



Università di Roma "La Sapienza"

**Dottorato di ricerca  
in Biologia Cellulare e dello Sviluppo  
(XVII ciclo)**

“Lo studio di *NOT4*, un componente del complesso CCR4-NOT, rivela nuove funzioni nei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*”

Dottoranda:  
**Dott.ssa Agnese Serafini**  
Matr. n° c/010187

Docente Guida: Prof. Claudio Falcone  
Tutore: Dr.ssa Patrizia Filetici  
Coordinatore della Scuola di Dottorato: Prof.ssa Laura Frontali

Anno 2004

	pag.
1. Introduzione	1
1.1. Il lievito	2
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.3. Il lievito <i>Kluyveromyces lactis</i>	3
1.4. Differenze metaboliche tra <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. lactis</i>	4
1.4.1. Fermentazione-Mutanti Rag <sup>-</sup> di <i>K. lactis</i>	5
1.4.2. Repressione da glucosio	7
1.4.3. Respirazione-Utilizzo di fonti di carbonio non-fermentabili	7
1.4.3.1. La proteina Cat8p, regolatore chiave del metabolismo delle fonti di carbonio	8
1.4.3.2. Proteine regolatrici dei geni per la respirazione mitocondriale, le proteine Happ	9
1.4.3.3. Adr1 e Cat8p nella regolazione dei geni <i>ACS1</i> e <i>ACS2</i>	9
1.5. Il complesso CCR4-NOT	10
1.5.1. Il complesso CCR4-NOT controlla processi cellulari diversi	11
1.5.2. Il complesso CCR4-NOT è evolutivamente conservato	12
1.5.3. Not4p	13
1.6. Cascata di trasduzione mediata da PKC1/MPK1	14
1.7. Stress ossidativo	15
1.7.1. Invecchiamento cellulare	16
1.7.1.1. Invecchiamento cronologico	18
1.7.2. Stress ossidativo e apoptosi	18
1.7.3. Il complesso CCR4-NOT è un regolatore della risposta cellulare al glucosio e agli stress ossidativi	19
2. Scopo della tesi	20
3. Materiali e metodi	22
Ceppi di lievito e condizioni di crescita	23
Metodi generali	24
Analisi della sequenza	26
Recupero di frammenti di DNA da gel d'agarosio	26
Ligazione	26
Costruzione dei plasmidi e inattivazione dei geni <i>KINOT4</i> e <i>ScNOT4</i>	26
Trasformazione di <i>E. coli</i>	27
Estrazione di DNA plasmidico da <i>E. coli</i>	28

Trasformazione di lievito	28
Estrazione di DNA genomico da lievito	28
Incrocio e dissezione tetradi	29
Life span cronologico	29
Trattamento con perossido di idrogeno	29
Determinazione della vitalità cellulare tramite il test delle microcolonie	29
Amplificazione del DNA tramite PCR	29
Marcatura “random priming” del DNA	30
Southern Blot	30
Estrazione di RNA totale da lievito	31
Northern Blot	31
Estrazione totale di proteine in condizioni denaturanti	32
Separazione elettroforetica delle proteine in condizioni denaturanti	32
Western Blot	32
Microscopia a fluorescenza	33
Saggio delle capacità respiratorie	33
<b>4 Risultati – I parte</b>	<b>34</b>
<b>Analisi fenotipica dei mutanti <i>not4</i> in <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. lactis</i></b>	
4.1 Isolamento e analisi della sequenza aminoacidica del gene <i>KINOT4</i>	35
4.2. Costruzione dei mutanti del gene <i>KINOT4</i>	36
4.3. Il mutante <i>KINot4ΔI</i> mostra difetti di parete cellulare	37
4.3.1. Sovraespressione del gene <i>MPK1</i> nei mutanti <i>Not4</i> di <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. lactis</i>	39
4.4 Il mutante <i>KINot4ΔI</i> mostra difetti nel riparo del danno al DNA	42
4.5 Il mutante <i>KINot4ΔI</i> mostra sensibilità al benomyl	43
4.6 Cross-complementazione dei geni <i>NOT4</i> di <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. lactis</i>	43
4.7 Il mutante <i>KINot4ΔI</i> mostra difetti nel metabolismo delle fonti di carbonio	45
4.7.1 La mutazione <i>KINot4ΔI</i> determina un fenotipo <i>Rag<sup>-</sup></i>	46
4.7.2 Difetti del mutante <i>KINot4ΔI</i> nel metabolismo delle fonti a 2 atomi di carbonio	47
4.7.3 Il mutante <i>KINot4ΔI</i> ha una ridotta attività respiratoria sul glucosio	48
4.7.4 Difetti del mutante <i>not4</i> di <i>S. cerevisiae</i> nel metabolismo delle fonti respirabili a 2 e 3 atomi di carbonio	50

<b>5. Risultati – II parte</b>	<b>53</b>
<b>Stress ossidativo in <i>S. cerevisiae</i></b>	
4.1    I mutanti <i>not4</i> e <i>ccr4</i> mostrano una maggiore resistenza allo stress ossidativo	50
4.1.1    Resistenza al perossido di idrogeno	50
4.1.2    Incremento della longevità cronologica	52
4.2    La trascrizione di geni per la resistenza allo stress ossidativo Msn-indipendenti risulta aumentata nei mutanti <i>not4</i> e <i>ccr4</i>	54
4.3    La resistenza al perossido di idrogeno è solo in parte dipendente dai fattori Msn2/4 nel mutante <i>not4</i>	55
4.3.1    Inattivazione del gene <i>NOT4</i> nel ceppo di <i>S. cerevisiae</i> W303 e costruzione del triplo mutante <i>msn2msn4not4</i>	55
4.3.2    Vitalità dopo trattamento con perossido e vitalità di colture invecchiate cronologicamente del triplo mutante <i>msn2msn4not4</i>	56
4.4    L'espressione di <i>KINot4</i> □ <i>2p</i> causa una estensione della longevità del mutante <i>not4</i>	56
4.5    Osservazione a microscopio della proteina di fusione NOT4-GFPp dopo stress ossidativo	58

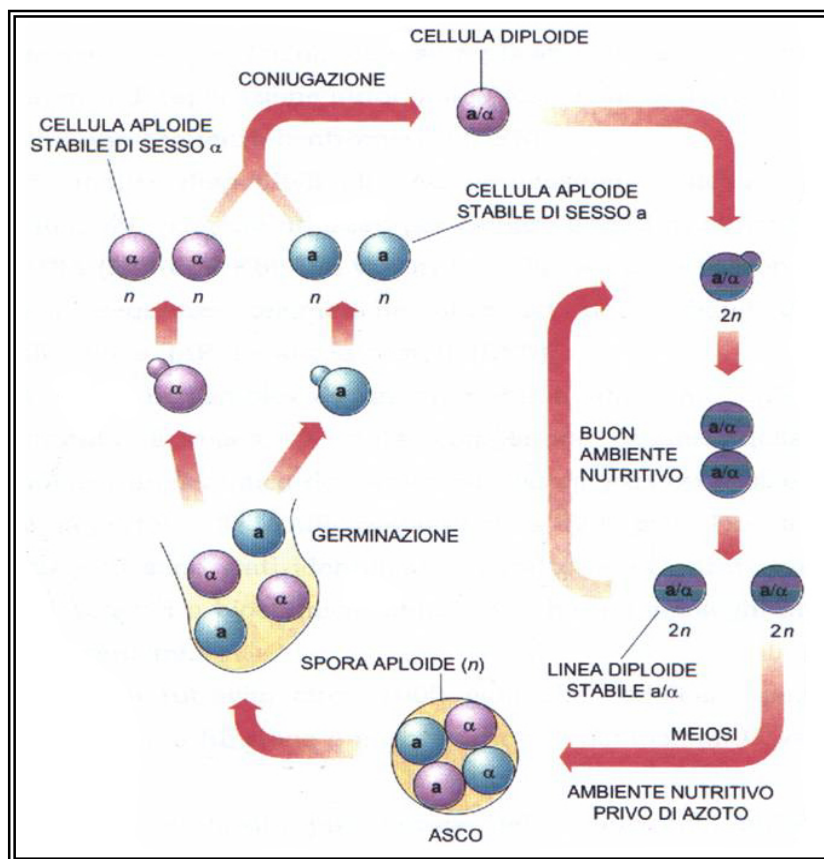
# **1. INTRODUZIONE**

## 1.1. Il lievito

Il lievito è un organismo unicellulare eucariotico appartenente al regno dei Funghi, divisione degli Ascomiceti, per il quale sono state descritte circa 800 specie (Kurtzman and Fell, 1998). Grazie alla facile coltivazione e manipolazione genetica, questo organismo è stato ed è tutt'ora fondamentale per la comprensione dei meccanismi cellulari di base della cellula eucariotica, e costituisce un ottimo sistema modello per affrontare problemi biologici complessi. Il più noto e il più studiato tra i lieviti è *Saccharomyces cerevisiae*, da millenni utilizzato dall'uomo per la produzione di pane, birra, vino e formaggio. Ma non meno importante è *Schyzosaccharomyces pombe*, noto per il suo contributo nella comprensione della regolazione del ciclo cellulare eucariotico (Nurse, 2002). Altri lieviti, definiti non-convenzionali, sono oggi oggetto di numerose ricerche: *Candida albicans* e *Criptococcus neoformans* per la loro patogenicità; *Yarrowia lipolytica* per la capacità di utilizzare particolari substrati, per le notevoli proprietà di secrezione proteica e per lo studio della biogenesi dei perossisomi (Vizeacoumar *et al.*, 2004); *Pichia stipitis* (Ding *et al.*, 2004) e *Kluyveromyces lactis* (vedi avanti) per il loro possibile impiego nel campo delle biotecnologie.

## 1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* è un organismo ideale per gli studi di base della biologia grazie alla sua rapida crescita (tempo medio di generazione è di circa due ore) e alla facilità dell'approccio genetico sia di tipo classico che molecolare. Il genoma è organizzato in 16 cromosomi per un totale di circa  $1,3 \times 10^7$  coppie di basi. *S. cerevisiae* può essere mantenuto stabilmente sia allo stato aploide che diploide. I ceppi aploidi possono essere di



**Figura 1.** Rappresentazione schematica del ciclo vitale del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Plevani e al., 1997)

due tipi sessuali diversi,  $\mathbf{a}$  e  $\alpha$ , che in opportune condizioni possono andare incontro a coniugazione e formare ceppi diploidi. Questi danno origine per mitosi a linee cellulari stabili purchè l'ambiente soddisfi le richieste nutrizionali. Se l'ambiente nutrizionale è povero, e in particolare se mancano fonti di azoto, le cellule diploidi ( $2n$ ) vanno incontro a meiosi e sporficano, generando quattro spore ( $n$ ), contenute in un unico involucro (asco), che possono dare a loro volta origine a linee cellulari aploidi stabili (**Fig.1**).

Sono disponibili oggi molti tipi di vettori per la trasformazione di *S. cerevisiae*:

- alto numero di copie (Yep) con l'origine di replicazione del plasmide naturale, di *S. cerevisiae*,  $2\mu\text{m}$ ;
- basso numero di copie (YCp) contenenti una sequenza di replicazione autonoma, ARS, e una sequenza centromerica, CEN;
- vettori integrativi (YIp), che si integrano a bassa frequenza nel genoma;
- vettori lineari (YAC, cromosomi artificiali di lievito) contenenti sequenze telomeriche, una origine di replicazione (ARS) e il centromero (CEN), utilizzati per clonare grandi frammenti di DNA (200-800 Kb).

Nel 1997, nell'ambito di un programma finanziato dalla Comunità Europea, è stata completata la sequenza nucleotidica del lievito *Saccharomyces cerevisiae* che ha portato all'identificazione di 6122 geni. Finora, 3199 sono stati identificati e caratterizzati attraverso studi genetici o biochimici, mentre 975 hanno omologhi in altri organismi. Rimangono tuttavia, circa 1900 geni che codificano per proteine la cui funzione è ancora ignota (Costanzo *et al.*, 2000).

Lo studio del genoma di lievito può fornire delle indicazioni sulla funzione dei corrispettivi geni umani dal momento che quasi il 50% dei geni umani implicati in malattie ereditarie hanno omologhi in lievito. Questo è possibile oggi grazie allo sviluppo di tecniche innovative come quella del DNA microarray, che costituisce lo strumento predominante per lo studio della genomica funzionale. Sono ormai disponibili chips contenenti le 6122 ORF di *S. cerevisiae*, che permettono di identificare geni la cui espressione è indotta o repressa al variare delle condizioni fisiologiche della cellula. In questo modo è stato possibile monitorare i cambiamenti nei livelli relativi di mRNA di molti geni durante il passaggio dalla fermentazione alla respirazione (De Risi *et al.*, 1997).

Grazie alle tecniche del DNA ricombinante ed alla costruzione di vettori di clonaggio e di espressione, il lievito *Saccharomyces cerevisiae* viene utilizzato per la produzione di proteine eterologhe. Infatti, a differenza di *E. coli*, le proteine prodotte in lievito possono subire modifiche a livello post-traduzionale, caratteristiche degli eucarioti, necessarie alla loro funzionalità. Inoltre, le proteine eterologhe secrete da ceppi ingegnerizzati mostrano un corretto ripiegamento e sono facilmente recuperate dal terreno di coltura. In questo modo è stato possibile produrre in lievito il primo vaccino umano, l'antigene del core dell'epatite B, ed il primo enzima di impiego nel settore alimentare, la rennina (Sherman, 1997).

### **1.3. Il lievito *Kluyveromyces lactis***

Come accennato nel paragrafo introduttivo, tra i lieviti di nuovo interesse spicca il *Kluyveromyces*, un genere che comprende 11 specie di cui il più interessante è *Kluyveromyces lactis* (Kreger-Van Rij, 1984). Studi comparativi tra le sequenze degli rRNA (26S e 5S) hanno permesso di studiare relazioni filogenetiche tra *K. lactis* e altri generi del gruppo degli ascomiceti come *Brettanomyces*, *Debariomyces* e *Dekkera* (Cai *et al.*, 1996, Kurtzman and Robnett, 1998).

La peculiarità di questo lievito e di altri rarissimi lieviti è quella di utilizzare il lattosio come unica fonte di carbonio. Sono presenti infatti in questo lievito una permeasi specifica per il lattosio e un enzima ad attività  $\beta$ -galattosidasi (Chang and Dikson, 1988; Poch

et.,1992). *K. lactis* è stato infatti isolato nei sottoprodotti dell'industria casearia, in cui è presente durante i processi di fermentazione che danno origine ai derivati del latte (Schaffrath and Breunig, 2000).

Un dato interessante, scaturito dalla comparazione dei geni di *S. cerevisiae* con quelli di *K. lactis*, è che le sequenze codificanti mostrano omologie che vanno dal 40 all'80%, mentre le regioni regolatrici sono state poco conservate durante l'evoluzione. Questa diversità nei promotori fa sì che geni omologhi possono essere espressi in modo diverso nei due lieviti. Questa differenza nella regolazione dell'espressione genica, riscontrata soprattutto nei geni metabolici, rispecchia le differenze fisiologiche tra i due lieviti.

*K. lactis* viene utilizzato nella produzione di biomassa ed ha utili applicazioni biotecnologiche. Infatti ha ottime capacità di secrezione, migliori rispetto a quelle di *S. cerevisiae*, che lo rendono particolarmente adatto alla produzione di proteine eterologhe (Van de Berg, 1990). Inoltre in *K. lactis* non si verifica il fenomeno della iperglicosilazione, osservato in *S. cerevisiae*, che potrebbe compromettere l'attività biologica delle proteine (Buckholz and Gleeson, 1991).

