospensione cellulare in tampone Na-fosfato, 0,2 ml di glucosio al 50% e 0,1 ml di EMS (concentrazione finale = 2%). E' stato preparato anche un tubo di controllo in cui non è stato aggiunto EMS. Le cellule sono state incubate a 28°C, in agitazione, per tempi diversi (15, 30 e 45 minuti). Alla fine della mutagenesi, l'EMS è stato neutralizzato aggiungendo 5 ml di una soluzione al 10% di tiosolfato di sodio. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione, lavate due volte con tampone Na-fosfato e risospese in 5 ml di terreno YP, quindi sono state incubate per 90 minuti a 28°C in agitazione affinché avvenisse il *recovery* delle mutazioni. Alla fine dell'incubazione le cellule (mutagenizzate e non) sono state lavate con acqua sterile, opportunamente diluite e piastrate su terreno YPD e su terreno sintetico completo contenente glucosio con e senza canavanina (60 mg/l). La canavanina è un analogo dell'arginina, che può essere incorporato al posto dell'amminoacido durante la sintesi proteica, portando alla produzione di proteine dal *folding* non corretto e quindi non

funzionanti. Aggiungendo tale droga ad un terreno sintetico completo si determina la morte delle cellule che sono in grado di acquisire l'arginina dal mezzo di crescita. Dopo la crescita delle colonie, confrontando le piastre YPD contenenti le cellule mutagenizzate con le piastre YPD contenenti il controllo è possibile calcolare la percentuale di mortalità indotta dal mutageno; confrontando il numero di colonie cresciute su piastre contenenti canavanina con il numero di colonie cresciute su terreno sintetico si può avere una stima della percentuale di mutazioni indotte con la mutagenesi.

## 7. Saggi di attività beta-galattosidasica

Il primo saggio della  $\beta$ -galattosidasi è stato descritto nel 1972 da J. H. Miller (1972). L'enzima  $\beta$ -galattosidasi catalizza l'idrolisi dei  $\beta$ -D-galattosidi; un tipico substrato di questo enzima è il disaccaride lattosio, il quale è scisso nei due monosaccadidi glucosio e galattosio. Nel saggio qui descritto, il substrato orto-nitro-fenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (ONPG) è utilizzato al posto del lattosio. Quando l'enzima  $\beta$ -galattosidasi idrolizza l'ONPG, uno dei prodotti rilasciati è l'orto-nitrofenolo, un composto di colore giallo che assorbe la luce a 420 nm. E' dunque possibile misurare l'attività  $\beta$ -galattosidasica di un estratto cellulare, cui è stato aggiunto l'ONPG, misurando l'intensità del colore giallo della soluzione, ovvero l'aumento dell'assorbanza a 420 nm, nel tempo.

Questo saggio prevede tre fasi: la prima fase consiste nell'incubazione di un determinato volume di una coltura cellulare in fase esponenziale; la seconda consiste nella preparazione dell'estratto cellulare, il quale verrà infine sottoposto al saggio vero e proprio, ultima fase dell'esperimento.

Il giorno prima del saggio, si utilizza una precoltura in fase stazionaria per inoculare 100 ml di YPD. Quando ha raggiunto una  $OD_{600}$  compresa tra 0,6 e 1, la coltura viene incubata nelle condizioni desiderate (ad es. in ipossia, incubando le cellule in una provetta senza lasciare spazio di testa). Al termine dell'incubazione, le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti. Da questo momento in avanti è molto

importante mantenere le cellule in ghiaccio. I *pellets* vengono risospesi in 300  $\mu$ l di *breaking buffer* (BB: Tris-HCl, pH 8, 100 mM; DTT 1 mM; glicerolo 20%) e trasferiti in un tubo da 10 ml, quindi nuovamente centrifugati per 5 minuti a 4000 rpm; una volta eliminato il supernatante acquoso, le cellule vengono risospese in 150  $\mu$ l di BB, cui viene aggiunto un isovolume di sfere di vetro del diametro di 425-600  $\mu$ m. La sospensione viene agitata mediante vortex per sette volte, ognuna della durata di 30 secondi, in modo da ottenere la lisi delle cellule; quindi vengono aggiunti altri 100  $\mu$ l di BB. La sospensione ottenuta viene centrifugata a 4°C per 10 minuti a 4000 rpm; il supernatante, ovvero l'estratto cellulare contenente le proteine, viene infine trasferito in un tubo da 1,5 ml. La concentrazione delle proteine contenute nell'estratto cellulare viene determinata tramite dosaggio di Bradford-Lowry. Una volta nota questa variabile, si può procedere con il saggio. In un tubo da 2 ml si prepara la miscela di reazione costituita da 0,9 ml di *Z-buffer* (per 1 l: 16,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5,5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,75 g KCl; 0,246 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,7 ml  $\beta$ -mercaptoetanol; pH 7) e un volume di estratto cellulare compreso tra 10 e 100  $\mu$ l (a seconda della concentrazione proteica contenuta); la soluzione viene quindi portata al volume di 1 ml con BB. Allo stesso modo si prepara un controllo negativo, costituito solo da *Z-buffer* e BB. Al campione ed al bianco si aggiungono quindi 200  $\mu$ l di ONPG (soluzione 4 mg/ml in *Z-buffer*) e i tubi vengono incubati a 28° C. Quando la soluzione assume un colore giallo paglierino, la reazione viene interrotta mediante l'aggiunta di 500  $\mu$ l di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; il tempo che intercorre tra l'aggiunta dell'ONPG e quella del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  deve essere annotato. Infine, l'assorbanza a 420 nm del campione è misurata mediante spettrofotometro e l'attività  $\beta$ -galattosidasica è determinata con la seguente formula:

$$\text{Attività} = \frac{\text{OD}_{420} * V_r}{V_e * [\text{P}] * t * 0,0045}$$

Dove:

$\text{OD}_{420}$  = assorbanza a 420 nm

$V_r$  = volume totale della reazione, sempre pari a 1,7 ml

$V_e$  = volume in ml di estratto cellulare utilizzato

[P] = concentrazione proteica in mg/ml

t = tempo in minuti primi tra l'aggiunta del reagente ONPG e quella di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

0,0045 = coefficiente di estinzione molare dell'orto-nitrofenolo.

## 8. Separazione degli estratti proteici citoplasmatici e nucleoplasmatici

Il protocollo che segue è stato messo a punto da Schneider nel 1986 e sfrutta l'osmolarità delle soluzioni di lavaggio.

Si inocula 1 litro di terreno con un'aliquota di precoltura in fase tardo-esponenziale. Quando la coltura ha raggiunto una OD<sub>600</sub> pari a 0,6, si centrifuga per 15 minuti a 4000 rpm alla temperatura di 4°C.

Si risospende il pellet in 6 ml di tampone così preparato: 1M sorbitolo, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT 30 mM (da aggiungere subito prima dell'uso).

Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente, le cellule vengono nuovamente centrifugate 15 minuti a 4000 rpm a 4°C.

Si risospende il pellet in 6 ml di tampone contenente 1M sorbitolo, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT 3 mM (da aggiungere subito prima dell'uso) e si aggiungono 10 mg di zimoliasi per lisare la parete cellulare. Le cellule vengono incubate 90 minuti a 37°C.

Le cellule vengono raccolte centrifugando 5 minuti a 4000 rpm a 4°C e risospese in 3 ml di tampone ipotonico: 15 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7,8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 3 mM DTT.

Le cellule vengono passate tre volte in un omogeneizzatore Dounce, quindi centrifugate 30 minuti a 10000 rpm, 4°C. Il supernatante contiene l'estratto proteico citoplasmatico.

