

4. RISULTATI I PARTE

Analisi fenotipica dei mutanti *not4* in *S. cerevisiae* e *K. lactis*

In questa prima parte della tesi vengono analizzati i fenotipi pleiotropici derivanti dalla inattivazione del gene *KINOT4* in *Kluyveromyces lactis* e confrontati con quelli del mutante *not4* del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, allo scopo di mettere in evidenza differenze funzionali della proteina Not4p nei due lieviti.

4.1. Isolamento e analisi della sequenza aminoacidica del gen *KINOT4*

Il gene *KINOT4* di *K. lactis* è stato identificato e successivamente isolato durante il sequenziamento della regione del cromosoma III vicina al gene *ARG 5,6*.

Il gene codifica una putativa proteina di 574 aminoacidi (KINot4p) che mostra un'identità (Fig.7) del 52% con la corrispondente proteina di *S. cerevisiae* e del 32% con la proteina

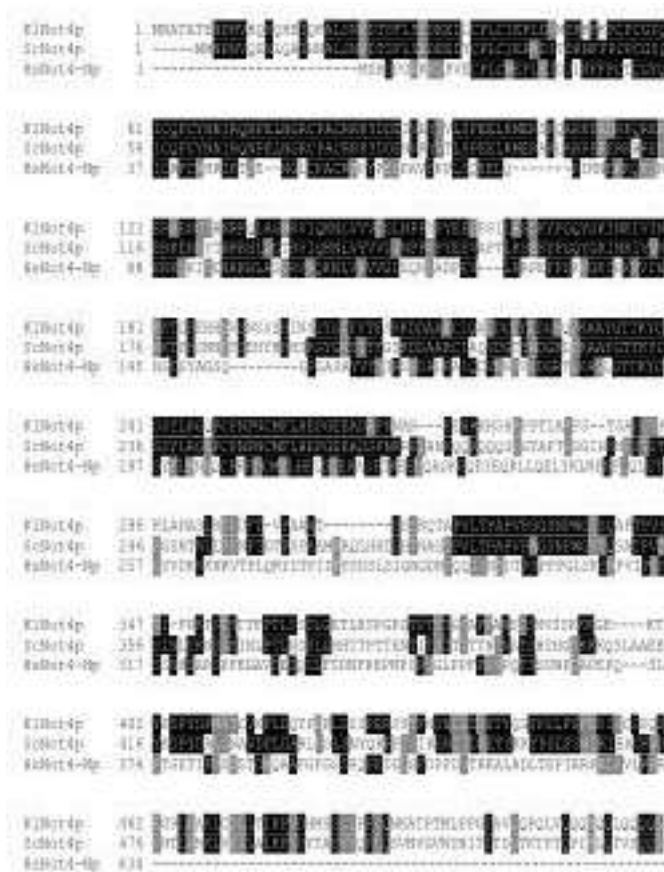


Figura 7. Allineamento delle proteine Not4p di *K. lactis*, *S. cerevisiae* e *H. sapiens*. Come proteina umana è stata analizzata l'isoforma N poiché è quella più studiata nell'ambito del complesso CCR4-NOT umano (Albert *et al.*, 2000; Hanzawa *et al.*, 2001). Lo sfondo nero indica gli aminoacidi identici, lo sfondo grigio indica gli aminoacidi simili.

umana.

La maggiore omologia si osserva nella metà N-terminale dove sono presenti i domini funzionali (Fig.8) che maggiormente sono stati conservati nel corso dell'evoluzione. Infatti la proteina KINot4p conserva il dominio RING-finger C₄C₄, responsabile dell'attività di E3-ubiquitin-ligasi (Albert *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2004), e il successivo dominio coiled-coil il quale, sulla base del ripiegamento strutturale, è noto mediare l'oligomerizzazione di proteine all'interno di complessi (Burkhard *et al.*, 2001).

E' interessante notare che è presente nella regione C-terminale della proteina di *K.lactis* un

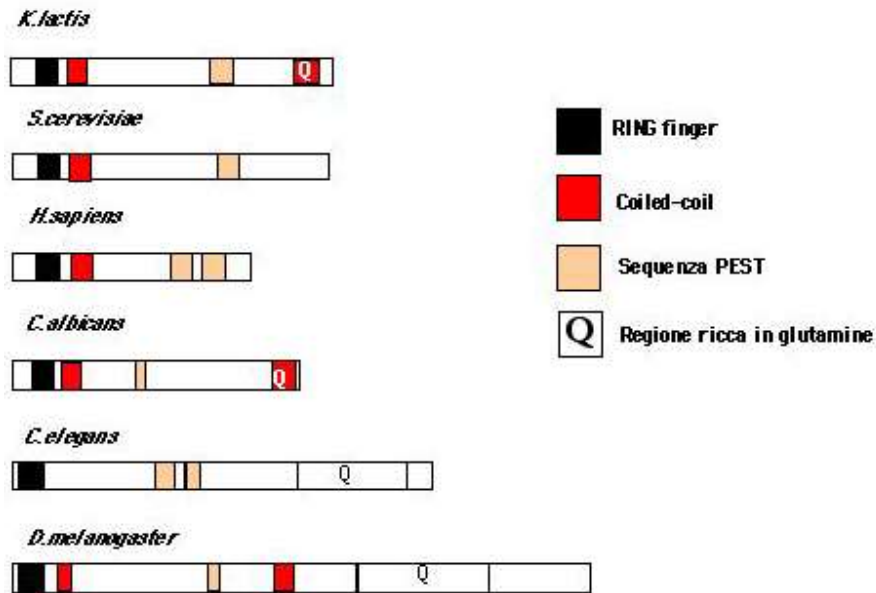


Figura 8. Rappresentazione schematica dei domini funzionali presenti nella proteina Not4p di diversi organismi.

secondo dominio coiled-coil ricco in residui di glutamina (Q); tale dominio è assente nelle proteine di *S. cerevisiae* e *H. sapiens* ma si ritrova nella proteina Not4p di *Candida albicans* (Zhao *et al.*, 2001). L'analisi della sequenza ha inoltre mostrato la presenza di una putativa sequenza PEST (residui da 351 a 396) che non mostra conservazione né di sequenza né di posizione. La sequenza PEST è un segnale per la degradazione proteolitica (Rechsteiner and Rogers, 1996) presente in quelle proteine, come le cicline, la cui emivita è finemente regolata durante il ciclo cellulare. Questo suggerisce che Not4p potrebbe essere presente solo in un particolare momento del ciclo cellulare.

4.2. Costruzione dei mutanti del gene *KINOT4*

Il gene *KINOT4* è stato inattivato inserendo all'interno del dominio RING-finger, 56 codoni dopo la tripletta ATG, il gene *KanMX4* che codifica una proteina per la resistenza all'antibiotico geneticina (G418) (**Fig.9A**). La sostituzione del gene selvatico con quello mutante è stata condotta sul ceppo diploide CMK29 e verificata tramite Southern blot (vedi materiali e metodi). I trasformanti eterozigoti per la mutazione sono stati fatti sporulare e sono apparse dopo 7gg di incubazione a 24°C piccole colonie resistenti all'antibiotico G418 portanti la mutazione *not4*. Da uno dei pochissimi aschi completi di 4 spore vitali è stato ottenuto il ceppo aploide CMK37-10B (*KINot4ΔI*), utilizzato in questo lavoro. Come controllo, negli esperimenti è stato usato il ceppo CMK37-10B (*KINot4ΔI*) trasformato con il gene selvatico *KINOT4* su un plasmide multicopia (CMK37-10Bw).

Allo scopo di identificare la possibile funzione del dominio coiled-coil ricco in glutamine della regione C-terminale della proteina Not4p, è stato trasformato il ceppo mutante CMK37-10B (*KINot4Δ1*) con un plasmide multicopia (pCXJ3) recante una forma tronca del gene (*KINOT4Δ2*) che codifica solo i primi 405 aminoacidi, ottenendo il ceppo CMK37-10Bc (*KINot4Δ2*) (Fig.9B). La produzione dei trascritti del gene *KINOT4* nei diversi mutanti è stata verificata tramite Northern Blot (Fig.10).