Dal punto di vista biologico questo lievito mostra un ciclo vitale come quello descritto per *S. cerevisiae*. Sono disponibili vettori per la trasformazione che contengono tutto o parti di pKD1, un plasmide isolato nel nostro laboratorio dal lievito *Kluyveromyces drosophilorum* (Chen et al., 1986; Falcone et al., 1986) in grado di replicarsi stabilmente in *K. lactis* (Bianchi et al., 1987). Sono stati inoltre costruiti vettori basati su pKD1 che contengono anche l'origine di replicazione del 2 $\mu$ m di *S. cerevisiae* e che pertanto sono in grado di replicarsi stabilmente in entrambi i lieviti (Chen et al., 1989; Schaffrath and Breunig, 2000).

#### 1.4. Differenze metaboliche tra *S. cerevisiae* e *K. lactis*.

In **Fig.2** vengono mostrate le principali vie metaboliche relative alle fonti di carbonio presenti in una cellula di lievito. Il glucosio entra nella cellula con un meccanismo di trasporto facilitato (tranne alcune eccezioni specie-specifiche) e viene immediatamente convertito in glucosio-6-fosfato. Questo è convogliato verso la glicolisi e verso la via dei pentosi-fosfato. Dalla glicolisi si produce piruvato che può subire due diversi destini : i) fermentazione: la piruvato decarbossilasi decarbossila e riduce il piruvato in acetaldeide, l'alcool deidrogenasi riduce l'acetaldeide a etanolo. ii) respirazione: il piruvato è convertito in acetyl-CoA attraverso il complesso della piruvato deidrogenasi mitocondriale (Pdh) oppure attraverso la via citoplasmatica definita "bypass della piruvato deidrogenasi".

La via della Pdh prevede che il piruvato sia trasportato nel mitocondrio dove viene convertito in acetyl CoA dalla Pdh mitocondriale ed entra così nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Nel "bypass della piruvato deidrogenasi", invece, il piruvato è convertito dalla piruvato decarbossilasi citoplasmatica in acetaldeide, questa viene a sua volta convertita in acetato da una acetaldeide deidrogenasi e quindi in acetyl-CoA dalla acetyl-CoA sintetasi. L'acetyl-CoA a questo punto può essere importato nel mitocondrio per la produzione di ATP oppure rimanere nel citoplasma per entrare nel ciclo del glicossilato per la produzione di zuccheri fosfato, necessari alle reazioni di biosintesi (nucleotidi, glicosilazioni, componenti della parete cellulare, biosintesi dei carboidrati di riserva). Le reazioni del "bypass" producono un pool di acetyl-CoA che viene utilizzato anche per la produzione di acidi grassi e, allo stesso tempo, è rigenerato dalla  $\beta$ -ossidazione di questi.

Le basi molecolari delle differenze fisiologiche tra *S. cerevisiae* e *K. lactis* sono adesso note: in presenza di glucosio *S. cerevisiae* ha un metabolismo fermentativo come risultato della repressione da glucosio sulla respirazione mitocondriale, mentre in *K. lactis* la repressione da glucosio è meno efficiente così che il metabolismo rimane prevalentemente respiratorio (Ulman,1985; Barnett, 1992). Durante la crescita di una coltura cellulare di *S.*



*cerevisiae*, ma non di *K. lactis*, si osserva il fenomeno dello “shift diauxico”: le cellule fermentano il glucosio presente nel terreno producendo l’etanolo; man mano che il glucosio viene consumato e prodotto l’etanolo, la repressione da glucosio diminuisce fino a scomparire e si attivano così i geni della respirazione necessari all’utilizzo dell’etanolo prodotto per fermentazione. Questo riarrangiamento della espressione genica per adattarsi al nuovo ambiente si traduce, nella curva di crescita, in un gradino dove il numero di cellule non aumenta, e la crescita esponenziale riprende dopo aver completato la transizione metabolica.

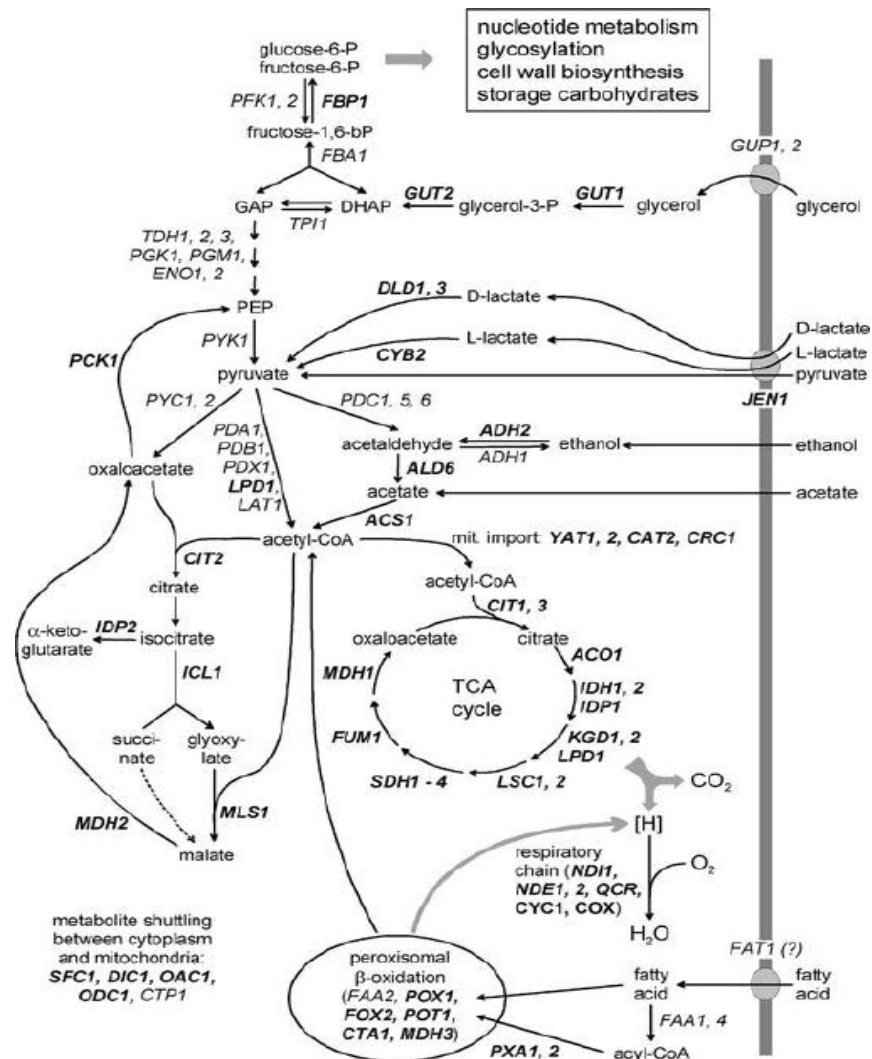


Figura 2. Genetica del metabolismo ossidativo e gluconeogenico in *S. cerevisiae*. Sono indicati i geni strutturali noti, coinvolti in ogni passaggio metabolico. Nella figura non viene considerata la compartimentazione (Schuller, 2003).

### 1.4.1. Fermentazione - Mutanti Rag<sup>-</sup> di *K. lactis*

In *K. lactis* sono stati isolati dei ceppi incapaci di crescere su glucosio in presenza di antimicina A poiché recano mutazioni in alcuni geni, denominati *RAG* (Resistenza

all'Antimicina su Glucosio) (Wesolowsky-Louvel *et al.*, 1992). L'antimicina A è un inibitore mitocondriale che agisce sulla catena di trasporto degli elettroni impedendo il passaggio di questi dal citocromo *b* al *c1*. I ceppi Rag<sup>+</sup> sopravvivono su glucosio in presenza di un inibitore della respirazione poiché capaci di utilizzare questa fonte di carbonio attraverso il metabolismo fermentativo. I geni *RAG* costituiscono quindi una classe di geni che controllano il flusso glicolitico, codificano e/o regolano enzimi coinvolti nella glicolisi e codificano trasportatori per il glucosio (per una review Breunig *et al.*, 2000). In assenza di inibitori della respirazione, i mutanti *rag* crescono normalmente su glucosio. Questo significa che alterazioni della via glicolitica non hanno particolari effetti negativi sulla crescita di *K. lactis*. Al contrario di quanto accade in *S. cerevisiae* dove il blocco della fermentazione su glucosio risulta letale, poiché la respirazione non è attiva a causa della repressione esercitata dallo zucchero stesso (per una review Schraffrath and Breunig, 2000). Il gene *RAG2* codifica la fosfoglucoisomerasi (PGI), un enzima glicolitico che catalizza l'isomerizzazione del glucosio-6-fosfato in fruttosio-6-fosfato (Wesolowski-Louvel *et al.*, 1988). Mutanti di *K. lactis* in questo gene si differenziano da quelli di *S. cerevisiae*. Infatti i primi sono in grado di crescere su glucosio aggirando il blocco della via glicolitica attraverso l'utilizzo di quella dei pentoso-fosfati (Heinisch *et al.*, 1993). I secondi non sono invece in grado di crescere su glucosio perché in questo lievito probabilmente la via dei pentoso-fosfati è meno attiva che in *K. lactis*.

Il gene *RAG6* codifica la piruvato decarbossilasi (Bianchi *et al.*, 1995), e il gene *RAG3* sembra essere coinvolto nella sua regolazione (Prior *et al.*, 1996). La sintesi della piruvato decarbossilasi risulta impedita quando c'è una riduzione del flusso glicolitico (Breunig *et al.*, 2000). È stato osservato che il gene *RAG1*, che codifica il trasportatore del glucosio (Goffrini *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992), subisce una regolazione ad opera dei geni *RAG4*, *RAG5* e *RAG8*. È stato dimostrato che quando uno di questi geni è inattivo, il gene *RAG1* non viene trascritto (Chen *et al.*, 1992).

Il gene *RAG4* è stato clonato recentemente (Betina *et al.*, 2001) e l'analisi della sequenza mostra un'alta somiglianza con le proteine Snf1p e Rgtp che intervengono nella segnalazione intracellulare del glucosio (Ozcan *et al.*, 1996, 1998).

Il gene *RAG5* codifica l'unica esochinasi presente in *K. lactis*, come dimostrato dal fatto che mutanti *rag5* sono del tutto privi di attività esochinasi (Prior *et al.*, 1993). *RAG5* è a sua volta regolato da altri fattori (Goffrini *et al.*, 1995).

Il gene *RAG8* codifica una proteina simile alla casein chinasi I (Blasonneau *et al.*, 1997). Nel tentativo di capire come questo influenzi la regolazione di *RAG1*, sono state isolate alcune mutazioni che sopprimono l'effetto della mutazione *rag8*. Uno di questi (*SCK1*) codifica una proteina che presenta un dominio di legame al DNA e che potrebbe quindi partecipare direttamente alla regolazione del gene. La delezione di *SCK1* risulta nel fenotipo Rag<sup>-</sup> oltre che nella riduzione dell'espressione di *RAG1* e di diversi geni glicolitici (Lemaire *et al.*, 2002).

Accanto a *RAG1*, in *K. lactis*, è presente un trasportatore ad alta affinità per il glucosio, *HGT1* (Billard *et al.*, 1996) che è costitutivamente espresso e non regolato da fonti di carbonio. Se in *K. lactis* è presente un solo trasportatore regolato dal glucosio, in *S. cerevisiae* ne sono stati isolati ben 17. Questo non sembra essere un caso unico, dal momento che anche il gene che codifica la piruvato decarbossilasi è presente in più copie (*PDC1-5*). La ridondanza dei geni glicolitici in *S. cerevisiae* è probabilmente dovuta all'essenzialità di questa via per l'utilizzo del glucosio, la fonte di carbonio più abbondante in un habitat naturale, assicurandone il consumo anche nel caso di una mutazione in uno dei geni chiave.

È tutt'ora in corso l'isolamento di altri mutanti *rag* che risulteranno molto utili per l'ulteriore chiarimento del rapporto tra respirazione e fermentazione esistente in *K. lactis*. Il più recente gene *RAG* isolato (Lemaire and Wesolowsky-Louvel, 2004) è *RAG17* che

codifica per l'unica enolasi di *K. lactis* (*KIENO1*). Questa proteina oltre all'attività catalitica possiede un ruolo di regolatore, probabilmente indiretto, dell'espressione del gene *RAG1*. I dati raccolti negli ultimi anni sui geni glicolitici di *K. lactis* stanno evidenziando una complessa rete di regolazione che coinvolge i geni glicolitici catalitici e quelli regolatori.

### 1.4.2. Repressione da glucosio

In *S. cerevisiae*, in presenza di glucosio i geni essenziali alla respirazione sono repressi e sono invece attivi i geni per la fermentazione. La derepressione dei geni respiratori dopo l'esaurimento del glucosio è controllata dalle subunità del complesso Snf1p-Gal83/Sip1/Sip2; Snf1p è una chinasi altamente omologa a AMPK umana, una chinasi AMP-attivata. In condizione di repressione, il dominio chinasi della subunità Snf1p è bloccato stericamente dalle altre subunità che impediscono l'interazione coi suoi bersagli. In condizioni di derepressione, questo dominio risulta libero di interagire con essi (Schuller, 2003). In *K. lactis* non si verifica la repressione da glucosio dei geni per la respirazione poiché in questo lievito i geni respiratori sono attivi anche quando il glucosio è presente e pertanto può essere respirato (Breunig *et al.*, 2000). Esiste però la repressione dei geni attivati da fonti di carbonio alternative al glucosio come saccarosio, maltosio e galattosio. A questo proposito è da citare il ruolo della proteina Mig1p, ampiamente studiata in *S. cerevisiae*. Tra i bersagli di Snf1p c'è Mig1p, un generale regolatore negativo dell'espressione dei geni *SUC*, *MAL*, *GAL* necessari rispettivamente per l'utilizzo di saccarosio, maltosio e galattosio. Siti leganti Mig1 (URE: Upstream Regulatory Element) sono stati trovati anche a monte di geni respiratori e gluconeogenetici, come *ICL1*, *HAP4*, *FBP1* e *CAT8*, anche se l'espressione di questi geni non risulta influenzata nel mutante nullo di *mig1*. Il ruolo di Mig1 è quello di reclutare il generale complesso corepressore Tup1-Cyc8 agli specifici promotori. In presenza di glucosio, Mig1 si trova legato ai promotori dei geni che devono essere repressi. Quando il glucosio si esaurisce o sono presenti fonti diverse di carbonio, Snf1p fosforila Mig1 promuovendone l'esporto dal nucleo e quindi la rimozione dai promotori (Schuller, 2003). In *K. lactis*, sono state isolate Fog1 e Fog2, due subunità del complesso Snf1-Gal83/Sip1/Sip2. *FOG1* è omologo alla famiglia di geni *GAL83/SIP1/SIP2*, mentre *FOG2* è omologo a *SNF1*. Il complesso di *K. lactis* è equivalente funzionalmente a quello di *S. cerevisiae* (Breunig *et al.*, 2000) ma, mentre in *S. cerevisiae* ci sono tre varianti di Snf1p localizzate in diversi compartimenti cellulari (Vincent *et al.*, 2001), in *K. lactis* è stata isolata una sola variante localizzata nel nucleo (Goffrini *et al.*, 1996; Charbon *et al.*, 2004).

Mig1p, al contrario, non mostra equivalenza funzionale tra i due lieviti. Infatti la mutazione nel gene *KIMIG1* causa soltanto una debole derepressione nel gene *SUC2*, che, in *S. cerevisiae*, è primariamente controllato da Mig1p (Breunig *et al.*, 2000).

### 1.4.3. Respirazione - Utilizzo di fonti di carbonio non-fermentabili

Le fonti di carbonio non fermentabili, quali glicerolo ed etanolo, entrano nelle vie cataboliche più a valle rispetto al glucosio (**Fig.2**). Tali substrati vengono utilizzati sia per il metabolismo ossidativo nei mitocondri (produzione di ATP) che per la rigenerazione degli zuccheri-fosfato (gluconeogenesi e ciclo del gliossilato).