Si risospende poi il *pellet* in 0,5 ml del tampone ipotonico e si aggiunge NaCl in modo da portarne la concentrazione a 0,7 mM. Le sospensioni vengono centrifugate per 1 ora a 40000 rpm a 4°C. Il supernatante contiene la frazione proteica nucleare, mentre nel *pellet* residuo sono presenti complessi proteici precipitati, organelli cellulari, membrane nucleari e proteine associate a tali componenti insolubili. Il *pellet* viene trattato con NaOH 0,2 N al fine di solubilizzare le proteine rimaste legate alle componenti insolubili; in



seguito a centrifugazione di 15 minuti a 12000 rpm, il supernatante viene prelevato e conservato ed il *pellet* viene risospeso il tampone di Laemmli e congelato.

## 9. Western Blot

Il western blot è un tipo di analisi che permette il riconoscimento di una specifica proteina all'interno di una miscela di proteine separate elettroforeticamente, mediante il riconoscimento con specifici anticorpi. Le proteine precedentemente denaturate vengono caricate su un gel di poliacrilammide e separate grazie all'applicazione di un campo elettrico. L'elettroforesi discontinua su gel di poliacrilammide in presenza di SDS è tra le tecniche più comunemente utilizzate in biochimica perché permette con buona accuratezza di stimare la purezza e il peso molecolare della proteina che si sta analizzando. La tecnica si basa sulla differenza dei tamponi di corsa utilizzati: Tris-HCl pH 6,8 e Tris-HCl pH 8,8.

Il gel è bidimensionale e nella prima parte, *stacking*, le proteine formano delle bande impilate le une sulle altre, che possono quindi entrare nel gel di separazione, *resolving*, dove il tampone a pH 8,8 le separa in base alla carica e il reticolo di poliacrilammide in base alla dimensione.

I campioni sono stati preparati per l'elettroforesi aggiungendo un isovolume di tampone di Laemmli (0,35 M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 30% glicerolo; 0,1 M DTT; 0,25% Blu di Bromofenolo), incubando a 95°C per 5 minuti, raffreddando in ghiaccio per 3 minuti e lasciando raffreddare a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo una centrifugazione di 2 minuti a temperatura ambiente, effettuata per eliminare eventuali detriti cellulari e SDS in eccesso, è stata condotta la separazione elettroforetica secondo il sistema discontinuo di Laemmli (Laemmli, 1970) in due gel caricati con gli stessi campioni, in parallelo. La concentrazione di acrilammide utilizzata è stata del 10% e la durata delle corse elettroforetiche di 60 minuti.

Al termine della corsa, condotta a temperatura ambiente con una differenza di potenziale di 200 V, uno dei due gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue R-250

(0,1% in etanolo 50%, acido acetico 10%) e successivamente decolorati con una soluzione di acido acetico al 10% ed isopropanolo 12,5%.

L'analisi degli estratti proteici per l'identificazione delle proteine è stata effettuata mediante elettrotrasferimento ed ibridazioni Western su filtro di PVDF (polivinilidene-fluoruro) (Amersham,  $\varnothing$  0,45  $\mu$ m),.

Prima del trasferimento, la membrana in PVDF è stata attivata tramite lavaggio, prima in etanolo assoluto per 15 secondi, quindi in acqua deionizzata per 2 minuti, e infine equilibrata in tampone di trasferimento contenente etanolo (Tris 25 mM; glicina 50 mM; etanolo 10% V/V; pH 8,3)

I campioni proteici separati mediante SDS-PAGE sono stati elettrotrasferiti su membrana di PVDF all'amperaggio costante di 300 mA per 1 ora e 15 minuti a 4°C. Al termine del trasferimento, la membrana è stata incubata in una soluzione al 2% di sieroalbumina bovina (BSA) in TBS-T (Tris 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05% V/V; pH 8,0) *overnight* a 4°C. Dopo 2 lavaggi di 3 minuti ciascuno in TBS-T, la membrana è stata incubata per 1 ora in una soluzione di TBS-T contenente latte allo 0,5% e un anticorpo monoclonale murino diretto contro il *tag* della proteina da analizzare, diluito secondo le specifiche della casa produttrice, quindi sottoposta a 3 lavaggi della durata di 2 minuti ciascuno in TBS-T e infine incubata per 1 ora in una soluzione dello stesso tampone, contenente latte 0,5% e l'anticorpo secondario diretto specificamente contro gli anticorpi murini e coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Dopo 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno in TBS-T, è stato effettuato il rilevamento incubando il filtro con una soluzione contenente il substrato della HRP (Amersham) che, una volta attivato, emette luminescenza ed è in grado di impressionare una lastra fotografica

## 10. Estrazione e retrotrascrizione di RNA

Il protocollo utilizzato per l'estrazione di RNA totale da lievito è quello del "fenolo caldo" elaborato da Köhrer *et al.* nel 1991.

Il giorno prima del saggio, si utilizza una precoltura in fase stazionaria per inoculare 10 ml di YPD. Quando ha raggiunto una OD<sub>600</sub> pari a 1, la coltura viene centrifugata per 5' a 5000 rpm e il *pellet* viene risospeso in 1 ml di AE *buffer* (50 mM Na-Acetato pH 5.3, 10 mM EDTA). Dopo una centrifugazione per 5' a 5000 rpm, il *pellet* viene risospeso in 400 µl di AE *buffer* in un tubo da 1,5 ml; a questo si aggiungono 40 µl di SDS 10% e 500 µl di PCIA (Fenolo-Cloroformio-Alcool Isoamilico 124:25:1, pH 4,7). Dopo aver agitato mediante vortex, la sospensione è incubata prima per 5' a 65° C e subito dopo in un contenitore colmo di etanolo a -70° C per altri 15'. Dopo essere stata centrifugata per 5' a 12000 rpm, la fase acquosa della sospensione è trasferita in un nuovo tubo da 1,5 ml, cui viene aggiunto un volume di PCIA (Fenolo-Cloroformio-Alcool Isoamilico 24:25:1; pH 5,2). Dopo essere stata vorticata, la sospensione è centrifugata per 5' a 12000 rpm e la fase acquosa è trasferita in un nuovo tubo da 1,5 ml, cui vengono aggiunti 3 volumi di etanolo 96% e 0,1 volume di Na-Acetato 3M pH 5,2. La soluzione viene incubata per un'ora a -20° C e dunque centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti; eliminato il supernatante, al tubo da 1,5 ml vengono aggiunti 0,5 ml di etanolo 70% avendo cura di non risospesare il pellet. Dopo essere stato centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti, il campione viene lasciato per circa 20 minuti a temperatura ambiente per far evaporare completamente l'etanolo; il pellet risultante viene infine risospeso in un volume adeguato di H<sub>2</sub>O sterile. La concentrazione dell'RNA estratto può essere infine valutata mediante uno spettrofotometro, misurando l'assorbimento del campione alla lunghezza d'onda di 260 nm e considerando che ad una OD<sub>260</sub> pari ad 1 corrisponde una concentrazione di acido ribonucleico di 20 µg/µl.

Per eliminare eventuali tracce di DNA presenti, i campioni di RNA sono stati trattati con DNaseI RNase-free (Ambion). Un volume di campione tale da avere una quantità di RNA pari a 2 µg è stato posto in un tubo da 1,5 ml, cui è stato aggiunto 1 µl del suddetto enzima, 2 µl del suo *buffer* di reazione (10X) ed una quantità di H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> necessaria per portare il volume di reazione a 20 µl. Dopo un'incubazione di 30' a 37° C, alla miscela di reazione sono stati aggiunti 5 µl di una resina necessaria per inattivare l'enzima; dopo una ulteriore incubazione di 2' a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati per 10' a 10000 rpm, ed infine il supernatante è stato trasferito in un nuovo tubo da 1,5 ml.