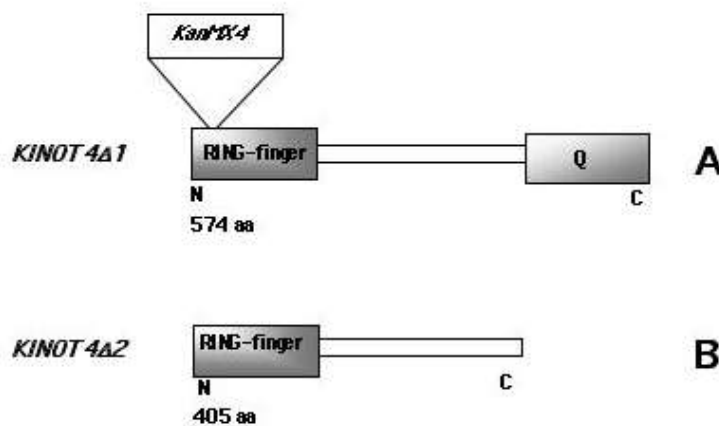


Figura 9. Rappresentazione schematica degli alleli mutati di *KINOT4* utilizzati in questo lavoro (vedi testo per maggiori dettagli). La serie di lettere Q indica il dominio coiled-coil ricco dell'aminoacido glutamina.

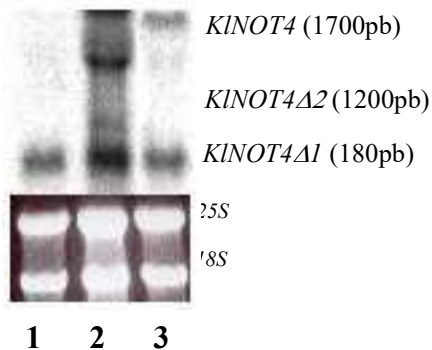


Figura 10. Analisi trascrizionale delle versioni tronche del gene *KINOT4* nei ceppi, CMK37-10B/*Klnot4Δ1* (corsia 1) CMK37-10Bc/*Klnot4Δ2* (corsia 2) e CMK37-10Bw/*KINOT4* (corsia 3). Gli RNA sono stati estratti da cellule cresciute su terreno ricco in presenza di glucosio al 2%. In parentesi sono indicate le dimensioni in paia di basi (pb) dei trascritti. Per la quantizzazione sono stati utilizzati gli RNA ribosomali 25S e 18S.

4.3. Il mutante *Klnot4Δ1* mostra difetti di parete cellulare

È noto che il gene *NOT4* in *S. cerevisiae* non è essenziale alla vita della cellula, ma la sua inattivazione determina un fenotipo di termosensibilità alla temperatura di 37°C. Questo fenotipo sembra dovuto a difetti di parete cellulare poiché può essere recuperato dalla presenza di uno stabilizzatore osmotico, come il sorbitolo, nel terreno di coltura (Cade and Errede, 1994; Irie *et al.*, 1994; Leberer *et al.*, 1994). Inoltre, è stato dimostrato che tutti i componenti del complesso CCR4-NOT mostrano difetti di parete cellulare (Collart and Struhl, 1993; Liu *et al.*, 1998). In modo simile ma non identico, il mutante *KINot4Δ1* mostra un fenotipo di termosensibilità che però, a differenza di *S. cerevisiae*, si manifesta

alla temperatura di 24°C ed è soppresso dal sorbitolo solo parzialmente. Le cellule che esprimono la proteina tronca (*KlNot4Δ2*) sono invece ancora capaci di crescere a 28°C ma non a 37°C e, in questo caso, la presenza del sorbitolo aiuta a ristabilire la crescita (**Fig.11A**).

Per trovare ulteriori differenze tra i mutanti *Klnot4Δ1* e *Klnot4Δ2*, sono state testate le loro capacità di crescita in presenza caffeina e calcofluoro. La caffeina interferisce con la via di trasduzione del segnale mediata dalla chinasi PKC1 che regola l'integrità della parete cellulare (**Fig. 5, paragrafo 1.6**), mentre il calcofluoro è un composto che lega la chitina, un componente della parete, e che quindi interferisce con la sua formazione (Heinisch *et al.*, 1999). La **Fig.11B** mostra la parziale sensibilità del mutante *KlNot4Δ1* di *K. lactis* ad entrambe le droghe, confermando i difetti di parete cellulare e suggerendo una conservazione funzionale, oltre che di sequenza, della proteina nei due lieviti. Le cellule che esprimono l'allele tronco (*KINOT4Δ2*) non mostrano invece sensibilità al calcofluoro, mentre si osserva una leggera inibizione della crescita nelle ultime diluizioni in presenza di caffeina. L'osservazione microscopica del mutante *Klnot4Δ1* ha rivelato la presenza di cellule con aumentate dimensioni e, come mostrato dalla colorazione con il calcofluoro (**Fig.12**) (vedi materiali e metodi), una distribuzione delocalizzata della chitina. La

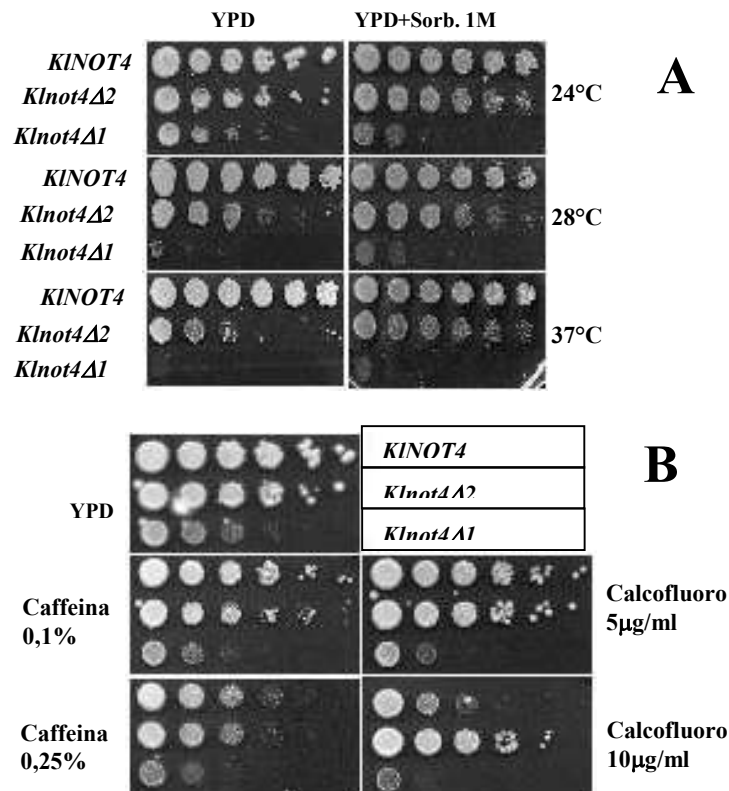


Figura 11 . A) Termosensibilità. B) Difetti di parete cellulare. Le cellule dei ceppi CMK37-10B (*Klnot4Δ1*), CMK37-10Bc (*Klnot4Δ2*) e CMK37-10Bw (*KINOT4*) sono state cresciute su terreno YPD liquido fino a saturazione. Circa 2×10^7 cellule sono state sottoposte a diluizioni seriali di 10 in 10 in piastre di microtiter. 5μl delle diluizioni sono state spottate su terreno completo (YPD) solido in assenza o in presenza dello stabilizzatore osmotico (sorbitolo), caffeina e calcofluoro alle concentrazioni indicate. Le piastre sono state incubate a 24°C, altrimenti indicato, e osservate dopo 3-4 giorni di crescita.

percentuale di cellule con chitina delocalizzata passa dal 10 al 20% spostando le cellule dalla temperatura permissiva (24°C) a quella non permissiva (28°C) (Serafini, 2001). La corretta localizzazione nei punti emergenza della gemma e nei setti di divisione cellulare viene ristabilita facendo esprimere nelle cellule del mutante *Klnot4Δ1* la proteina tronca *KINot4Δ2p* o la proteina selvatica.

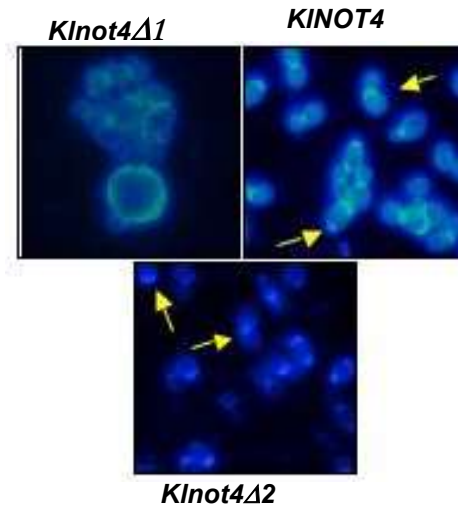


Figura 12. Distribuzione della chitina nei mutanti *not4* di *K. lactis*. Colorazione con il calcofluoro delle cellule dei ceppi CMK37-10B (*Klnot4Δ1*), CMK37-10Bc (*Klnot4Δ2*) e CMK37-10Bw (*KINOT4*). Le cellule sono state colorate dopo 3h a 28°C. Le frecce indicano i punti di accumulo della chitina in condizioni selvatiche.

