

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"

Facoltà di scienze matematiche, fisiche e naturali

Dottorato di Ricerca in Biologia Cellulare e Molecolare

XX ciclo

**Relazione tra la proteina La e la
regolazione traduzionale dei
messaggeri TOP**

Maria Chiara de Stefano

Docente Guida/Tutor: Prof. Fabrizio Loreni

Coordinatore: Prof. Gianni Cesareni

Alla mia mamma

Indice

Indice	3
Summary	5
Riassunto	7
Introduzione	10
I geni TOP	10
Componenti dell'apparato traduzionale codificate dai TOP mRNA. ..	10
Il controllo traduzionale dei geni TOP	10
Analisi della distribuzione dei TOP-mRNA tra polisomi e mRNP	11
Il controllo traduzionale di alcuni mRNA TOP può dipendere dal tipo cellulare	12
Il controllo traduzionale dei geni TOP durante lo sviluppo e il differenziamento.	13
Pathway di signalling nella regolazione traduzionale dei TOP mRNA	13
Elementi in <i>cis</i> nel controllo traduzionale dei TOP mRNA.	16
Elementi in <i>trans</i> nel controllo traduzionale dei TOP mRNA.	17
La proteina ZNF9/CNBP	18
Ruolo ipotetico di La e ZNF9/CNBP nella regolazione traduzionale dei geni TOP	19
La proteina La	21
Abbondanza e localizzazione cellulare della proteina La	22
Caratteristiche strutturali della proteina La	22
Funzioni della proteina La	24
Il complesso ribonucleoproteico (RNP) di Ro 60	28
Scopo della ricerca	31
Risultati	33
Costruzione di plasmidi codificanti le proteine La wild-type e La $\Delta 373$. ..	33
Sovraespressione transiente inducibile di La wt e La $\Delta 373$	34
Sovraespressione stabile inducibile di La wt e La $\Delta 373$	37
Analisi polisomale delle linee cellulari TREx-La ^{wt} e TREx-La $\Delta 373$	42
Inibizione della proteina La tramite trasfezione di oligo siRNA	46
Inibizione della proteina La e traduzione dei messaggeri TOP	49
Analisi del profilo di sedimentazione di La, Ro60 e Y1	52
Inibizione della proteina Ro60 tramite trasfezione di oligo siRNA	60
Discussione	62
L'alterazione del dosaggio di La non modifica significativamente la traduzione dei messaggeri TOP	62

Ro60, La e l'RNA Y1 cosedimentano sui polisomi in differenti condizioni di crescita	65
Materiali e Metodi.....	68
Colture cellulari	68
Trasfezione dei plasmidi	68
Trasfezione degli oligo siRNA per La e per Ro60.....	69
Costruzione di plasmidi di espressione	70
Preparazione di estratti nucleari e citoplasmatici.....	70
Analisi polisomale	71
Estrazione dell'RNA e Northern Blotting.....	71
Estrazione delle proteine e Western Blotting.....	72
Analisi P100-S100	72
Immunoprecipitazione	73
Bibliografia.....	74

Summary

TOP mRNAs encode for ribosomal proteins, elongation factors and several other proteins associated with the assembly or function of the translational apparatus. These messengers are identified by two major characteristics : i) a 5' terminal oligopyrimidine tract (TOP motif), ii) a growth- dependent translational regulation. It has been shown both *in vitro* (cultured cells) and *in vivo* that perturbation of cellular growth, due to a variety of causes (development, mitogens, drugs etc.), is correlated to specific, rapid and reversible changes in TOP mRNAs polysomal association. Moreover the distribution of any TOP mRNA is bimodal, that is it is either fully loaded on polysomes (translated at maximum efficiency) or stored as subpolysomal mRNPs (an "all-or-none" phenomenon). This bimodal distribution of TOP mRNAs suggests that the regulation could need mRNA-specific translational regulators. It has been found that the 5'-UTR of these mRNAs, including the TOP sequence, is the *cis*-acting element responsible for regulation but the *trans*-acting factors and pathways involved remain incompletely understood. It has been shown that La protein binds the 5'- terminal oligopyrimidine (5'TOP) motif (Cardinali et al., 2003; Crosio et al., 2000; Intine et al., 2003; Pellizzoni et al., 1996) but the functional significance of this binding remains unclear. La is an evolutionary conserved and abundant RNA-binding phosphoprotein, present mostly in the nucleus, where is associated with the 3' poly(U)-rich elements of nascent RNA polymerase III (pol III) transcripts. A major role of La protein is to protect newly synthesized small RNAs from exonuclease digestion, ensuring that they are correctly folded and processed (Maraia and Intine, 2001; Wolin and Cedervall, 2002). However, despite the mainly nuclear localization, cytoplasmic functions connected with translation have been ascribed to La. The best documented and most studied role in the cytoplasm is in the translational initiation of certain viral RNAs (Ali et al., 2000; Ali and Siddiqui, 1997; Costa-Mattioli et al., 2004; Meerovitch et al., 1993). Several lines of evidence suggest that the La protein may play a positive role in TOP mRNA translational regulation: 1) in *in vitro* binding experiments, *Xenopus* homologue of the La protein binds the 5' TOP of ribosomal proteins mRNAs in competition with the putative translational repressor CNBP (Pellizzoni et al., 1996); 2) Crosio et al. (Crosio et al., 2000) reported in *Xenopus* a modest but reproducible effect of La protein on TOP mRNA translation; 3) La is

associated specifically with TOP mRNAs in the polysome fraction (Cardinali et al., 2003). However, other data point to a negative role of La in TOP mRNA translation: 1) La has been described to increase the abundance of subpolysomal RPL37 mRNA (Schwartz et al., 2004) and 2) to repress the translation of a TOP mRNA *in vitro* (Zhu et al., 2001). Evidently, La can interact with TOP mRNAs and is somehow implicated in their translational regulation, but its precise role in this process remains to be determined. For this reason, we have constructed and analyzed human cell lines that overexpress wild type La or mutated La lacking the nuclear localization signal (NLS). Our results indicate that, both in serum deprived cells and growing cells, overexpression of La does not alter significantly the association of TOP mRNAs with polysomes. As an experimental approach alternative to overexpression we utilized RNA interference to induce a decrease of La protein. About 70% reduction in La protein level does not cause visible consequences on TOP translation. It's known that La is part of the cytoplasmic Ro ribonucleoprotein (RNP) complex, which also includes Ro60 and Y RNA, and it is reported that Ro60 is required for the binding of La to the TOP element. Therefore we decided to investigate the possible involvement of the Ro RNP complex in TOP mRNA translation. The RNP complexes are small cytoplasmic particles of unknown functions that are well conserved during evolution and are expressed in all types of cells. We performed sedimentation analysis of cytoplasmic extracts fractionated on sucrose gradients or pelleted by centrifugation, and we found that La, Ro 60 and Y RNA cosediment on polysomes with TOP mRNAs in different growth conditions. This is consistent with previous work that showed that La is associated with TOP mRNAs on polysome fractions (Cardinali et al., 2003). As the binding of La to the TOP sequence has been demonstrated by several independent groups, it can be hypothesized that La recruits the Ro complex on TOP mRNA. Although this has to be proven, we have shown that a decrease of La protein abolishes the Ro60 and Y1 RNA cosedimentation with polysomes. Taken together, our data are consistent with a possible role of Ro RNP complex in TOP mRNAs translational regulation.

Riassunto

I messaggeri TOP codificano per le proteine ribosomali, fattori di allungamento e diverse altre proteine coinvolte con l'assemblaggio o la funzione dell'apparato di traduzione. Questi messaggeri sono identificati da due caratteristiche principali: i) un tratto di oligopirimidine nel 5' UTR (il motivo TOP), ii) una regolazione traduzionale dipendente dalle condizioni di crescita. E' stato riportato sia *in vitro* (cellule in coltura) che *in vivo* che la perturbazione delle condizioni di crescita cellulare, causata da una varietà di cause (sviluppo, mitogeni, uso di droghe etc.), è correlata ad uno specifico, rapido e reversibile cambiamento dell'associazione polisomale dei messaggeri TOP. La percentuale dei messaggeri TOP associati con i polisomi è circa 30-40 in cellule quiescenti e 65-75 in cellule in attiva crescita. Inoltre la distribuzione dei TOP mRNAs è definita "bimodale", in quanto questi messaggeri o vengono caricati pienamente sui polisomi (cioè tradotti alla massima efficienza) o sono sequestrati nelle particelle ribonucleoproteiche mRNP. La distribuzione bimodale dei TOP mRNA suggerisce che la regolazione potrebbe avvalersi di regolatori traduzionali specifici. E' stato dimostrato che il 5'UTR di questi messaggeri, comprensivo della sequenza TOP, è l'elemento che agisce in *cis* responsabile per la regolazione, ma i fattori in *trans* ed i *pathways* coinvolti non sono ancora stati chiariti. E' stato mostrato che la proteina La lega il motivo TOP nel 5' UTR (Cardinali et al., 2003; Crosio et al., 2000; Intine et al., 2003; Pellizzoni et al., 1996) ma il significato funzionale di questa interazione è ancora ambiguo. La è una abbondante proteina che lega l'RNA, evolutivamente conservata. Ha una localizzazione prevalentemente nucleare ed è associata con gli elementi ricchi in uridine del 3' UTR dei trascritti appena sintetizzati dalla RNA polimerasi III (Pol III). Il principale ruolo di La è proteggere da digestione esonucleasica i piccoli RNA neosintetizzati, assicurando che possano essere ripiegati e processati correttamente (Maraia and Intine, 2001; Wolin and Cedervall, 2002). Comunque, nonostante la prevalente localizzazione nucleare, sono state riportate funzioni citoplasmatiche della proteina La connesse con la traduzione. Il ruolo più documentato e meglio studiato della proteina La nel citoplasma è il suo coinvolgimento nell'inizio traduzionale di alcuni RNA virali (Ali et al., 2000; Costa-Mattioli et al., 2004; Meerovitch et al., 1993). Alcuni studi suggeriscono che la proteina La può avere un ruolo positivo nella

regolazione traduzionale dei messaggeri TOP: 1) in esperimenti di legame *in vitro*, l'omologo di *Xenopus* dell'autoantigene La lega il 5' TOP dei messaggeri codificanti le proteine ribosomali, in competizione con l'ipotetico repressore CNBP (Pellizzoni et al., 1996); 2) Crosio et al. (Crosio et al., 2000) hanno riportato in *Xenopus* un modesto ma riproducibile effetto della proteina La sulla traduzione dei messaggeri TOP; 3) La è associata in maniera specifica con i TOP mRNA nella frazione polisomale (Cardinali et al., 2003). Tuttavia altri risultati indicano un ruolo negativo di La sulla traduzione dei messaggeri TOP: 1) La può incrementare l'abbondanza del messaggero RPL37 nella frazione subpoliribosomale (Schwartz et al., 2004) e 2) può reprimere la traduzione di un TOP mRNA *in vitro* (Zhu et al., 2001). Evidentemente la proteina La interagisce con i messaggeri TOP ed è in qualche modo coinvolta nella loro regolazione traduzionale, ma il suo ruolo preciso in questo processo rimane da essere determinato.

Per questo motivo abbiamo costruito ed analizzato linee cellulari umane che sovraesprimessero la proteina La "wild- type" od una forma mutata, mancante della sequenza di localizzazione nucleare (NLS). I nostri risultati indicano che, sia in cellule quiescenti sia in attiva crescita, la sovraespressione di La non altera in maniera significativa l'associazione polisomale dei messaggeri TOP. Come approccio sperimentale alternativo alla sovraespressione abbiamo utilizzato l'RNA interference per indurre un decremento della proteina La; abbiamo ottenuto oltre il 70% di riduzione nel livello proteico della proteina La ma questa diminuzione non causa conseguenze visibili sulla traduzione dei messaggeri TOP. I risultati degli esperimenti di sovraespressione e di interference di La ci hanno indotto ad analizzare il coinvolgimento di altri possibili effettori nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP. In particolare ci siamo concentrati sulla proteina Ro60, indicata come fattore richiesto per il legame di La alla sequenza TOP (Pellizzoni et al., 1998). La proteina Ro60, insieme a La e al piccolo RNA Y, costituisce il "core" dei complessi ribonucleoproteici (RNP) di Ro, che sono piccole particelle prevalentemente citoplasmatiche, ben conservate durante l'evoluzione, ma la cui funzione è ancora poco chiara. Abbiamo compiuto esperimenti di co-sedimentazione ed abbiamo trovato, sia frazionando estratti citoplasmatici su gradiente di saccarosio sia separando per centrifugazione, che Ro60, La e Y1 colocalizzano con i polisomi in differenti condizioni di crescita. Ciò indica una possibile connessione funzionale tra il complesso Ro60 e la regolazione traduzionale dei messaggeri TOP. I nostri risultati sono in accordo con un precedente lavoro che mostrava l'associazione di La con i messaggeri TOP sulle

frazioni polisomali (Cardinali et al., 2003). Poichè il legame di La alla sequenza TOP è stato provato da diversi gruppi indipendenti, si può ipotizzare che La recluti il complesso di Ro sui messaggeri TOP. Anche se questa ipotesi deve essere provata, abbiamo dimostrato che Ro60 e Y1 non cosedimentano con i polisomi quando è indotto un decremento della proteina La. Complessivamente i nostri dati sono in accordo con un possibile ruolo del complesso Ro RNP nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP.

Introduzione

I geni TOP

Componenti dell'apparato traduzionale codificate dai TOP mRNA.