L'RNA così purificato è stato utilizzato per la successiva reazione di retrotrascrizione; al templato sono stati inizialmente aggiunti gli esanucleotidi *random* (100 pmol) e la sospensione è stata incubata per 5' a 70° C per avere la denaturazione dell'acido

ribonucleico. Dopo questa incubazione i campioni sono stati trasferiti in ghiaccio e alla miscela di reazione sono stati aggiunti i dNTP (0,7 mM), la trascrittasi inversa (New England Biolabs), il suo *buffer* di reazione (10X) ed una quantità di H<sub>2</sub>O bidistillata necessaria a portare il volume di reazione a 45 µl. La soluzione è stata quindi incubata per 60' a 37° C ed infine, per disattivare l'enzima, per 2' a 94° C.

## 11. Real-Time PCR

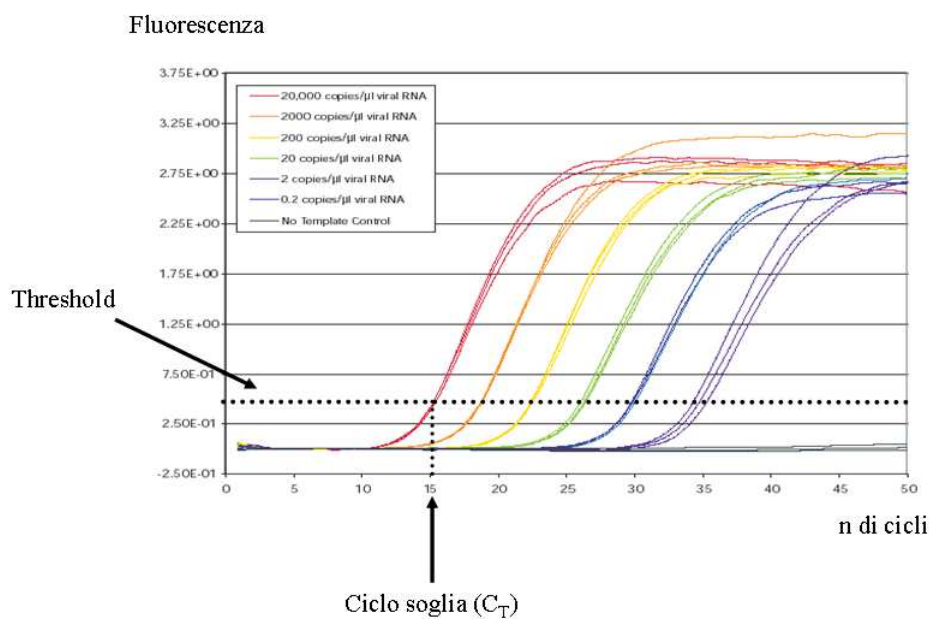
La real time-PCR (PCR in tempo reale) è una tecnica che consente di determinare il livello di espressione di geni poco espressi all'interno della cellula, come ad esempio quelli codificanti per fattori di regolazione, a partire dal cDNA ottenuto per retrotrascrizione del *pool* di RNA estratto dalla cellula.

Le miscele di reazione (25 µl ciascuna) sono state preparate aggiungendo a 12,5 µl di SYBR green mix (Aurogene), contenente il fluoroforo, il *buffer* e la Taq polimerasi, 0,5 µl di ciascun *primer* (10 µM), 1 µl di cDNA e 10,5 µl di H<sub>2</sub>O bidistillata. La reazione di amplificazione è stata condotta nel seguente modo: la Taq polimerasi è stata attivata per 3' a 95° C; sono seguiti 35 cicli di amplificazione, ciascuno composto di una fase di denaturazione a 95° C per 30", una fase di appaiamento a 58° C per 30" ed una fase di allungamento a 72° C per 20".

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando l'apparecchiatura iCycler (Bio-Rad) e i dati sono stati registrati ed elaborati utilizzando il software iCycler iQ (Bio-Rad).

La quantificazione mediante real time-PCR è resa possibile dalla presenza, nella miscela di reazione, di un particolare fluoroforo in grado di emettere un segnale la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di trascritto. Nel nostro caso, il fluoroforo utilizzato è il SYBR green, una molecola organica che emette fluorescenza solo quando è intercalata al DNA a doppio filamento; l'intensità della fluorescenza emessa aumenta quindi ad ogni ciclo di amplificazione, seguendo la stessa cinetica della reazione di PCR.

La figura 20 rappresenta un tipico esempio di grafico risultante da una reazione di real time-PCR in cui l'intensità della fluorescenza è riportata in funzione del numero dei cicli di amplificazione. La *threshold* (soglia) è una linea scelta dall'operatore o da un *software* in modo da intersecare tutte le curve di amplificazione nella loro fase esponenziale; dall'intersezione della threshold con la curva si può ricavare il ciclo soglia ( $C_T$ ).



**Figura M-5.** Esempio di grafico ottenuto alla fine di una reazione di real time-PCR.

I trascritti di nostro interesse sono stati sottoposti a quantificazione relativa, impiegando come gene di riferimento l'actina e come campione di riferimento l'estratto cellulare di un ceppo selvatico coltivato in condizioni normossiche. Il punto di partenza è il calcolo dei  $\Delta C_T$ , dove:

$$\Delta C_T = C_T (\text{gene di interesse}) - C_T (\text{gene di riferimento})$$

Una volta ottenuti i  $\Delta C_T$ , si calcolano i  $\Delta\Delta C_T$ :

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{campione}) - \Delta C_T (\text{campione di riferimento})$$

Infine viene utilizzata l'equazione

$$y = 2^{(-\Delta\Delta C_T)} \cdot 100$$

per determinare, in percentuale, il tasso di espressione (y) dei geni di interesse nei diversi ceppi e nelle diverse condizioni di crescita; si assume come 100% il livello di espressione di ciascun gene nel ceppo selvatico coltivato in condizioni normossiche.

## 12. Northern Blot

L' RNA è stato separato tramite elettroforesi su gel denaturante di agarosio e formaldeide e poi trasferito su una membrana di nitrocellulosa. L'RNA di interesse viene poi individuato con l'ibridazione con DNA o RNA marcato radioattivamente e poi sottoposto ad autoradiografia. Il trasferimento dell'RNA denaturato sulla nitrocellulosa è irreversibile.

Come prima cosa si prepara il gel di agarosio all' 1-1,2%, MOPS1x (20 mM Acido morfolinpropansolfonico, 5mM Na acetato pH 7.0, 1 mM EDTA) e 6.3% di formaldeide. I campioni da caricare si preparano nel seguente modo: 1 volume di RNA, 1 volume di formaldeide, 3 volumi di loading buffer e 1/10 di volume di Bromuro di Etidio.

L'RNA deve essere denaturato per 2 minuti a 65°C, raffreddato in ghiaccio e caricato sul gel. La corsa elettroforetica deve avvenire a 4°C utilizzando come tampone il MOPS 1X a 80V (7 mA) per 4-5 ore. Alla fine della corsa, si sottopone il gel si equilibra per 30' con SSC 20X (3M NaCl, 0.3 M Na citrato pH 8,1±0.6).