4.3.1. Sovraespressione del gene *MPK1* nei mutanti *not4* di *S. cerevisiae* e *K. Lactis*

I mutanti degli intermedi della via di trasduzione PKC/MPK1 che regola l'integrità della parete cellulare, mostrano termosensibilità dovuta a difetti di parete cellulare e mostrano sensibilità a caffeina e calcofluoro (per una review Heinisch *et al.*, 1999). La somiglianza dei fenotipi relativi ai difetti di parete cellulare tra i mutanti *not4* e i mutanti degli intermedi della via suddetta hanno suggerito un possibile blocco in questa cascata di chinasi nei mutanti *not4* di *K. lactis* e di *S. cerevisiae*. E' stato quindi sovraespresso il gene *MPK1* di entrambi i lieviti nei rispettivi mutanti per verificare l'esistenza di una relazione tra i due geni. Cosa interessante, il risultato ottenuto è stato diverso nei due lieviti: mentre in *K. lactis* (**Fig.13**) si osserva un recupero parziale dei difetti di crescita in presenza di caffeina e calcofluoro e della termosensibilità a 28°C, in *S. cerevisiae* si osserva un aggravamento dei difetti di crescita (**Fig.14**) e non si osserva inoltre il recupero della normale localizzazione della chitina sia a temperatura permissiva che restrittiva (**Fig.15**) (La percentuale di cellule con chitina delocalizzata nel passaggio dalla temperatura permissiva (28°C) alla temperatura restrittiva (37°C) passa da 4 a 6 nel mutante *not4* ed a 3 a 10 nello stesso mutante che sovraesprimeva *MPK1*). L'analisi Northern ha mostrato che il mutante *not4* in *S. cerevisiae* già da sé iperesprime il gene *MPK1* (**Fig.16**).

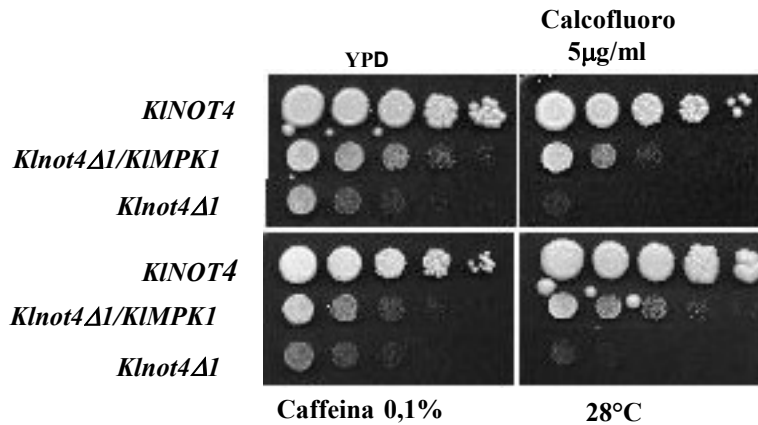


Figura 13. Sovraespressione del gene *KIMPK1* nel mutante *Klnot4Δ1* di *K.lactis*. Le cellule dei ceppi CMK37-10B (*Klnot4Δ1*), CMK37-10Bm (*Klnot4Δ1/KIMPK1*) e CMK37-10Bw (*KINOT4*) sono state cresciute su terreno minimo di selezione fino a una concentrazione di 10^7 cellule/ml e sottoposte a diluizioni seriali di 10 in 10 in piastre di microtiter. 5μl di ogni diluizione sono stati depositati su piastre contenenti terreno ricco supplementato di glucosio 2% (YPD), in presenza di caffeina e calcofluoro alle concentrazioni indicate e incubate a 24°C, altrimenti indicato, per 3-4 giorni.

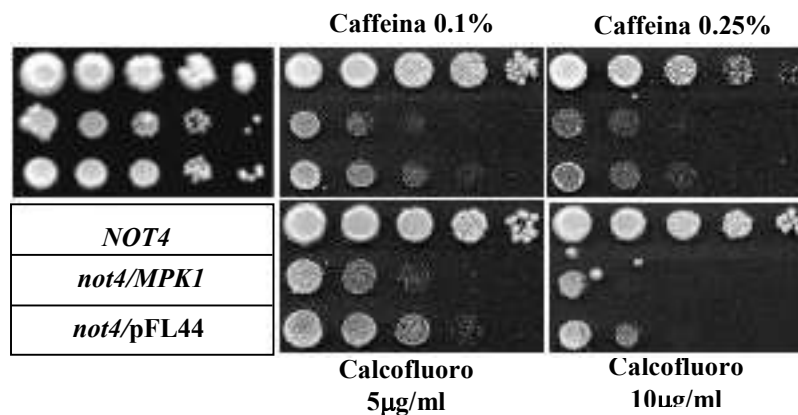


Figura 14. Sovraespressione del gene *MPK1* nel mutante *not4* di *S.cerevisiae*. Diluizioni seriali di 10 in 10 dei ceppi BY4741 (*NOT4*), Y00207m (*not4/MPK1*) e Y00207pFL (*not4/pFL44*) a partire da una concentrazione di 10^7 cellule/ml sono state depositate su piastre contenenti terreno ricco supplementato di glucosio 2% (YPD), in presenza di caffeina e calcofluoro alle concentrazioni indicate e incubate a 28°C per 3 giorni.

Per escludere la possibilità che la sovraespressione del gene in *S. cerevisiae* fosse responsabile della aumentata sensibilità alle due droghe è stato sovraespresso il gene anche nel ceppo selvatico BY4741, isogenico del mutante *not4* (Fig.17). Dal momento che la sovraespressione di *MPK1* non altera la crescita del ceppo selvatico, si può concludere che

esiste una relazione funzionale tra Not4p e Mpk1p anche in *S. cerevisiae*, i cui effetti sull'integrità della parete sono opposti a quelli che si osservano in *K. lactis*.

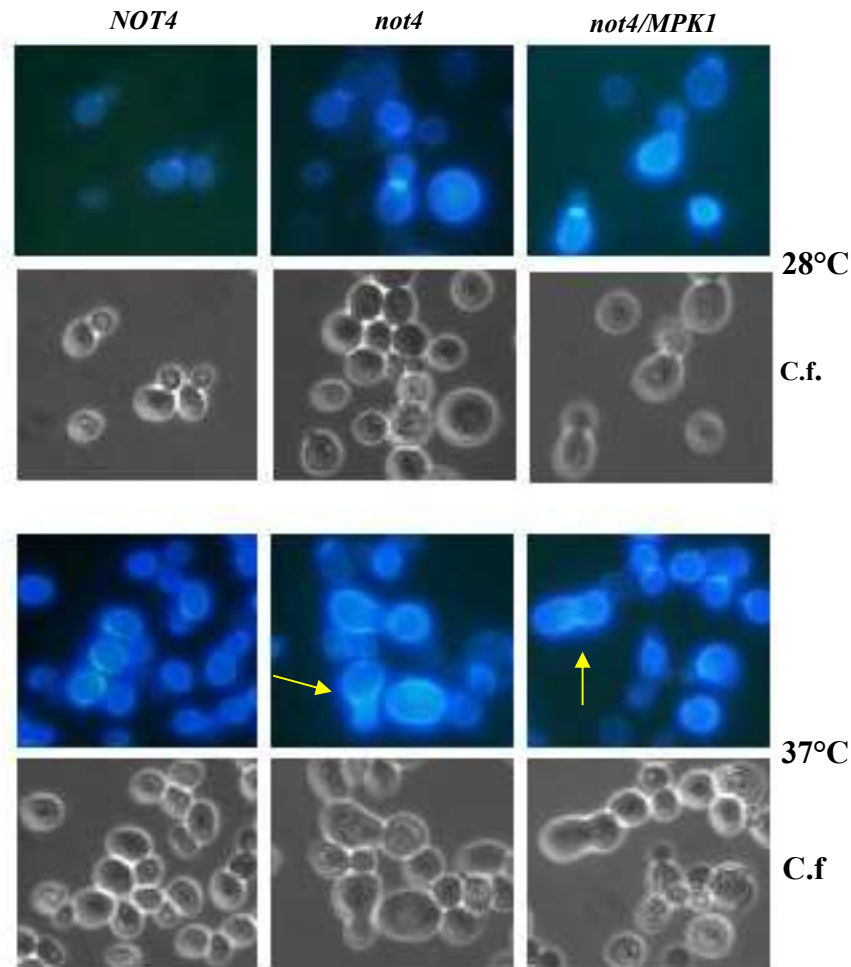


Figura 15. Distribuzione della chitina. Colorazione con il calcofluoro nei ceppi BY4741 (*NOT4*), Y00207pFL (*not4/pFL44*) e Y00207m (*not4/MPK1*). I ceppi sono stati incubati a 28°C per 24 ore e trasferiti a 37°C per 3 ore. C.f. = contrasto di fase. Le frecce indicano la chitina delocalizzata.