Molti processi biologici fondamentali negli eucarioti come la proliferazione cellulare, il differenziamento, lo sviluppo e la trasformazione maligna coinvolgono cambiamenti a livello traduzionale. Scoperte fatte negli ultimi anni hanno rivelato che la sintesi di molte componenti dell'apparato di traduzione è regolata a livello traduzionale. Tra queste ricordiamo le proteine ribosomali (RPs) (Meyuhas, 2000), il fattore eEF1 α (Loreni et al., 1993), le tre subunità alfa, beta e gamma del fattore eEF1B (dati del nostro laboratorio in pubblicazione), Rack (Loreni et al., 2005), la PABP (Hornstein et al., 1999), la nucleolina e la hnRNP (Kato et al., 1994). Una caratteristica strutturale degli mRNA sopra citati è la presenza di un tratto ricco di pirimidine al 5'UTR (5' TOP) e per questo sono chiamati TOP mRNAs. Questo motivo strutturale comprende l'elemento regolatore in *cis* nel controllo traduzionale di questi mRNAs (cfr. paragrafo “elementi in *cis* nel controllo traduzionale dei TOP-mRNA”). I geni TOP rappresentano circa lo 0,2-0,5% dei geni di una cellula eucariotica, mentre circa il 20% dell'RNA messaggero di cellule in attiva crescita appartiene a questa classe di geni (Meyuhas et al., 1996). La specifica regolazione dei messaggeri TOP non è limitata ai vertebrati, in quanto è stata osservata anche nei TOP mRNA di *Drosophila* (Meyuhas et al., 1996). Al contrario nessuna delle proteine di Lievito appartenenti all'apparato di traduzione è codificata da un messaggero TOP.

Il controllo traduzionale dei geni TOP

I messaggeri TOP sono prevalentemente associati ai polisomi in cellule in attiva crescita, mentre in cellule quiescenti in massima parte sono sequestrati in particelle ribonucleoproteiche leggere (mRNP). Questo comportamento è stato osservato in cellule in coltura sia in uno stato di crescita attiva che in uno stato di stasi proliferativa, e in risposta a diversi stimoli fisiologici e farmacologici. Ad esempio esperimenti eseguiti in una linea cellulare di *Xenopus*, laB3.2, derivata da epitelio di rene, hanno evidenziato come la

presenza o l'assenza di siero nel terreno di coltura determina la percentuale dei messengeri TOP sui polisomi; in particolare in presenza di siero circa il 70-80% dell'mRNA TOP è localizzato sui polisomi (quindi attivamente tradotto), mentre in assenza di siero solo il 20-30% resta sui polisomi (Lorenì and Amaldi, 1992). Quindi, i messengeri TOP si ritrovano alternativamente in uno stato represso o attivo ed inoltre, quando sono in uno stato attivo, vengono tradotti alla massima efficienza (fenomeno del "tutto o niente") (Lorenì and Amaldi, 1992). Questa distribuzione bimodale dei messengeri TOP tra mRNP e polisomi indica chiaramente che la repressione traduzionale avviene durante l'inizio della traduzione. Questa regolazione traduzionale è stata riscontrata anche in seguito al trattamento con glucocorticoidi di cellule di linfossarcoma (Meyuhas et al., 1987) o in cellule arrestate in fase S dopo trattamento con afidicolina o idrossiurea (Shama et al., 1995) o in cellule arrestate in fase M usando nocodazolo (Avni et al., 1994). Inoltre il controllo traduzionale dipendente dalle condizioni di crescita non è limitato a cellule in coltura, come indicato dall'osservazione che la traduzione dei messengeri TOP è repressa nella transizione da fegato fetale, in stato di attiva crescita, a fegato adulto, in stato quiescente (Alonì et al., 1992).

Analisi della distribuzione dei TOP-mRNA tra polisomi e mRNP

La tecnica usata per saggiare l'attività traduzionale di un messaggero è l'analisi della "distribuzione polisomale". Con questa tecnica è possibile valutare l'attività traduzionale di un trascritto in diverse condizioni di crescita osservando la sua associazione con particelle di diversa grandezza (dai polisomi pesanti alle particelle ribonucleoproteiche leggere). Il protocollo sperimentale prevede i seguenti passaggi:

- Estratti citoplasmatici di cellule in differenti condizioni di crescita sono caricati su un gradiente di saccarosio 15-50%.
- Il gradiente viene frazionato e dalle frazioni raccolte viene estratto l'RNA
- L'RNA di ogni singola frazione viene caricato su gel e l'analisi per Northern Blotting con l'utilizzo di sonde specifiche permette di misurare la percentuale di messaggero associato ai polisomi.

L'utilizzo di sonde specifiche per i messaggeri TOP mostra che questi tendono a ripartirsi in due popolazioni discrete (polisomi o mRNP) a seconda delle diverse condizioni di crescita, rispetto ai messaggeri non TOP, come l'mRNA della β -actina, che invece sono sempre attivamente tradotti (fig.1)

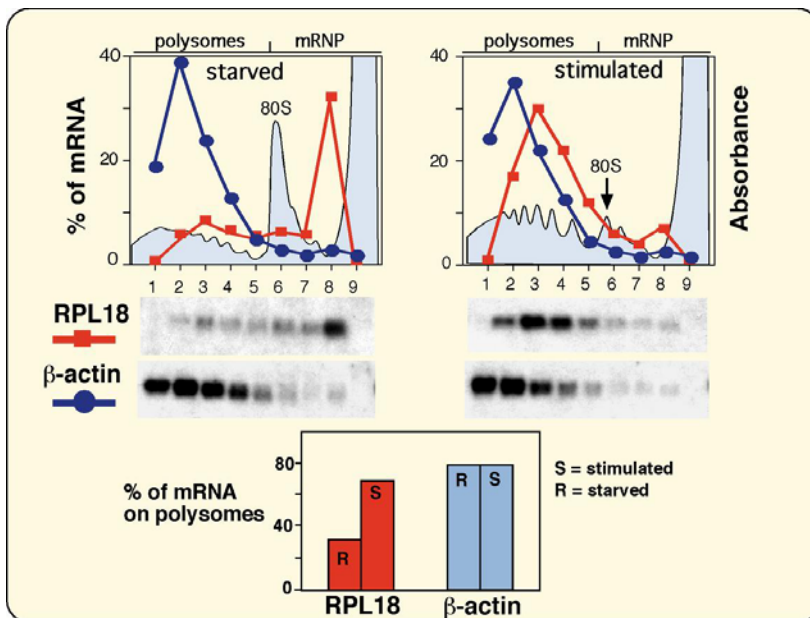


Fig.1: Distribuzione polisomale dei TOP-mRNA. I grafici mostrano la quantizzazione dei segnali relativi alla percentuale di messaggero TOP RPL18 e del messaggero non TOP β -actina nelle singole frazioni del gradiente, in condizioni quiescenti e di attiva crescita. Sotto i grafici sono mostrati i corrispondenti Northern Blot ibridati con le sonde specifiche per i messaggeri analizzati. L'istogramma indica la percentuale dell'mRNA sui polisomi

Il controllo traduzionale di alcuni mRNA TOP può dipendere dal tipo cellulare

Alcuni messaggeri TOP mantengono il caratteristico controllo traduzionale solo in specifici tipi cellulari. L'mRNA del gene TOP EF2 è

regolato traduzionalmente in maniera dipendente dalle condizioni di crescita solo nelle cellule ematopoietiche, ma non in fibroblasti e cellule HeLa (Avni et al., 1997). In maniera simile, il messaggero della PABP non è regolato nelle cellule HeLa ed è costitutivamente represso nelle cellule di linfosarcoma (Avni et al., dati non pubblicati). Esperimenti di trasfezione con messaggeri chimerici hanno dimostrato che i primi 30 nucleotidi degli mRNA codificanti EF2 e PABP conferiscono a un messaggero reporter una regolazione traduzionale dipendente dalle condizioni di crescita anche in linee cellulari in cui l'mRNA endogeno risulta refrattario a questo tipo di controllo (Avni et al., 1997 e dati non pubblicati). Questi risultati suggeriscono la presenza, in alcuni TOP mRNA, di regioni di regolazione poste più a valle capaci di annullare le caratteristiche di regolazione del 5'UTR TOP in maniera dipendente dal tipo cellulare.

Il controllo traduzionale dei geni TOP durante lo sviluppo e il differenziamento.

La sintesi dei messaggeri TOP durante l'embriogenesi di *Xenopus laevis* inizia subito dopo la cosiddetta "transizione di midblastula" (stadio 8) durante la gastrulazione. I trascritti neosintetizzati, però, vengono conservati in uno stato traduzionalmente inattivo per circa 24 ore e solo dopo lo stadio 26 dello sviluppo sono caricati sui polisomi per essere attivamente tradotti consentendo l'accumulo delle proteine ribosomali (Baum and Wormington, 1985; Pierandrei-Amaldi et al., 1982). Un meccanismo molto simile avviene anche durante l'oogenesi di *Xenopus laevis*, dove l'rp-mRNA (RNA messaggero delle proteine ribosomali), è accumulato in grandi quantità già allo stadio II dello sviluppo e diviene traduzionalmente attivo solamente nelle fasi successive (Cardinali et al., 1987).

Pathway di signalling nella regolazione traduzionale dei TOP mRNA

Poichè la biogenesi del ribosoma richiede un notevole dispendio energetico, la sintesi degli RNA e delle proteine ribosomali è altamente regolata. Quindi, le cellule devono rispondere rapidamente ai segnali di crescita extracellulari ed intracellulari, e questi segnali devono essere convertiti nella sintesi dei ribosomi. Come già detto, i messaggeri TOP sono controllati a livello traduzionale con un meccanismo dipendente dalle

condizioni di crescita ed è stata focalizzata molta attenzione nel determinare quali vie di trasduzione del segnale sono implicate in questo processo.

Diverse evidenze hanno rivelato che la trasduzione dei segnali mitogenici e di crescita nella traduzione dei messaggeri TOP coinvolge il pathway mediato dalla PI3 (**Phosphoinositide 3 Kinase**)(Stolovich et al., 2002; Tang et al., 2001). La stimolazione di numerosi recettori di fattori di crescita porta ad un aumento dell'attività di PI3K e del livello dei suoi prodotti, fosfatidilinositolo -3,4,5-P₃ e fosfatidilinositolo -3,4-P₂. Questi secondi messaggeri lipidici, insieme alla PDK1 (3-phosphoinositide.dependent kinase 1), determinano l'attivazione di PKB (protein kinase B), capace di mediare gli eventi a valle indotti da PI3K. E' stato dimostrato che sia l'utilizzo di un inibitore specifico della PI3K (LY294002) sia la sovraespressione di un dominante negativo di PI3K, PDK1 e PKB, determinano la repressione dell'attività traduzionale dei messaggeri TOP in risposta ai fattori di crescita (Stolovich et al., 2002) e ai nutrienti (Tang et al., 2001).

Tra gli eventi indotti da PI3K c'è l'attivazione di mTOR (mammalian target of rapamycin) (Hay and Sonenberg, 2004). mTOR è una chinasi serina/treonina altamente conservata dal punto di vista evolutivo, capace di regolare la crescita cellulare, così come la progressione del ciclo, integrando segnali dai nutrienti e dai fattori di crescita. L'azione di mTOR può essere inibita in maniera altamente specifica dalla rapamicina, antibiotico derivante dal batterio *Streptomyces hygroscopicus*. Effettori a valle di mTOR sono 4E-BP1 (**4E-binding protein 1**) e le chinasi di S6, S6K1 e S6K2. La fosforilazione della proteina ribosomale S6 ad opera delle chinasi S6K è uno dei primi eventi rilevati in seguito a stimoli mitogenici . La concomitante attivazione traduzionale dei TOP mRNA in queste circostanze (Jefferies et al., 1994b; Thomas and Thomas, 1986) ha portato i ricercatori ad ipotizzare una relazione causa-effetto tra i vari eventi. Secondo il modello di Thomas e colleghi (Fumagalli and Thomas, 2000) la fosforilazione della proteina S6, conseguente all'attivazione delle chinasi S6K, aumenta l'affinità dei ribosomi per i messaggeri TOP e così facilita la loro traduzione. A favore di questo modello è stato osservato che il trattamento di cellule in crescita con rapamicina, inibendo mTOR e impedendo quindi l' attivazione delle S6K e la fosforilazione di S6, determina una inibizione traduzionale specifica dei messaggeri TOP (Jefferies et al., 1994a; Terada et al., 1994). Inoltre l'espressione di un dominante negativo di S6K1 privo dell'attività chinasica rende gli mRNA TOP non stimolabili da siero (Jefferies et al., 1997). Altre osservazioni però sono in disaccordo con questo modello e successivi studi

biochimici e genetici hanno contraddetto una relazione causale tra la fosforilazione di S6 e la traduzione dei messaggeri TOP (Barth-Baus et al., 2002; Stolovich et al., 2002; Tang et al., 2001). Inoltre è stato dimostrato recentemente che la traduzione dei messaggeri TOP è regolata normalmente sia in epatociti di topi knockout $S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-}$ (Pende et al., 2004) sia in topi esprimenti una forma di S6 non fosforilabile (Ruvinsky et al., 2005). Quindi questi ultimi risultati sperimentali indicano nel loro insieme che i messaggeri TOP sono probabilmente regolati da un pathway indipendente da S6K e dalla fosforilazione di S6 (Ruvinsky and Meyuhas, 2006). Comunque, come descritto precedentemente, è stato riportato che la regolazione dei TOP mRNA è pienamente dipendente dal pathway della PI3K e della PKB, che include anche mTOR (Stolovich et al., 2002; Tang et al., 2001). Quindi il ruolo della chinasi mTOR nel controllo traduzionale dei messaggeri TOP deve ancora essere stabilito chiaramente. La figura 2 illustra un possibile pathway di signalling nella regolazione dei TOP mRNA.