Il trasferimento degli RNA su nitrocellulosa è verticale: innanzitutto si dispongono due fogli di carta Whatman 3MM su un supporto immerso nel tampone SSC 20X in modo tale che le estremità dei fogli siano immerse nel liquido, poi si dispone il gel, su di esso la membrana di nitrocellulosa (Nytran N, Schleicher & Schuell) e altri tre fogli di carta 3MM. Al di sopra si dispone una pila di fogli di carta assorbente e un peso che faciliti il trasferimento. Il tampone trasferisce gli RNA dal gel al filtro per capillarità. Il trasferimento degli RNA su nitrocellulosa richiede circa 14 ore, successivamente si asciuga il filtro a temperatura ambiente per un'ora o a 80°C per 10' ed infine si fissano gli RNA sul filtro tramite esposizione a raggi ultravioletti per tre minuti .

A questo punto dell'analisi si può procedere con la preibridazione: preparare la soluzione di preibridazione (50% formammide, 5X SSC, 5X soluzione Denhart, 0.5% SDS e 20 mg/ml di DNA eterologo (salmon sperm). Il filtro si preibrida per un'ora a 42°C nella soluzione sopracitata, nel frattempo si denatura la sonda radioattiva per 10' a 95°C.

Si ibrida per 14-16 ore a 42°C nella soluzione di preibridazione contenente la sonda e successivamente si lava il filtro con soluzioni stringenti per eliminare la sonda fredda:

- due lavaggi di 10' a temperatura ambiente in una soluzione 2x SSC e 0.1% SDS.
- due lavaggi di 15' a 42°C in una soluzione 1xSSC e 0.1% SDS.
- un lavaggio di 10' a 42°C in 0.1x SSC e 0.1% SDS.

Si asciuga il filtro a temperatura ambiente ed si espone su lastra Kodak a -70°C. La durata dell'esposizione dipende dal livello di radioattività del filtro stabilito grazie all'uso di un contatore geiger manuale.

La marcatura della sonda è effettuata utilizzando il Random Primed DNA Labeling Kit (Roche). Con questo Kit l'elica complementare viene sintetizzata dalla subunità Klenow della DNA polimerasi I batterica a partire dall'estremità 3'-OH di un esanucleotide casuale ibridato. Il DNA da marcare (40 ng) è stato denaturato per 5 minuti a 95° C ed immediatamente raffreddato in ghiaccio. Ad esso sono stati aggiunti 2 µl di una miscela di dGTP, dCTP, dTTP 2 µl della miscela di reazione contenente gli esanucleotidi in un tampone di reazione 10x, 2,5 µl pari a 2,5 µCi di α-32P dATP e 1 µl dell'enzima Klenow (2 unità / µl in glicerolo 50%). Il volume finale è stato quindi portato a 20 µl con acqua bidistillata ed infine incubato per 30 minuti a 37° C. Al termine la reazione, la sonda è stata purificata utilizzando un metodo cromatografico consistente di una colonnina di Sephadex G50, capace di trattenere idesossiribonucleotidi non incorporati, usando STE (0,1 M NaCl, 10 mM TrisHcl pH

7.4, 1 mM EDTA) per eluire la sonda. Il frammento marcato recuperato è subito utilizzato nell'analisi Northern o conservato a -20° C.



### 13. DNA - *affinity capture*

La tecnica della “DNA-*affinity capture*” consiste in una cromatografia per affinità al DNA immobilizzato su sfere di streptavidina, condotta *in batch*; si basa sulla capacità di una data proteina di legare il DNA *in vitro*. Il protocollo utilizzato è una versione modificata di quello utilizzato da Gabrielsen (1989). Per ciascun *batch*, 1,5 mg di sfere di streptavidina (Promega) sono state sottoposte a 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con TE (pH 8,0). Alle sfere è stata aggiunta una sonda di DNA, ottenuta amplificando la sequenza d’interesse con due oligonucleotidi, uno dei quali biotinilato. Nel nostro caso, sono state utilizzate tre diverse sonde, denominate rispettivamente D, P ed U (D, porzione distale del promotore di *PDC1*, dal nucleotide -1200 al -1800; P, porzione prossimale del promotore di *PDC1*, dal nucleotide -800 al -400; U, porzione di 400 nucleotidi del promotore del gene *URA3* di *S. cerevisiae*, utilizzato come controllo per il legame aspecifico); un quarto esperimento è stato condotto utilizzando sfere non legate a sonde di DNA, come controllo per il legame aspecifico tra le proteine e la streptavidina. I *batch* sono stati incubati a 28°C in lieve agitazione per 2 minuti, per permettere al DNA biotinilato di legare la streptavidina. Ai *batch* è stato poi applicato un campo magnetico, in modo da far aderire le sfere di streptavidina alla parete della provetta. Ad intervalli regolari di 2 minuti è stato prelevato 1 µl della miscela. I campioni sono stati poi analizzati su gel di agarosio per verificare la progressiva scomparsa della sonda dalla miscela, dovuta alla migrazione del complesso sonda biotinilata-streptavidina verso la parete della provetta.

L’estratto proteico cellulare è stato ottenuto come segue: le cellule provenienti da 100 ml di coltura in fase tardo-esponenziale sono state raccolte per centrifugazione e risospese in 10 ml di tampone A1 (50 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% Nonidet-P40, Inibitori delle Proteasi) e sottoposte a lisi meccanica con sfere di vetro. Al termine della lisi è stato aggiunto un isovolume di tampone A1 contenente glicerolo 15%; la miscela è stata centrifugata per 10 minuti a 12000 rpm, 4°C; al termine della centrifugazione le proteine estratte, contenute nel supernatante, sono state prelevate e quantificate attraverso il dosaggio di Bradford-Lowry.

A 2 mg di estratto proteico sono stati aggiunti, come competitori aspecifici della sonda, 6 µg di *salmon sperm* DNA e 100 µg di poli (dI-dC). la miscela, in volume finale di 1 ml, è stata incubata in lieve agitazione per 1 ora a 30°C. Al termine dell'incubazione, la miscela è stata aggiunta alle sferette di strptavidina e incubata per 1 ora a 30°C; le sferette sono state fatte aderire alla parete della provetta tramite applicazione del campo magnetico, ed il supernatante è stato prelevato e conservato per le successive analisi. Le sferette sono state quindi lavate prima con 1 ml di tampone AW1 (75 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% Nonidet-P40, Inibitori Proteasi, 15% glicerolo, BSA 0,5 mg/ml), quindi con 0,5 ml di tampone AW2 (150 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% Nonidet-P40, Inibitori Proteasi, 15% glicerolo, BSA 0,5 mg/ml) ed infine con 0,5 ml di tampone AW3 (200 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% Nonidet-P40, Inibitori Proteasi, 15% glicerolo, BSA 0,5 mg/ml). Al termine dei lavaggi sono state effettuate tre eluizioni separate, ciascuna con 50 µl di tampone A/E1 (1M KCl, 20 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% Nonidet-P40, Inibitori Proteasi, 15% glicerolo). Al termine dell'esperimento, è stato condotto un SDS-PAGE (e successivo Western Blot) sui seguenti campioni: estratto proteico totale incubato con DNA aspecifico; tampone contenente le proteine non legate alla sonda dopo l'applicazione del campo magnetico; ciascuno dei tra lavaggi; ciascuna delle tre eluizioni.

## 14. Programmi utilizzati

La stima dell'intensità delle bande visibili per autoradiografia è stata effettuata mediante il programma "Phoretix Software Analysis 1D". Per l'analisi densitometrica è stata tracciata un'area rettangolare definita "regione d'interesse" (ROI), di dimensioni standard per ogni singolo esperimento, sufficiente ad includere l'area di ciascuna banda visibile. E' stata pertanto assegnata una ROI a ciascuna banda. Il programma esegue automaticamente i calcoli relativi all'intensità del segnale, espressa come somma dei valori di pixel, a cui è sottratto automaticamente il valore di pixel relativo allo sfondo.