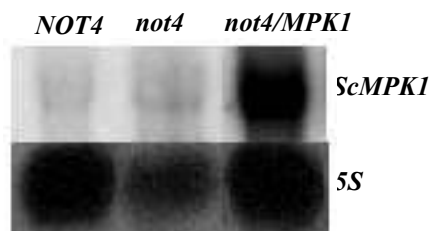


Figura 16. Aumento dell'espressione del gene *ScMPK1* nel mutante *not4*. Analisi trascrizionale nei ceppi BY4741 (*NOT4*), Y00207pFL (*not4/pFL44*) e Y00202m (*not4/MPK1*). Gli RNA sono stati estratti da cellule cresciute su terreno minimodi selezione suolementato di glucosio 2%.

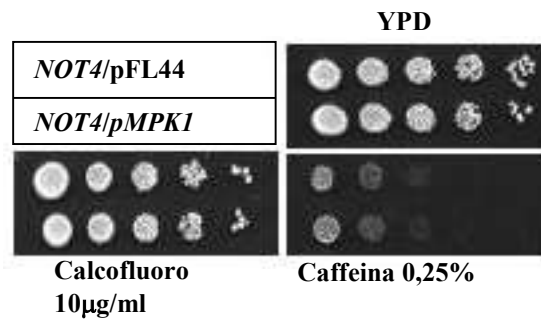


Figura 17. Sovraespressione del gene *MPK1* nel ceppo selvatico di *S.cerevisiae*. Diluizioni seriali di 10 in 10 dei ceppi BY4741pFL (*NOT4/pFL44*) e BY4741m (*NOT4/MPK1*), a partire da una concentrazione di 10^7 cellule/ml, sono state depositate su piastre contenenti terreno ricco supplementato di glucosio 2% (YPD), in presenza di caffeina e calcofluoro alle concentrazioni indicate, incubate a 28°C per 3 giorni.

4.4. Il mutante *Klnot4Δ1* mostra difetti nel riparo del danno al DNA.

La caffeina, oltre a interferire con la via del segnale PKC/MPK1, interferisce con i meccanismi di riparo del danno al DNA poiché è un analogo delle purine. Per valutare se la sensibilità dei mutanti a questa droga fosse legata a tale processo, è stata saggiata la sensibilità dei mutanti *not4* di *K. lactis* ad altre droghe che causano danni al DNA: metilmetan-sulfonato (MMS), un composto alchilante che causa grossi riarrangiamenti cromosomici, e i raggi UV, responsabili della formazione di dimeri di timina. Come possiamo osservare dalla **Fig.18A**, il mutante *Klnot4Δ1* mostra sensibilità ad entrambe le sostanze a suggerire un coinvolgimento della proteina Not4p nel riparo del danno al DNA. La sensibilità a queste due droghe è stata valutata anche nel mutante *not4* di *S. cerevisiae* (**Fig.18B**) e, in entrambi i casi, si osservano difetti di crescita, più evidenti dopo trattamento con raggi UV. La maggiore sensibilità ai raggi UV del mutante di *S. cerevisiae* rispetto al mutante di *K. lactis*, sembra essere legata più che ad una diversa importanza di Not4, ad una differenza fisiologica tra i due lieviti. Infatti, l'analisi della sensibilità ai raggi UV dei ceppi selvatici ha evidenziato nel ceppo di *S. cerevisiae* seri difetti di crescita già alla dose di 120 KJ/cm² mentre, per il ceppo selvatico di *K. lactis*, bisogna raggiungere dosi più elevate di 180 KJ/ cm² (dati non mostrati).

Il mutante *Klnot4Δ2* di *K. lactis* mostra un leggero difetto di crescita in presenza di MMS e difetti di crescita già alla dose di 120 KJ/cm² mentre, per il ceppo selvatico di *K. lactis*, bisogna raggiungere dosi più elevate di 180 KJ/ cm² (dati non mostrati).

Il mutante *Klnot4Δ2* di *K. lactis* mostra un leggero difetto di crescita in presenza di MMS e dopo trattamento con raggi UV (**Fig.18A**) così come in presenza di caffeina (vedi paragrafo precedente). Questi dati suggeriscono che la regione C-terminale della proteina svolga un ruolo, anche se marginale, nella resistenza a queste droghe.

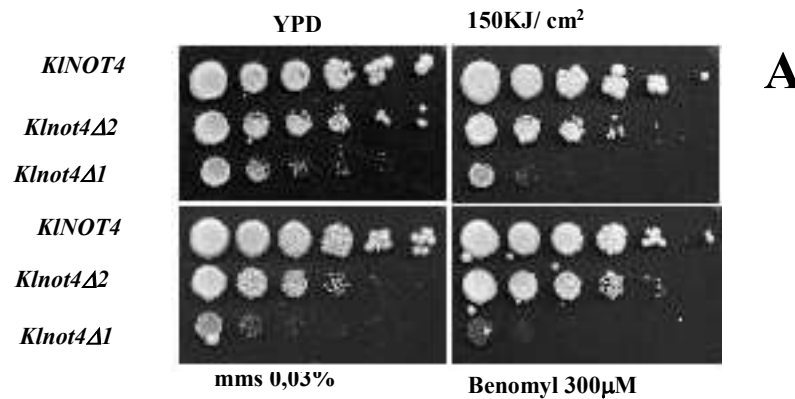
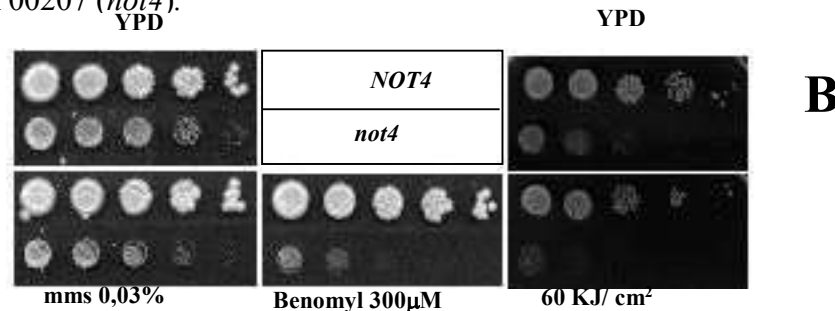


Figura 18. Difetti nel riparo al danno al DNA nei mutanti *not4* e sensibilità al benomyl. Le cellule sono state cresciute su terreno YPD liquido fino a saturazione. Circa 2×10^7 cellule sono state sottoposte a diluizioni seriali di 10 in 10 in piastre di microtiter. 5μl delle diluizioni sono state spottate su terreno terreno completo (YPD) solido in assenza o in presenza di mms e benomyl, e sono state esposte ai raggi UV alle concentrazioni indicate. A) *K. lactis*, ceppi CMK37-10B (*Klnot4Δ1*), CMK37-10Bc (*Klnot4Δ2*) e CMK37-10Bw (*KINOT4*). B) *S. cerevisiae*, ceppi BY4741 (*NOT4*) e Y00207 (*not4*).



4.5. Il mutante *KlNot4Δ1* mostra sensibilità al benomyl.

Durante la caratterizzazione fenotipica dei mutanti *not4* di *K. lactis* è stata anche saggiata la crescita in presenza del benomyl. Questa droga lega i microtubuli ed interferisce quindi con funzioni quali il trasporto intracellulare e la divisione cellulare (Hampsey, 1997). Entrambi i mutanti *not4* nulli di *K. lactis* e *S. cerevisiae* mostrano difetti di crescita in presenza di questa droga (Fig.18), ad indicare che Not4p potrebbe essere coinvolta anche nel controllo di questi processi.