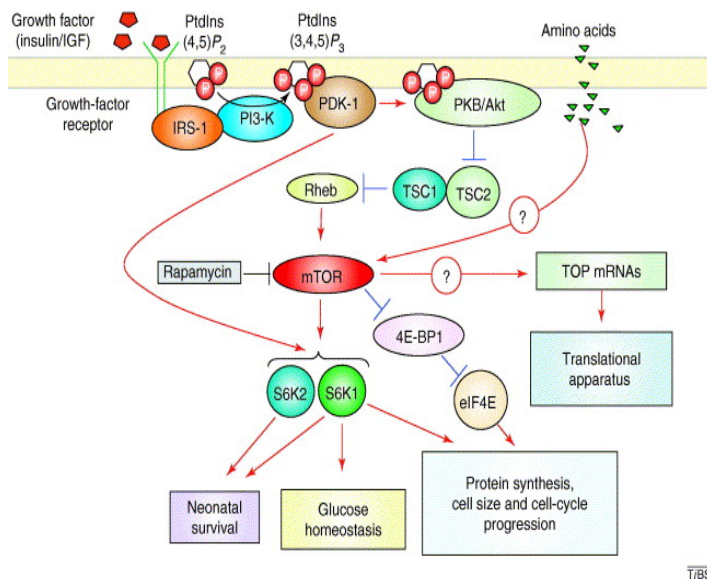


Fig 2: Schema generale del pathway di signalling dei fattori di crescita e degli amminoacidi. I TOP mRNAs sono traduzionalmente attivati dai fattori di crescita e dagli amminoacidi, attraverso un pathway che coinvolge mTOR con un meccanismo non ancora chiarito

Elementi in cis nel controllo traduzionale dei TOP mRNA.

Il confronto fra le sequenze degli mRNA TOP conosciuti di *Xenopus* ha messo in evidenza caratteristiche strutturali conservate fra tutti i membri di questa famiglia:

- 1) La presenza di una citosina al sito CAP: l'inizio di trascrizione con questo nucleotide al posto della più generale adenina è caratteristica comune di tutti i TOP mRNA.
- 2) Un tratto ininterrotto di 5-12 pirimidine nel 5'UTR del messaggero prima del codone di inizio (Fig.3)
- 3) Due moduli di sequenza vicini ricchi in GC, il primo, e AG, il secondo, a valle del tratto oligopirimidinico, sempre nel 5'UTR.
- 4) La presenza di un primo introne in corrispondenza o nelle vicinanze del codone di inizio della traduzione.
- 5) Un 3'UTR mediamente corto (Ledda et al., 2005)

```
RPL3  CUCUACCGGCGGGAUUUGAUG
RPL6  CUCUUUCCCAUCUUGCAAGAUG
RPL7  CCUCUUUUUCCGGCUGGAACCAUG
RPL8  CUCUUUCGGCCGCGUGUGAACAGGACCCGUGGCCAUG
RPL9  CUUUCUUUGCUGCGUCUACUGCGAGAAUG
RPL10 CUCUUUCCCUUCGGUGUGCCACUGAAGAUCCUGGUGUGGCCAUG
RPL10A CUCUUUCCGGUUAAGCGCGGCGUGAGAAGCCAUG
```

Fig 3: Allineamento dei 5'UTR di vari rp-mRNA umani. In rosso sono indicate le regioni ricche in pirimidine mentre il codone di inizio della traduzione è sottolineato.

Questi elementi sono altamente conservati e svolgono un ruolo importante nella regolazione traduzionale di tutti i messaggeri TOP. Esperimenti di trasfezione hanno mostrato che i primi 27-34 nucleotidi degli mRNA di mammifero che codificano per rpS16, rpL32, rpL31a, eEF2 e

PABP conferiscono un comportamento TOP all'mRNA dell'ormone della crescita umano utilizzato come gene reporter (Avni et al., 1997; Avni et al., 1994; Hornstein et al., 1999; Levy et al., 1991). Inoltre singole mutazioni all'interno del tratto ininterrotto di pirimidine aboliscono la regolazione (Biberman and Meyuhass, 1997). Un'analisi più approfondita ha evidenziato che anche la regione a valle del tratto di oligopirimidine è necessaria per una completa regolazione (Avni et al., 1994), indicando quindi l'integrità del 5'UTR come elemento sufficiente e necessario per la regolazione traduzionale dei TOP.

Elementi in *trans* nel controllo traduzionale dei TOP mRNA.

Per capire i meccanismi molecolari del controllo traduzionale dipendente dalle condizioni di crescita dei messaggeri TOP si sono ricercati possibili fattori in *trans* implicati nella regolazione del 5'TOP. Un modello iniziale (rivisto in Meyuhass, 2000) proponeva il coinvolgimento di fattori generali dell'apparato di traduzione. Se qualcuno di questi avesse avuto una particolare bassa affinità per i messaggeri TOP, a causa dell'unicità del 5'UTR, allora un aumento o una diminuzione della sua attività avrebbe portato ad uno specifico controllo di questi messaggeri. Due evidenze sperimentali sono però in disaccordo con l'ipotesi che componenti generali della traduzione possano determinare l'efficienza traduzionale dei messaggeri TOP: 1) in condizioni quiescenti la maggior parte dei TOP mRNAs sono totalmente esclusi dai polisomi, piuttosto che essere localizzati gradualmente nei polisomi più leggeri; questo indica che la repressione traduzionale possa dipendere da uno specifico fattore, invece che da una diminuita competitività per un fattore limitante dell'inizio di traduzione. 2) La traduzione dei TOP mRNAs di *Xenopus* è repressa durante gli stadi iniziali dell'embriogenesi, in condizioni di rapida proliferazione e intensa sintesi proteica (Amaldi and Pierandrei-Amaldi, 1990) ed in presenza quindi di un'elevata quantità di fattori generali della traduzione.

Attualmente è ritenuto più probabile il coinvolgimento di specifici fattori proteici in grado di reprimere o attivare la traduzione dei TOP mRNA. Ricerche tese ad identificare proteine che interagiscono con il motivo TOP hanno rivelato in linfociti T di topo una proteina citoplasmatica, p56^{L32}, che lega specificatamente il 5'UTR del messaggero rpL32 (Severson et al., 1995). Esperimenti di legame *in vitro* tra proteine ed RNA, eseguiti utilizzando porzioni del 5'UTR di 54 nucleotidi del gene L4 di *Xenopus* ed

estratti proteici di vari tipi cellulari della stessa specie, hanno portato all'identificazione del fattore A di 57 KDa che interagisce con il tratto di oligopirimidine, e del fattore C di 31 KDa, che lega i moduli ricchi in GC e GA posti leggermente a valle (Cardinali et al., 1993). Studi successivi hanno permesso di identificare la proteina di 57KDa, capace di legare il tratto di pirimidine, come l'omologo in *Xenopus* dell'autoantigene umano La e, dall'altra parte, la proteina che interagisce in forma dimerica con il tratto subito a valle, come la proteina CNBP (cellular nucleic-acid-binding protein), chiamata ZNF9 nell'uomo (Pellizzoni et al., 1996; Pellizzoni et al., 1997). Il legame di La e ZNF9/CNBP al 5'UTR dei TOP mRNA richiede la presenza di una terza proteina, l'autoantigene Ro60 (Pellizzoni et al., 1998).

L'apparente correlazione tra gli elementi strutturali al 5'UTR dei messaggeri TOP e il legame specifico di questi fattori proteici indicano La e ZNF9/CNBP come potenziali candidati per la regolazione traduzionale dei geni TOP (cfr paragrafo ruolo ipotetico di La e ZNF9/CNBP nella regolazione traduzionale dei geni TOP)

Nei prossimi capitoli saranno descritte le proteine La e Ro60, il cui ruolo nella regolazione dei TOP è stato analizzato durante la mia tesi.

La proteina ZNF9/CNBP

ZNF9/CNBP è una proteina di circa 20 KDa, costituita da 120 amminoacidi, con sette domini Zinc-finger Cys/Cys-Hys/Cys per l'interazione con l'RNA. Appartiene ad una famiglia di proteine che legano acidi nucleici a singolo filamento (Rajavashisth et al., 1989) ed ha una sequenza amminoacidica altamente conservata: la sequenza di CNBP umana (ZNF9) è oltre il 90% identica a quella di *Xenopus laevis*, il 99% identica a quella del pollo ed al 100% identica a quella del topo.

Nonostante la sua scoperta sia avvenuta più di dieci anni fa, ben poco è conosciuto sulla funzione di CNBP. Inizialmente fu proposta una sua interazione con i promotori di numerosi geni coinvolti nella sintesi e l'apporto del colesterolo, incluso il recettore per le lipoproteine a bassa densità (Rajavashisth et al., 1989). Studi successivi hanno però escluso un coinvolgimento di questa proteina nella regolazione degli steroli nella cellula (Warden et al., 1994) ed hanno mostrato un suo ruolo nel reprimere la trascrizione del gene umano per la catena leggera della β miosina (β -MHC) (Flink and Morkin, 1995). Inoltre recentemente il Knock-out di ZNF9/CNBP nel topo e nel pollo ha evidenziato un ruolo importante di questo fattore

nella formazione del cervello (Abe et al., 2006; Chen et al., 2003a). Nell'uomo ZNF9 è coinvolta in una delle forme più comuni di patologie muscolari, la distrofia miotonica di tipo 2 (DM2). E' stato infatti dimostrato che questa malattia è causata dalla presenza di espansioni di tetranucleotidi CCTG (con una media di 5000 ripetizioni) nel primo introne del gene ZNF9 (Liquori et al., 2001). L'RNA contenente l'espansione sembrerebbe essere trascritto ma non esportato nel citoplasma ed il suo accumulo nel nucleo determinerebbe la formazione di foci identificabili mediante ibridazione. Rimane ancora da chiarire come l'espansione di una regione non codificante possa causare il fenotipo clinico. L'ipotesi più accreditata evidenzia l'eventuale effetto dannoso dell'RNA espanso che, accumulandosi nel nucleo, determina il sequestro di proteine capaci di legare le ripetizioni CCTG, necessarie in altre funzioni nucleari come lo splicing o la trascrizione. Recentemente comunque è stato dimostrato che topi ZNF9^{+/-} mostrano le caratteristiche fenotipiche della distrofia miotonica di tipo 2, suggerendo quindi un ruolo chiave di questa proteina nella manifestazione di questa patologia (Chen et al., 2007).

Ruolo ipotetico di La e ZNF9/CNBP nella regolazione traduzionale dei geni TOP

Come detto precedentemente le proteine La e ZNF9/CNBP legano *in vitro* due regioni distinte del 5'UTR dei messaggeri TOP, con l'ausilio dell'autoantigene Ro60. Queste due proteine competono per l'interazione con Ro60 e il loro legame sul messaggero è mutualmente esclusivo (Pellizzoni et al., 1998). Inoltre mutazioni nel tratto di pirimidine, che annullano *in vivo* la regolazione traduzionale delle proteine ribosomali, compromettono non solo l'interazione di La sul 5'UTR, ma anche quella del dimero ZNF9 (Pellizzoni et al., 1998). Sulla base di queste osservazioni è stato proposto un modello (Fig.4) nel quale il 5'UTR di un messaggero TOP è in equilibrio tra una conformazione aperta ed una chiusa. Queste due conformazioni potrebbero essere riconosciute in maniera diversa dall'apparato di traduzione. In particolar modo una conformazione chiusa, mediata dal legame di ZNF9, potrebbe inibire la traduzione del messaggero, mentre una conformazione aperta, mediata dal legame con La potrebbe favorirne la traduzione. In questa prospettiva il ruolo positivo di La consisterebbe principalmente nella rimozione della repressione esercitata da ZNF9, che stabilizza il 5'UTR in una conformazione chiusa. Alla luce di

questo modello durante la mia tesi sono stati compiuti esperimenti tesi ad approfondire l'effetto della proteina La sulla traduzione dei messaggeri TOP.

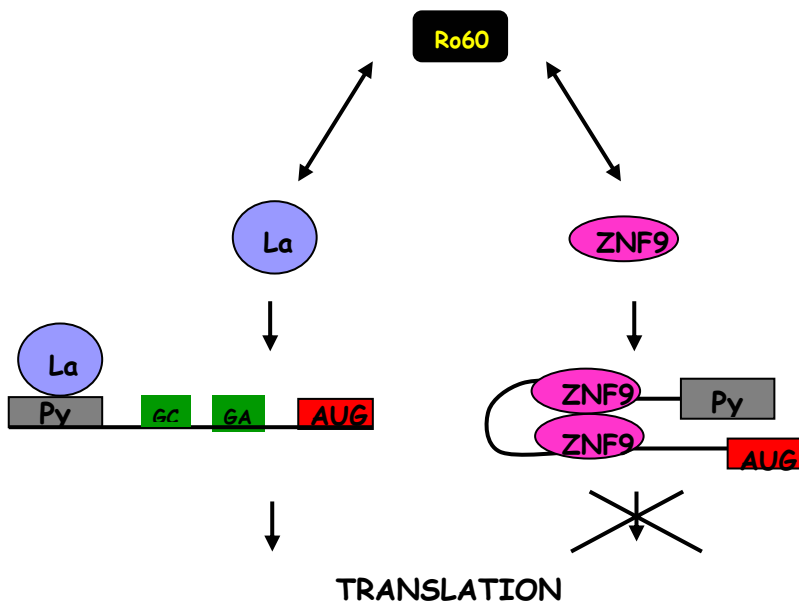


Fig 4: Modello proposto per il ruolo di La e di ZNF9 nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP

La proteina La

La proteina La (anche chiamata SS-B) è stato il primo autoantigene descritto in pazienti affetti dalle malattie reumatiche del “Lupus Eritematoso sistemico” e della sindrome di Sjögren (Alspaugh and Tan, 1975; Mattioli and Reichlin, 1974). (Il nome La deriva dal nome del paziente in cui è stato rilevato l'anticorpo, e SS-B si riferisce alla prevalenza di anticorpi nella sindrome di Sjögren). Sebbene caratterizzata inizialmente nell'uomo, omologhi di La sono stati identificati in tutti gli eucarioti compresi tripanosomi, lievito e piante (Maraia and Intine, 2001; Wolin and Cedervall, 2002). Questa proteina è stata implicata in diversi processi cellulari e virali, di cui il più noto è il legame e la stabilizzazione di nuovi trascritti sintetizzati dalla RNA polimerasi (Pol) III. Questi trascritti comprendono i pre-tRNAs, il pre-5S rRNA, il 7SL (SRP) RNA, il piccolo RNA nucleare (snRNA) U6 e l'RNA della RNase P (Wolin and Cedervall, 2002). La proteina La è anche associata, insieme all'autoantigene Ro60, con i piccoli RNAY e con i 5S rRNAs non maturati correttamente (Belisova et al., 2005; Shi et al., 1996).