Per l'analisi e l'elaborazione delle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche è stato utilizzato il programma DNAMAN, mentre per gli allineamenti delle sequenze sono stati utilizzati i programmi, accessibili dalla rete, CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Per l'analisi predittiva della struttura delle proteine sono stati utilizzati i programmi SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e Scansite (<http://scansite.mit.edu/>).

La banca dati di riferimento per il genoma di *K. lactis* è Génolevures (<http://www.genolevures.org>), mentre i dati relativi al genome di *S. cerevisiae* sono stati raccolti nella banca dati SGD (<http://www.yeastgenome.org>).

# **BIBLIOGRAFIA**

- Agron P. G., Monson E. K., Ditta G. S., Helinski D. R.** (1994). Oxygen regulation of expression of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. *Res Microbiol* 145 (5-6): 454-459.
- Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M.** (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
- Auld K. L., Brown C. R., Casolari J. M., Komili S., Silver P. A.** (2006). Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates. *Mol Cell* 21 (6): 861-871.
- Bailey-Serres J., Chang R.** (2005). Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Annals of Botany* 96: 507-518
- Baruffini E., Goffrini P., Donnini C., Lodi T.** (2006). Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res* 6: 1235-1242.
- Becerra M., Lombardia-Ferreira L. J., Hauser N. C., Hoheisel J. D., Tizon B. e Cerdan M. E.** (2002). The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. *Mol Microbiol* 43: 545-555.
- Bertolucci C., Ming L. J., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A.** (1996). Assignment of the hyperfine-shifted <sup>1</sup>H-NMR signals of the heme in the oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*. *Chem Biol* 3 (7): 561-566.
- Betina s., Goffrini P., Ferrero I. e Wésolowski-Louvel M.** (2001). *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 158: 541-548.
- Bianchi M. M.** (1992). Site-specific recombination of the circular 2µm-like plasmid pKD1 requires integrity of therecombinase A and of the partitioning genes B and C. *J Bacteriol* 174: 6703-6706.
- Bianchi M. M., Santarelli R. e Frontali L.** (1991). Plasmid functions involved in stable propagation of pKD1 circular plasmid in *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* 19: 155-161.
- Bianchi M. M., Tizzani L., Destruelle M., Frontali L. e Wésolowski.Louvel M.** (1996). The “petite-negative” yeast *Kluyveromyces lacti* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Mol Microbiol* 19(1): 27-36.
- Billard P., Menart S., Blaisonneau J., Bolotin-Fukuhara M., Fukuhara H. e Wésolowski-Louvel M.** (1996). Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J Bacteriol* 178: 5860-5866.
- Bolotin-Fukuhara M., Casaregola S., Aigle M.** (2006). Genome evolution: lessons from

Genolevures. Topics Curr Genet 15: 165-196.

**Bonekamp K. D. e Oosterom J.** (1994). On the safety of *Kluyveromyces lactis*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 41: 1-3.

**Bourgarel D., Nguyen C. C., Bolotin-Fukuhara M.** (1999). *HAP4*, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. Mol Microbiol 31: 1205-1215.

**Brahimi-Horn M. C. e Pouysségur J.** (2007). Oxygen, a source of life and stress. FEBS Letters 581: 3582-3591.

**Brahimi-Horn M. C., Chiche J., Pouysségur J.** (2007) Hypoxia and cancer. J Mol Med 85 (12): 1301-1307.

**Breunig K. D., Bolotin-Fukuhara M., Bianchi M. M., Bourgarel D., Falcone C., Ferrero I., Frontali L., Goffrini P., Krijger J. J., Mazzoni C., Milkowski C., Steensma H. Y., Wésolowski-Louvel M., Zeeman A. M.** (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. Enzyme Microb Technol 26: 771-780.

**Bui D. M., Kunze I., Horstmann C., Schmidt T., Breunig K. D. and Kunze G.** (1997). Expression of the *Arxula adenivoras* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. Appl Microbiol Biotechnol 45: 102-106.

**Bunn H. F. e Poyton R. O.** (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev 76: 839-885.

**Cadenas E.** (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. Ann Rev Biochem 58: 79-110.

**Camattari A., Bianchi M. M., Branduardi P., Porro D. e Brambilla L.** (2007). Induction by hypoxia of heterologous protein production with the *KIPDC1* promoter in yeasts. Appl Environ Microbiol 73: 922-929.

**Cardinali G., Vollenbroich V., Jeons M. S., de Graaf A. A., Hollenberg C. P.** (1997). Constitutive expression in *gal7* mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an internal inducer of the Gal/Lac regulon. Mol Cell Biol 17: 1722-1730.

**Cash T. P., Pan Y., Simon M. C.** (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. Free Radic Biol Med 43: 1219- 1225.

**Chang, Y.D., Dickson, R.C.** (1988). Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. J Biol Chem 263: 16696-16703.

**Chellappa R., Kandasamy P., Oh C. S., Jiang Y., Vemula M. e Martin C. E.** (2001). The membrane proteins, Spt23p and Mga2p, play distinct roles in the activation of

*Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene expression. J. Biol Chem 276 (47): 43548-43556.

**Chen X. J e Clark-Walker G. D.** (1995). Specific mutations in  $\alpha$ - and  $\gamma$ - subunits of F<sub>1</sub>-ATPase affect mitochondrial genome integrity in the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. EMBO J 14 (13), 3277-3286.

**Chen X. J., Wésolowski-Louvel M. e Fukuhara H.** (1992). Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. Mol Gen Genet 233: 97-105.

**Chen XJ, Bianchi MM, Suda K e Fukuhara H.** (1989). The host range of the pKD1-derived plasmids in yeast. Curr Genet 16(2):95-98.

**Crack J. C., Jervis A. J., Gaskell A. A., White G. F., Green J., Thomson A. J., Le Brun N.E.** (2008). Signal perception by FNR: the role of the iron-sulfur cluster. Biochem Soc Trans 36(6): 1144-1148.

**Czyz M., Nagiec M. M., Dickson R. C.** (1993). Autoregulation of *GAL4* transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose. Nucleic Acids Res 21: 4378-4382.

**Deckert J., Rodriguez Torres A. M., Simon J. T., Zitomer R. S.** (1995). Mutational analysis of Rox1, a DNA-Bending Repressor of Hypoxic Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 15: 6109-6117.

**Destruelle M., Menghini R., Frontali L. e Bianchi, M. M.,** (1999). Regulation of the expression of the *Kluyveromyces lactis* PDC1 gene: carbon source-responsive elements and autoregulation. Yeast 15: 361-370.

**Dickson R. C. e Barr K.** (1983). Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. J Bacteriol 154: 1245-1251.

**Dietrich FS, Voegeli S., Brachat S., et al.** (2004). The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. Science 304: 304-307.

**Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., de Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J. M., Beyne E., Bleykasten C., Boisramé A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., de Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur, I., Ma L., Muller H., Nicaud J. M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz S., Potier, S., Richard G. F., Straub, M. L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P. e Souciet J. L.,** (2004).

Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44.

**Estrada E., Agostinis P., Vandenhede J. R., Goris J., Merlevede W., Francois J., Goffeau A., Ghislain M.** (1996). Phosphorylation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by casein kinase I. *J Biol Chem* 271: 32064-32071.