4.6. Cross complementazione dei geni NOT4 di *S.cerevisiae* e *K.lactis*.

Sono stati eseguiti esperimenti di cross-complementazione tra i geni *NOT4* di *S. cerevisiae* e *K. lactis* per valutare l'interscambiabilità di funzione delle due proteine. L'introduzione del gene *NOT4* di *S. cerevisiae* su un plasmide centromerico (pCXJ18) nel mutante di *K. lactis*, *Klnot4Δ1*, permette il recupero di alcuni dei fenotipi, quali la crescita a 28°C e la

resistenza al calcofluoro ma non la crescita a 37°C e la resistenza alla caffeina (**Fig.19A**). Il recupero del fenotipo di termosensibilità a 28°C ma non a 37°C è del tutto simile a quello osservato con l'espressione della proteina tronca *KINot4Δ2p* nel mutante di *K.lactis* descritto nel paragrafo precedente (**Fig.11A**). Le due proteine, *KINot4Δ2p* e *ScNot4p* hanno in comune l'assenza del dominio coiled-coil e questo suggerisce fortemente l'importanza di tale dominio per la crescita ad alte temperature. Il mancato recupero della normale crescita in presenza di caffeina potrebbe confermare l'ipotesi avanzata nel paragrafo precedente sull'importanza del secondo dominio coiled-coil nel riparo del danno al DNA. Infine, l'espressione di *ScNOT4* in *K. lactis* ripristina la normale distribuzione della chitina di parete, escludendo così il ruolo del secondo coiled-coil nel mantenimento dell'integrità della parete cellulare a 28°C (**Fig.19B**). Il completo recupero dei difetti di crescita si osserva introducendo il gene *KINOT4* clonato nel plasmide centromerico pRS416 nel mutante *not4* di *S. cerevisiae* (**Fig.20A**). Al contrario, l'espressione della proteina tronca di *K. lactis*, *KINot4Δ2p*, non consente un recupero completo della crescita nelle condizioni saggiate (**Fig.20B**). La regione deleta contiene, oltre al motivo coiled-coil, anche regioni molto conservate tra le due proteine (**Fig.21**) che potrebbero svolgere funzioni ancora sconosciute. In alternativa la delezione della regione C-terminale potrebbe danneggiare il folding proteico compromettendo così la funzione biologica della proteina.

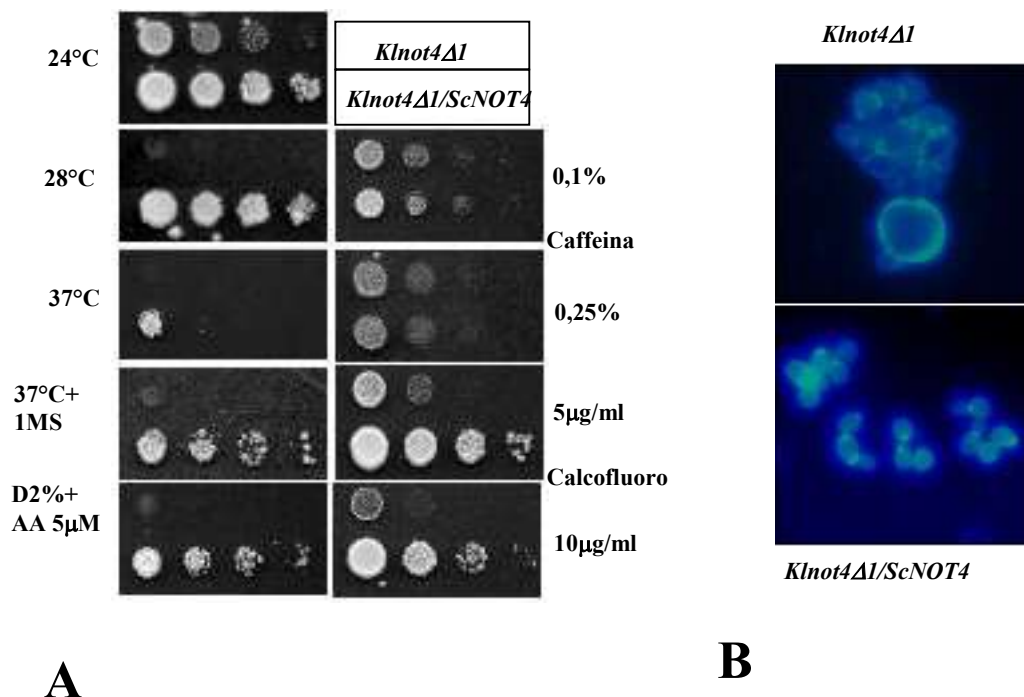


Figura 19. Complementazione del mutante *Klnot4Δ1* con il gene *ScNOT4*. A) Le cellule dei ceppi CMK37-10Bsc (*Klnot4Δ1/ScNOT4*) e CMK37-10B (*Klnot4Δ1*) sono state cresciute su opportuno terreno di selezione fino a saturazione e circa 2×10^7 cellule sono state sottoposte a diluizioni seriali di 10 in 10 in piastre di microtiter. 5μl delle diluizioni sono state spottate su terreno completo (YPD) supplementato delle droghe e fonti di carbonio indicate. La crescita è stata registrata dopo 3 giorni di incubazione alle temperature di 24°C per *K. lactis*, altrimenti indicato. B) Distribuzione della chitina nel mutante. Colorazione con calcofluoro delle cellule dei ceppi CMK37-10Bsc (*Klnot4Δ1/ScNOT4*) e CMK37-10B (*Klnot4Δ1*) cresciute a 24°C.

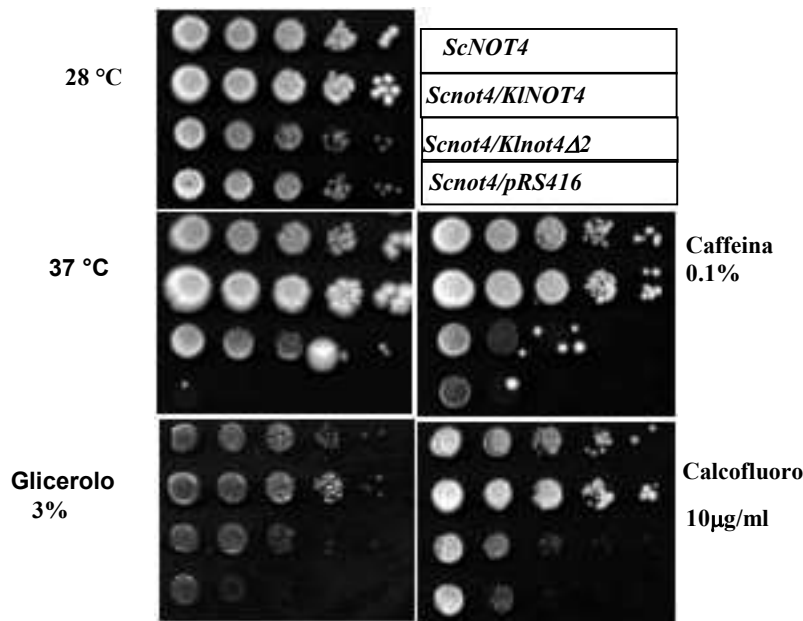


Figura 20. Complementazione del mutante nullo *Scnot4* con i geni *KINOT4* e *KINOT4*Δ2. Le cellule dei ceppi BY4741 (*ScNOT4*), Y00207Kln (*Scnot4/KINOT4*) Y00207Kln2 (*Scnot4/Klnot4Δ2*) e Y00207pFL (*Scnot4/pRS416*) sono state cresciute su opportuno terreno di selezione fino a saturazione e circa 2×10^7 cellule sono state sottoposte a diluizioni seriali di 10 in 10 in piastre di microtiter. 5 μ l delle diluizioni sono state spottate su terreno completo (YPD) supplementato delle droghe e fonti di carbonio indicate. La crescita è stata registrata dopo 3 giorni di incubazione alle temperature di 28°C, altrimenti indicato.