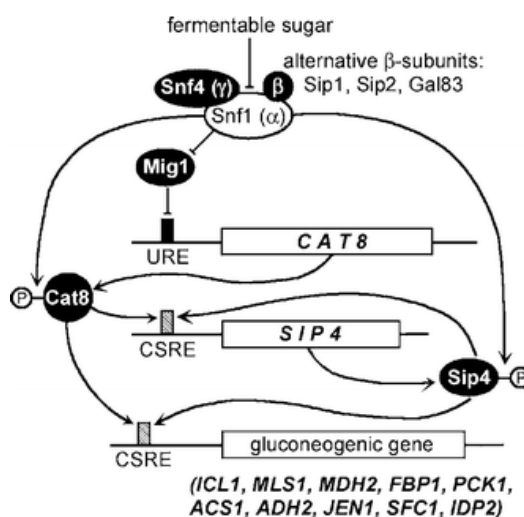
Il **glicerolo** entra a livello del diidrossiacetone-fosfato nella via glicolitica proseguendo con essa per produrre piruvato, o proseguendo con la via gluconeogenetica per la produzione di glucosio-6-fosfato. Il piruvato viene trasportato nel mitocondrio e convertito dalla piruvato deidrogenasi mitocondriale (PDH) in acetyl-CoA che entra nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Destino analogo ha il lattato che viene convertito direttamente in piruvato da una lattato deidrogenasi mitocondriale.

L'**etanolo** invece, prodotto per fermentazione o esogeno, viene convertito in aldeide acetica, poi in acetato e quindi in acetyl-CoA. Queste reazioni avvengono nel citoplasma e pertanto l'etanolo dà origine ad un pool di acetyl-CoA citoplasmatico che potrà essere convogliato verso la produzione di energia nel mitocondrio o verso le biosintesi con il ciclo del gliossilato. Analogο destino ha l'acetato che entra più a valle rispetto all'etanolo. La via del "bypass della Pdh" è quindi attiva per il consumo delle fonti a due atomi di carbonio.

### 1.4.3.1. La proteina Cat8p, regolatore chiave del metabolismo delle fonti di carbonio

I dettagli molecolari del controllo trascrizionale del metabolismo non-fermentativo sono stati ampiamente studiati in *S. cerevisiae* (per una review, Schuller 2003). La proteina Cat8p è un regolatore chiave del flusso del carbonio in lievito. L'analisi del trascrittoma in *S. cerevisiae* ha rivelato che tutti gli enzimi chiave che riforniscono di carbonio i processi anabolici in risposta alla deplezione da carbonio sono regolati da Cat8p a livello trascrizionale (Haurie *et al.*, 2001, Young *et al.*, 2003). I mutanti *cat8* sono incapaci di utilizzare fonti di carbonio non-fermentabili poiché un numero di geni codificanti enzimi della gluconeogenesi e del ciclo del gliossilato non sono attivati (Hedges, 1995; Rahner *et al.*, 1996). Cat8 è membro della famiglia Gal4 di fattori di trascrizione (Schjerling and Holmberg, 1996) che legano il DNA per mezzo del motivo "zinc-cluster" ( $Zn_2Cys_6$ ) e mostra un'elevata somiglianza con la proteina Sip4p. Entrambe le proteine, Cat8p e Sip4p (Rahner *et al.*, 1999; Vincent and Carlson, 1998), controllano la trascrizione tramite sequenze regolatrici chiamate CSRE (Carbon Source-Responsive Element).

Dal momento che i mutanti *sip4* non differiscono dal ceppo selvatico per la crescita su fonti di carbonio non fermentabili (Lesage, *et al.*, 1996), si può ipotizzare un ruolo predominante di Cat8p nell'utilizzo delle suddette fonti. Nella **Fig.3** è mostrato il modello del meccanismo d'azione di regolazione dei geni gluconeogenetici e del ciclo del gliossilato che coinvolge le proteine Cat8p, Mig1p e Sip4p. In presenza di glucosio, il complesso della chinasi Snf1p è represso e il repressore Mig1 reprime il gene *CAT8*. In assenza di glucosio e in presenza di fonti di carbonio alternative, il complesso della chinasi Snf1p fosforila Mig1 che lascia il nucleo permettendo così la trascrizione del gene *CAT8*. La proteina Cat8p viene fosforilata da Snf1p (Charbon *et al.*, 2004). Cat8p fosforilato induce la trascrizione di Sip4p la quale è a sua volta fosforilata da Snf1p. Infine, Cat8p e Sip4p insieme attivano il gruppo di geni gluconeogenetici, importanti per la produzione di glucosio 6-fosfato: i) geni della gluconeogenesi: *FBP1*, fruttosio 1,6 bifosfatasi; *PCK1*, fosfoenolpiruvatocarbossichinasi; ii) geni del ciclo del gliossilato: *ICL1*, isocitrato liasi; *MLS1*, malato sintasi; *MDH2*, malato deidrogenasi; *IDP2*, isocitrato deidrogenasi; iii) geni per la sintesi dell'acetyl-CoA citoplasmatico a partire dall'etanolo o acetato: *ACS1*, acetyl-



**Figura 3.** Deregolazione dei geni strutturali gluconeogenetici dai fattori Cat8 e Sip4 leganti le sequenze CSRE (Schuller, 2003).

CoA sintetasi; *ADH2*, alcool deidrogenasi; iv) il gene del trasportatore del lattato, *JEN1*; v) geni per il trasporto dei metaboliti tra mitocondrio e citoplasma, *SFC1*; (Schuller, 2003). Numerosi studi hanno riguardato recentemente la regolazione dei geni gluconeogenetici, del ciclo dei glicosilati e della sintesi dell'acetyl-CoA citoplasmatico in *K. lactis* (per delle review, Breunig *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2000). È stato isolato il gene *KICAT8* che è in grado di sopprimere i difetti metabolici del mutante *cat8* di *S. cerevisiae*. Tuttavia, la regolazione di molti geni che sono noti essere il bersaglio di Cat8p in *S. cerevisiae*, come *FBK1* e *PCK1*, non sono influenzati nel mutante *Klcat8* di *K. lactis* (Georis *et al.*, 2000). Mentre rimane in *Klcat8p* il ruolo di attivatore trascrizionale dei geni *ICLI*, *ACS* e *JEN1* (Georis *et al.*, 2000; Charbon *et al.*, 2004). Questo è in accordo alle capacità di crescita del mutante *cat8* su fonti non fermentabili, il quale non è in grado di crescere su acetato, etanolo e lattato, ma è in grado di utilizzare il glicerolo, per il cui metabolismo vengono attivati i geni della gluconeogenesi, non attivati da *Klcat8p* (Georis *et al.*, 2000). È stato recentemente dimostrato che la trascrizione di *KICAT8* non è regolata da fonti di carbonio né da Mig1. Infatti, a monte del gene *KICAT8* non ci sono le sequenze di legame di Mig1 (URE: Upstream Regulatory Element) e la sua regolazione avviene a livello dell'attività. È stato inoltre dimostrato che Cat8p è un diretto bersaglio della chinasi Snf1p in *K. lactis* come in *S. cerevisiae* (Charbon *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.2. Proteine regolatrici dei geni per la respirazione mitocondriale, le proteine Hap.**

La regolazione dei geni respiratori (*CYC1*: iso-1-citocromo c; *CYC7*: iso-2-citocromo c; *COX6*: citocromo ossidasi; *CYT1*: citocromo c1; *QCR8*: ubiquinolo-citocromo c ossidoreduttasi; *CIT1*: citrato sintasi; *SDH2*: succinato deidrogenasi) in *S. cerevisiae* avviene attraverso due sequenze regolatorie a monte di essi, UAS1 e UAS2. Alla prima si lega l'attivatore eme-dipendente Hap1p, mentre alla seconda si lega il complesso attivatore eterotetramerico Hap2/Hap3/Hap4/Hap5. La trascrizione degli Hap è regolata da fonti di carbonio e il bersaglio della regolazione da fonti di carbonio è Hap4p (per una review, Schuller 2003). La trascrizione di HAP4 è totalmente dipendente da Cat8p indicando un legame funzionale tra respirazione e gluconeogenesi (Brons *et al.*, 2002). Ma la regolazione non è solo da parte degli Hap, infatti sono presenti a monte di questi geni altre sequenze che legano fattori di regolazione pleiotropici, come ad esempio Abf1 per il gene *COX6*. Accanto a questi fattori di trascrizione, l'espressione dei geni respiratori è controllata anche dalla differenziale stabilità degli mRNA, ad esempio il turnover dell'mRNA del gene *SDH2* è diverso tra glucosio e glicerolo (Scheffler *et al.*, 1998; Schuller, 2003).

In *K. lactis*, l'omologo funzionale di *HAP4* è stato isolato ma mostra una debole omologia di sequenza con il gene di *S. cerevisiae* (Bougarel *et al.*, 1999) e sorprendentemente la distruzione dei geni *KIHAP2*, *KIHAP3* e *KIHAP4* non influenza la capacità di questo lievito di crescere su fonti di carbonio respirabili (Mulder *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1995). Il ruolo di questo complesso rimane quindi ancora da stabilire in *K. lactis* (Breunig *et al.*, 2000).

#### **1.4.3.3. Adr1 e Cat8 nella regolazione dei geni *ACS1* e *ACS2***

In *S. cerevisiae* sono presenti due geni che codificano la acetil-CoA sintetasi: *ACS1* e *ACS2* (De Virgilio *et al.*, 1992; Van der Berg and Steensma, 1995). *ACS1* è represso da glucosio e indotto durante la crescita su acetato mentre *ACS2* è espresso costitutivamente (Van der Berg *et al.*, 1996). La delezione di entrambi questi geni è letale. Ciò fa pensare

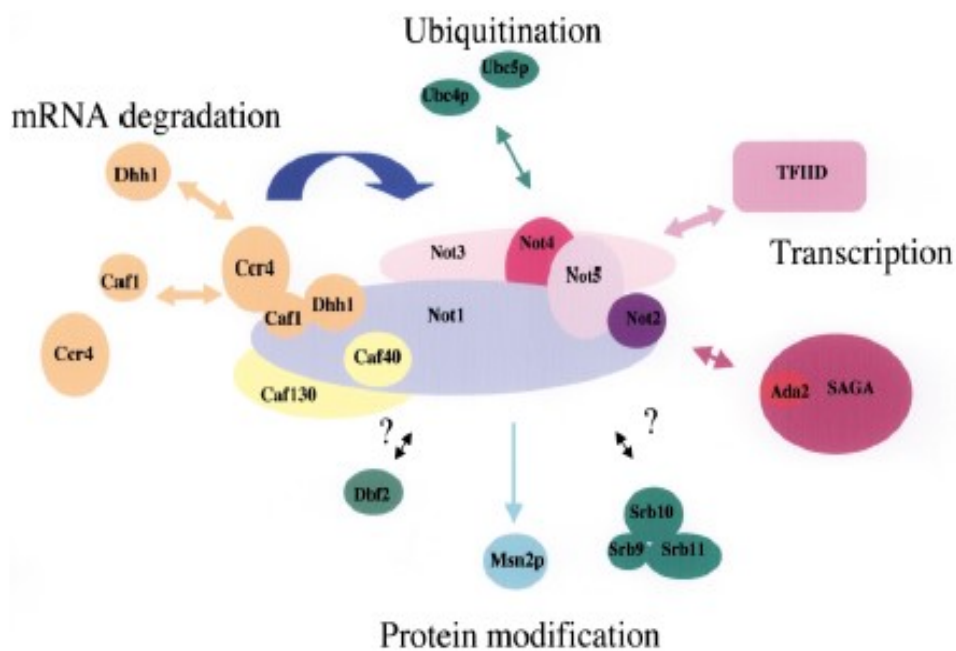
che l'acetyl-CoA citosolico sia necessario e che non può essere compensato dall'acetyl-CoA prodotto dal mitocondrio ad indicare che la via del bypass della piruvato deidrogenasi è essenziale in *S. cerevisiae*. Un'altra ipotesi sulla letalità del doppio mutante *acs* è che questi geni abbiano un altro tipo di funzione, sconosciuta ma essenziale (Zeeman and Steensma, 2003). In *K. lactis* sono stati identificati due geni ACS, *KIACS1* e *KIACS2* (Lodi *et al.*, 2001; Zeeman and Steensma, 2003). Entrambi sono attivati da KICat8p ma hanno una differente regolazione rispetto a *S. cerevisiae*: *KIACS1* è indotto da acetato e lattato, mentre *KIACS2* è indotto da etanolo (Lodi *et al.*, 2001).

Accanto a Cat8p, un altro attivatore trascrizionale è necessario per la trascrizione di geni indotti da fonti a due atomi di carbonio, la proteina Adr1p. La sequenza alla quale si lega Adr1p è detta UAS1. La combinata azione di Cat8p e Adr1p è richiesta per la derepressione del gene *ACS1* su fonti di carbonio respirabili (Kratzer and Schuller, 1997). Adr1 attiva anche i geni per l'utilizzo del glicerolo ed è coinvolto nella derepressione degli enzimi perissosomali (Schuller, 2003). Adr1 richiede Snf1 per la sua funzione ma non è noto se sia un suo diretto bersaglio. In *K. lactis* l'omologo del gene *ADR1* non è ancora stato isolato.

## 1.5. Il complesso CCR4-NOT

Il complesso CCR4-NOT è un complesso multiproteico essenziale per la cellula evolutivamente conservato dal lievito all'uomo. Geni ortologhi per le proteine che lo costituiscono sono stati infatti trovati in diverse specie di eucarioti e mostrano un'alta omologia di sequenza nei domini specifici di ogni proteina (Collart, 2003; Collart and Timmers, 2004). CCR4-NOT è un regolatore generale dell'espressione genica, su cui agisce sia positivamente che negativamente.

In *S. cerevisiae* è stato dimostrato influenzare la repressione da catabolita per le fonti di carbonio (Ccr= Carbon Catabolite Repression) ed esibire caratteristiche di un globale regolatore negativo della trascrizione (Not= Negative on TATA) (Denis, 1984; Collart and



**Figura 4.** Rappresentazione schematica del complesso CCR4-NOT e delle proteine che interagiscono con esso (Collart, 2003).

Struhl, 1994; Liu *et al.*, 1998; Collart, 2003). In *S. cerevisiae* questo complesso esiste in due forme di diverse dimensioni, una di 1,9-2MDa e l'altra di 0,9-1,2 Mda. La forma più piccola rappresenta il "core" del complesso, costituito dalle proteine Ccr4p, Caf1p, Caf40, Caf130 e 5 proteine denominate Not (Not1-5p) (Liu *et al.*, 1998). Not1p (Cdc39p) è la proteina più grande, sembra critica per la formazione del complesso ed è inoltre l'unica proteina essenziale per la cellula (Maillet *et al.*, 2000). Not5p è simile a Not3p, infatti negli organismi è presente l'una o l'altra (Oberholzer and Collart, 1998). Il complesso si forma per interazione della regione C-terminale di Not1p con le proteine Not2p (Cdc36p), Not4p e Not3/5p, mentre Ccr4p e il fattore 1 associato a Ccr4, Caf1p, si associano ad aminoacidi in una regione più centrale di Not1p (Bai *et al.*, 1999). Varie mutazioni in Not2p possono impedire l'associazione delle proteine Notp al complesso (Russell *et al.*, 2002) e in modo simile, Caf1p è essenziale per l'interazione di Ccr4p con Not1p (Bai *et al.*, 1999). Come mostrato in **Fig.4**, esiste una separazione fisica tra il gruppo di proteine Notp e Ccr4p/Caf1p, una separazione che rispecchia la loro attività funzionale: è esclusiva delle proteine Notp la repressione sui promotori TATA-less (Collart and Struhl, 1993,1994; Oberholzer and Collart, 1998), ed è invece esclusiva di Ccr4p e Caf1p la regolazione positiva del gene *ADH2* (Denis, 1984; Draper *et al.*, 1994).