**Falcone C, Saliola M, Chen XJ, Frontali L, Fukuhara H.** (1986). Analysis of a 1.6-micron circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilae*: structure and molecular dimorphism. *Plasmid* 15(3):248-52.

**Fang ZA, Wang GH, Chen AL, Li YF, Liu JP, Li YY, Bolotin-Fukuhara M, Bao WG** (2009). Gene responses to oxygen availability in *Kluyveromyces lactis*: an insight on the evolution of the oxygen-responding system in yeast. *PLoS One* 4(10):e7561

**Ferrara N. e Kerbel R. S.** (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-974.

**Fleer R., Xin J. C., Amellal N., Yeh P., Fournier A., Guinet F., Gault N., Faucher D., Folliard F., Fukuhara H. e Mayaux J. F.** (1991a). High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 $\beta$  in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 107: 285-295

**Fleer R., Yeh P., Amellal N., Maury I., Fournier A., Bacchetta F., Baduel P., Jung G., L'Hôte H., Becquart J., Fukuhara H. and Mayaux J. F.,** (1991b). Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeast. *Biotechnology* 9: 968-974.

**Forsburg S. L. e Guarente L.** (1988). Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3-responsive site. *Mol Cell Biol* 8: 647-654.

**Freire-Picos M. A., Hollenberg C. P., Breunig K. D., Cerdà M. E.** (1995). Regulation of cytochrome c expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett* 360: 39-42.

**Gabrielsen O. S., Hornes E., Korsnes L., Ruet A., Oyen T. B.** (1989). Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor tau--a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Res.* 17 (15): 6253-67.

**Gancedo C. e Serrano S.** (1989). Energy-yielding metabolism. In: Rose A.H., Harris J.S. (eds) *The yeast III*. Academic Press, New York, pp.205-259.

**Goffrini P., Algeri A., Donnini C., Wésolowski-Louvel M. e Ferrero I.** (1989). *RAG1* and *RAG2*: nuclear genes involved in the dependence/independence on mitochondrial respiratory function for growth on sugars. *Yeast* 5: 99-106.

**Goffrini P., Wésolowski-Louvel M. and Ferrero I.** (1991). Phosphoglucose isomerase



gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Mol. Gen. Genet. 228: 401-409.

**Goffrini P., Wésolowski-Louvel M., Ferrero I. e Fukuhara, H.** (1990). *RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter. Nucl. Acids Res. 18: 5294.

**González-Siso M. I., Freire Picos M. A., Cerdán M. E.** (1996). Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose By *Kluyveromyces lactis* *rag2* mutants. FEBS Letters 387: 7-10.

**González-Siso M. I., Freire-Picos M. A., Ramil E., González-Dominiguez M., Rodriguez Torres A. e Cerdán M. E.** (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and prospectives. Enzyme Microb. Technol. 26: 699-705.

**González-Siso M. I., Ramil E., Cerdán M. E. e Freire-Picos M. A.** (1996). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: ethanol production and the Crabtree effect. Enzyme Microb. Technol. 18: 585-591.

**González-Dominguez M., freire-Picos M. A., Ramil E., Cerdán M. E.** (2000). Hama-mediated transcriptional control in *Kluyveromyces lactis*. Curr Genet 38: 171-177.

**Guldener U., Hegemann J. H.** (1998). A second generation of GFP vectors for subcellular localization studies in budding yeast.

**Gunge N, Tamaru A., Ozawa F. e Sakaguki K.** (1981). Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. J. Bacteriol. 145: 382-390.

**Hach A., Hon T., Zhang L.** (1999). A new class of repression Modules is critical for heme regulation of the yeast transcriptional activator Hap1. Mol Cell Biol 19: 4324-4333.

**Herman A.I. e Halvorson H.O.** (1963). Genetic control of  $\beta$ -glucosidase in *Saccharomyces lactis*. J. Bacteriol. 85: 901-910.

**Hickman M. J. e Winston F.** (2007). Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. Mol Cell Biol 27(21): 7141-7424.

**Hitchcock A. L., Krebber H., Fritze S., Lin A., Latterich M., Silver P. A.** (2001). The conserved Npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. Mol Biol Cell 12: 3226-3241.

**Hnatova M., Wésolowski-Louvel M., Dieppois G., Deffaud J., Lemaire M.** (2008). Characterization of *KIGRR1* and *SMS1* genes, two new elements of the glucose signaling pathway of *Kluyveromyces lactis*. Eukaryotic Cell 7 (8): 1299-1308.

**Hochachka P. W.** (1998). Mechanisms and evolution of hypoxia tolerance in humans. J Exptl Biol 201: 1243-1254.

**Hochachka P. W., Buck L. T., Doll C., Land S. C.** (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci Usa* 93: 9493-9498.

**Hohmann S.** (1991). Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173: 7963-7969.

**Hohmann S.** (1993). Characterisation of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 241: 657-666.

**Hohmann S. e Cederberg H.** (1990). Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes *PDC1* and *PDC5*. *Eur J Biochem* 188(3): 615-621.

**Hohmann S. E Meacock P. A.** (1998). Thiamin metabolism and thiamindiphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Bioch Biophys Acta* 1385 (2): 201-219.

**Holland M. J., Yokoi T., Holland J. P., Myambo K., e Innis M. A.** (1987). The *GCR1* gene encodes a positive transcriptional regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987 February; 7(2): 813-820.

**Hon T, Dodd A, Dirmeier R, Gorman N, Sinclair PR, Zhang L, Poyton RO.** (2003) A mechanism of oxygen sensing in yeast. Multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. *J Biol Chem.* 278(50): 50771-50780.

**Hon T., Lee H. C., Hu Z., Iyer V. R. e Zhang L.** (2005). The heme activator protein Hap1 represses transcription by a heme-independent mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 169: 1343-1352.

**Hongay C., Jia N., Bard M., Winston F.** (2002). Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *S. cerevisiae*. *EMBO J* 21: 4114-4124.

**Hoppe T., Matuschewski K., Rape M., Schlenker S., Ulrich H. D., Jentsch S.** (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102 (5): 577-586.

**Huh W. K., Falvo J. V., Gerke L. C., Carroll A. S., Howson R. W., Weissman J. S., O'Shea E. K.** (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425 (6959): 686-691.

**Irani K., Xia Y., Zweir J. L., Solott S. J., Der C. J., Fearon E. R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P. J.** (1997). Mitogenic signalling mediated by

oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science* 275: 1649-1652.

**Iuchi S., Lin E. C.** (1992). Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174 (17): 5617-23.

**Jacoby J., Hollenberg C. P. e Heinisch J. J.** (1993). Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose pathway. *Mol Microbiol* 10: 867-876.

**Jiang Y., Vasconcelles M. J., Wretzel S., Light A., Martin C. E., Goldberg M. A.** (2001). MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21(18): 6161- 6169.

**Kato M., Mizuno T., Shimizu T., Hakoshima T.** (1997). Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell* 88 (5): 717-723.

**Kelley R., Ideker T.** (2009). Genome-wide fitness and expression profiling implicate Mga2 in adaptation to hydrogen peroxide. *PLoS Genet.* 5(5):e1000488.

**Kellis M., Patterson N., Endrizzi M., Birren B e Landers E. S.** (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423: 241-254.

**Kiers J., Zeeman A. M., Luttk M., Thiele C., Castrillo J. I., Steensma H. Y., van Dijken J. P. E Pronk J. T.** (1998). Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* 14: 459-469.

**Klinkenberg L. G., Mennella T. A., Luetkenhaus K., Zitomer R. S.** (2005). Combinatorial Repression of the hypoxic genes of *Saccharomyces cerevisiae* by DNA binding proteins Rox1 e Mot3. *Eukar Cell* 4: 649-660.