Per la maggior parte degli RNA cellulari coinvolti nel legame con questa proteina, come i tRNAs e l'rRNA 5S, il fattore La lega i precursori piuttosto degli RNA maturi. Questo avviene perchè almeno parte del sito di riconoscimento per La è UUU_{OH} , che è presente al 3' dei nuovi trascritti della Pol III. Questi uridilati terminali sono usualmente rimossi durante la maturazione dell'RNA, eliminando così il sito di legame per La.

Una classe di mRNA cellulari target della proteina La, il cui legame non dipende dal $3'UUU_{OH}$, sono i geni TOP, che sono stati descritti nel precedente capitolo (Cardinali et al., 2003; Crosio et al., 2000; Intine et al., 2003; Pellizzoni et al., 1996).

La proteina La è anche coinvolta nel pathway dell'inizio di traduzione usato dagli mRNA con elementi IRES sia virali, come il poliovirus (Meerovitch et al., 1993) e il virus dell'Epatite C (HCV) (Ali et al., 2000; Ali and Siddiqui, 1997; Costa-Mattioli et al., 2004), sia cellulari, come la proteina XIAP (proteina inibitrice dell'apoptosi X-linked) (Holcik and Korneluk, 2000) e l'mRNA della proteina che lega la catena pesante dell'immunoglobulina umana (Kim et al., 2001)

Abbondanza e localizzazione cellulare della proteina La

La è una proteina molto abbondante. La proteina La umana è stata stimata essere presente in circa 2×10^7 copie per cellula, quasi quanto le proteine ribosomali. Esperimenti di immunofluorescenza hanno rivelato che La è più abbondante nel nucleo che nel citoplasma. Nel nucleo, è sia nucleoplasmica che nucleolare (Hendrick et al., 1981; Intine et al., 2003; Maraia and Intine, 2001; Yoo and Wolin, 1994). Sebbene sia maggiormente nucleare, in certe circostanze una frazione di La può diventare citoplasmatica. Durante l'infezione di cellule di mammifero da parte del poliovirus una porzione di La si ridistribuisce nel citoplasma (Meerovitch et al., 1993). In maniera simile La diventa citoplasmatica durante l'apoptosi di cellule di mammifero, probabilmente per la rimozione della sequenza di localizzazione nucleare da proteasi simili alle caspasi (Ayukawa et al., 2000). Inoltre Maraia e colleghi hanno trovato una correlazione tra lo stato fosforilativo della serina 366 di La e la sua localizzazione nucleare (Intine et al., 2003). Nella proteina La umana sono infatti stati mappati quattro siti di fosforilazione e il maggiore sito di fosforilazione è quello della casein chinasi 2 (CK2) nel residuo serina 366 (Broekhuis et al., 2000; Schwartz et al., 2004). Secondo lo studio di Maraia e colleghi La non fosforilata è prevalentemente citoplasmatica, mentre quella fosforilata è essenzialmente nucleare, anche se lo stato di fosforilazione della proteina non sembra essere causa della sua localizzazione.

Infine è stato mostrato che la proteina La fa la spola ("shuttles") tra il nucleo ed il citoplasma (Fok et al., 2006) ed un recente lavoro, che ha analizzato l'espressione e la localizzazione di questa proteina nei neuroni, ha dimostrato che la sumoilazione (una modifica post traduzionale simile ad una piccola ubiquitinazione) di La determina la direzionalità del suo trasporto nel compartimento assonale (van Niekerk et al., 2007).

Caratteristiche strutturali della proteina La

Subito dopo il sequenziamento la proteina La è stata inclusa nella famiglia di proteine con motivo di riconoscimento dell'RNA (RRM) (Kenan et al., 1991). Il RRM è uno dei più numerosi domini codificati dal genoma umano, che spesso si trova nelle proteine in prossimità di altri tipi di domini di legame all'RNA (Maris et al., 2005). Il peso della proteina La varia da

circa 30kDa nel lievito, dove ha un solo RRM, a circa 50kDa nell'uomo, dove ha due RRM.

L'allineamento delle proteine La di specie diverse rivela che la struttura può essere divisa in tre regioni: il "motivo La", il RRM1 e il dominio C-terminale. Il "motivo La" e il RRM1 costituiscono il dominio N-terminale (NTD), la regione più conservata della proteina La (Fig.5). L'N-terminale nell'uomo ha il 30% di identità con quello di *S.cerevisiae* e il 40% con quello di *T.brucei*. Il "motivo La" e il RRM1 cooperano a formare un unico dominio di legame all'RNA, specifico per il legame al 3' UUU_{OH} dei neosintetizzati trascritti di Pol III (Maraia and Bayfield, 2006).

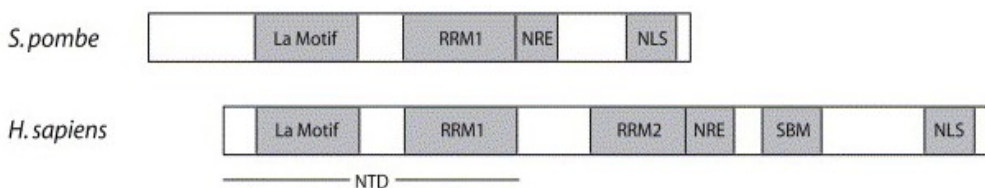


Fig 5: Confronto tra le rappresentazioni schematiche delle proteine La di *S. pombe* e dell'uomo. NRE: elemento di ritenzione nucleare; SBM: corto motivo basico; NLS: segnale di localizzazione nucleare; NTD: dominio N-terminale

La struttura del "motivo La" è stata recentemente caratterizzata ed adotta una conformazione "winged-helix" (Dong et al., 2004; Kenan and Keene, 2004). Il dominio C-terminale è la parte meno conservata della proteina La, variando tra le diverse specie sia in misura che in sequenza. E' costituito da circa 70 amminoacidi in *S.cerevisiae* e in *S.pombe* fino a oltre 200 amminoacidi nell'uomo. In questa regione mappano i siti di fosforilazione della proteina e la sequenza di ritenzione nucleare (NRE), necessaria per prevenire l'esporto di La associata ai pre-tRNA e garantire una corretta maturazione di questi precursori nel nucleo (Bayfield et al., 2007; Intine et al., 2002). Nel dominio C-terminale umano è stata dimostrata la struttura di un atipico RRM, che comprende un integrale elemento di ritenzione nucleare (Jacks et al., 2003). Sebbene per questo atipico RRM non siano state provate delle funzioni di legame all'RNA, sembra probabile che il dominio C-

terminale partecipi al legame dell'RNA con un meccanismo finora non determinato. Risultati precedenti indicano che il RRM C-terminale di La partecipa all'interazione con il cap5'-trifosfato dei trascritti Pol III (Maraia and Intine, 2001). Alcuni dati suggeriscono che questa regione lega gli RNA che non sono Pol III, come i messaggeri che codificano per le proteine ribosomali e fattori di traduzione (Cardinali et al., 2003; Intine et al., 2003), che sono caratterizzati da sequenze terminali ricche in pirimidine (TOP) nei loro 5'UTR

Funzioni della proteina La

Il ruolo fondamentale della proteina La è la stabilizzazione, durante la loro maturazione, dei trascritti della Pol III, di cui una classe importante sono i tRNAs. I precursori dei tRNAs appena sintetizzati sono sottoposti ad un processamento da parte della RNasi P al 5', ad un processamento al 3', a modificazioni di basi, all'addizione del 3'-CCA, all'amminoacilazione ed all'esporto nucleare prima di assumere la loro funzione nel citoplasma. Durante il suo ciclo vitale un tRNA interagisce con 30-40 proteine. Attraverso il legame all'estremità 3' UUU_{OH} che risulta dalla terminazione di Pol III, La è la prima proteina ad interagire con i trascritti nascenti e, la sua assenza nel lievito, rende questi trascritti facilmente suscettibili a digestione esonucleolitica 3'-5' (Fig.6) (Intine et al., 2000; Yoo and Wolin, 1997). In cellule wild-type, il primo evento del processamento è la rimozione della sequenza leader al 5' da parte della RNasi P. Successivamente l'estremità immatura del 3', legata a La, è rimossa da un'endonucleasi non ancora identificata. In cellule in cui manca La, il primo evento di processamento è la digestione esonucleolitica al 3' (Yoo and Wolin, 1997). Dopo il taglio da parte della RNasi P l'estremità 3' matura è generata da una successiva digestione esonucleasica (Fig.6). Esperimenti compiuti in estratti di *Xenopus* (Lin-Marq and Clarkson, 1998) e in estratti cellulari umani (Fan et al., 1998) in cui non c'era la proteina La hanno confermato che in assenza di La i pre-tRNAs subiscono digestioni esonucleolitiche al 3'. Quindi, in organismi che vanno dal lievito all'uomo, il legame di La al pre-tRNA serve per proteggere il 3' dagli attacchi esonucleolitici.

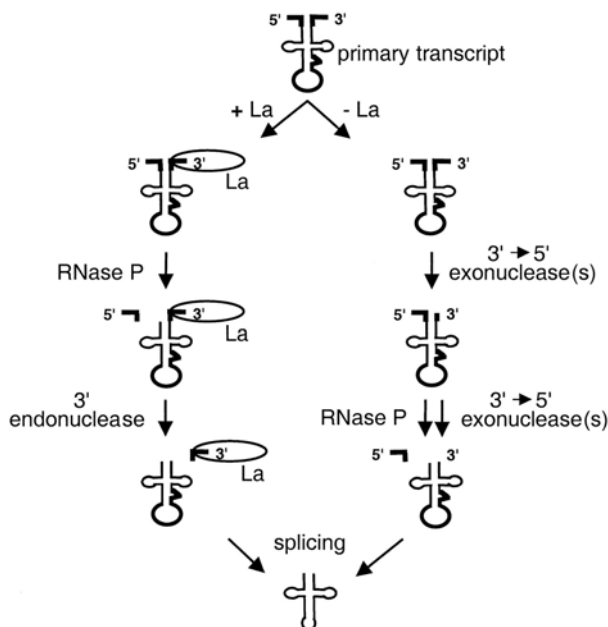


Fig 6: Modello di maturazione dei pre-tRNA in cellule wild-type e in cellule in cui manca La

Recentemente è stato proposto che la fosforilazione della proteina La umana modula la rimozione della sequenza 5'leader da parte della RNAsiP (Fan et al., 1998; Intine et al., 2000). In questi esperimenti l'aggiunta di proteina La ricombinante a reazioni di processamento di pre-tRNA inibiva il taglio da parte della RNAsi P. L'inibizione non era rivelata quando veniva analizzata una proteina La fosforilata nel residuo 366 (Fan et al., 1998). Esperimenti in cui la proteina La umana era espressa in *S.pombe* hanno dimostrato che la proteina La umana bloccava la maturazione di un pre-tRNA reporter. Dal momento che la proteina umana wild-type era meno inibitoria per la maturazione rispetto ad una proteina mutata che non poteva essere fosforilata, è stato proposto che la fosforilazione della proteina La umana modulasse l'attività della RNAsi P. Secondo questi dati quindi la proteina La umana interagisce non solo con il 3' dei pre-tRNA, mediante il dominio N-terminale, ma anche con il 5', mediante il dominio C-terminale, il cui stato di fosforilazione influenza la maturazione dei t-RNA.

Oltre i pre-tRNA, La protegge dalle esonucleasi al 3' altri piccoli RNA neosintetizzati. In *S. cerevisiae* il legame di La stabilizza U1, U2, U4, U5 e il

piccolo RNA nucleolare (snoRNA) U3 (Kufel et al., 2000; Xue et al., 2000). Questi RNAs sono trascritti dalla RNA polimerasi II ed i precursori La-U snRNA sono generati dal taglio da parte della RNasi III del trascritto primario, seguito da digestione esonucleolitica. Il legame di La stabilizza questi precursori, in quanto gli RNA nascenti non sono rilevabili o sono più corti in ceppi in cui non c'è La (Kufel et al., 2000; Xue et al., 2000). Sebbene La non è richiesta per la biogenesi sia degli snRNA dello splicing sia del snoRNA U3 in cellule wild-type, il legame da parte di La può rallentare la maturazione di questi RNAs, probabilmente come parte di un controllo di qualità (Kufel et al., 2000). Per quanto riguarda i metazoi, si sa molto poco del legame di La con i precursori dei piccoli RNA trascritti da Pol II, mentre per il snRNA U6 è stata dimostrata in cellule di vertebrati la funzione stabilizzante di La (Wolin and Cedervall, 2002).