La differenza funzionale si riflette nell'espressione fenotipica dei mutanti del complesso che hanno fenotipi simili tra loro ma anche fenotipi propri. Questa diversità può essere in parte spiegata dalla particolare struttura modulare del complesso, ma non facilmente compatibile con una singola funzione di questo (vedi avanti), a meno che la specificità di questi fenotipi sia fornita dal fatto che ogni componente abbia funzioni addizionali esterne a quelle del complesso Ccr4-Not (Collart, 2003). E' il caso, ad esempio, di Ccr4p la quale è stata dimostrata essere parte della seconda RNAPolimerasi II, recentemente isolata in lievito (Chang *et al.*, 1999; Betz *et al.*, 2002), di cui non fanno parte le proteine Notp (Maillet *et al.*, 2000). Tuttavia a confermare l'importanza dell'esistenza del complesso, oltre l'essenzialità di Not1p, è il fenotipo di letalità sintetica dei doppi mutanti nei geni che codificano i componenti del complesso (Maillet and Collart, 2002).

### 1.5.1. Il complesso CCR4-NOT controlla processi cellulari diversi

Ci sono sempre maggiori evidenze che il complesso CCR4-NOT svolga funzioni multiple, spiegando così il fenotipo pleiotropico che si osserva nei mutanti dei componenti del complesso stesso.

- **Degradazione dell'mRNA.** Ccr4p e Caf1p costituiscono la principale deadenilasi citoplasmatica *in vivo* in lievito (Tucker *et al.*, 2001). In lievito la principale via di degradazione ha inizio con la deadenilazione della coda poli-A al 3', seguita dal decapping e quindi dalla degradazione 5'-3'. Ccr4p è la subunità catalitica della deadenilasi (Chen *et al.*, 2002; Tucker *et al.*, 2002). Anche le proteine Notp sembrano avere un ruolo nella regolazione della stabilità degli mRNA, anche se marginale (Tucker *et al.*, 2001), e attualmente non è ben chiaro se Ccr4p e Caf1p funzionino insieme come principale deadenilasi citoplasmatica nel contesto CCR4-NOT oppure come modulo separato (Collart, 2003). E' stata inoltre dimostrata l'interazione fisica e funzionale di Dhh1p, una putativa RNA elicasi presente nel macchinario del decapping (Coller *et al.*, 2001; Fischer and Weis, 2002), con Caf1p (Tucker *et al.*, 2001) e Not1p (Maillet and Collart, 2002). L'interazione con Not1p potrebbe confermare che questa attività deadenilasica sia legata a Ccr4 come membro del complesso Ccr4-Not. L'attività deadenilasica potrebbe essere un modo per regolare l'espressione genica (per una review, Khodursky and Bernstein, 2003; Collart, 2003).



- **Inizio della trascrizione.** Le proteine Notp sono state identificate in una selezione di mutanti che mostravano un aumento del trascritto del gene *HIS3*. Questo gene è sotto il controllo di due elementi prossimali,  $T_R$  e  $T_C$ , il primo si comporta come una sequenza TATA canonica, il secondo perde l'elemento TATA convenzionale. I mutanti *not* causavano un aumento preferenziale del trascritto originatosi dall'elemento  $T_C$  (Collart and Struhl, 1993,1994; Oberholzer and Collart, 1998). Mutazioni che hanno effetti differenziali sui trascritti che originano dal core del promotore *HIS3* probabilmente influenzano l'inizio della trascrizione (Collart, 2003). Questa ipotesi è stata avvalorata da numerosi esperimenti dell'ultimo decennio nei quali è stata dimostrata l'interazione fisica e genetica tra i componenti del complesso e importanti componenti del fattore di inizio TFIID, quali TBP (proteina legata alle TATA-box), TAF13 e TAF1 (fattori che si associano a TBP) (Lee *et al.*, 1998; Badarinarayana *et al.*, 2000; Lemaire and Collart, 2000; Deluen *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002). Risultati *in vivo* dimostrano che Not5p si associa al promotore e l'interazione dipende da TAF1. Quindi il complesso potrebbe interagire con TAF1 per regolare la sua associazione al promotore (Deluen *et al.*, 2002). L'interazione col promotore è stata dimostrata anche per le proteine Not2p e Ccr4p (Swanson *et al.*, 2003; Zwartjies *et al.*, 2004). Inoltre, alleli mutanti dei geni *NOT1*, *NOT3*, *NOT5* e *CAF1* possono sopprimere il difetto di termosensibilità di un mutante del gene *SRB4* (Lee *et al.*, 1998), il quale codifica un essenziale componente del Mediatore RNAPolimerasi II. L'insieme di questi dati punta al ruolo di repressore della trascrizione, mediata dalla RNAPolimerasiII, mostrato dal complesso.
- **Allungamento della trascrizione.** Ci sono evidenze genetiche che suggeriscono un'influenza di CCR4-NOT sul processo di allungamento trascrizionale (Denis *et al.*, 2001). Sono state isolate le proteine Caf4p e Caf16p, del complesso più grande di 1,9-2MDa (Liu *et al.*, 2001), la cui funzione è tutt'ora sconosciuta. Sembra comunque che tramite queste proteine il complesso contatti le proteine Srb9p, Srb10p e Srb11p, componenti del sub-complesso dell'oloenzima RNA polimerasiII, importanti per l'allungamento del trascritto (Greenblatt, 1997).
- **Modificazione delle proteine.** Le modificazioni post-traduzionali di Msn2p in cellule in crescita esponenziale, condizione dove l'attività di Msn2p è bassa, risultano alterate nei mutanti *ccr4-not* (Lenssen *et al.*, 2002). Recenti osservazioni suggeriscono che il complesso interagisca fisicamente con fosfatasi che a sua volta mediano le alterate modificazioni di Msn2p nei mutanti *ccr4-not* (Collart, 2003). Un altro elemento che lega il complesso CCR4-NOT alla modificazione delle proteine è la recente scoperta che Not4p possiede una attività di E3 ligasi ubiquitinante (Albert *et al.*, 2002).

E' inoltre stata accertata l'interazione con altre proteine che hanno diverse funzioni nella cellula: i) Dbf2p, una chinasi ciclo cellulare regolata (Liu *et al.*, 1997); ii) Ada2p (Benson *et al.*, 1998), Spt3p e Spt8p (Collart, 1996), componenti del complesso SAGA necessario alla deacetilazione degli istoni.

### 1.5.2. Il complesso CCR4-NOT è evolutivamente conservato

Il complesso CCR4-NOT non è specifico del lievito ma è presente anche in altri organismi (Gavin *et al.*, 2002). Recentemente omologhi dei suoi componenti sono stati identificati nell'uomo: *CNOT1* (Not1p), *CNOT2* (Not2p), *CNOT3* (Not3p/Not5p), *CNOT4* (Not4p) e due geni *CAF1*-simile, *CNOT7* (hCaf1p) e *CNOT8* (hPop2p). L'analisi dei livelli degli mRNA di questi geni nei differenti tessuti umani ha rivelato un profilo di espressione



ubiquitario. Mediante la tecnica dei saggi a “due ibridi” e co-immunoprecipitazione è stato dimostrato che questi geni codificano per proteine che costituiscono un complesso anche nelle cellule di mammifero. La conservazione funzionale di queste proteine attraverso l'evoluzione è suggerita dall'osservazione che i cDNA umani di *NOT3* e *NOT4* complementano parzialmente le corrispondenti mutazioni *not* in lievito (Albert *et al.*, 2000). Inoltre è stata dimostrata la conservazione dell'attività deadenilasica sia in *Drosophila* (Temme *et al.*, 2004) che in topo (Viswanathan *et al.*, 2004), anche se in quest'ultimo l'attività catalitica sembra sia svolta dalla subunità Caf1p.

Sono stati condotti degli studi per vedere se il complesso fosse legato a situazioni patologiche nell'uomo e recentissimi lavori hanno rivelato un chiaro coinvolgimento del complesso CCR4-NOT nella regolazione positiva di fattori che promuovono la virulenza di *C. albicans* (Zhao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003; Uhl *et al.*, 2003; Krueger *et al.*, 2004). In particolare, di rilevante importanza sembra il ruolo della proteina Not4p, la cui assenza inibisce la crescita ifale e sopprime la patogenicità (Krueger *et al.*, 2004) a differenza di altri mutanti del complesso che mostrano una virulenza attenuata.

Nella sfera delle malattie genetiche è interessante l'osservazione che entrambi i geni umani omologhi a yCAF1 sono localizzati su regioni cromosomiche che spesso risultano delete in tumori umani. Inoltre, *CNOT8* (hPop2), è stato isolato come soppressore genico tumorale associato con lo sviluppo della sindrome 5q (Fidler *et al.*, 1999), anche detta mielodisplastica, una malattia caratterizzata da disordini della mielopoiesi che derivano da un difetto della cellula staminale emopoietica con perdita progressiva della capacità differenziativa. I disordini emopoietici tendono a una trasformazione leucemica acuta. Entrambe le proteine *CNOT8* (hPop2) e *CNOT7* (hCaf1p) interagiscono con BTG1 e BTG2 (Prévot *et al.*, 2001), due proteine che controllano negativamente il ciclo cellulare, quindi sono antiproliferative. Questa attività antiproliferativa è stata dimostrata anche per la sovraespressione del gene *CNOT7*(hCaf1p) in molti tipi cellulari (Bogdan *et al.*, 1998). In seguito a queste chiare indicazioni del coinvolgimento di CCR4-NOT nelle manifestazioni tumorali, l'interesse internazionale verso questo complesso si sta spostando dal lievito all'uomo.

### 1.5.3. Not4p

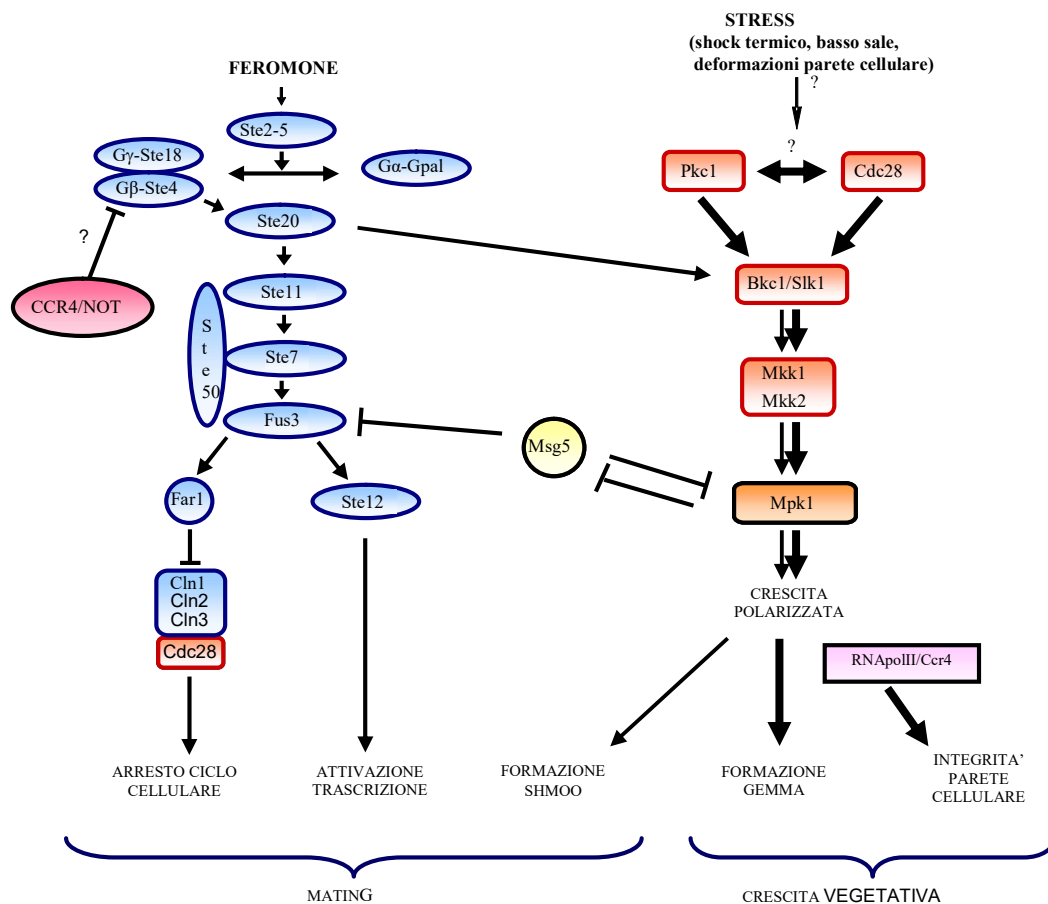
Il gene *NOT4*, di *S. cerevisiae*, è stato isolato durante uno screening per la ricerca di mutanti in grado di sopprimere il fenotipo di termosensibilità della mutazione *ste11-S626* e di sterilità a carico delle mutazioni *ste4* (Irie *et al.*, 1994; Leberer *et al.*, 1994) e *ste11* (Cade and Errede, 1994). Anche i geni *NOT2* (*CDC36*) e *NOT1* (*CDC39*) sono stati isolati in un simile screening (de Barros Lopes *et al.*, 1990). Da questi primi dati sulle proteine Notp è emerso un loro ipotetico ruolo come repressori basali della via di trasduzione indotta da feromone in condizioni di non induzione. Nella **Fig. 5** vengono mostrate questa via di trasduzione e la via strettamente correlata mediata da PKC1. I dati raccolti fanno ipotizzare un ruolo delle proteine Notp nella regolazione della attività della proteina Ste4p, la subunità  $\beta$  della proteina G trimerica, anche se non è chiaro se a livello trascrizionale o post-trascrizionale.

Gli studi in *S. cerevisiae* hanno dimostrato che questo gene non è essenziale poiché il mutante nullo ha un fenotipo di letalità condizionale (assenza di crescita a 37°C, crescita rallentata tra i 22 e i 30°C), ma la combinazione della mutazione *not4* con le mutazioni degli altri componenti del complesso, tranne *not2-1*, risulta letale (Maillet *et al.*, 2002).

Nella regione N-terminale di Not4p è presente il dominio RING-finger (motivo C<sub>4</sub> C<sub>4</sub> che coordina 2 atomi di zinco), comune a proteine che mostrano una attività di E3-ubiquitinligasi (Joazeiro and Weissman, 2000). Successivamente al RING-finger, sono presenti un dominio coiled coil, il quale sulla base del ripiegamento conformazionale media le

interazioni proteina-proteina ed è stato trovato mediare l'oligomerizzazione di complessi multiproteici (Burkhard *et al.* 2001), e un Pharm:rrm motivo che sembra essere necessario per il legame delle proteine all'RNA (Draper, 1999). L'attività di ligasi ubiquitinante è stata dimostrata *in vitro* per la proteina CNot4p umana (Albert *et al.*, 2002) e recentemente è stato dimostrato che possiede una elevata selettività di legame per l'enzima coniugante (E2) UbcH5B e non con altri enzimi coniuganti (Winkler *et al.*, 2004). L'importanza di questa attività nel complesso deve ancora essere definita. Potrebbe regolarne l'emivita o essere il mezzo che porta i substrati proteici alla ligasi ubiquitinante (Collart, 2003). È stato ipotizzato che potrebbe ubiquitinare fattori legati al promotore (Winkler *et al.*, 2004). Not4p è inoltre in grado di ubiquitinare se stessa (Albert *et al.*, 2002), fornendo forse così un meccanismo di regolazione a feedback, positivo o negativo (Winkler *et al.*, 2004). Tuttavia, ad oggi, i bersagli di Not4p non sono ancora noti.