	Calcofluoro
KlnOT4p	YDPMATCVKFLDQTFKFLSDIPERSYTFNSNLLDDEITQSTFSTFSTFKI
ScNOT4p	YDALGNAVDFLDARLHSLSNYQKRPISEIKSNIIIDEETYKKYPSLFSWDKI
KlnOT4p	GCSEQSEGVLGAKLCDLLTIKPVDMHMSLLPFIQNKATPTMLPPGI AVQQ
ScNOT4p	EASKKSDNTLAN KLVEILAIKPIDYTASVVQFLQSVNVGVNDNITITDNT
KlnOT4p	PQLV <u>QQQKQQLQQQQLQQQQQLSLQMQLQAQQGMAQQGMAQQVMSQPQS</u>
ScNOT4p	KTPTQPIRLQTVSQQIQPPLNVSTPPPGIFGPQHKVPI-QQQQMGDTSSR
KlnOT4p	NSSDLLNQLIHGKKQTAAV
ScNOT4p	NSSDLLNQLINGRKIIAGN

Figura 21. Allineamento della sequenza aminoacidica, tra *S. cerevisiae* e *K. lactis*, della regione C terminale deleta nel mutante *Klnot4Δ2*. Il dominio ricco di Q è sottolineato. Gli aminoacidi identici sono indicati in rosso.

4.7. Il mutante *Klnot4Δ1* mostra difetti nel metabolismo delle fonti di carbonio

4.7.1. La mutazione *Klnot4Δ1* determina un fenotipo Rag-

Un'inaspettata osservazione durante l'analisi fenotipica ha riguardato la riduzione dell'attività glicolitica delle cellule in seguito alla distruzione del gene *KINOT4*. Come descritto nell'introduzione, i ceppi selvatici di *K.lactis* mostrano il fenotipo RAG+ (Resistenza all'Antimicina su Glucosio), cioè sono in grado di utilizzare il glucosio in presenza di un inibitore mitocondriale poiché capaci di svolgere il processo fermentativo (Wesolowsky-Louvel *et al.*, 1992).

Studi di crescita hanno mostrato che il mutante *klnot4Δ1* è incapace di crescere su glucosio 2 e 5% in presenza di antimicina A (**Fig.22A**) suggerendo un blocco della via glicolitica.

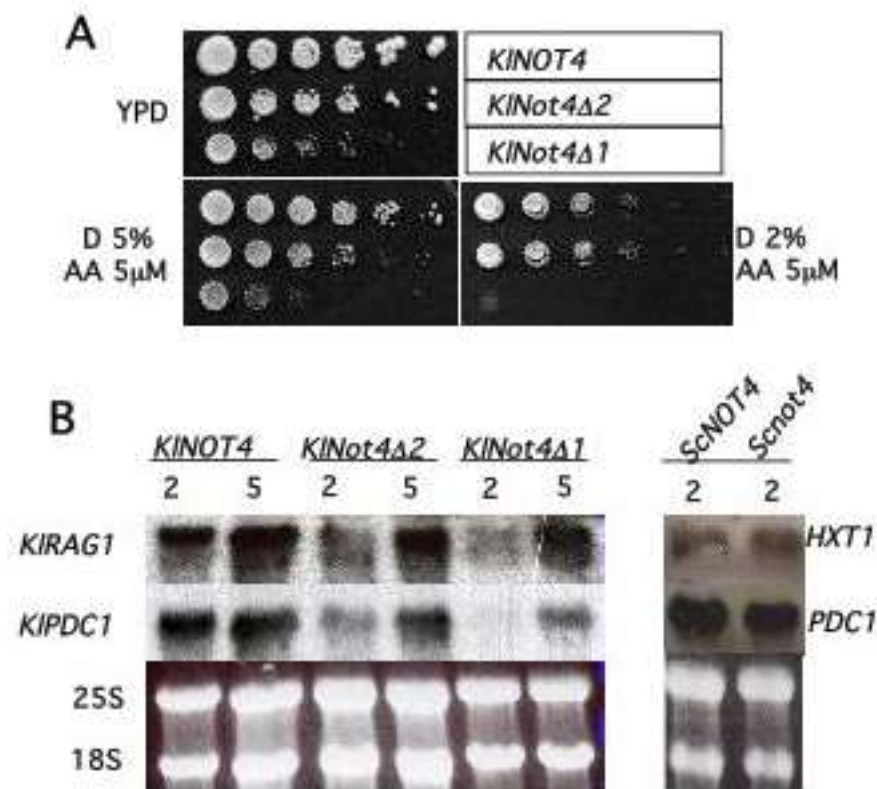


Figura 22. Fenotipo Rag⁻ (A) e analisi trascrizionale di geni fermentativi (B) nei ceppi CMK37-10Bw (*KINOT4*), CMK37-10Bc (*Klnot4Δ2*), CMK37-10B (*Klnot4Δ1*), BY4741 (*ScNOT4*) e Y00207 (*Scnot4*). A) Le cellule sono state cresciute su YPD fino a una concentrazione di 2×10^7 cellule/ml e sottoposte a diluizioni seriali di 10 in 10. 5 µl di ogni diluizione fu depositata su terreno solido contenente glucosio al 2% (D2%) o 5% (D5%) in presenza di antimicina alla concentrazione finale di 5 µM. La crescita è stata registrata 3 giorni dopo incubazione a 24°C. B) I ceppi sono stati cresciuti su terreno YP contenente la concentrazione di glucosio indicata (2= 2%; 5=5%). Gli RNA estratti e ibridati con le sonde indicate. Gli RNA ribosomali 25S e 18S sono mostrati per la normalizzazione della quantità di acido ribonucleico.

Dato che il fenotipo Rag⁻ è più evidente su glucosio al 2%, è stato ipotizzato che l'assenza di *KINOT4* potesse influenzare in qualche modo il flusso del glucosio nella cellula. Per

questa ragione sono stati estratti gli RNA totali da colture cresciute su terreno YP in presenza di glucosio al 2 e 5% e ibridati con le sonde dei geni *KIRAG1* e *KIPDC1* che codificano rispettivamente il trasportatore del glucosio a bassa affinità e la piruvato decarbossilasi. I risultati hanno mostrato, alla concentrazione di glucosio 2%, che il livello di espressione del gene *RAG1* è notevolmente abbassato nel mutante *klnot4Δ1*, rispetto al selvatico, mentre non è rilevabile il trascritto per il gene *KIPDC1*. I livelli trascrizionali di entrambi i geni aumentano alla concentrazione di glucosio del 5% (**Fig.22B**) e questo potrebbe giustificare la parziale crescita del mutante su alto glucosio. Dal momento che l'espressione della piruvato decarbossilasi è regolata positivamente dal prodotto del gene *RAG1* (Destruelle *et al.*, 1999), la ridotta espressione di questo potrebbe essere la causa della diminuzione trascrizionale del gene *KIPDC1*. L'analisi del metabolismo fermentativo nel mutante *Klnot4Δ2* ha dimostrato una situazione trascrizionale che è intermedia tra quella del ceppo selvatico e del mutante *Klnot4Δ1*. Dato che la crescita su antimicina è del tutto simile a quella del ceppo selvatico, possiamo concludere che i livelli trascrizionali di *RAG1* e *KIPDC1* nel mutante *Klnot4Δ2* sono sufficienti per una normale crescita.

Sono stati successivamente analizzati i trascritti di altri geni glicolitici fortemente espressi su glucosio quali *KIRAG2* (fosfoglucoisomerasi), *KIPGK1* (fosfogliceratochinasi) ed *KIENO1* (enolasi). Anche in questi geni è stata osservata una significativa riduzione dei livelli trascrizionali (**Fig.23**) probabile conseguenza della riduzione del flusso del glucosio.

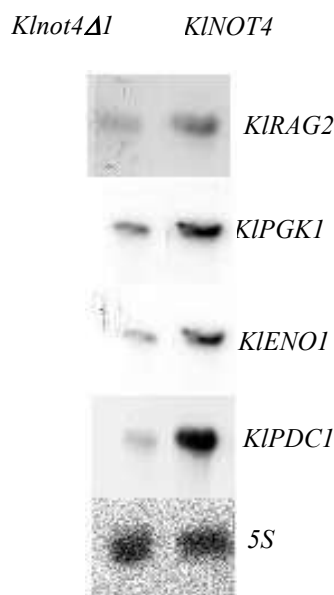


Figura 23. Analisi trascrizionale di altri geni glicolitici. I ceppi CMK37-10Bw (*KINOT4*) e CMK37-10B (*Klnot4Δ1*), sono stati cresciuti su terreno YP contenente la concentrazione di glucosio al 2%. Gli RNA sono stati ibridati con le sonde indicate.

Al contrario, la delezione di *ScNOT4* in *S. cerevisiae* non produce difetti nella trascrizione di *HXT1* e *PDC1*, i geni omologhi di *KIRAG1* e *KIPDC1* rispettivamente (**Fig. 22B**). In accordo con questo, il mutante *not4* è in grado di crescere su glucosio in presenza di antimicina A sia su glucosio al 2% che 5% (dati non mostrati).