Nonostante la prevalente localizzazione nucleare, un certo numero di studi ha implicato la proteina La nella traduzione di specifici mRNAs virali e cellulari. Nel primo di questi studi, La fu identificata come la proteina che poteva essere maggiormente soggetta a “cross-linking” con UV a un frammento della regione non codificante al 5' del poliovirus (Meerovitch et al., 1993). Il poliovirus, come altri picornavirus, è tradotto in maniera cap-indipendente attraverso il legame dei ribosomi alle IRES (internal ribosome entry sequence). L'RNA del poliovirus è scarsamente tradotto in lisati di reticulociti di coniglio, in cui l'inizio di traduzione avviene in siti aberranti nell'RNA. Ma l'aggiunta di alte quantità di La sopprime l'inizio in questi siti aberranti, suggerendo che questa proteina può favorire proprio l'inizio traduzionale (Meerovitch et al., 1993). Questi risultati sono stati confermati da esperimenti *in vivo*, in cui, attraverso l'uso di Small Interference RNA (siRNA) e un mutante negativo di La, è stato dimostrato che questa proteina è necessaria per la traduzione ottimale del virus (Costa-Mattioli et al., 2004). La proteina La è stata anche implicata nella traduzione IRES dipendente del virus dell'epatite C *in vitro* (Ali et al., 2000; Ali and Siddiqui, 1997) e *in vivo* (Costa-Mattioli et al., 2004). Nei lavori di Siddiqui e colleghi l'aggiunta di La a lisati di reticulociti stimolava la traduzione di una proteina reporter contenente la regione non codificante al 5' dell' HCV (virus dell'epatite C) (Ali and Siddiqui, 1997). Inoltre, per determinare se la proteina La fosse necessaria per la traduzione di HCV, fu usata una sequenza ad RNA con alta affinità di legame per La per sequestrare la proteina; l'aggiunta di questo RNA inibiva la traduzione degli RNAs contenenti la regione non codificante al 5' di HCV, supportando l'idea che La può contribuire alla scelta del sito di inizio della traduzione (Ali et al., 2000).

Per quanto riguarda gli mRNA cellulari La è coinvolta ad esempio nella traduzione IRES dipendente della proteina inibitrice dell'apoptosi X-linked (XIAP) (Holcik and Korneluk, 2000). L'mRNA XIAP è rilevato in immunoprecipitati anti-La in cellule in coltura ed esperimenti in lisati di reticulociti hanno mostrato che un frammento C-terminale di La, usato come dominante negativo, inibiva la traduzione di un gene reporter contenente la regione non codificante al 5' di XIAP (Holcik and Korneluk, 2000). L'influenza di La sulla traduzione di XIAP è in accordo con una maggiore presenza di La nel citoplasma durante l'apoptosi (Ayukawa et al., 2000).

Tra gli mRNA cellulari target di La sono stati descritti anche i geni TOP, caratterizzati da una sequenza di pirimidine nel 5'UTR e che codificano per le proteine ribosomali e per altre proteine coinvolte nell'apparato di traduzione (Vedi il capitolo "I geni TOP"). La proteina La è stata implicata nella regolazione traduzionale di questi messaggeri dalla scoperta che la proteina omologa di *Xenopus* poteva essere soggetta a "cross-linking" ad un piccolo RNA (12 nucleotidi), che consisteva solo della sequenza di oligopirimidine (Pellizzoni et al., 1996). Ulteriori studi sono stati compiuti per chiarire il significato di questo legame ma finora non si sono avuti risultati univoci (Cardinali et al., 2003; Crosio et al., 2000; Schwartz et al., 2004; Zhu et al., 2001).

La proteina La è quindi una proteina multifunzionale che svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo cellulare ed è essenziale in *Drosophila melanogaster* (Bai and Tolias, 2000) e nei mammiferi (Park et al., 2006). In maniera inaspettata non è invece essenziale nel lievito (Van Horn et al., 1997; Yoo and Wolin, 1994). Recentemente è stata trovata una spiegazione nei risultati che dimostrano che nel lievito la proteina La funziona nell'assicurare la stabilità strutturale dei tRNA in maniera ridondante con gli enzimi di modificazione dei tRNA (Copela et al., 2006).

Il complesso ribonucleoproteico (RNP) di Ro 60

I malati affetti da malattie reumatiche sistemiche, come le polimiositi, il “Lupus Eritematoso sistemico” e la sindrome di Sjögren, spesso sviluppano anticorpi contro componenti cellulari altamente conservati. Molti anticorpi riconoscono particelle ribonucleoproteiche (RNPs) e sono stati preziosi indizi per capire la funzione di queste particelle. Le RNPs riconosciute da questi anticorpi includono le U sn-RNPs dello spliceosoma, i ribosomi, e complessi tRNA-sintetasi. Oltre alla proteina La, descritta nel precedente capitolo, il maggiore autoantigene caratterizzato in pazienti affetti dalle malattie reumatiche del “Lupus Eritematoso sistemico” e della sindrome di Sjögren è la proteina Ro 60 (Chen and Wolin, 2004). Ro60 e La sono le proteine “core” di complessi ribonucleoproteici, che sono piccole particelle citoplasmatiche la cui funzione non è stata ancora chiarita e che sono conservate durante l’evoluzione e sono espresse in tutti i tipi cellulari. In cellule umane l’RNA componente di ogni particella Ro RNP consiste di uno tra quattro piccoli RNAs trascritti dalla Pol III, approssimativamente di 100 nucleotidi, chiamati Y1-Y5 (Y2 è un prodotto di degradazione di Y1)(Belisova et al., 2005; Pruijn et al., 1997). Mentre le cellule umane nucleate hanno tutti e quattro gli hY RNAs, anche se in differenti rapporti (dati di Pruijn e colleghi non pubblicati), i globuli rossi hanno solo hY1 e hY4 e nelle piastrine sono rilevabili solo hY3 e hY4. In altre specie il numero dei piccoli RNA Y varia da quattro, ad esempio nel bovino, a solo due, come nel topo e nell’anatra (Peek et al., 1993). Questi piccoli RNAs si ripiegano in una estesa struttura “stem-loop”, il cui stem è formato dalle estremità 5’ e 3’ dell’RNA eccetto per una corta coda di poliuridine all’estremità 3’ che, a differenza degli altri trascritti della RNA polimerasi III, non è rimossa durante la maturazione. Questo tratto di oligo (U) è legato da La, mentre Ro 60 lega direttamente lo stem (Boire and Craft, 1990; Peek et al., 1993). Sono state identificate ulteriori proteine che legano gli RNAs Y, come hnRNP I, hnRNP K e la nucleolina (Fig. 7)(Fabini et al., 2001; Fouraux et al., 2002), ma il ruolo del complesso Ro 60 è ancora oscuro. La primaria localizzazione citoplasmatica del complesso Ro RNP e la conservazione lungo l’evoluzione suggerisce una sua funzione in qualche processo citoplasmatico fondamentale. Alcuni esperimenti hanno rivelato che la proteina Ro 60 lega piccoli RNAs conformati in maniera scorretta,

facendo ipotizzare un suo ruolo nel pathway di controllo di qualità per la biogenesi dei piccoli RNAs.

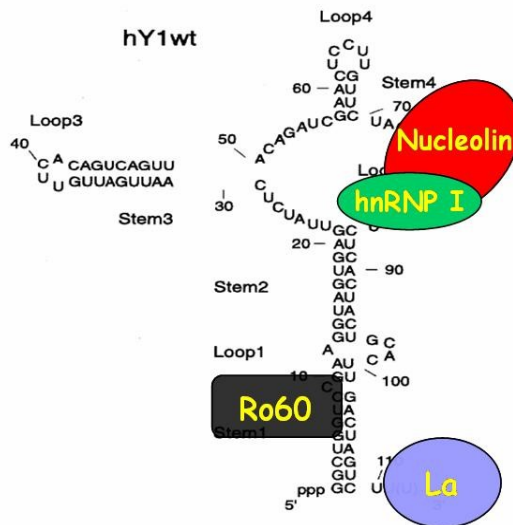


Fig 7: Rappresentazione del “core” strutturale del complesso Ro RNP, costituito da una molecola di RNA Y, Ro 60 e La.

In oociti di *Xenopus laevis*, è stato osservato il legame di Ro 60 con una ampia classe di varianti di pre- 5S rRNAs. Per produrre un gran numero di ribosomi richiesti nelle prime fasi dello sviluppo *Xenopus laevis* ha circa 20000 geni che codificano per l'rRNA 5S e molti di questi geni sono diversi rispetto alla sequenza consenso dell'rRNA 5S. Le varianti 5S rRNA legate da Ro 60 hanno ulteriori nucleotidi al 3' e, oltre ad essere più lunghi, hanno mutazioni nucleotidiche che sono responsabili della formazione di un 'elica non presente negli rRNA 5S maturi (O'Brien and Wolin, 1994; Shi et al., 1996). Poichè questi “misfolded” pre-5S rRNAs sono processati in maniera inefficiente a maturi 5S RNA e sono eventualmente degradati, il legame di Ro 60 può segnalare questi RNAs ad eventuali nucleasi per essere degradati (O'Brien and Wolin, 1994). Più recentemente è stato dimostrata

l'associazione con varianti "misfolded" del snRNA U2 in cellule staminali embrionali di topo (Chen et al., 2003b). In questo lavoro geni wild-type e varianti per U2 sono stati iniettati in oociti di *Xenopus* ed è stato rilevato non solo il legame preferenziale di Ro 60 a certe varianti ma anche che questo legame, come per l'rRNA 5S, richiede la formazione di un anormale elica dell'RNA. Studi strutturali e biochimici hanno mostrato che Ro 60 forma un anello in cui l'estremità 3' a singolo filamento degli RNAs "misfolded" sono legate nella cavità centrale mentre le eliche adiacenti si ritrovano sulla sua superficie (Reinisch and Wolin, 2007; Stein et al., 2005).

Oltre al coinvolgimento nel pathway di controllo di qualità dei piccoli RNAs, è emerso da studi in cellule di batterio e di mammifero un ruolo conservato di Ro 60 nel facilitare la sopravvivenza cellulare dopo irradiazione con UV (Chen et al., 2000; Xue et al., 2003).

Infine in topi Ro 60^{-/-} si sviluppa una sindrome autoimmune che mostra le stesse caratteristiche trovate nei pazienti affetti dal "Lupus Eritematoso sistemico", suggerendo che il normale funzionamento di Ro 60 possa essere importante per la prevenzione di questa patologia autoimmune (Xue et al., 2003).

Scopo della ricerca

Nei vertebrati circa il 20% degli RNA messaggeri di cellule in attiva crescita è caratterizzato dalla presenza al 5' terminale di un tratto di oligopirimidine (5'TOP) e questi mRNA sono quindi chiamati TOP mRNA. I geni TOP codificano per le proteine ribosomali e per altre proteine associate all'apparato di traduzione. La sintesi delle proteine TOP è selettivamente regolata al livello traduzionale in maniera dipendente dalle condizioni di crescita. La sequenza 5'TOP comprende il "core" dell'elemento regolatore traduzionale in *cis* e questo tipo di regolazione traduzionale permette di soddisfare rapidamente la richiesta di proteine coinvolte nella traduzione in base alle diverse condizioni di crescita. Per capire il ruolo del 5'TOP nel controllo traduzionale di questi messaggeri si sono ricercati dei possibili fattori in *trans*. Tra le varie proteine che sono state identificate negli anni come interattori della sequenza 5'TOP, durante il mio progetto di dottorato mi sono concentrata sulla proteina La, un autoantigene la cui funzione principale è la stabilizzazione e la ritenzione nel nucleo dei trascritti della Polimerasi III. In base ai risultati di Pierandrei-Amaldi e colleghi (Pellizzoni et al., 1998) è stato proposto un modello in cui il legame della proteina La al 5'TOP, coadiuvato dal fattore Ro 60, potrebbe favorire l'inizio traduzionale di questi messaggeri. Ulteriori studi sono stati compiuti per chiarire il significato di questo legame ma finora non si sono avuti risultati univoci, e mentre alcuni lavori descrivono un effetto positivo di La sulla traduzione (Cardinali et al., 2003; Crosio et al., 2000), altri autori ne definiscono uno inibitorio (Schwartz et al., 2004; Zhu et al., 2001). La e Ro 60 sono le proteine "core" dei complessi ribonucleoproteici di Ro 60 (RoRNP), che sono piccole particelle citoplasmatiche di funzione sconosciuta e che sono ben conservate e sono espresse in tutti i tipi cellulari. Nelle cellule umane il componente ad RNA di RoRNP è uno dei quattro piccoli RNA Y (Y1, Y3, Y4 e Y5). Per chiarire un possibile ruolo della proteina La nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP, abbiamo compiuto esperimenti di sovraespressione e di inibizione di questa proteina in cellule umane in coltura. In particolare, per la essenzialità della proteina La nell'uomo, abbiamo indotto la sovraespressione stabile di La con un sistema di espressione inducibile, e la sua inibizione transiente tramite knockdown mediato da oligo siRNA. Abbiamo quindi successivamente esaminato l'attività traduzionale dei messaggeri TOP. Inoltre per studiare la relazione tra il complesso Ro RNP (La, Ro 60 e Y) e i messaggeri TOP,

abbiamo analizzato il profilo di sedimentazione di La, Ro 60 e Y1 in cellule sia in diverse condizioni di crescita sia in cui era stata indotta la diminuzione di La tramite interference.