**Köhler K. e Domdey H.,** (1991). Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.* 194: 398–405.

**Kutter S., Wille G., Relle S., Weiss M. S., Hubner G e König S.** (2006). The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*. Implications for the substrate activation mechanism of this enzyme. *FEBS Journal* 273: 4199-4209.

**Kwast K. E., Burke P. V., Poyton R. O.** (1998). Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exptl Biol* 201: 1177-1195.

**Kwast K. E., Lai L. C., da N., James D. T., Aref S. e Burke P. V.** (2002). Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J Bacteriol* 184: 250-265.

**Labbe-Bois R. e Labbe P.** (1990). Tetrapyrrole and heme biosynthesis in the yeast

*Saccharomyces cerevisiae*. In: Dailey H. A. (Ed.), Biosynthesis of heme and chlorophylls. McGraw-Hill, New Yprk, NY, pp. 235-285.

**Lacy L. R. e Dickson R. C.** (1981). Transcriptional regulation of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase gene. *Mol Cell Biol* 1: 629-634.

**Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 e segg.

**Lamas-Maceiras M., Nunez L., Rodriguez-Belmonte E., Gonzalez-Siso M. I., Cerdan M. E.** (2007). Functional characterization of Hap1: a model to foresee different mechanisms of transcriptional regulation by Hap1p in yeasts. *Gene* 405: 96-107.

**Larson G. P., Castanotto D., Rossi J. J. e Malafa M. P.** (1994). Isolation and functional analysis of a *Kluyveromyces lactis* *RAP1* homologue. *Gene* 150: 35-41.

**Lemaire M. e Wésolowski-Louvel M.** (2004). Enolase and glycolytic flux play a role in the regulation of glucose permease gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 168: 723-731.

**Lemaire M., Guyon A., Betina S e Wésolowski-Louvel M** (2002). Regulation of glycolysis by casein kinase I (Rag8p) in *Kluyveromyces lactis* involves a DNA-binding protein, Sck1p, a homologue of Sgc1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 40: 355-364.

**Lemaire M., Guyon A., Betina S., Wésolowski-Louvel M.** (2002). Regulation of glycolysis by casein kinase I (Rag8p) in *Kluyveromyces lactis* involves a DNA-binding protein, Sck1p, a homologue os Sgc1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 40: 355-364.

**Lin E. C. C., Iuchi S.** (1991). Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related organisms. *Annu Rev Genet* 25:361-387.

**Lowry C. V., Lieber R. H.** (1986). Negative regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ANB1* gene by heme, as mediated by the *ROX1* gene product. *Mol Cel Biol* 6: 4145-4148.

**Marchal C., Haguenaer-Tsapis R., Urban-grimal D** (2000). Caseine kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J Biol Chem* 275: 23608-23614.

**Marziali G., Perrotti E., Ilari R., Testa U., Coccia E. M. e Battistini A.** (1997) Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol Cell Biol* 17: 1387–1395.

**McNabb D. S., Xing Y. e Guarente L.** (1995). Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of

a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* 9, 47–58.

**McNabb D., Pinto I.** (2005). Assembly of the Hap2/3/4/5 DNA Complex in *S. cerevisiae*. *Eukar Cell.* 4: 1829-1839.

**Mense S. e Zhang L.** (2006). Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res* 16: 681-692.

**Meyer J., Walker-Jonah A., Hollenberg C. P.** (1991). Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 5454-5461.

**Micolonghi C., Corsi E., Conte R. e Bianchi M.M.** “Heterologous products from the yeast *Kluyveromyces lactis*: exploitation of *KIPDC1*, a single-gene based system”. In: *Comm Curr Res and Educat Topics and Trends in Appl Microbiol Vol.1 (978-84-611-9422-3)* 271-282. A. Mendez-Vilas ed. (Formatex, Badajoz, Spain, 2007).

**Miller J. H.** (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratories, 352-355.

**Mojzita D. E Hohmann S.** (2006). Pdc2 coordinates expression of the *THI* regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 276: 147-161.

**Morlino GB, Tizzani L, Fler R, Frontali L, Bianchi MM.** 1999. Inducible amplification of gene copy number and heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65(11): 4808-4813.

**Mulder W., Scholten I. H., De Boer R. W., Grivell L. A.** (1994). Sequence of the *HAP3* transcription factor of *Kluyveromyces lactis* predicts the presence of a novel 4-cysteine zinc-finger motif. *Mol Gen Genet* 245: 96-106.

**Muller Y. A., Lindqvist Y., Furey W., Schulz G. E., Jordan F. E Schneider G.** (1993). A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxydase and pyruvate decarboxylase. *Structure* 1: 95-103.

**Nakagawa Y., Sugioka S., Kaneko Y., Harashima S.** (2000). O2R, a novel Regulatory element mediating Ro1p-independent O<sub>2</sub> and unsaturated fatty acid repression of *OLE1*. *J Bacteriol* 183: 745-751

**Neil H., Hnatova M., Wésolowski-Louvel M., Rykovska A. E Lemaire M.** (2007). Sck1 activator coordinates glucose transport and glycolysis and is controlled by Rag8 casein kinase I in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* 63: 1537-1548.

**Neil H., Lemaire M. E Wésolowski-Louvel M.** (2004). Regulation of glycolysis in *Kluyveromyces lactis*: role of *KIGCR1* and *KIGCR2* in glucose uptake and catabolism.

Curr Genet 45: 129-139.

**Ozcan S. e Johnston M.** (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 554-569.

**Panek H. R., Stepp J. D., Engle H. M., Marks K. M., Tan P. K., Lemmon S. K., Robinson L. C.** (1997). Suppressors of *YCK*-encoded yeast casein kinase deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP- like complex. *EMBO J* 16: 4194-4204.

**Pfeifer K., Kim K. S., Kogan S. e Guarente L.** (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell* 56, 291–301.

**Poch, O., L'Hôte, H., Dallery, V., Debeaux, F., Fleer, R. e Sodoyer R.** (1992). Sequence of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase: comparison prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* 118: 55-63.

**Poyton R. O.** (1999). Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. *Respiration Physiol* 115: 119-133.

**Poyton R. O., e Burke P. V.** (1992). Oxygen regulated transcription of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxydase genes in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1101: 252-256.

**Prior C., Tizzani L., Fukuhara H. e Wésolowski.Louvel M.** (1996). *RAG3* gene and transcriptional regulation of the pyruvate decarboxylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* 20 (4): 765-772.

**Protani F.** (1998). Regolazione della piruvato decarbossilasi nel lievito *Kluyveromyces lactis*. Tesi di laurea sperimentale in Scienze Biologiche.

**Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E. E Werner T.** (1995). MatInd and MatInspector – New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequences data. *Nucleic Acids Res* 23: 4878-4884.

**Raghuram V., Lobo Z. E Maitra P. K.** (1994). *PDC2*, a yeast gene essential for synthesis of pyruvate decarboxylase, encodes a novel transcription factor. *J Genet* 73: 17-32.

**Robinson L. C., Menold M. M., Garrett S., Culberston M. R.** (1993). Casein kinase I-like protein kinases encoded by *YCK1* and *YCK2* are required for yeast morphogenesis. *Mol Cell Biol* 13: 2870-2881.

**Rocha T. L., Paterson G., Crimmins K., Boyd A., Sawyer L. e Fothergill-Gilmore L. A.** (1996). Expression and secretion of recombinant ovine  $\beta$ -lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. J.* 313: 927-932.