4.7.2 Difetti del mutante *Klnot4Δ1* nel metabolismo delle fonti a 2 atomi di carbonio.

Mutanti di *S. cerevisiae* per il gene *NOT4* sono stati isolati anche come ceppi deficienti nella respirazione (Dimmer *et al.*, 2002), cioè incapaci di crescere su fonti di carbonio

respirabili quali il glicerolo. Per questa ragione è stata esaminata la crescita dei mutanti di *K.lactis* su differenti fonti di carbonio respirabili. Come riportato in **Tab.1**, il mutante *Klnot4Δ1* è incapace di crescere su fonti a due atomi di carbonio respirabili (etanolo e acetato), ma è ancora in grado di utilizzare fonti respirabili a 3 atomi di carbonio (glicerolo e lattato), indicando importanti differenze nella regolazione del metabolismo aerobico con *S. cerevisiae*.

Genotipo	Glucosio	Etanolo	Glicerolo	Acetato	Lattato
<i>Klnot4Δ1</i>	+	-	+	-	+
<i>Klnot4Δ2</i>	+	+	+	+	+
KINOT4	+	+	+	+	+

Tabella 1. Crescita dei ceppi CMK37-10Bw (*KINOT4*), CMK37-10Bc (*KINOT4Δ2*) e CMK37-10B (*KINOT4Δ1*) su fonti di carbonio respirabili a 2 e 3 atomi di carbonio, alla concentrazioni del 2%.

Sulla base di questi fenotipi di crescita, è stata analizzata l'espressione di geni chiave del metabolismo delle fonti a 2 atomi di carbonio quali i geni dell'acetyl-CoA sintetasi (*ACS*) e i geni del ciclo del glicossilato (*ICL* e *MLS*). In *K.lactis* esistono due geni *ACS*: *KIACS1*, indotto da acetato e lattato, e *KIACS2*, indotto da etanolo. Per studiare l'effetto di *KINot4p* sull'espressione di questi geni, sono stati estratti gli RNA totali da ceppi cresciuti su terreno YP contenente glucosio al 2% e poi trasferiti in terreno YP in presenza di etanolo al 2% per 2h. Come controllo sono stati utilizzati gli RNA estratti da cellule cresciute su glicerolo al 2%. Come mostrato in **Fig.24**, nel mutante *Klnot4Δ1* si osserva un più basso livello del trascritto del gene *KIACS2* su

tutte le fonti saggiate e, cosa rilevante, la induzione del gene da parte dell'etanolo non si verifica. Nel caso di *KIACS1*, i livelli di mRNA sono comparabili a quelli del ceppo selvatico in tutte le condizioni saggiate.

Quindi è stata rivolta l'attenzione sui geni *KIICLI* e *MLS1* che codificano rispettivamente l'isocitrato liasi e la malato sintasi. Nel ceppo selvatico il gene *KIICLI* è fortemente indotto da etanolo e scarsamente indotto da glicerolo e glucosio (Charbon *et al.*, 2004). Risultati del tutto inattesi hanno mostrato una sopra-induzione nel mutante dei trascritti di entrambi i geni dopo shift su etanolo. Dato che la crescita su fonti di carbonio non-fermentabili richiede la piena funzionalità della catena di trasporto degli elettroni e della fosforilazione ossidativa, è stata anche analizzato il trascritto del gene *KICYCI*. Come osservato per il gene *KIACS2*, anche in questo caso si nota una riduzione dei livelli del trascritto in tutte le condizioni saggiate nel mutante *Klnot4Δ1* rispetto al selvatico, con una debole induzione da parte dell'etanolo.

4.7.3. Il mutante *Klnot4Δ1* ha una ridotta attività respiratoria su glucosio.

Oltre alla incapacità di utilizzare fonti a due atomi di carbonio, il mutante *Klnot4Δ1* di *K.lactis* mostra difficoltà di crescita sia su glucosio che su glicerolo. Su entrambe queste due fonti il trascritto del gene *KICYCI* risulta notevolmente ridotto nel mutante rispetto al ceppo selvatico (Fig.24). E' stata quindi evidenziata la capacità respiratoria su glucosio mutante con il saggio TTC (Fig.25A). Questo test viene eseguito su colonie di lievito cresciute su fonti di carbonio respirabili e la capacità respiratoria viene messa in evidenza

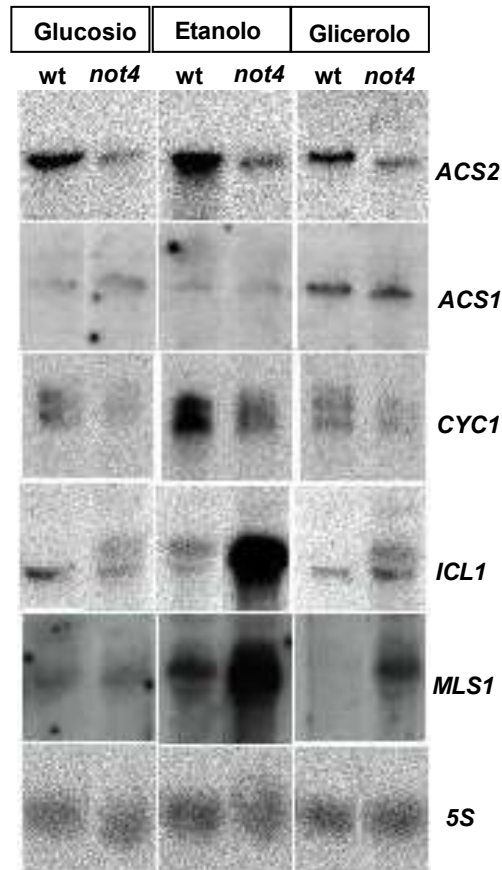


Figura 24. Analisi northern dei geni respiratori nel mutante *not4* di *K. lactis*. Gli RNA totali sono stati estratti dai ceppi CMK37-10Bw (*wt*) e CMK37-10B (*Klnot4Δ1*) (vedi il testo per maggiori dettagli) e ibridizzati con le sonde indicate, specifiche di *K. lactis*.

dalla intensità della colorazione rossa assunta dalla colonia. Le cellule del mutante mostrano una colorazione rosa che indica un basso tasso respiratorio rispetto alle colonie del ceppo selvatico che mostrano un'intensa colorazione rossa.

Come accennato nel precedente paragrafo, il gene *NOT4* di *S. cerevisiae* è stato isolato in uno screening di mutanti respiratori (Dimmer *et al.*, 2002) ed è stato successivamente osservato che il mutante del gene *NOT4* mostrava anche difetti di morfologia mitocondriale. I mitocondri formano strutture tubulari in continuo cambiamento di forma in grado di fondersi (fusione) tra loro per poi separarsi di nuovo (fissione).

Come in *S. cerevisiae*, anche in *K. lactis* la morfologia mitocondriale del ceppo selvatico è in evidenza trattando le cellule con il colorante vitale DASPMI, che lega le membrane mitocondriali attive, non presenta la tipica struttura tubulare del ceppo selvatico, ma una struttura puntiforme a suggerire problemi nell'equilibrio fissione/fusione degli organuli mitocondriali (**Fig. 25B**).

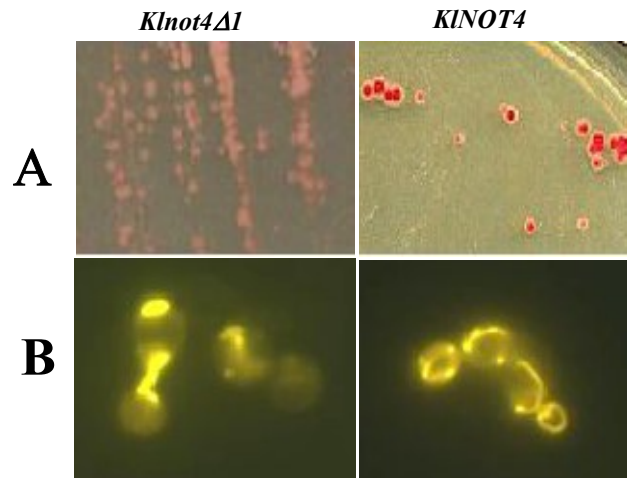


Figura 25. A) Alterata morfologia mitocondriale nel mutante *Klnot4ΔI* di *K. lactis*. Colorazione DASPMI delle cellule dei ceppi CMK37-10B (*Klnot4ΔI*) e CMK37-10Bw (*KINOT4*) selvatico dopo crescita su terreno ricco in presenza di glucosio al 2%, a 24°C. B) Ridotte capacità respiratorie del mutante *Klnot4ΔI*. Colorazione TTC (vedi materiali e metodi) delle colonie dei ceppi CMK37-10B (*Klnot4ΔI*) e CMK37-10Bw (*KINOT4*) dopo crescita su piastra YPD a 24°C.