Risultati

Costruzione di plasmidi codificanti le proteine La wild-type e La $\Delta 373$

Per analizzare la funzione della proteina La nella regolazione traduzionale dei TOP mRNAs ho compiuto esperimenti di sovraespressione inducibile in cellule umane trasfettate sia transientemente che stabilmente. La regione maggiormente conservata della proteina La è il dominio N-terminale, caratterizzato da un paio di motivi di riconoscimento dell' RNA (RRM), che sono il "motivo La" e il RRM1. Il "motivo La" e il RRM1 cooperano a formare un unico dominio di legame all'RNA, specifico per il legame al 3' UUU_{OH} dei neosintetizzati trascritti di Pol III (Maraia and Bayfield, 2006). Oltre al conservato dominio N-terminale, sicuramente necessario per la funzione nucleare di La, la proteina umana ha un espanso dominio C-terminale che include il RRM2 ed il segnale di localizzazione nucleare (NLS) (Maraia and Intine, 2001) . In un lavoro precedente (Simons et al., 1996) il NLS è stato identificato dall'amminoacido 383 al 401 grazie alla microiniezione negli oociti di *Xenopus laevis* della proteina La tradotta *in vitro*. Inoltre Ayukawa et al. (Ayukawa et al., 2000) hanno riportato che la proteina La tagliata dalla caspasi-3 o da una proteasi simile alla caspasi 3 in posizione Asp-374 era localizzata nel citoplasma. Poichè volevamo studiare gli effetti di La sui messaggeri TOP e questa proteina è prevalentemente nucleare, abbiamo costruito una forma deleta di La, priva della sequenza di localizzazione nucleare NLS (La $\Delta 373$). Le forme intera (LaWT) e deleta (La $\Delta 373$) dei cDNAs sono state poi clonate sia nel vettore pTRE2 sia nel pcDNA5/FRT/TO, per l'espressione inducibile rispettivamente transiente e stabile in cellule umane. Abbiamo scelto un sistema inducibile perchè la sovraespressione costitutiva di La avrebbe potuto avere un effetto tossico e risultare letale per le cellule trasfettate. Una rappresentazione schematica dei costrutti Lawt e di La $\Delta 373$ è mostrata in Fig. 8.

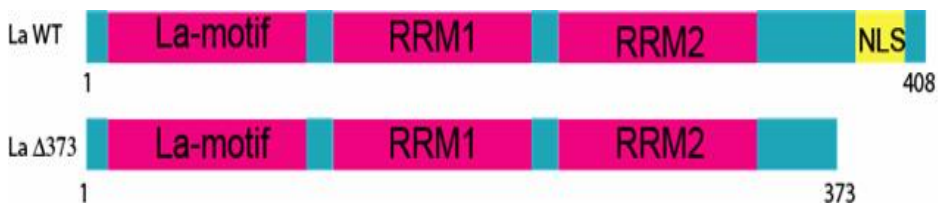


Fig 8: Schematica rappresentazione di La wild-type (La_{wt}) e La $\Delta 373$. Il motivo La, i domini di legame all'RNA (RRM1 e RRM2) e la sequenza di localizzazione nucleare (NLS) sono mostrati

Sovraespressione transiente inducibile di La wt e La $\Delta 373$

Gli esperimenti di sovraespressione in transiente dei costrutti pTRE2-La wt e di pTRE2-La $\Delta 373$ sono stati compiuti in cellule EBNA/293, che permettono un'espressione dei geni esogeni dipendente dalla tetraciclina. Queste cellule esprimono stabilmente un trans-attivatore tetraciclina dipendente in cui l'affinità per il DNA del promotore in assenza di tetraciclina è stata diminuita grazie alla selezione di una forma mutante della proteina; solamente in presenza dell'antibiotico lega sequenze TRE (tetracycline-responsive element) interne al promotore del plasmide pTRE2 attivando la trascrizione di ciò che è clonato a valle. Nelle cellule EBNA/293 è prodotto stabilmente anche un repressore che in assenza di tetraciclina lega gli elementi TRE, impedendo così l'eventuale legame del trans attivatore in assenza dell'antibiotico. Quindi con la combinazione nella stessa cellula di un repressore e di un attivatore trascrizionale è possibile ottenere un efficiente e stringente sistema di repressione/attivazione. Le cellule EBNA/293 sono state trasfettate con i due costrutti La e analizzate per la loro capacità di sovraesprimere i geni esogeni in maniera dipendente dalla tetraciclina. L'analisi è stata effettuata utilizzando estratti totali (nucleari e citoplasmatici) ottenuti da cellule non trattate o trattate per 24 o 48 ore con la doxiciclina, un analogo della tetraciclina. Esperimenti di Western Blot

utilizzando un anticorpo specifico per La e come normalizzatori uno per l'actina (per La wt) e uno per β -Tubulina (per La $\Delta 373$) hanno permesso di quantificare la sovraespressione dei due costrutti. La Fig. 9 mostra il risultato derivante da una induzione di 48 ore in cui la quantizzazione indica una sovraespressione di circa due volte rispetto alle cellule non indotte sia per La wt sia per La $\Delta 373$.

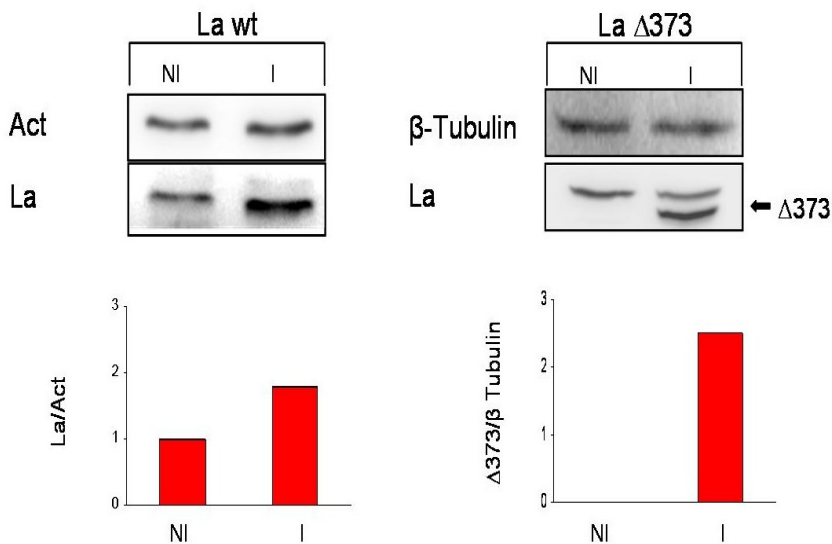


Fig 9: Analisi dell'espressione dei costrutti La wt e La $\Delta 373$. Cellule EBNA/293 sono state trasfettate con i costrutti La e dopo un'induzione con doxiciolina di 48 ore (I) gli estratti totali sono stati preparati ed analizzati per Western Blot con l'uso di anticorpi per La, actina (Act) e β -Tubulina (β -Tubulin). I segnali sono stati quantificati per densitometria e la quantizzazione dell'analisi è mostrata. La freccia indica la banda corrispondente alla forma troncata La $\Delta 373$. NI: non indotti

Nel caso di La $\Delta 373$, in cui la banda relativa al costrutto esogeno è distinguibile da quella di La endogena, la quantità di quest'ultima rimane pressochè invariata quando viene indotto il transgene. Non sono riportati i dati di induzione dopo 24 ore, in quanto i livelli di sovraespressione sono simili a quelli di 48 ore. Una volta verificata la sovraespressione di La wt e di La $\Delta 373$, abbiamo voluto analizzare un possibile effetto sulla traduzione dei messaggeri TOP mediante Western Blot. Poichè in un sistema transiente l'efficienza di trasfezione è bassa, non è possibile valutare l'effetto della sovraespressione di La su proteine cellulari endogene derivate dall'intera popolazione cellulare. Per questo motivo ho cotrasfettato, insieme ai costrutti pTRE2-Lawt e pTRE2-La $\Delta 373$, il plasmide pEF1 α GEF1 α . Il vettore pEF1 α GEF1 α era già presente nel nostro laboratorio dove era stato precedentemente costruito a partire dal plasmide pEGFP-1, codificante per la proteina reporter GFP, ed in cui il 5'UTR ed il 3'UTR erano stati sostituiti con quelli del gene TOP EF1 α . Poichè il 5'UTR ed il 3'UTR di un gene TOP sono sufficienti e necessari per la regolazione traduzionale dei messaggeri TOP (Avni et al., 1997; Avni et al., 1994; Hornstein et al., 1999; Levy et al., 1991) questo costrutto rappresenta un valido modello di studio di un gene TOP, la cui regolazione traduzionale è facilmente evidenziabile dall'espressione del gene reporter GFP. Il plasmide pEF1 α GEF1 α , oltre al gene per la GFP, ha anche una cassetta che porta la resistenza alla neomicina, che nelle trasfezioni stabili permette di selezionare i cloni resistenti all'antibiotico G418. Nel nostro caso invece la neomicina fosfotransferasi, la proteina codificata dal gene Neo^r, è stata usata come normalizzatore interno, specifico del costrutto esogeno, dell'espressione del gene TOP non canonico 5'EF1- α GFP-3'EF1 α .

Dopo circa 8 ore dalla cotrasfezione le cellule sono state indotte per 24 ore. Il Western Blot sugli estratti totali e la successiva quantizzazione (Fig.10) indica che non vi sono significative differenze a livello proteico dell'espressione del gene TOP-GFP in seguito alla trasfezione di Lawt e di La $\Delta 373$. Questo risultato poteva essere dovuto a diversi fattori tecnici propri del sistema in transiente, come la scarsa efficienza di trasfezione, o la necessità di brevi tempi di induzione a causa del rapido processo di degradazione del vettore da parte della cellula. Per questo motivo abbiamo deciso di costruire una linea cellulare stabile che sovraesprimesse in maniera inducibile i nostri costrutti.

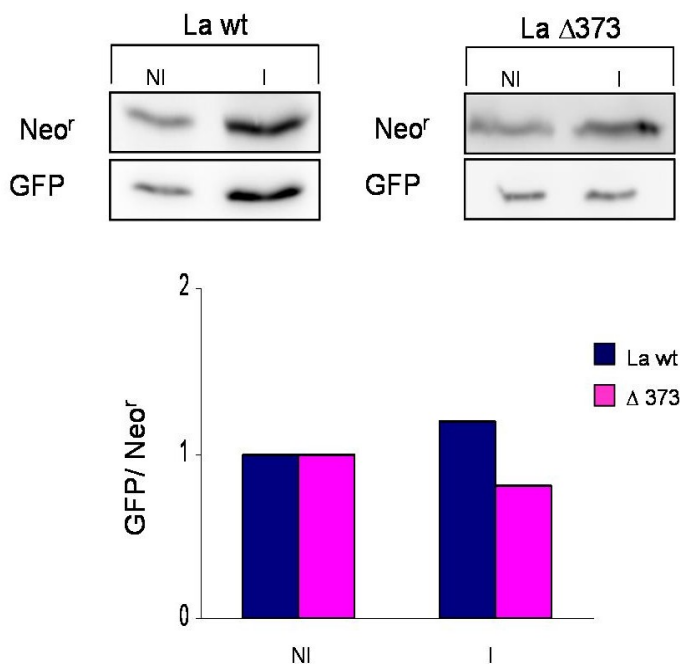


Fig 10: Analisi dell'espressione della proteina TOP EF1 α -GFP-3EF1 α . Cellule EBNA/293 sono state cotrasfettate con i costrutti La (Lawt e La Δ 373) e pEF1 α GEF1 α . Dopo un'induzione con doxicielina di 48 ore (I) gli estratti totali sono stati preparati ed analizzati per Western Blot con l'uso di anticorpi per GFP e per la neomicina fosfotransferasi (Neo^r). I segnali sono stati quantificati e riportati come rapporto tra il segnale relativo di GFP rispetto a quello di Neo^r. Il valore ottenuto dai campioni non indotti (NI) è stato posto uguale ad 1.

Sovraespressione stabile inducibile di La wt e La Δ 373

Gli esperimenti di sovraespressione in maniera stabile dei costrutti La wt e La Δ 373 sono stati inizialmente compiuti nelle cellule EBNA/293, le stesse in cui sono state fatte le trasfezioni transienti. Questa linea cellulare è stata cotrasfettata stabilmente con i costrutti La e con il plasmide pTK-Hygro che conferisce la resistenza all'igromicina e permette così di selezionare i cloni

che hanno acquisito i plasmidi esogeni. Tramite questa strategia ho ottenuto numerosi cloni che sono stati analizzati per la loro capacità di sovraesprimere i costrutti La in maniera dipendente dalla doxamicina. L'analisi di ogni clone è stata effettuata utilizzando estratti totali ottenuti da cellule non trattate o trattate per 24 ore con l'antibiotico. Sono stati analizzati circa 20 cloni per Lawt ed altrettanti per La $\Delta 373$ e, come mostrato in Fig.11, i cloni non sovraesprimono la proteina La wild-type e mutante in seguito al trattamento con doxamicina, nonostante possano crescere in terreno con igromicina e quindi avendo integrato il plasmide con la resistenza a questo antibiotico.