Nell'uomo la proteina esiste in tre differenti forme, N, L e S, derivanti probabilmente da splicing alternativo, identiche nei primi 357 residui aminoacidici e differenti nella regione C-terminale. Il loro significato funzionale è sconosciuto (Albert *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Vie di trasduzione del segnale mediate dalla presenza di feromone che coinvolgono il complesso CCR4/NOT (Zarzov *et al.*, 1996; Leberer *et al.*, 1994).

## 1.6. Cascata di trasduzione del segnale mediata da PKC1.

Nel lievito aploide ci sono diverse vie di trasduzione dipendenti da MAP-chinasi (MAP:

Mitogen Activated Protein), che rispondono a differenti stimoli extracellulari e mediano le specifiche risposte delle cellule a questi stimoli.

Due di queste (**Fig.5**) sono la via del mating, attivata da feromone, che induce l'arresto del ciclo cellulare in G1 e i cambiamenti morfologici richiesti per il mating (Gustin *et al.*, 1998; Elion, 1998), e la via di integrità della parete cellulare mediata da PKC1/MPK1, attivata da stress ipotonico, shock termico o impedita sintesi della parete cellulare (Heinisch *et al.*, 1999), che regola la dinamica tra la parete cellulare e il citoscheletro di actina (Heinisch *et al.*, 1999; Schmidt and Hall, 1998).

La via di integrità della parete cellulare è sotto il controllo della proteina chinasi C (PKC) ed è composta da Bck1 (una MAPKKK), Mkk1 e Mkk2 (una MAPKK), e infine da Mpk1 (una MAPK).

L'arresto del ciclo cellulare e la ripolarizzazione della crescita cellulare nella formazione dello "shmoo" (una protuberanza sulla superficie cellulare a livello della quale avviene il contatto tra le due spore) verso la fonte del segnale di mating richiedono un rimodellamento della parete cellulare, un processo che dipende dalla cascata di trasduzione per l'integrità della parete cellulare (Buherer and Errede, 1997; Roberts *et al.*, 2000). La proteina Ste20p è il punto di collegamento tra le due vie del segnale.

Una recente pubblicazione dimostra un nuovo punto d'interazione: esiste una regolazione reciproca tra la chinasi Mpk1p e la fosfatasi Msg5p (Flández *et al.*, 2004). In assenza di feromone Msg5p defosforila Mpk1p e Fus3p inattivandole. In presenza di feromone la chinasi Ste20p attiva indirettamente Mpk1p la quale fosforila Msg5 inattivandola. La dinamica della regolazione non è comunque ancora chiara, poiché nulla è noto sulla regolazione Msg5-Mpk1 in presenza di stress di parete.

Poco è noto circa i meccanismi di trasduzione del segnale che coinvolgono le MAP chinasi in *K. lactis*. Sono state isolate le due chinasi omologhe a BCK1 e MPK1, rispettivamente *KIBCK1* e *KIMPK1*. Sorprendentemente il mutante *Klbck1* non mostra alcun fenotipo relativo a difetti di parete cellulare. Questo risultato può essere spiegato da una ridondanza funzionale nella via o dalla presenza di una via completamente diversa per questa cascata di chinasi in *K. lactis* (Jacoby *et al.*, 1999). Tuttavia, il mutante *Klmpk1* mostra sensibilità a caffeina e calcofluoro, suggerendo quindi simili funzioni della MAP chinasi tra *K. lactis* e *S. cerevisiae* (Kirchrath *et al.*, 2000).

## 1.7. Stress ossidativo

Sebbene necessario per la sopravvivenza degli organismi aerobi, l'ossigeno è un biradiale che acquistando elettroni può generare molecole tossiche, quali  $O_2^{\cdot -}$  (anione superossido),  $H_2O_2$  (perossido di idrogeno) e  $OH\cdot$  (radicale idrossilico), altamente reattive. Queste molecole, per successive reazioni, possono generare addizionali metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) causando danno ossidativo alle macromolecole biologiche (Stadtman, 2004).

Le cellule di un organismo cresciute in condizioni aerobie sono continuamente esposte a specie reattive dell'ossigeno (ROS) formatesi come sottoprodotto del metabolismo respiratorio e pertanto la principale fonte di ROS è la catena di trasporto degli elettroni. Un aumento dell'attività mitocondriale (shift diauxico, crescita in presenza di fonti di carbonio non-fermentabili) si riflette in un aumento della produzione di ROS. Le specie reattive dell'ossigeno possono essere prodotte anche in seguito all'esposizione delle cellule a diversi stress esterni come radiazioni, shock termico, etanolo, agenti ossidanti, alta osmolarità e si accumulano nelle cellule madri come prodotti di una respirazione che via via diventa meno efficiente. Allo stesso tempo i ROS sono utili negli organismi superiori poiché utilizzati nel sistema immunitario come difesa da patogeni.

In condizioni fisiologiche normali, i danni cellulari sono impediti da difese antiossidanti che neutralizzano i ROS (difese primarie) e riparano le molecole da essi danneggiate (difese secondarie). Tuttavia, in condizioni di stress eccessivo, la quantità di ROS prodotta supera le capacità antiossidanti della cellula la quale subisce così il danno ossidativo.

Diversi fattori di trascrizione regolano la risposta adattativa del lievito alle condizioni di stress: Msn2p e Msn4p mediano la risposta generale allo stress (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt and McEntee, 1996; Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Estruch *et al.*, 2000), mentre Yap1p, Skn7p (Schnell *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1999) Hsf1p (Raitt *et al.*, 2000) e Gis1p (Pedruzzi *et al.*, 2000) rispondono in modo più specifico. Il compito di questi fattori è indurre la trascrizione di geni che codificano enzimi antiossidanti. Esiste un'ampia gamma di proteine con tali proprietà, tra le quali ci sono Sod2p (Mn<sup>++</sup> superossido dismutasi mitocondriale) e Ctt1p (catalasi citosolica), indotte da differenti stress e comunemente regolate da Msn2/4p, Yap1p e Skn7p (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Hasan *et al.*, 2002). Oltre alla superossido dismutasi e alla catalasi, lo stress induce l'espressione di proteasi, chaperonine, proteine da shock termico (HSP) e importanti vie essenziali per la risposta allo stress come la via dei pentosi-fostato, il sistema della tioredossina e del glutatione.

La via dei pentosi-fostato è di grande importanza perché è la principale fonte di NADPH, il cofattore necessario per la riduzione del glutatione ossidato (GSSG) a glutatione ridotto (GSH), un processo catalizzato dalla glutatione-reduttasi NADPH-dipendente. Gli enzimi che catalizzano le due reazioni nelle quali viene rigenerato il NADPH sono la glucosio6-fosfato deidrogenasi (ZWF1) e la fosfogluconato deidrogenasi (GND1). È noto che mutanti dei geni che codificano per questi due enzimi mostrano una maggiore sensibilità al perossido di idrogeno (Juhnke *et al.*, 1996) ed inoltre è noto che l'attività della glucosio6-fosfato deidrogenasi si riduce nel mutante *yap1* (Schnell *et al.*, 1992). Yap1p e Skn7p sono i responsabili della trascrizione dei geni che codificano per proteine delle vie di detossificazione mediate da tioredossina e glutatione, Hsf1p è specifico per proteine indotte da shock termico (HSP) (Costa and Moradas-Ferreira, 2001) mentre Gis1p è specifico per geni indotti nella fase post-diauxica (Pedruzzi, *et al.*, 2000). In **Fig.6** sono mostrate le vie di trasduzione del segnale che regolano la risposta allo stress ossidativo e l'attivazione/repressione dei fattori sopra citati. In condizioni fisiologiche di cellule in crescita su glucosio, le vie Ras/PKA e Sch9 (**Fig.6A**) stimolano la crescita, la glicolisi e reprimono la resistenza allo stress, l'accumulo di glicogeno, la gluconeogenesi e tutti i geni necessari allo "switch" ipometabolico della fase stazionaria e dello stato dormiente della spora (Fabrizio and Longo, 2003). In carenza di glucosio i livelli di cAMP e dell'attività della chinasi PKA si riducono favorendo la attivazione dei fattori Msn2/4p (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Estruch *et al.*, 2000), Skn7p, Yap1p (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Hasan *et al.*, 2002) e Gis1p (Pedruzzi *et al.*, 2000) che attivano i geni necessari per la sopravvivenza nella fase post-diauxica.

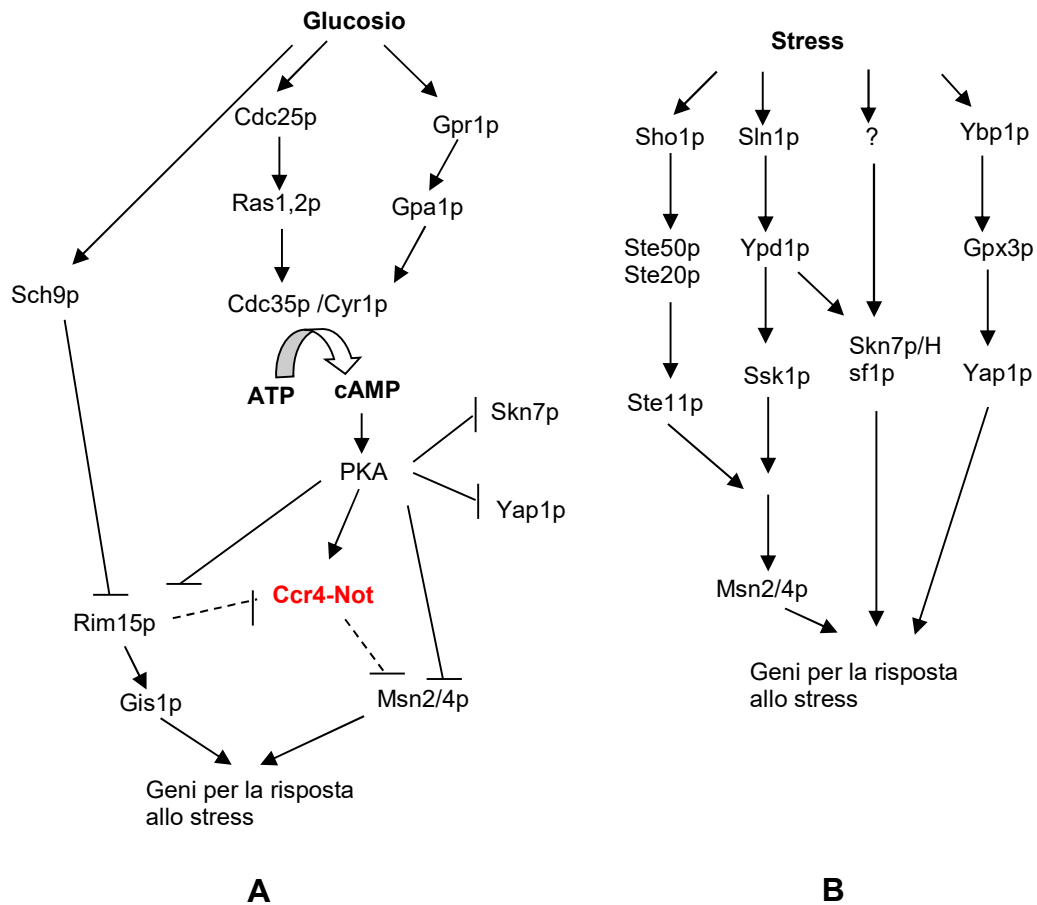
La riduzione della attività di PKA si verifica non solo in carenza di glucosio, ma anche durante l'esposizione a condizioni di stress pleiotropici. In queste condizioni la ridotta attività della via Ras/PKA e l'induzione di specifiche vie che regolano positivamente i geni da stress (**Fig.6B**) permettono alla cellula di rispondere efficacemente all'alterazione del suo stato fisiologico (Costa and Moradas-Ferreira, 2001).

### 1.7.1. Invecchiamento cellulare

Una comune caratteristica del ciclo vitale di tutti gli organismi cellulari è la perdita progressiva dell'efficienza di vari processi fisiologici con la perdita delle capacità proliferative. Le cause della perdita di funzione durante la senescenza cellulare sono attribuite all'accumulo di danno ossidativo (Harman, 1956; Stadtman, 2004).

Negli ultimi anni intense ricerche sono state condotte sull'invecchiamento cellulare in lievito (Jazwinski *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1999; Guarente and Kenyon, 2000; Fabrizio and Longo, 2003). Le somiglianze nei cambiamenti morfologici e fisiologici con le cellule di mammifero rendono il lievito un ottimo modello per lo studio dell'invecchiamento cellulare (Frohlich and Madeo, 2001).

L'invecchiamento in lievito è associato ad un ingrandimento della cellula e a un rallentamento del grado di gemmazione, comunemente misurato contando il numero di gemme generate da una singola cellula madre (life span replicativo) (Egilmez and Jazwinski, 1989; Sinclair, 1998). La senescenza replicativa può essere causata dall'accumulo di circoli di DNA ribosomale extracromosomico (ERC) nelle cellule madri (Sinclair *et al.*, 1997), il cui accumulo è inibito dal Sir2p, una deacetilasi istonica (Kaeberlein *et al.*, 1999). La restrizione



**Figura 6.** Regolazione della risposta allo stress. A) Vie che reprimono i geni per la risposta allo stress in condizioni fisiologiche B) Vie che inducono i geni per la risposta allo stress (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Fabrizio and Longo, 2003; Lenssen e al., 2002; Veal e al., 2003).

di calorie è noto estendere il life span replicativo in molti organismi, inclusi i mammiferi (Lin *et al.*, 2000), e questa estensione è mediata da Sir2p e da un aumento della attività respiratoria (Lin *et al.*, 2002). E' stato recentemente sviluppato un differente metodo per la misura dell'invecchiamento del lievito basato sulla longevità cronologica di una

popolazione di cellule di lievito che non si divide (life span cronologico) (Longo *et al.*, 1996; Fabrizio *et al.*, 2001; Longo and Fabrizio, 2002). Entrambi i tipi di life-span sono regolati dalla via di trasduzione Ras/PKA ma, mentre il life-span cronologico richiede i fattori Msn2/4 e Sod2 ed è associato all'aumentata resistenza allo stress, l'effetto di questa via sul life-span replicativo sembra indipendente dalla resistenza allo stress e dipendente solo da Sir2p. Perciò il life-span replicativo e cronologico sembrano essere regolati da due distinti meccanismi in parte sovrapposti (Fabrizio and Longo, 2003).

#### **1.7.1.1. Invecchiamento cronologico**

I lieviti e altri microrganismi si sono evoluti per sopravvivere in avverse condizioni comunemente incontrate nell'ambiente, come la carenza di nutrienti, condizione nella quale gli organismi vivono in una fase di metabolismo rallentato (Werner-Washburne *et al.*, 1996). L'uscita da questo periodo si verifica probabilmente solo quando sono disponibili tutti i nutrienti per la crescita (condizione assai rara nell'ambiente naturale). Per comprendere nel migliore dei modi le vie che regolano la longevità è importante riprodurre le condizioni nelle quali queste vie si sono evolute. E' per questo motivo che il life-span cronologico viene eseguito in terreno contenente una limitata quantità di nutrienti (terreno minimo) o addirittura in acqua. Quando il lievito è incubato in terreno minimo sopravvive per 6-7 giorni con un alto grado metabolico per poi morire in breve tempo: la crescita avviene rapidamente nelle prime 24-48h e quando è superata la transizione diauxica continua lentamente per circa 48h per poi arrestarsi. Tuttavia la sopravvivenza media di ceppi selvatici varia a seconda del contesto genico (Fabrizio and Longo, 2003). Al contrario, quando incubato in terreno ricco YPD, il lievito può sopravvivere per mesi in una fase stazionaria ipometabolica nella quale le cellule non si dividono e mostrano una elevata resistenza agli stress (Werner-Washburne *et al.*, 1996).