**Rolland s., Hnatova M., Lemaire M., Leal-Sanchez J., Wésolowski-Louvel M.** (2006). Connection between the Rag4 glucose sensor and the *KIRgt1* repressor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 174: 617-626.

**Salmeron J. M. e Johnston S. A.** (1986). Analysis of the *Kluveromyces lactis* positive regulatory gene *LAC9* reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene. *Nucleic Acids Res* 14: 7767-7781.

**Sambrook J., Fritsch E. F., T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

**Schaaff I., Green J. B., Gozalbo D., Hohmann S.** (1989). A deletion of the *PDC1* gene for pyruvate decarboxylase of yeast causes a different phenotype than previously isolated point mutations. *Curr Genet* 15 (2): 75-81.

**Schaffrath R., Breunig K.,** (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluveromyces lactis*. *Fungal genetics and physiology* 30: 173-190.

**Schaffrath R., Soond S. M. e Meacock P. A.** (1995). The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology* 141: 2591-2599

**Schneider R., Gander I., Müller U., Mertz R., Winnacker E.L.** (1986). A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nucleic Acids Res.* 14(3):1303-17.

**Sertil O., Kapoor R., Cohen B. D., Abramova N., Lowry C.** (2003). Synergic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Ac Res* 31: 5831- 5837.

**Shigenana M. K., Hagen T. M., Ames B. N.** (1994). Oxidative damage and mitochondria decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-10778.

**Singh G. P., Dash D.** (2007). Intrinsic disorder in yeast transcriptional regulatory network. *Proteins* 68 (3): 602-605.

**Snoek I. S. I. e Steensma H. Y.** (2006). Why does *Kluveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluveromyces lactis* genome. *FEMS Yeast Res* 6: 393-403.

**Sor F, Fukuhara H.** 1989. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluveromyces*. *Yeast* 5(1):1-10.

**Spiro S., Guest J. R.** (1991). Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 16 (8): 310-4.

**Sreekishna K, Dichson R. C.** 1985. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7909-7913.

**Sreekishna K., Bhairi S. M., Dickson R. C.** (1987). Isolation and characterization of

mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. Mol Gen Genet 208: 145-151.

**Stark M. J. R, Boyd A., Mileham A. J. e Romanos M. A.** (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. Yeast 6: 1-29.

**Ter Linde, J. J. E Steensma, H. Y.** (2002). A microarray-assisted screen for potential Hap1 and Rox1 target genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 19: 825-840.

**Timmerman J., Vuidepot A. L., Bontems F., Lallemand J. Y., Gervais M., Shechter E. e Guiard B.** (1996). 1H, 15N resonance assignment and three-dimensional structure of CYP1 (HAP1) DNA-binding domain. J Mol Biol 259: 792–804.

**Tizzani L., Meacock P., Frontali L. e Wésolowski-Louvel M.** (1998). The *RAG3* gene of *Kluyveromyces lactis* is involved in the transcriptional regulation of genes coding for enzymes implicated in pyruvate utilization and genes of the biosynthesis of thiamine pyrophosphate. FEMS Microbiol Lett 168: 25-30.

**Tizzani L., Wésolowski-Louvel M., Forte V., Romitelli F., Salani F., Lemaire M., Neil H., Bianchi M. M.** (2007). Mutations of the *RAG3* gene encoding a regulator of fermentation in *Kluyveromyces lactis* are suppressed by a mutation of the transcription factor gene *KIGCR1*. FEMS 7:675-682

**Vasconcelles M. J., Jiang Y., McDaid K., Gilooly L., Wretzel S., Porter D. L., Martin C. E., Goldberg M.A.** (2001). Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. J Biol Chem 276(17): 14374-14384.

**Visser W., Scheffers W. A., Bburg-van der Vegte W. H., van Djken J. P.** (1990). Oxygen requirements of yeasts. Appl Environ Microbiol 56: 3785-3792.

**Wach A., Brachat A., Pohlmann R., Philippsen P.** (1994). New heterologous modules for classical or PCR

**Wach A.** (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. YEAST 12:259-265.

**Walsh D. J. e Bergquist P. L.** (1997). Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. Appl.Environ.Microbiol. 63: 3297-3300.

**Wang X., Hoekstra M. F., DeMaggio A. J., Dhillon N., Vancura A., Kuret J., Johnston G. C., Singer R. A.** (1996). Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. Mol Cell Biol 16: 5375-5385.

**Webster T. D. e Dickson R. C.** (1988). The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*.i Nucleic Acids Res 16: 8011-8028.



- Wésolowski-Louvel M. e Fukuhara H.** (1995). A map of *Kluyveromyces lactis* genome. *Yeast* 11: 211-218
- Wésolowski-Louvel M., Breunig K. D., Fukuhara H.** *Kluyveromyces lactis*. In: Non conventional yeasts in biotechnology. Wolf editore. Springer-Verlag, 1996. p. 139-201.
- Wésolowski-Louvel M., Goffrini P., Ferrero I. and Fukuhara H.** (1992a). Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low affinity glucose transporter gene. *Mol. Gen. Genet.* 233: 89-96.
- Wésolowski-Louvel M., Prior C., Bornecque D. e Fukuhara H:** (1992b).  $Rag^-$  mutations involved in glucose metabolism in yeast: isolation and genetic characterization. *Yeast* 8: 711-719.
- Wolfe KH e Shields DC** (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708-713.
- Zachariae W. e Breunig K. D.** (1993). Expression of the transcriptional activator *LAC9* (*KLGAL4*) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Mol Cell Biol* 13: 3058-3066.
- Zenke F. T., Engels R., Vollenbroich V., Meyer J., Hollenberg C. P., Breunig K. D.** (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science* 272: 1662-1665.
- Zhang L. e Hach A.** (1999). Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol Life Sci* 56: 415-426.
- Zhang S., Burkett T. J., Yamashita I., Garfinkel D. J.** (1997). Genetic redundancy between SPT23 and MGA2: regulators of Ty-induced mutations and Ty1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17 (8): 4718-29.
- Zhang S., Skalsky Y., Garfinkel D. J.** (1999). MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet* 151 (2): 473- 483.
- Zitomer R. S., Lowry C. V.** (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 56: 1-11.
- Zivanovic Y., Wincker P., Vacherie B., Bolotin-Fukuhara M. e Fukuhara H.** (2005). Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast reserch.* 5: 315-322.

# **RINGRAZIAMENTI**

Voglio ringraziare innanzitutto il mio docente guida, il Professor Michele Maria Bianchi, per avermi guidato e sostenuto con professionalità ed umanità durante questi tre anni; ringrazio inoltre il mio tutor, il Professor Rodolfo Negri, per il prezioso aiuto nella discussione dei risultati.

La Professoressa Micheline Wésolowski-Louvel dell'Università Lyon1 (Dept. Génétique des Levures) è stata indispensabile per l'analisi dei mutanti *random* e per la discussione critica dei risultati.

Ringrazio inoltre la dott.ssa Isabelle Sagot dell'Università Bordeaux2 (Insitut de Biochimique et Génétique Moleculaire) per i dati sulla localizzazione di Rag3 e Pdc1 ottenuti al microscopio a fluorescenza.

Un ringraziamento particolare va agli studenti che hanno lavorato con me durante questi tre anni: Giuseppe Damato ed Eva Di Silvio, che hanno svolto gli esperimenti relativi allo studio della risposta all'ossigeno; e Daniela Ottaviano, che ha svolto gli esperimenti relativi allo studio dell'autoregolazione.

Infine, ringrazio tutte le persone che lavorano nel piano rialzato del Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo per i suggerimenti e le discussioni scientifiche.