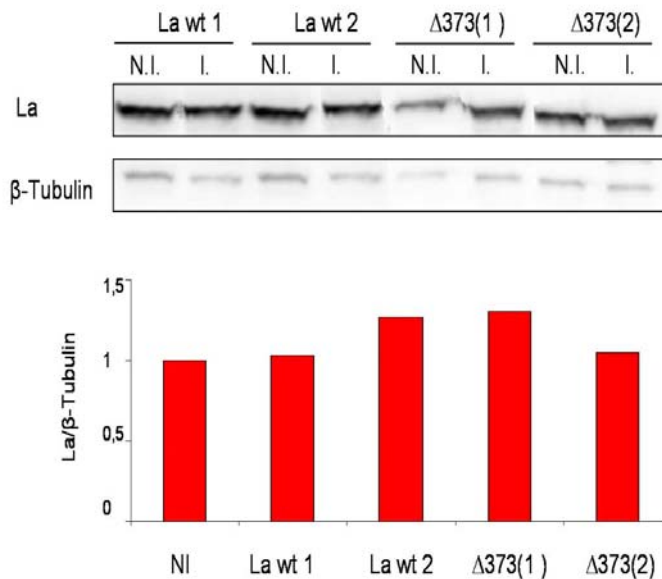


Fig 11 : Analisi dell'espressione dei cloni La wt e La $\Delta 373$. Estratti totali provenienti da 2 cloni Lawt e 2 cloni La $\Delta 373$ non trattati (NI) o trattati (I) con doxamicina per 24 ore sono stati analizzati per Western Blot con anticorpi specifici per La e per la β -Tubulina. La quantificazione dell'analisi è mostrata.

Dopo molti tentativi, in cui sono state variate le condizioni di trasfezione, non siamo riusciti comunque ad ottenere cloni sovraespressanti i nostri costrutti ed abbiamo deciso di cambiare la linea cellulare in cui trasfettare i nostri plasmidi. Abbiamo allora utilizzato la linea umana TREx-293 che permette l'integrazione del gene di interesse nel sito FRT (Flp Recombination Target) (O'Gorman et al., 1991) attraverso una ricombinazione del DNA mediata dalla ricombinasi Flp (Buchholz et al., 1996a; Buchholz et al., 1996b). Questo sistema consente l'integrazione mirata e non random in siti di espressione genomici. Le cellule TREx-293 hanno integrato stabilmente due plasmidi che esibiscono le seguenti caratteristiche:

- il plasmide pFRT/*lacZeo* introduce un singolo sito FRT ed esprime il gene di fusione *lacZ-Zeocina*
- Il plasmide pcDNA6/TR esprime il repressore Tet che impedisce l'espressione del gene esogeno in assenza di tetraciclina.

Quando vengono cotrasfettati in queste cellule un plasmide in cui è stato clonato il gene di interesse e che presenta anche un sito FRT (pcDNA5/FRT/TO) ed un plasmide esprimente la ricombinasi Flp (pOG44), la ricombinasi Flp catalizza un evento di ricombinazione omologa tra i siti FRT delle cellule ospiti e del vettore di espressione pcDNA5/FRT/TO. Il vettore pcDNA5/FRT/TO presenta anche un gene codificante per la resistenza all'igromicina, mancante però del promotore e del codone di inizio ATG. Quando avviene la ricombinazione le cellule perdono la resistenza alla zeocina ed acquisiscono quella all'igromicina, permettendo così di selezionare le cellule trasfettate. Una volta integrato, l'espressione del gene di interesse è impedita dal repressore Tet. La successiva aggiunta di tetraciclina (o l'analogo doxiciclina) ne induce l'espressione.

Così ho clonato La wt e La $\Delta 373$ nel vettore pcDNA5/FRT/TO ed ogni costrutto è stato stabilmente trasfettato nelle TREx-293. I cloni ottenuti sono stati analizzati per l'espressione delle sequenze La al livello di RNA e di proteine. Il Northern Blot dell'RNA totale e l'analisi per Western Blot degli estratti cellulari totali sono stati eseguiti a diversi intervalli di tempo dopo l'aggiunta nel mezzo di crescita di doxiciclina. Come mostrato in Fig.12 l'RNA e le proteine dei costrutti trasfettati sono rilevabili dopo 24 ore e rimangono a livelli simili fino a 120 ore.

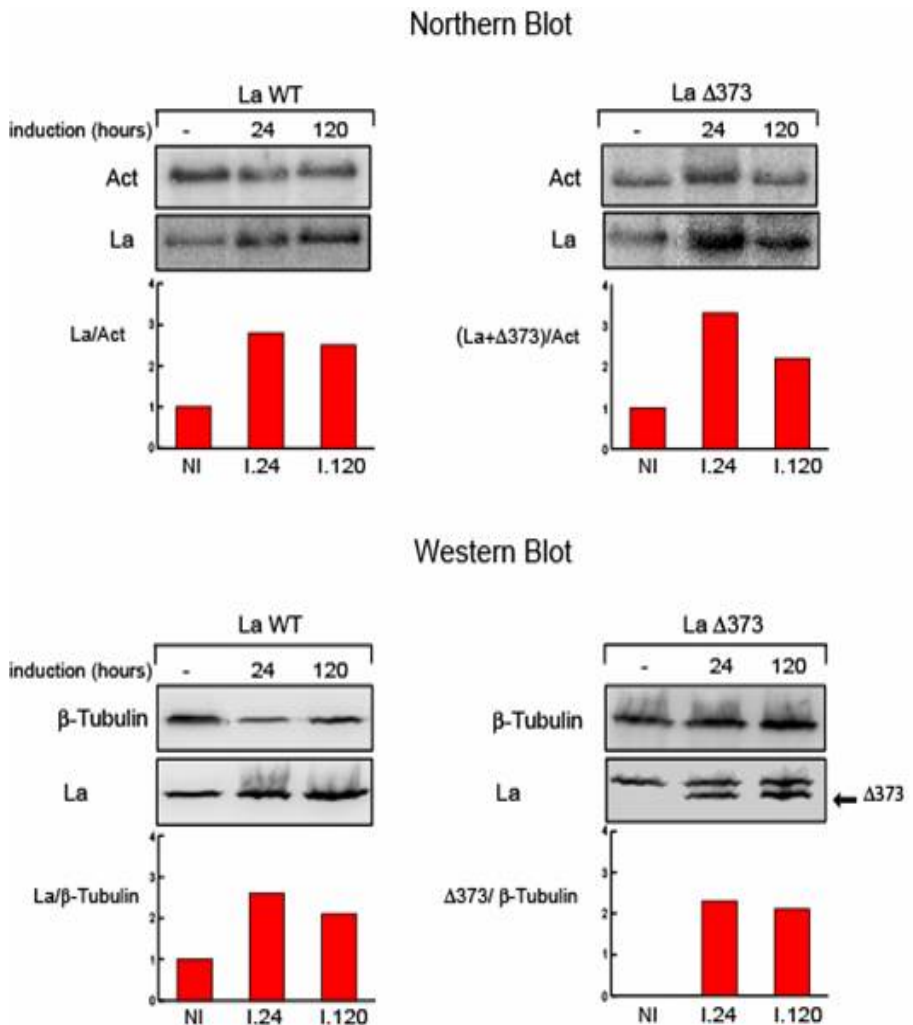


Fig 12 : Analisi dell'espressione delle sequenze La nelle linee cellulari trasfettate. Agli intervalli di tempo di induzione indicati L'RNA e le proteine totali sono stati isolati e i livelli di La sono stati analizzati per Northern e Western blot. Anche i livelli del trascritto actina (Act) e i livelli proteici della β -Tubulina (β -Tub) sono stati analizzati. La freccia indica la banda corrispondente alla forma troncata La $\Delta 373$. La quantizzazione dell'analisi è mostrata. NI: non indotte I: indotte

La quantizzazione del Western Blot mostrato in Fig. 12 indica che dopo l'aggiunta di doxyciclina le cellule TREx-Lawt esprimono livelli di La circa due volte superiori a quelli delle cellule non indotte. Un incremento simile è rilevato anche nelle cellule TREx-La Δ 373 per il La Δ 373 deletato al C-terminale confrontato con la normale proteina endogena, la cui quantità rimane invariata. Inoltre le quantità di proteine esogene sovraesprese sono molto simili a quelle basate sull'analisi per Northern Blot dell'mRNA (Fig12). Quindi c'è una piena corrispondenza tra l'espressione al livello di RNA e quella al livello proteico e la misura della sovraespressione stabile dei costrutti Lawt e La Δ 373 è paragonabile a quella ottenuta con le trasfezioni transienti.

Una volta ottenuti cloni sovraesprimenti Lawt e La Δ 373, abbiamo voluto esaminare la localizzazione cellulare del mutante La Δ 373, per verificare che si esprimesse maggiormente nel citoplasma. Ho quindi separato gli estratti cellulari, ottenuti dalle cellule TREx-La Δ 373 dopo induzione di 24 ore, nelle frazioni nucleare e citoplasmatica. L'analisi per Western Blot ha evidenziato una quantità di La endogena nel citoplasma più alta di quella attesa sulla base di precedenti lavori (Hendrick et al., 1981; Intine et al., 2003; Yoo and Wolin, 1994). La localizzazione essenzialmente nucleare della proteina La è però basata su dati derivanti da esperimenti di immunofluorescenza, mentre è stato riportato che la proteina La è trovata nel citoplasma quando le cellule sono frazionate usando procedure standard (Lerner et al., 1981; Stefano, 1984) suggerendo una possibile facile fuoriuscita di La dal nucleo. I nostri risultati quindi sono in linea con gli altri dati ottenuti con tecniche di separazione biochimica. Inoltre la quantizzazione mostrata in Fig. 13 indica che la frazione di La Δ 373 presente nel citoplasma è maggiore di quella di La endogena, come aspettato dalla delezione della sequenza di localizzazione nucleare (NLS).

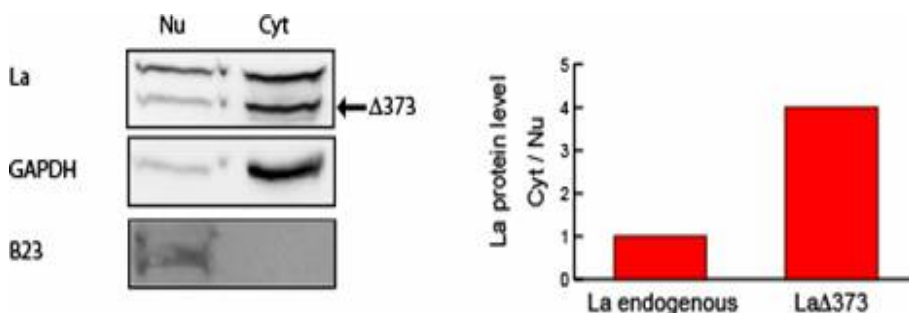


Fig 13 : Localizzazione cellulare del mutante LaΔ373. Estratti nucleari (Nu) e citoplasmatici (Cyt) di cellule TREx-LaΔ373 sono stati analizzati per Western Blot con anticorpi contro La e contro le proteine nucleari (B23) e citoplasmatica (GAPDH) usate come controllo. E' stato analizzato un estratto citoplasmatico equivalente ad 1/3 di numero di cellule dell'estratto nucleare. La quantizzazione dell'analisi è mostrata

Analisi polisomale delle linee cellulari TREx-Lawt e TREx-LaΔ373

Per analizzare l'effetto della sovraespressione di Lawt e di LaΔ373 sulla regolazione traduzionale dei geni TOP dipendente dalle condizioni di crescita, ho analizzato nelle linee cellulari trasfettate la distribuzione polisomale di due TOP mRNAs e di un mRNA di controllo (Fig.14). Come detto nell'Introduzione la tecnica dei gradienti polisomali permette di osservare e quantificare la percentuale di trascritto associata ai polisomi, quindi attivamente tradotta, e quella associata alle particelle sub-polisomali, non traduzionalmente attive. Una volta indotta l'espressione dei costrutti esogeni Lawt e di LaΔ373 le cellule sono state cresciute per due ore in assenza (resting cells) o in presenza (growing cells) di siero. Gli estratti citoplasmatici sono stati preparati e frazionati su un gradiente di saccarosio 15%-50%. Sono state successivamente raccolte nove frazioni da ogni gradiente mentre veniva registrato il profilo di assorbanza a 260 nm. Il profilo di assorbanza permette di monitorare il materiale presente nelle singole frazioni e di fare un'analisi qualitativa del numero dei polisomi associati ai messaggeri analizzati nelle due condizioni di crescita.