L'arresto della crescita (incapacità di formare colonie) che si verifica dopo la post-diauxica in terreno minimo è dovuto a morte cellulare (Fabrizio *et al.*, 2003) ed è stato dimostrato non dipendere dalla deplezione di riserve di nutrienti, dal momento che, se risospese in acqua, le cellule di lievito sopravvivono per un tempo maggiore che in terreno minimo (Fabrizio and Longo, 2003). E' sempre più crescente il numero di dati che dimostrano che l'arresto della crescita dipende dall'accumulo di danno ossidativo. Mutazioni nei geni *SCH9*, *CYR1*, *RAS2* aumentano la longevità e la resistenza allo stress (Fabrizio *et al.*, 2001; 2003) causando un ritardo nella inattivazione dell'aconitasi, bersaglio primario dell'anione superossido (Fabrizio *et al.*, 2001). La sovraespressione del gene *SOD2* aumenta la longevità in un ceppo selvatico e la sua inattivazione la riduce (Longo *et al.*, 1999). E' stato inoltre dimostrato che la morte cellulare nella fase post-diauxica è preceduta da danno mitocondriale: nelle cellule in fase di mortalità l'indice di competenza respiratoria risulta ridotto (Fabrizio and Longo, 2003) e nei mutanti *sod2* di lievito (Longo *et al.*, 1999) e topo (Melov *et al.*, 1998) è stato dimostrato che le attività dell'aconitasi e della succinato deidrogenasi (bersagli primari del superossido) sono notevolmente ridotte.

#### **1.7.2. Stress ossidativo e apoptosi in lievito**

L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata che svolge un importante ruolo nel normale sviluppo e nel controllo di una varietà di malattie in organismi pluricellulari (Steller *et al.*, 1995). L'apoptosi è caratterizzata da cambiamenti morfologici e strutturali che includono la condensazione della cromatina, la frammentazione nucleare, l'invaginazione della membrana, l'arrotondamento e rimpicciolimento della cellula, fenomeni che portano alla frammentazione della stessa in corpi apoptotici. Nonostante lo studio dell'intero genoma di *S. cerevisiae* non abbia mostrato la presenza di geni omologhi ad importanti attivatori (Bax) o repressori (Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub>) dell'apoptosi nei mammiferi,

recenti studi supportano la nozione che l'apoptosi avviene anche in *S. cerevisiae* (Frolich and Madeo, 2000; Madeo *et al.*, 2002). Evidenze sperimentali suggeriscono inoltre che lo stress ossidativo ha un ruolo principale nell'apoptosi di lievito (Costa and Moradas-Ferreira, 2001) e negli eucarioti superiori (Zhang and Herman, 2001). Colture cellulari di lievito invecchiate cronologicamente mostrano i tipici marcatori citologici dell'apoptosi, accumulano ROS e mostrano attivazione di caspasi (Herker *et al.*, 2004). Inoltre, è stato dimostrato che la sovraespressione in lievito della proteina umana Bcl2p, antiapoptotica e con proprietà antiossidanti, estende la longevità cronologica in ceppi selvatici e in mutanti *sod2* (Longo *et al.*, 1997).

Il lievito può quindi essere utilizzato come sistema modello di cellula eucariotica per caratterizzare i meccanismi della risposta allo stress ossidativo e per chiarire il suo ruolo nell'invecchiamento, nell'apoptosi e in malattie degenerative causate da mutazioni che aumentano la sensibilità allo stress ossidativo (Costa and Moradas-Ferreira, 2001).

### **1.7.3. Il complesso CCR4-NOT è un regolatore della risposta cellulare al glucosio e agli stress ossidativi.**

Un recente studio ha dimostrato che il complesso CCR4-NOT contribuisce alla regolazione di Msn2/4p attraverso la via di trasduzione Ras/cAMP (Lessen *et al.*, 2002), **Fig.6**, fornendo la prima evidenza che il complesso agisce come regolatore globale della espressione genica in risposta a specifici stimoli (Collart, 2003). Il meccanismo col quale il complesso contribuisce alla regolazione di PKA non è ancora stato definito, ma sembra coinvolgere modificazioni post-traduzionali di alcuni suoi componenti. Infatti, le due proteine Not3p e Not5p vengono fosforilate e diminuiscono in quegli estratti cellulari derivati da cellule sottoposte a segnali di stress (deplezione da glucosio durante lo shift diauxico e shock termico), i quali portano anche ad un'aumentata attività di Msn2/4p. E' stata dimostrata mediante saggi a due ibridi l'interazione tra Not3p e Not5p con la subunità catalitica di PKA, suggerendo quindi che queste due proteine possano essere bersaglio di fosforilazione da parte di PKA (Lessen *et al.*, 2002). Anche Caf1p risulta fosforilata in seguito a deplezione da glucosio durante lo shift diauxico, anche se ancora non è noto se questa possa dipendere da PKA (Moriya *et al.*, 2001). Inoltre, è stato dimostrato che Not4p è necessario alle cellule per adattarsi all'uso di differenti fonti di carbonio quando le cellule approdano allo shift diauxico, in particolare per la crescita su galattosio (Deluen *et al.*, 2002) e la repressione dipendente da Not1p è attivata durante lo shift diauxico (Lemaire *et al.*, 2000). Questi dati forniscono quindi l'evidenza che Ccr4-Not è funzionalmente attivo durante lo shift diauxico. Il quadro maturato dall'analisi dei dati ottenuti negli ultimi anni su questo complesso è il seguente: CCR4-NOT costituisce una piattaforma regolatrice per il controllo di molti macchinari cellulari che essenzialmente controlla il metabolismo degli mRNA; inoltre tale piattaforma è in grado di sentire i livelli dei nutrienti, gli stress e possibilmente altri segnali integrandoli con il metabolismo degli mRNA, in modo che la cellula sia pronta a rispondere in modo efficiente senza alterare troppo il suo stato funzionale (Collart, 2003; Collart and Timmers, 2004).

## **2. SCOPO della TESI**

---



Nell'ambito di un progetto di sequenziamento del cromosoma III di *K. lactis* è stato isolato un gene che presentava elevata omologia con il gene *NOT4* di *S. cerevisiae* che codifica una proteina del complesso CCR4-NOT. Questo complesso regola molti processi cellulari tra cui trascrizione, stabilità degli mRNA, mating type e integrità della parete cellulare. La sua multifunzionalità si riflette nella pleiotropicità dei fenotipi dei mutanti nei componenti del complesso (termosensibilità, resistenza ad aminotriazolo, sensibilità a caffeina, difetti di crescita su fonti di carbonio respirabili, etc.).

Nonostante numerosi fattori di regolazione siano conservati nei lieviti *K.lactis* e *S. cerevisiae*, è noto che questi possono svolgere ruoli differenti, probabilmente a causa delle differenze fisiologiche dei due lieviti.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di analizzare i fenotipi del mutante del gene *NOT4* di *K. lactis* e di confrontare i risultati ottenuti con il mutante *not4* di *S. cerevisiae*. La comparazione fisiologica è volta alla comprensione dell'esistenza di differenze funzionali della proteina Not4p in questi due lieviti. Lo studio ha riguardato in particolare la regolazione dei geni chiave del metabolismo fermentativo e respiratorio che costituisce una delle principali differenze tra i due lieviti.

Inoltre, la recente osservazione che il complesso CCR4-NOT in *S. cerevisiae* è coinvolto nella regolazione della risposta cellulare agli stress ha indirizzato lo studio verso la risposta dei mutanti *not4* e *ccr4* di *S. cerevisiae* allo stress ossidativo.

### **3. MATERIALI e METODI**

---

**Ceppi di lievito e condizioni di crescita.** I ceppi di lievito, elencati in **Tab. 2**, venivano cresciuti su terreno ricco YP (peptone 2%, estratto di lievito 1%) contenente differenti fonti di carbonio, come specificato nel testo.

I trasformanti erano selezionati su terreno minimo (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosio) supplementato con gli appropriati aminoacidi e nucleotidi alla concentrazione finale di 0,02mg/ml, in accordo col genotipo del ceppo usato. Quando indicati, l'antibiotico G418 e l'antimicina A erano aggiunti al terreno YP, alle concentrazioni finali rispettivamente di 100µg/ml e 5µM. Il terreno solido veniva supplementato con bactoagar al 2%. L'inibitore benomyl veniva preparato sciogliendo la polvere in dimetilsulfossido alla concentrazione dell'1%.

<b>Ceppo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referenza</b>
<b><i>K.lactis</i></b>		
CMK29	<i>MAT a/α ura3/ura3, leu2/LEU2 ade/ade, met, trp/TRP, lac4-8/ lac4-8</i>	Mazzoni and Falcone 2001
CMK37	Isogenic to CMK29 except <i>Klnot4Δ1::kanMX4</i>	Questo studio
CMK37-10B	<i>MAT α, ura3, ade, met, lac4-8, Klnot4Δ1::kanMX4</i>	Questo studio
CMK37-10Bw	Isogenico a CMK37-10B, <i>Kep6/KINOT4</i>	Questo studio
CMK37-10Bc	Isogenico a CMK37-10B, <i>pCXJ3/, Klnot4Δ2</i>	Questo studio
CMK37-10Bsc	Isogenico a CMK37-10B, <i>pCXJ18/ScNOT4</i>	Questo studio
CMK37-10Bm	Isogenico a CMK37-10B, <i>Kep6/KIMPK1</i>	Questo studio
<b><i>S.cerevisiae</i></b>		
BY4741	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
Y00207	Isogenico a BY4741 eccetto per <i>YER068w (NOT4)::kanMX4</i>	Collezione EUROSCARF
Y00387	Isogenico a BY4741 eccetto per <i>YAL021c(CCR4)::kanMX4</i>	Collezione EUROSCARF
YO3858	Isogenico a BY4741 eccetto per <i>YDL160c(DHH1)::kanMX4</i>	Collezione EUROSCARF
Y00207Kln	Isogenico a Y00207, <i>pRS416/KINOT4</i>	Questo studio
Y00207Kln2	Isogenico a Y00207, <i>pRS416/ Klnot4Δ2</i>	Questo studio
Y00207pFL	Isogenico a Y00207, <i>pFL44</i>	Questo studio
Y00207m	Isogenico a Y00207, <i>pFL44/MPK1</i>	Questo studio
BY4741pFL	Isogenico a BY4741, <i>pFL44</i>	Questo studio
BY4741m	Isogenico a BY4741, <i>pFL44/MPK1</i>	Questo studio

W303	<i>MAT</i> $\alpha$ <i>ura3-52, ade2-1, leu2-3_112, can1-100, his3-11, trp1<math>\Delta</math>2</i>	EUROFAN 1
W303 STRE- LacZ	<i>MAT</i> <i>a ura3-52, ade2-1, leu2-3_112, can1-100, URA3::STRE-LacZ, msn2::HIS3, msn4::TRP1</i>	Estruch and Carlson, 1993
ASY1	<i>MAT</i> <i>a/<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 ade2-1/ade2-1, leu2-3_112/leu2-3_112, can1-100, his3-11/msn2::HIS3, trp1-1/MSN4::TRP1, URA3::STRE-LacZ</i>	Questo studio
ASY2	Isogenico a <i>ASY1</i> eccetto per <i>ScNOT4/Scnot4::KanMX4</i>	Questo studio
ASY2-10B	<i>MAT</i> <i>a ura3-52, ade2-1, leu2-3_112, can1-100, leu2, , his3-11, trp1<math>\Delta</math>2</i>	Questo studio
ASY2-6D	<i>MAT</i> $\alpha$ <i>ura3-52, ade2-1, leu2-3_112, can1-100, MSN2::HIS3, MSN4::TRP1,</i>	Questo studio
ASY2-3C	Isogenico a <i>ASY2-10B</i> con <i>ScNOT4::KanMX4</i>	Questo studio
ASY2-10°	Isogenico a <i>ASY2-6D</i> con <i>ScNOT4::KanMX4</i>	Questo studio

**Tabella 2.** Ceppi di lievito utilizzati.

Il ceppo *DH5 $\alpha$*  di *Escherichia coli* veniva utilizzato per gli esperimenti di clonaggio e propagazione del DNA plasmidico. Tale ceppo presenta un'alta efficienza di trasformazione (106-107 cellule/ $\mu$ g di DNA) ed ha il vantaggio di essere *rec-*, per cui non presenta il rischio di riarrangiamenti dei vettori usati. I batteri venivano cresciuti a 37°C in terreno LB (0.5%estratto di lievito, 1%triptone, 1%NaCl) contenente l'antibiotico Ampicillina alla concentrazione finale di 100 $\mu$ g/ml.

**Metodi generali.** Le digestioni con enzimi di restrizione, ingegnerizzazione di plasmidi e altri comuni tecniche venivano eseguite in accordo con le procedure standard (Sambrook *et al.*, 1989). In **Tabella 3** sono elencati gli oligonucleotidi utilizzati in questa tesi.

Nome	Sequenza
AGN1	GTATTAGCGTGTTTAATG
AGN3	CGGTTTAGCAAGTGTAG
KIPGK1for	CACTGGTAAAAGAGTGTTTCATC
KIPGK1rev	CTGAATTTGGTAACAGCAGCC
KIENO1for	CCACCGAAAAGGGTACTTTC
KIENO1rev	GTTGGGTCTTAGCACCGGC
ScICL1for	GTCAACGAAAAATGCCTATCC
ScICL1rev	GGGTATAACACATCTTCCTGC
ScACS1for	GTGCTATGTCGCCCTCTGCCG
ScACS1rev	GGGGGCATGGAAAGCAACAG
ScACS2for	GACAATCAAGGAACATAAAGTAG

ScACS2rev	CGGGAAACCAAATCGACTCCG
Kl Cyc1-for	AATGCCAGCTCCATACAAGAAGG
KlCyc1-rev	CCGGGAAGGGTGAGATGG
ZWF1for	GGTGGCGAATTCTTCAATGTAC
ZWF1rev	GTAGCTGACCATCTTGAAGAAC
SOD2for	CTGCTACAGGAACGAAACCC
SOD2rev	CCCTGCGACTCTGGAGCCAG
CTT1for	CGTATCCCCTACTGCTACAC
CTT1rev	CTGGTATGGAGCGGCGTATG
GND1for	GCTGCAGTATTGTTCTGAGC
GND1rev	CCATCGATGATAATATCACCC
NOTforGFP	CCCCCGAATTCATGATGAATCCACACGTTCAAGAAAAT
NOTrevGFP	CCCCCGTCGACATTACCGGCGATAATTTTCCTTC
NOT4deltafor	CCTGGTCGATGATTATATCG
NOT4deltarev	CATTCGGATAAGAATTCCAAC
NOT45'	CGCTATAAAGTAGTATCACTG
NOT43'	CGAGTAAGCTAGCAGATGGC
CYC1_5'	ATGACTGAATTCAAGGCCGG
CYC1_3'	GAGAGCGACGATGAGAGTG
KIICL1for	ATGGTCTCCGTTAAGGCTTC
KIICL1rev	AATGTGGATACCGGCAGCTC
K2	TCATGCCCTGAGCTGCG

**Tabella 3.** Oligonucleotidi utilizzati. La sequenza è stata scritta nella direzione 5' ⇒ 3'.

La digestione del DNA veniva effettuata in un tampone specifico per ciascun enzima, utilizzando una unità di enzima per  $\mu\text{g}$  di DNA. La reazione avveniva alla temperatura alla quale ogni enzima esplicava la sua maggiore attività.

L'esito della digestione veniva controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio alla concentrazione finale dell'1%.

La corsa elettroforetica si effettuava ad un voltaggio costante tra 50 e 150 Volts nel tampone TBE (Tris base 89mM, acido borico 89mM, EDTA pH 8.3 2mM).

Il DNA era messo in evidenza mediante l'aggiunta di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nell'agarosio e irraggiamento con raggi U.V.

**Analisi della sequenza.** La sequenza veniva determinata manualmente con il metodo enzimatico (Sanger *et al.*, 1977).

La presenza del dominio coiled coil e della sequenza PEST sono state verificate per analisi al computer ai siti [www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) e [www.ch.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/](http://www.ch.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/), rispettivamente.