4.7.4. Difetti del mutante *not4* di *S. cerevisiae* nel metabolismo delle fonti respirabili a 2 e 3 atomi di carbonio.

In *S. cerevisiae*, il mutante *not4*, mostra difetti di crescita su fonti a 3 e 2 atomi di carbonio (Tab.4). Quindi abbiamo analizzato l'espressione dei geni *ACS* e di enzimi chiave del ciclo del glicossilato anche in questo mutante. Come in *K. lactis*, anche in *S. cerevisiae* sono presenti due geni *ACS*, ma sono regolati diversamente. Il gene *ACS2* è costitutivamente espresso su tutte le fonti di carbonio mentre *ACS1*, come anche *ICL1* e *CYCI*, sono repressi da glucosio e attivati da fonti di carbonio respirabili. E' stata quindi analizzata l'espressione di questi geni nel mutante *not4* di *S. cerevisiae* e nel selvatico cresciuti su terreno YP contenente glucosio al 2% e poi trasferiti in terreno YP in presenza di etanolo al 2% e in terreno YP in presenza di glicerolo al 2% per 2h (Fig.26, corsie 3–6).

A differenza di quanto accade in *K. lactis*, per tutti i geni analizzati è stato riscontrato un notevole aumento dei livelli di mRNA nel mutante *not4* rispetto al ceppo selvatico.

E' riportato in letteratura che l'espressione del *CYCI* è ridotta nei mutanti *not4* (Liu *et al.*, 1998) e questo dato sembrava contraddire quanto osservato nei nostri esperimenti di induzione. E' stato quindi ripetuto l'esperimento in condizioni simili a quelle descritte da Liu e collaboratori in cui le cellule sono state cresciute per una notte su terreno YP supplementato con etanolo e glicerolo al 2% (Fig.26, corsie 7 e 8). I risultati hanno mostrato un abbassamento dei livelli di mRNA del *CYCI* nel mutante *not4*, come descritto in letteratura e allo stesso tempo anche un abbassamento dei livelli di mRNA del gene *ACS1*. Questa riduzione della trascrizione potrebbe essere la conseguenza del fatto che i mutanti *not4* crescono con difficoltà sulle fonti di carbonio respirabili, problema che non si verifica negli esperimenti di shift.

La differenza nei livelli di mRNA tra mutante e selvatico dopo shift sulle fonti di carbonio respirabili suggeriva due possibili meccanismi: i) effetto sull'inizio della trascrizione; ii) effetto sulla stabilità degli mRNA. Entrambi i processi sono sotto il controllo del complesso CCR4-NOT in *S. cerevisiae* (vedi introduzione). Il dato che lasciava perplessi era la estremamente ridotta espressione dei geni *ACSI* e *ICLI* dopo induzione con etanolo nel ceppo selvatico: 2 ore potevano essere sufficienti a indurre e degradare il trascritto. E' noto, in *S. cerevisiae*, che enzimi chiave del metabolismo dei carboidrati sono regolati sia a livello trascrizionale che post-traduzionale a differenza di *K. lactis* dove esiste una buona correlazione tra livelli degli mRNA e specifiche attività (Lopez *et al.*, 2003). Quindi la maggiore quantità di trascritto nel mutante *not4* poteva derivare da un aumento della stabilità dell'mRNA.

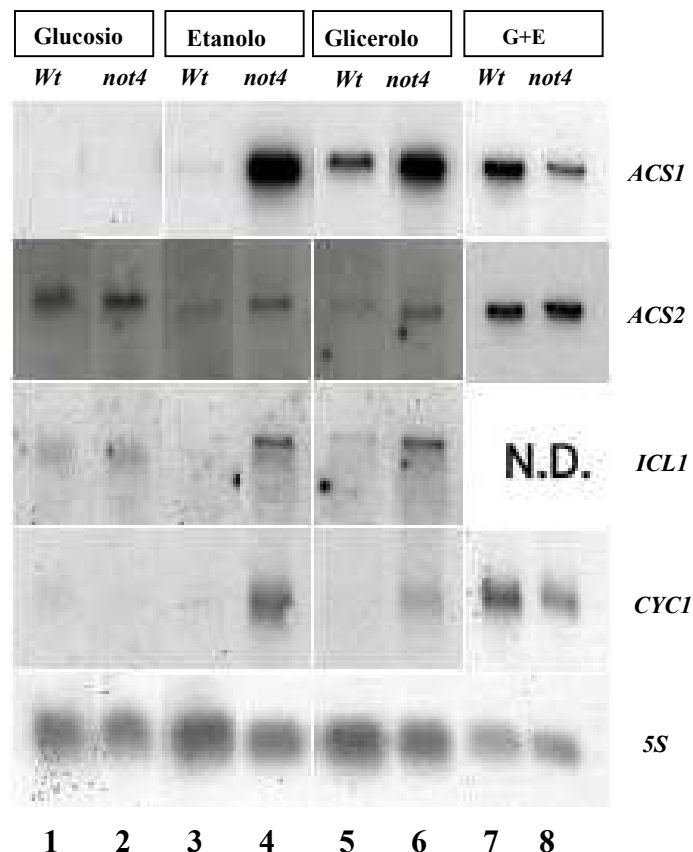


Figura 26. Analisi northern dei geni respiratori nel mutante *not4* di *S. cerevisiae*. Gli RNA totali sono stati estratti dai ceppi BY4741 (*wt*) e Y00207 (*not4*) e ibridizzati con le sonde indicate (vedi testo per maggiori dettagli), specifiche di *S.cerevisiae*. N.D.= Non Determinato. G=glicerolo. E=etanolo

Allo scopo di valutare se l'emivita dei messaggeri nel ceppo selvatico dei geni testati fosse minore delle due ore, è stato condotto un esperimento di induzione con etanolo a tempi più brevi e gli RNA che sono stati ibridati con la sonda del gene *ACSI*. Il risultato ottenuto (Fig.27) dimostra che il livello di mRNA per questo gene nel ceppo selvatico è notevolmente ridotto anche a tempi più brevi e dimostra che l'aumento della quantità di trascritti che osserviamo nel mutante *not4* dipende da un effetto a livello dell'inizio della

trascrizione. L'esperimento non esclude però che Not4p possa regolare la stabilità degli mRNA dei geni analizzati.

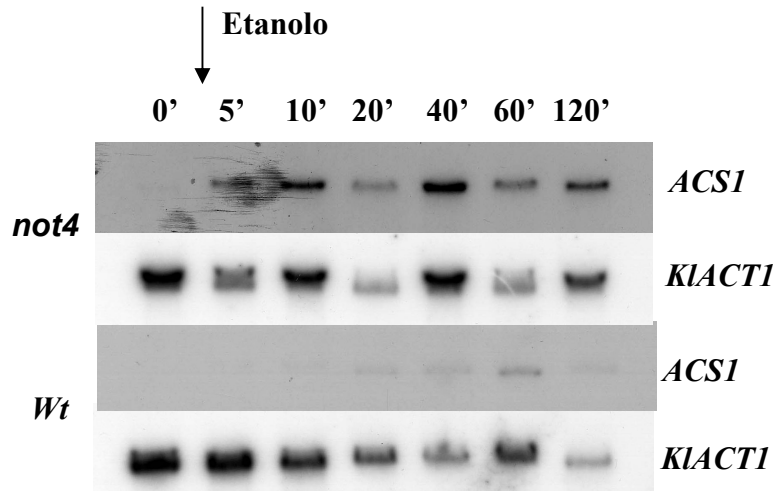


Figura 28. Cinetica di induzione da etanolo del gene ACS1 in *S. cerevisiae*. Gli RNA totali sono stati estratti dai ceppi BY4741 (*wt*) e Y00207 (*not4*) cresciuti su glucosio, lavate 3 volte con H₂O sterile e incubate in terreno YP contenente etanolo alla concentrazione del 2%. Aliquote di coltura sono state prelevate ai tempi indicati. Gli RNA sono stati ibridati con le sonde indicate nella figura.