**Recupero dei frammenti di DNA da gel di agarosio.** I frammenti di DNA prodotti da digestione con enzimi di restrizione venivano separati tramite elettroforesi su gel di agarosio 1%. Le zone del gel contenente i frammenti di DNA da isolare, erano ritagliate e trattate con circa 3 volumi di una soluzione satura di idruro di sodio e incubate a 60°C per 5' al fine di fondere l'agarosio. Venivano poi aggiunti 5µl di Glassmilk, una sospensione commerciale di matrice silicea in acqua, e dopo incubazione in ghiaccio per 5 minuti, i campioni venivano centrifugati per 5 secondi a 14.000g. Il pellet così ottenuto era lavato 3 volte con 500µl di New Wash, una soluzione commerciale contenente etanolo, cloruro di sodio, Tris base ed EDTA a pH compreso tra 7 e 8,5. Il campione veniva successivamente risospeso in acqua e incubato a 60°C per 5 minuti al fine di consentire il distacco del DNA dalla matrice di Glassmilk. Dopo 30'' di centrifugazione a 14.000g veniva recuperato il supernatante contenente il DNA diluito in acqua.

**Ligazione.** La ligazione tra un frammento di DNA lineare ed un plasmide, digeriti così da creare estremità compatibili, avveniva utilizzando quantità di frammento e di vettore in un rapporto 3:1 ed aggiungendo 1µl di T4 DNA ligasi, tampone 10X (TrisHCl 20mM, EDTA 1mM, dithioerythritol 5mM, KCl 60mM, glicerolo 50%, pH7,5) di reazione della ligasi e portando a un volume di 20µl con acqua distillata. Questa miscela veniva lasciata a 18°C per 12-16 ore.

**Costruzione dei plasmidi e inattivazione dei geni *KINOT4* e *ScNOT4*.** I plasmidi utilizzati in questa tesi sono elencati in **Tabella 4**.

Plasmide	Marcatore	Inserito, estremità	Referenza
Kep6	URA3		Wesolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1996
Kep6- <i>KINOT4</i>	URA3	<i>KINOT4</i> , <i>Sau3A/Sau3A</i>	Banca genomica di <i>K.lactis</i>
pCXJ18	<i>URA3-CEN</i>		Chen, 1996
pCXJ18/ <i>ScNOT4</i>	<i>URA3-CEN</i>	<i>ScNOT4</i> , <i>XhoI/EcoRI</i>	Questo studio
pCXJ3	<i>URA3</i>		Chen, 1996
pCXJ3/ <i>KINot4Δ2</i>	<i>URA3</i>	<i>KINOT4</i> , <i>BamHI/BamHI</i>	Questo studio
pRS416	<i>URA3-CEN</i>		Sikorski and Hieter, 1989
pRS416/ <i>KINOT4</i>	<i>URA3-CEN</i>	<i>KINOT4</i> , <i>ClaI/BglIII</i>	Questo studio
pRS416/ <i>Klnot4Δ2</i>	<i>URA3-CEN</i>	<i>KINOT4</i> , <i>BamHI/BamHI</i>	Questo studio
pUG35	<i>C-FUS-GFP</i> <i>URA3</i>		Güldener and Hegemann, 2000
pNOT4-GFP	<i>C-FUS-GFP</i> <i>URA3</i>	<i>ScNOT4</i> , <i>Sall/EcoRI</i>	Questo studio

pFL44	<i>URA3</i>		Bonneaud <i>et al.</i> , 1991
pFL44- <i>SLT2/MPK1</i>	<i>URA3</i>	<i>ScMPK1</i>	Mazzoni <i>et al.</i> , 1993
Kep6- <i>KIMPK1</i>	<i>URA3</i>	<i>KIMPK1</i>	Kirchrath <i>et al.</i> , 2000
PKSII ( <i>E.coli</i> )	Amp		Stratagene
pKS/Klnot4Δ2	Amp	<i>KINOT4</i> , <i>BamHI/BamHI</i>	Questo studio
pFA6a- <i>KanMX4</i>	Amp		Wach <i>et al.</i> , 1994
pYElac112- <i>NOT4</i>	<i>LEU</i>		Gentilmente fornitoci da Martine Collart

**Tabella 4.** Plasmidi utilizzati.

Il frammento *BamHI/BamHI* di circa 2,2 Kbp, contenente il promotore e i primi 1215 nucleotidi di sequenza codificante del gene *KINOT4*, proveniente dal plasmide Kep6-*KINOT4* della banca genomica di *K.lactis*, veniva clonato nel sito *BamHI* del plasmide pKSII di *E.coli* e nel plasmide multicopia pCXJ3 di *K.lactis* per ottenere i plasmidi pKS/Klnot4Δ2 e pCXJ3/Klnot4Δ2 rispettivamente. Il plasmide pCXJ18/ScNOT4, contenente il gene *ScNOT4* e il suo promotore veniva ottenuto clonando il frammento *XhoI/EcoRI* di circa 3,3Kbp proveniente dal plasmide pYElac112-*NOT4* nei siti *SalI/EcoRI* del plasmide centromerico pCXJ18 di *K.lactis*.

Il frammento *HincII/HincII* di circa 1,4Kbp derivato dal plasmide pFA6a-*KanMX4* e contenente il gene *kanMX4*, veniva clonato nel sito *EcoRV* di pKS/*Klnot4Δ2* per ottenere il plasmide pKS/*Klnot4Δ1::KanMX4*. In tal modo la sequenza di lettura aperta di *KINOT4* è stata interrotta 174 bp dopo il codone di inizio ATG. Il frammento lineare *Klnot4Δ1::kanMX4* era amplificato per PCR usando gli oligonucleotidi AGN1 e AGN3 e poi usato per distruggere il gene *KINOT4* nel ceppo diploide *CMK29*. Dopo ripetute crescite su terreno non selettivo, i trasformanti stabili erano selezionati su piastre di YPD contenenti l'antibiotico G418, e la corretta integrazione della cassetta al locus cromosomico di *KINOT4* verificata tramite Southern blot.

I plasmidi pRS416/*KINOT4* e pRS416/*Klnot4Δ2* venivano ottenuti clonando i frammenti di 4,0 Kbp *ClaI/BglIII* e 2,1 Kbp *BamHI/BamHI*, derivati da Kep6-*KINOT4*, nei siti *ClaI/BamHI* e *BamHI*, rispettivamente, del plasmide centromerico pRS416 di *S. cerevisiae*. Il plasmide pNOT4-GFP veniva ottenuto clonando il frammento *EcoRI/SalI* contenente l'intera ORF del gene *ScNOT4*, dal codone di inizio ATG al codone di stop TAA, nel plasmide pUG35, digerito *EcoRI/SalI*. Il frammento *EcoRI/SalI* era stato amplificato per PCR utilizzando gli oligonucleotidi NOT4GFPfor e NOT4GFPprev.

Il plasmide multicopia pFL44-*SLT2/MPK1* conteneva l'intero gene *SLT2/MPK1* di *S. cerevisiae* ed il suo promotore; il plasmide Kep6-*KIMPK1*, gentilmente fornitoci da Heinisch J.J., proveniva dalla banca genomica di *K. lactis*.

Una cassetta di circa 2,3Kbp contenente il gene *KanMX4* fiancheggiato da circa 300pb a monte e 300pb a valle di sequenza extragenica del gene *ScNOT4* veniva amplificata tramite PCR, a partire dal DNA totale estratto dal ceppo *not4*, per mezzo degli oligonucleotidi NOT4deltafor e NOT4deltarev. Questa cassetta veniva utilizzata per la inattivazione del gene *NOT4* nel ceppo diploide ASY1. Dopo ripetute crescite su terreno non selettivo, i trasformanti stabili erano selezionati su piastre di YPD contenenti l'antibiotico G418, e la corretta integrazione della cassetta al locus cromosomico di *ScNOT4* veniva verificata per PCR utilizzando le due coppie di oligonucleotidi NOT45'/NOT43' e NOT43'/K2.

**Trasformazione di *E. coli*.** Preparazione cellule competenti. Le cellule di *E. coli* venivano cresciute in 40 ml di terreno LB fino ad una densità ottica di circa OD<sub>600</sub> 0,3. Quindi venivano raccolte tramite centrifugazione, lavate con H<sub>2</sub>O sterile fredda una volta e

quindi risospese in una soluzione di  $\text{CaCl}_2$  50mM sterile fredda e lasciate per 30' in ghiaccio. Le cellule venivano raccolte per centrifugazione e risospese in 4ml di una soluzione di  $\text{CaCl}_2$  50mM e glicerolo 60%. Trasformazione delle cellule competenti. 10-50ng di DNA plasmidico venivano aggiunti a 150 $\mu\text{l}$  di cellule competenti e la sospensione veniva lasciata in ghiaccio per 40'. Successivamente le cellule subivano una shock termico a 42°C per 3' venivano lasciate a temperatura ambiente per 10'. Quindi la sospensione veniva diluita con terreno liquido LB e incubata per 30' a 37°C. Dopo il ricovero le cellule venivano piastrate su terreno solido LBA, contenente l'antibiotico ampicillina. La comparsa dei trasformanti veniva registrata dopo 1 giorno di crescita a 37°C.

**Estrazione di DNA plasmidico da *E. coli*.** 1.5ml di terreno LB contenente ampicillina venivano seminati con una singola colonia batterica contenente il plasmide di DNA voluto. Dopo la crescita a 37°C per 14-16 ore, le cellule venivano raccolte in centrifuga per 2' a 14000g.

Il supernatante veniva allontanato ed il pellet cellulare risospeso in 100 $\mu\text{l}$  di soluzione I (glucosio 20%, TrisHCl pH 8,0 25 mM, EDTA 10 mM).

Venivano quindi aggiunti 200 $\mu\text{l}$  della soluzione II (NaOH 200mM, SDS 1%) e 150 $\mu\text{l}$  della soluzione III (CH<sub>3</sub>COOK 3M, CH<sub>3</sub>COOH 11.5%).

Dopo centrifugazione per 10 minuti a 14000g, veniva recuperata la fase liquida e a quest'ultima venivano aggiunti due volumi di etanolo 95° per precipitare gli acidi nucleici. I campioni venivano centrifugati ed il pellet risospeso in 40 $\mu\text{l}$  di TE (TrisHCl pH 7.5 10mM, EDTA pH 8.0 1mM) a cui veniva aggiunto 1 $\mu\text{l}$  di una soluzione di RNasi A 2mg/ml al fine di rimuovere l'RNA. L'identificazione del plasmide ricombinante avveniva mediante digestione con enzimi di restrizione di 1  $\mu\text{l}$  della soluzione di DNA estratto e successiva elettroforesi su gel di agarosio 1%.

**Trasformazione di lievito.** Le cellule venivano inoculate in terreno YPD e lasciate crescere fino ad una densità ottica  $\text{OD}_{600}=0,8-1,0$ . Le cellule venivano raccolte tramite centrifugazione a 4000rpm per 5 minuti, lavate in H<sub>2</sub>O sterile a 4°C per 2 volte, in sorbitolo 1M una volta e infine risospese in sorbitolo 1M ad una concentrazione di circa  $3 \times 10^{10}$  cellule/ml. 50 $\mu\text{l}$  della sospensione cellulare venivano aggiunti a 10ng di DNA plasmidico e trasferiti in una cuvetta per elettroporazione da 0.2cm fredda. Si procedeva quindi alla trasformazione tramite elettroporazione (Apparato BioRad) nelle seguenti condizioni: 25mF, 1.5KV, 200W (costante di tempo 4,5msec). Dopo l'elettroporazione veniva aggiunto 1ml di terreno YPD quindi la sospensione veniva incubata per 2-3 ore alla temperatura permissiva specifica del ceppo. Infine, le cellule venivano centrifugate ed il pellet cellulare risospeso in 100 $\mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O sterile. Si procedeva quindi a piastare le cellule trasformate su piastre YPD + G418 oppure su piastre di terreno minimo private della specifica auxotrofia di selezione.

**Estrazione di DNA genomico da lievito.** 5ml di terreno YPD venivano inoculati con il ceppo in esame lasciato crescere fino ad una densità ottica di circa  $10^8$  cellule/ml. Le cellule venivano raccolte mediante centrifugazione, lavate una volta con TE e risospese in 0.2ml di tampone di estrazione (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, TE pH 8.0). A questa sospensione venivano aggiunti 0.2ml di PCI (fenolo/CHCl<sub>3</sub>/alcol isoamilico in proporzioni 25:24:1 rispettivamente), 0.3gr di biglie di vetro (0.45mm di diametro) e si agitava su vortex per la rottura meccanica delle cellule (4 minuti). Al termine della rottura cellulare si aggiungevano 0.2ml di TE e, dopo centrifugazione, si recuperava la fase acquosa. Su quest'ultima si effettuava una estrazione con fenolo e alla fase acquosa



venivano aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto per precipitare gli acidi nucleici. Dopo centrifugazione a 14000g il precipitato veniva risospeso in una soluzione di TE e RNasi.

**Incrocio e dissezione delle tetradi.** In *K. lactis* l'incrocio avveniva miscelando insieme i due ceppi aploidi su piastre ME (Estratto di Malto) e incubandoli alla temperatura permissiva per 1-2 giorni. Quindi si procedeva con la replica plating per la selezione del diploide su terreno selettivo. I ceppi diploidi venivano fatti sporulare depositando una goccia di coltura su piastra ME. La piastra era lasciata alla temperatura permissiva per circa 2-3 giorni. In *S. cerevisiae* l'incrocio è stato eseguito ponendo le due cellule dei due ceppi aploidi l'uno accanto all'altra su terreno YPD con l'ausilio del micromanipolatore. La formazione dello zigote si osservava dopo 4-6h di incubazione alla temperatura di crescita. Quindi si lasciava riprodurre il diploide fino alla comparsa della colonia. Per la sporulazione il diploide veniva inoculato in 1 ml di KCOOH 1% e incubato per circa tre giorni alla temperatura permissiva in agitazione.

Le cellule venivano quindi osservate al microscopio per identificare le strutture ad asco indice dell'avvenuta sporulazione. Si procedeva alla digestione della parete dell'asco mescolando 30 $\mu$ l di YPD, 5 $\mu$ l dell'enzima glusulasi e stemperandovi una colonia di lievito. Si incubava 15' a temperatura ambiente e poi si bloccava la reazione di digestione aggiungendo 500 $\mu$ l di acqua sterile fredda e mettendo subito in ghiaccio.

Infine, si faceva colare una goccia di questa soluzione (circa 10 $\mu$ l) su una piastra YPD e si procedeva alla dissezione mediante micromanipolatore.

**Life span cronologico.** Tutti gli esperimenti venivano eseguiti in terreno minimo contenente glucosio al 2% e supplementato degli aminoacidi e dei nucleotidi relativi al genotipo dei ceppi analizzati. I ceppi venivano inoculati in fiasche di terreno minimo con un rapporto volume/terreno di 5:1 e cresciuti a 28°C con agitazione a 175 rpm circa. Per misurare la vitalità cellulare ci si avvaleva del test delle microcolonie (vedi avanti). La misura della vitalità veniva sempre accompagnata dalla misura della densità cellulare mediante lo spettrofotometro (la densità massima raggiunta era di OD<sub>600</sub> = 1,0, ma variava in base al ceppo).

**Trattamento con perossido di idrogeno.** Cellule in crescita su terreno massimo in fase pre-esponenziale (YPD) venivano trattate per 4h a 28°C in agitazione (175rpm) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alle concentrazioni specificate nel testo e la vitalità veniva misurata con il test delle microcolonie.

**Determinazione della vitalità cellulare tramite il test delle microcolonie.** (Mazzoni *et al.*, 2001) 5  $\mu$ l di sospensione cellulare, diluita in modo da avere circa 6X10<sup>6</sup> cellule/ml, venivano depositate su un sottile strato di YPD colato su un vetrino. La goccia di coltura veniva ricoperta con un vetrino coprioggetto i cui bordi venivano sigillati con smalto per impedire l'essiccamento del terreno. I vetrini venivano incubati alla temperatura permissiva per 1-2gg. Al termine dell'incubazione si contavano al microscopio ottico (400X) su un totale di circa 300 cellule quelle che erano state in grado di formare microcolonie e, quelle che non lo erano. Il rapporto tra il numero di cellule vive contate e il numero totale di cellule forniva la percentuale di cellule vitali.

**Amplificazione del DNA tramite PCR.** La amplificazione veniva eseguita alle seguenti concentrazioni finali:

- DNA 1  $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM

- Tampone PCR II 10X
- dNTP 250  $\mu$ M
- Oligo 1 pmole/ $\mu$ l
- Taq polimerasi 2.5 U/ $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O dd fino a volume di 30  $\mu$ l

I dNTP, il tampone PCR II, il MgCl<sub>2</sub> e la Taq polimerasi sono forniti nel kit “Gene Amp” dalla Perkin Elmer Cetus. La temperatura di appaiamento variava sulla base della T<sub>m</sub> della coppia di oligonucleotidi utilizzati nell’esperimento e il tempo di allungamento (alla T 72°C) variava in base al numero di coppie di basi del frammento da amplificare. Gli oligonucleotidi impiegati sono riportati nella Tab. 2.

**Marcatura “random priming” del DNA.** Circa 25ng del frammento di DNA da marcare venivano denaturati per 5 minuti a 95°C ed immediatamente incubati in ghiaccio. Ad esso venivano aggiunti:

- 3 $\mu$ l di una miscela di dGTP, dCTP, dTTP (11 di una soluzione 0,5mM di ognuno).
- 2 $\mu$ l della miscela di reazione contenente gli esanucleotidi in un tampone di reazione 10X.
- 1 $\mu$ l pari a 10Ci di <sup>32</sup>P dATP.
- 1 $\mu$ l di enzima Klenow (2unità/l in glicerolo 50%).

Si portava la soluzione a un volume finale di 20 $\mu$ l con acqua distillata. Si incubava per 30 minuti a 37°C. La reazione veniva poi bloccata aggiungendo 2 $\mu$ l di EDTA 0,5M pH 8 e/o riscaldando a 65° C per 10 minuti.

La sonda veniva quindi purificata utilizzando colonnine Sephadex G50, utilizzando STE per eluire la sonda. Il frammento recuperato veniva conservato a -20°C.

**Southern blot.** Il DNA totale opportunamente digerito veniva separato mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%. Quindi si colorava il gel con EtBr e si illuminava con i raggi U.V. per osservare la migrazione del DNA. Il gel veniva quindi trattato con una soluzione di HCl 0,25M e successivamente veniva lavato per due volte con 250ml di soluzione denturante (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) per 15 minuti e due volte con la soluzione neutralizzante (NaCl 1,5M; Tris-HCl 0,5M pH 7,2; EDTA 0,001M) per 20 minuti. Il gel veniva posto su due fogli di carta Whatmann 3MM di dimensioni maggiori del piano di appoggio del gel in modo che le estremità fossero immerse nel tampone 20X SSC (3M NaCl, 0,3M Nacitrato).

Sul gel veniva successivamente appoggiata una membrana di nylon (Amersham Hibond C) ricoperta da tre fogli di carta Whatmann 3MM e fogli di carta assorbente. In questo modo il tampone SSC20X, migrando per capillarità, trasportava il DNA dal gel al filtro.

Il trasferimento avveniva per un tempo compreso tra le 12 e le 14 ore, trascorse le quali il DNA veniva fissato sulla membrana attraverso irraggiamento con raggi ultravioletti (UV) per 2 minuti.

Dopo preibridazione a 65° C per 1 ora, in una soluzione contenente SSC6X, SDS5%, soluzione di Denhardt’s5X (Denhardt’s 100X: BSA2%, ficoll2%, polivinilpirrolidone2%), il filtro veniva posto ad ibridare per 12 ore a 65°C in una soluzione di composizione identica a quella di preibridazione a cui era stata aggiunta la sonda radioattiva. Prima dell’aggiunta della sonda, questa veniva denaturata 5’ a 95°C. Trascorso il tempo necessario, il filtro veniva lavato per due volte a 65° C per 15 minuti in una soluzione SSC2X e successivamente trasferito in una soluzione SSC2X contenente SDS 0,1% e lavato una volta a 65° C per 30 minuti.

Un ulteriore lavaggio veniva effettuato in una soluzione SSC0,1X per 15 minuti a 65° C. Il filtro, una volta essiccato, veniva sottoposto ad autoradiografia con lastre Kodak e schermo intensificatore a -70°C. La durata dell’esposizione veniva di volta in volta stabilita in

funzione del livello di radioattività rilevabile sul filtro, misurata mediante un contatore geiger manuale.

**Estrazione di RNA totale da lievito.**  $4 \times 10^8$  cellule cresciute per 16-18 ore su terreno liquido venivano centrifugate, lavate con 1 ml di acqua sterile fredda e risospese in provette Eppendorf con 0.2 ml di una soluzione contenente 0.5M NaCl, 0.2M Tris/HCl pH 7.5, 0.01M EDTA e 1% SDS. Le cellule venivano rotte meccanicamente per agitazione su vortex per 2 minuti e 30 secondi, dopo aggiunta di 0.4g di palline di vetro e 0.2ml di PCI (fenolo, cloroformio, alcol isoamilico nelle proporzioni 25:24:1) ad ogni campione. Le palline di vetro erano preparate in precedenza per 2 ore con HNO<sub>3</sub> concentrato, lavandole ripetutamente con acqua ed asciugandole in stufa.

Venivano poi aggiunti altri 0.3 ml di PCI, si riagitavano in vortex i campioni per 30 minuti e, dopo centrifugazione per 10 secondi a 12000rpm, veniva prelevata la fase acquosa; il trattamento con fenolo era ripetuto sull'estratto.

L' RNA veniva quindi precipitato con etanolo contenente 0.05% di dietil pirocarbonato (aggiunto per inattivare l'eventuale attività Rnastica residua che può riattivarsi dopo la rimozione del fenolo), centrifugato per 1 minuto a 14000rpm, lavato con 500µl di etanolo 80% e risospeso in 50µl di acqua.

Dopo la quantizzazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260nm, 15µg di RNA di ogni campione venivano caricati su gel denaturante (formaldeide 15,7%, MOPS 1X, agarosio 1%) contenente formaldeide in tampone di corsa costituito da MOPS 1X (MOPS10X: acido morfolino propan solfonico 20mM, acetato di sodio 50mM, EDTA 10mM).

**Northern blot.** Dopo elettroforesi il gel veniva posto su due fogli di carta Whatmann 3MM di dimensioni maggiori del piano di appoggio del gel in modo che le estremità erano immerse nel tampone SSC20X (NaCl 3M, Sodio Citrato 0.3M).

Sul gel venivano successivamente appoggiati una membrana di nitrocellulosa (bagnata in una soluzione di SSC 2X), 3 fogli di carta 3MM ed una grande quantità di fogli di carta assorbente, il tutto di dimensioni uguali o leggermente maggiori di quelle del gel.

Il trasferimento avveniva per un tempo compreso tra le 12 e le 14 ore, trascorse le quali l'RNA veniva fissato sulla membrana in stufa a 80°C per 1 ora e 30 minuti.

Dopo preibridazione a 42°C in una soluzione contenente SSC 2X, SDS 0.5%, soluzione di Denhardt's 5X (Denhardt's 100X: BSA 2%, ficoll 2%, polivinilpirrolidone 2%), si procedeva ad ibridazione overnight a 45°C in una soluzione di composizione identica a quella di preibridazione alla quale era stata aggiunta la sonda radioattiva.

Il filtro subiva quindi due lavaggi a 45°C per 15 minuti in una soluzione SSC 2X e un terzo lavaggio in una soluzione SSC 2X addizionata di SDS 0.1% 42°C per 10 minuti.

Un ulteriore lavaggio veniva effettuato in una soluzione SSC 0.1X per 15 minuti a 42°C.

Il filtro, una volta essiccato, veniva sottoposto ad autoradiografia con lastre Kodak e schermo intensificatore del segnale Biomax a -70°C.

La durata dell'esposizione veniva stabilita in funzione del livello di radioattività rilevabile sul filtro, misurata mediante un contatore geiger manuale.

Le sonde *ScACSI*, *ScACS2*, *ScICLI*, *5S*, *ScCYCI*, *ScZWF1*, *ScGND1*, *ScSOD2*, *ScCTT1*, *ScHXT1*, *KIACSI*, *KIACS2*, *KIICLI*, *KICYCI*, *KIACT1*, *KIENO1* e *KIPGKI* furono ottenute da amplificazione con PCR i cui oligonucleotidi (elencati in **Tab.4**) corrispondevano alla sequenza codificante.

La sonda *RAG1* era un frammento di estremità *AvaII/HindIII* di 3,1Kpb contenente l'intero gene e circa 1000pb della sequenza 5' a monte, ottenuto dal plasmide PK1-*RAG1* (Saliola and Falcone, 1995). La sonda *KIPDC1* era un frammento di circa 0,4Kpb di estremità *EcoRI/SalI* localizzato all'interno della ORF (Bianchi e al., 1995). La sonda per l'actina

era un frammento di 1,3Kpb di estremità HindIII, contenente parte dell'introne e l'esone 2 del gene *KLACT1* (Deshler *et al.*, 1989).

La sonda *KINOT4* era un frammento di estremità *EcoRV/XbaI* di circa 400pb contenente i primi 173 nucleotidi della ORF.

La sonda *SLT2/MPK1* è costituita da un frammento di 2,2Kbp di estremità *KpnI/NotI* ottenuta dalle digestione con enzimi di restrizione nel plasmide pFL44-*SLT2/MPK1*.

Gli RNA dei geni *Sc5S*, *KLACT1*, *18S* e *25S* venivano utilizzati per la normalizzazione degli RNA, sia in *K. lactis* che in *S. cerevisiae*.

**Estrazione totale di proteine in condizioni denaturanti.** Cellule cresciute una notte venivano centrifugate e il pellet risospeso in 200µl di una soluzione di NaOH 2M/ 2-β-mercaptoetanolo 0,5% per volume. Si lasciavano in ghiaccio per 10' quindi si aggiungevano 40µl di TCA (acido tricarbossilico) al 50% (per 200 µl di NaOH 2M/ 2-β-mercaptoetanolo 0,5%). Si lasciava ancora 10' in ghiaccio. Si centrifugava a 13000 rpm per 15'. Il pellet di proteine veniva risospeso in tampone di caricamento con vortex e quindi bollito per 5-10' e caricato su gel per la corsa elettroforetica, oppure poteva essere conservato a -20°C. (Ossig e al., 1991)

**Separazione elettroforetica delle proteine in condizioni denaturanti.** Le proteine totali estratte da cellule di lievito venivano separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliaccrilammide al 10% (stacking 5% in Tris Base pH 6.8). Il tampone impiegato nella corsa era così composto: Tris base 25mM, glicina 250mM, SDS 0,1%. 4µl dell'estratto totale venivano diluite con 5µl di tampone di caricamento (Tris HCl pH6.8 50 mM, SDS2%, glicerolo 10%, 2-β-mercaptoetanolo 10%, blu di bromofenolo 0.1%), bollite per 5' e caricate su minigel. La corsa veniva effettuata a temperatura ambiente per circa 1h ad amperaggio costante di 25mA per gel in un apparato per elettroforesi Biorad Mini Protean II.

**Western blot.** Il gel di acrilammide contenente le proteine separate viene posto a contatto con un foglio di nitrocellulosa di identiche dimensioni. Gel e membrana vengono poste tra due spugnette all'interno di un apparato di trasferimento per elettro-blotting della BioRad. Il trasferimento avveniva a 4°C per 1h a 300mA in tampone di trasferimento (Tris 25mM, glicina 192mM, metanolo 20%). Dopo il trasferimento le proteine venivano fissate alla membrana incubando questa in una soluzione di PBS e BSA 1% per almeno 1h, al fine di saturare i siti aspecifici. Quindi si procedeva all'ibridazione con l'anticorpo primario diluito 1:4000 per una notte a 4°C in PBS e BSA1%. Dopo l'ibridazione l'anticorpo primario veniva recuperato e la membrana veniva lavata in una soluzione di PBS e Tween20 allo 0.1% per tre volte. Si ibridava con anticorpo secondario, coniugato alla perossidasi, diluito 1:10000 in PBS e Tween20 0,1% per 1h a temperatura ambiente. Si procedeva con 3 lavaggi con PBS e Tween20 0,1%. Si preparava la soluzione di rivelazione miscelando parti uguali di una soluzione di perossido stabile e una di luminolo (tenuta al riparo dalla luce). Si incubava la membrana di nitrocellulosa con la soluzione per 5'. Quindi si rimuoveva il liquido e si avvolgeva la membrana con pellicola trasparente. A questo punto si procedeva con l'esposizione delle lastre (che variava da 1'' a 15') e al loro sviluppo.

Anticorpo primario: ANTI-GFP, miscela di due anticorpi monoclonali di topo, cloni 7.1 e 13.1 (subtipo mouse IgG-1K), diretto contro la molecola GFP (Roche). Anticorpo secondario: ANTI-MOUSE (IgG-POD), diretto contro anticorpo di topo (Roche).

**Microscopia a fluorescenza.** Colorazione con calcofluoro. Il calcofluoro lega la chitina della parete cellulare e fluoresce quando irradiato con raggi UV. Le cellule cresciute in fase esponenziale venivano fissate in formaldeide 3.7% e colorate con calcofluoro bianco per determinare la localizzazione della chitina (Pringle, 1991).

Colorazione con DHR (diidrorodamina 123). La diidrorodamina viene ossidata a rodamina da agenti ossidanti, una molecola altamente fluorescente. Le cellule venivano incubate per 1-2h in presenza di diidrorodamina 123 (Sigma D1054) alla concentrazione di 5 µg/ml e quindi osservate al microscopio. Una colorazione rossa indicava l'accumulo di danno ossidativo all'interno delle cellule (Madeo *et al.*, 1999).

Colorazione DAPI (4',6'-Diamino-2-fenil-indolo) *in vivo*. Il colorante DAPI lega le molecole di DNA formando complessi altamente fluorescenti. Cellule in fase esponenziale venivano trattate con colorante DAPI alle concentrazione finale di 2,5µg/ml e incubate in agitazione alla temperatura di crescita al riparo dalla luce fino al momento dell'osservazione al microscopio.

Colorazione DASPMI (2-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide) *in vivo*. Il colorante DASPMI lega le membrane mitocondriali attive. Cellule in crescita esponenziale cresciute in terreno contenente glucosio venivano trattate con il colorante alla concentrazione finale di 20µM (Bereiter-Hann, 1983).

**Saggio delle capacità respiratorie.** Il saggio veniva eseguito su colonie di lievito cresciute su una fonte di carbonio respirabile. Si preparava una soluzione di agar all'1% raffreddata alla temperatura di 50-55°C alla quale si aggiungevano 30µl di una soluzione 2000X di TTC (triphenil tetrazolium chloride, 1g in 5ml di H<sub>2</sub>O distillata; conservata al riparo dalla luce) e 4ml di tampone fosfato 1M pH7.4. Si versava la soluzione ancora liquida sulle piastre con le colonie. Si aspettava la solidificazione dell'agar, quindi si incubava al buio a temperatura ambiente fino a comparsa della colorazione rosa-rosso (10-20 minuti). Il tetrazolium accetta elettroni dalla catena di trasporto degli elettroni mitocondriale convertendosi in un composto rosa che conferisce alla colonia una colorazione rossa. L'intensità del colore rosso è proporzionale al grado di respirazione. L'assenza di colorazione indicava assenza di respirazione.