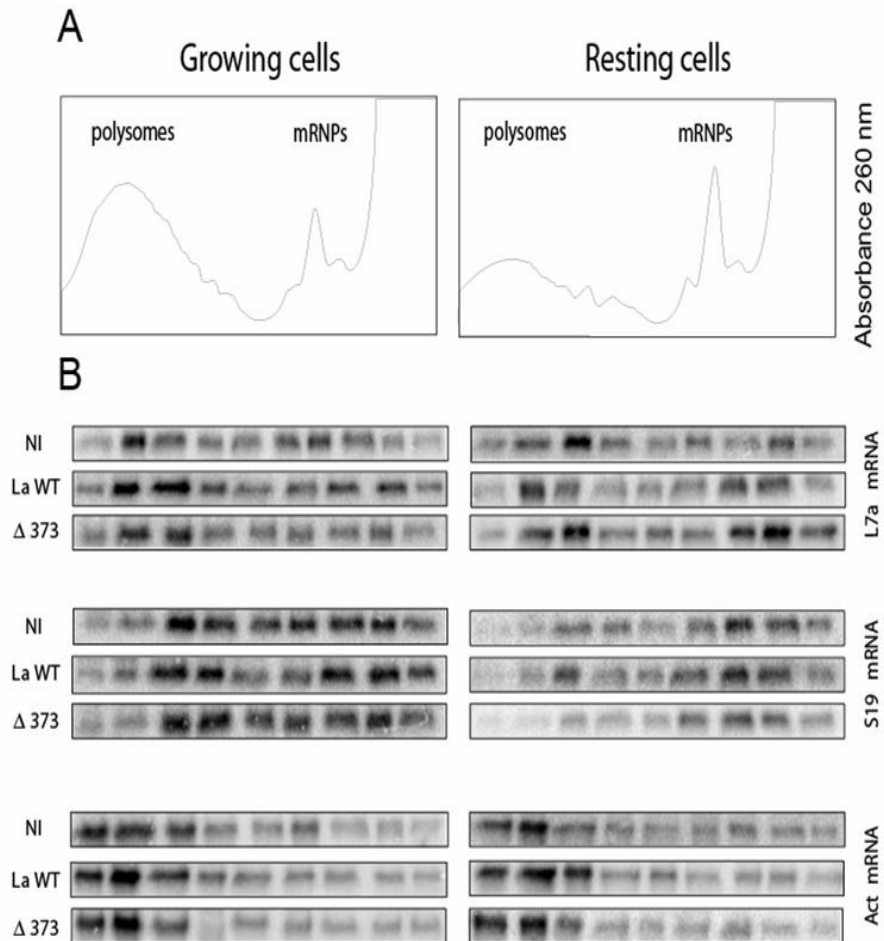


Fig 14 : Distribuzione polisomale dei messaggeri TOP in TREx-Lawt e in TREx-La $\Delta 373$. (A) Profili di assorbanza delle cellule TREx-Lawt e in TREx-La $\Delta 373$ in presenza ed in assenza di siero. (B) Estratti citoplasmatici sono stati frazionati sul gradiente di saccarosio e l'RNA estratto da ogni frazione è stato analizzato per Northern Blot con le sonde per i mRNA indicati. NI: non indotto

La Fig. 14A mostra un tipico profilo di assorbanza sia in condizioni di crescita sia in condizioni quiescenti. In particolare in cellule in attiva crescita

si può notare come un maggior numero di ribosomi sono associati con i polisomi rispetto a quelli in cellule quiescenti. I profili di assorbanza ottenuti per le linee cellulari TREx-Lawt e TREx-La Δ 373 non presentano significative differenze sia in condizioni di non induzione che in quelle di induzione, indicando che i transgeni non producono consistenti cambiamenti nel metabolismo cellulare.

Le frazioni raccolte sono state poi analizzate per Northern Blot con sonde specifiche per i messaggeri TOP RPS19 ed RPL7a ed anche per la β actina che è un messaggero non TOP e che è attivamente tradotto a prescindere dalle condizioni di crescita (Fig. 14B). Come controllo per ogni linea cellulare è stata usata la stessa linea cellulare cresciuta in assenza di doxiciiclina (condizione di non induzione), in quanto in esperimenti preliminari non sono state notate differenze di associazione polisomale dei TOP mRNAs e dell' mRNA della β actina tra le linee parentali non trasfettate con i costrutti La e le linee trasfettate non indotte. Inoltre ho anche verificato che la presenza od assenza della doxiciiclina in quanto tale non cambiasse il pattern di traduzione e la regolazione dei messaggeri TOP e non TOP.

La quantizzazione dei segnali radioattivi nelle frazioni dei gradienti è stata usata per misurare la percentuale di un dato messaggero associato con i polisomi. Il sommario di tre esperimenti indipendenti è mostrato in Fig. 15.

I risultati mostrano che i due messaggeri TOP analizzati, RPS19 ed RPL7a, esibiscono la caratteristica risposta alla deprivazione di siero sia in condizioni di non induzione che in quelle di induzione. Questo indica che la sovraespressione di Lawt e di La Δ 373, sia in cellule quiescenti che in attiva crescita, non causa un alterazione rilevabile del controllo traduzionale dei messaggeri TOP.

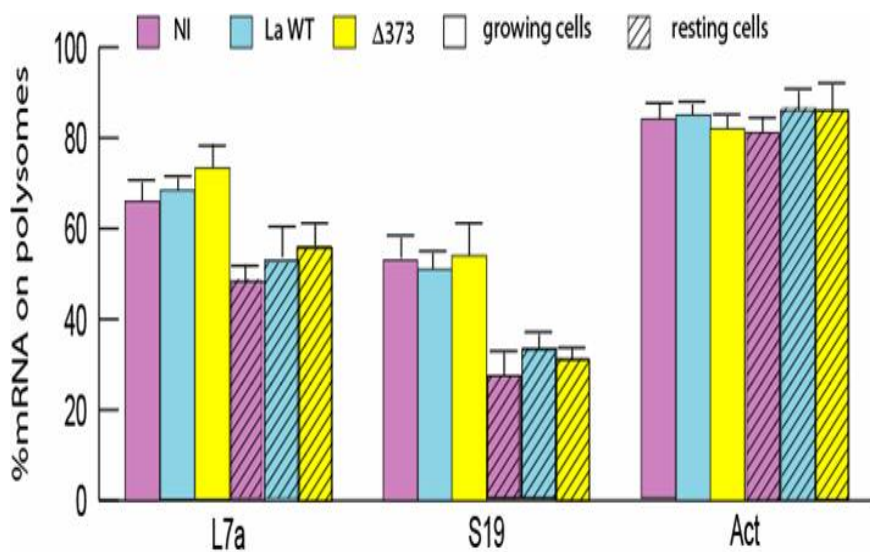


Fig 15: Quantizzazione di un'analisi polisomi/mRNP in triplicato eseguita come descritto in Fig.14. I risultati sono espressi come percentuale di mRNA sui polisomi ottenuto addizionando i valori delle prime cinque frazioni. I valori rappresentano le medie $\pm$ SEM (errore standard della media) di tre esperimenti.

Inibizione della proteina La tramite trasfezione di oligo siRNA

Per analizzare se un decremento della quantità di proteina La potesse avere un effetto sulla traduzione dei messaggeri TOP, ho usato il metodo dell'RNA interference (RNAi). L'inibizione dell'espressione di un gene mediante questa tecnica avviene a livello post-trascrizionale determinando la degradazione del messaggero. Questo meccanismo avviene attraverso eventi successivi che richiedono la produzione di siRNA (small interfering RNA) mediante taglio endonucleolitico di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) da parte dell'RNasi Dicer. Gli siRNA prodotti sono lunghi circa 20-23 nt e si appaiano per complementarità al messaggero bersaglio che viene poi degradato dal complesso RISC (RNA-induced silencing Complex). Nelle cellule di Mammifero siRNA specifici per il messaggero da degradare possono essere introdotti attraverso:

- trasfezione transiente di oligo siRNA prodotti *in vitro*
- trasfezioni di plasmidi per la produzione di siRNA *in vivo*

Questo secondo metodo permette di ottenere linee che esprimono in modo stabile siRNA specifici per il messaggero di interesse determinandone così l'inibizione a lungo termine. Nel nostro caso però abbiamo utilizzato il metodo degli oligo siRNA prodotti *in vitro* in quanto la proteina La è essenziale nei Mammiferi (Park et al., 2006) ed una sua mancanza costante e duratura è letale per le cellule. Negli ultimi tempi sono usciti in commercio anche plasmidi inducibili, ma non sono ancora stati sperimentati in maniera diffusa ed inoltre sono molto meno economici sia dei plasmidi non inducibili che degli oligo siRNA.

Innanzitutto, per determinare le modalità di trasfezione da adottare, abbiamo esaminato la stabilità della proteina La, utilizzando come inibitore della sintesi proteica la cicloesimide. Le cellule HEK-293 sono state incubate in assenza o in presenza dell'inibitore per tempi crescenti e successivamente gli estratti cellulari totali sono stati analizzati per Western Blot con anticorpi specifici per la proteina La, per la proteina molto stabile actina come controllo positivo e per la proteina poco stabile ZNF9 come controllo negativo. Come è mostrato in Fig. 16 già dopo sei ore di

trattamento con cicloesimide il livello della proteina ZNF9 comincia a diminuire e questo decremento è aumentato dopo ventiquattro ore, mentre il livello delle proteine actina e La rimane pressoché costante lungo tutto il periodo di trattamento. Quindi i risultati dimostrano che La è una proteina stabile.

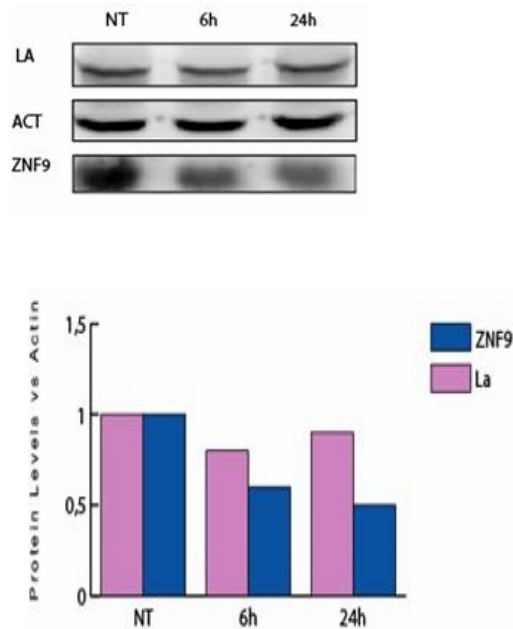


Fig 16: Analisi della stabilità della proteina La. Cellule HEK-293 sono state incubate in assenza o in presenza di cicloesimide per 6 e 24 ore. Le proteine totali estratte sono state analizzate per Western Blot con anticorpi specifici per La, Actina e ZNF9. La quantificazione è mostrata ed i valori rappresentano il rapporto di La/Actina e di ZNF9/Actina. NT: non trattati

Una volta analizzata la stabilità di La abbiamo utilizzato l'oligo siRNA La-1091-siRNA (nome derivante dalla sua posizione nel cDNA di La umano) in quanto selezionato, tra altri oligo siRNA a nostra disposizione, come quello che produceva il maggior decremento della proteina La. Cellule HEK-293 sono state transientemente trasfettate con gli oligo siRNA specifici per La (La-1091-siRNA) e gli estratti cellulari totali sono stati sottoposti a Western blot con l'anticorpo contro La. Ho potuto osservare una riduzione riproducibile della proteina La di oltre il 70% dopo centoventi ore di trasfezione (Fig.17). L'effetto dei siRNA per La era specifico perchè HEK-293 non trasfettate o trasfettate con i siRNA di controllo (scrambled) non mostravano alcun decremento della proteina La (Fig. 17).

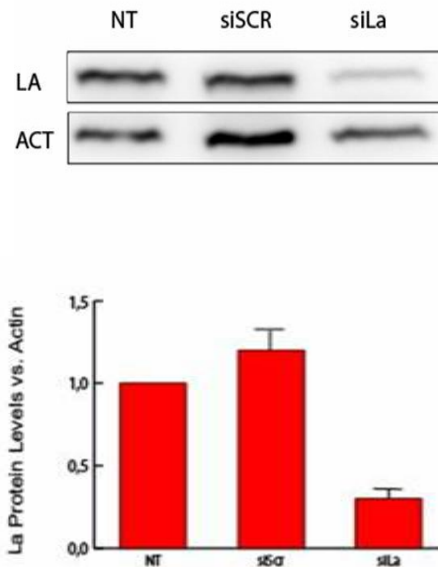


Fig 17: Diminuzione della proteina La in seguito a trasfezione con oligo siRNA. Cellule HEK-293 sono state trasfettate transientemente con oligo siRNA specifici per La (siLa) e con siRNA di controllo (siScr) come descritto in Materiali e Metodi. Gli estratti cellulari totali sono stati raccolti dopo 120 ore di trasfezione ed analizzati per immunoblot con anticorpi contro La e la actina. Le colonne e le barre dell'istogramma rappresentano le medie $\pm$ SEM (errore standard della media) di tre esperimenti ognuno normalizzato ai livelli di actina.

Inibizione della proteina La e traduzione dei messaggeri TOP

Per analizzare quale effetto potesse avere una diminuzione della proteina La sul controllo traduzionale dei messaggeri TOP ho compiuto sia esperimenti di associazione polisomale sia di Western blot da estratti totali ottenuti da cellule trasfettate con gli oligo siRNA specifici per La. L'analisi dell'attività traduzionale tramite gradienti polisomiali permette infatti di osservare l'inizio della traduzione, grazie alla quantizzazione dell'associazione dei polisomi al messaggero, mentre l'analisi per Western Blot dà una misura dei livelli cellulari finali di una specifica proteina. L'analisi per Western blot tiene conto quindi degli eventuali cambiamenti globali nella quantità di una proteina, dovuti a variazioni sia nell'inizio traduzionale sia nei processi di degradazione. Per quanto riguarda la distribuzione polisomale cellule HEK-293 in attiva crescita sono state trasfettate per centoventi ore con oligo siRNA specifici per La e gli estratti citoplasmatici sono stati frazionati su gradiente di saccarosio 15%-50%. Sono state successivamente raccolte nove frazioni da ogni gradiente mentre veniva monitorato il profilo di assorbanza a 260 nm. Come mostrato in Fig. 11 non ci sono differenze tra i profili di assorbanza di cellule trasfettate con oligo siRNA di controllo (scrambled) ed oligo siRNA specifici per La. La quantizzazione dei segnali radioattivi nelle frazioni dei gradienti, analizzate per Northern Blot con sonde specifiche per RPS19 ed RPL7a, è stata usata per misurare la percentuale di un dato messaggero associato con i polisomi. Il sommario di tre esperimenti indipendenti è mostrato in Fig. 18. I dati indicano che l'associazione polisomale dei messaggeri TOP RPS19 ed RPL7a non è influenzata dal decremento della proteina La.

In maniera coerente con i risultati dell'associazione polisomale l'analisi per Western blot per misurare i livelli proteici di RPS19 ed RPL7a non presenta alcuna variazione come conseguenza della diminuzione della proteina La (Fig. 19).

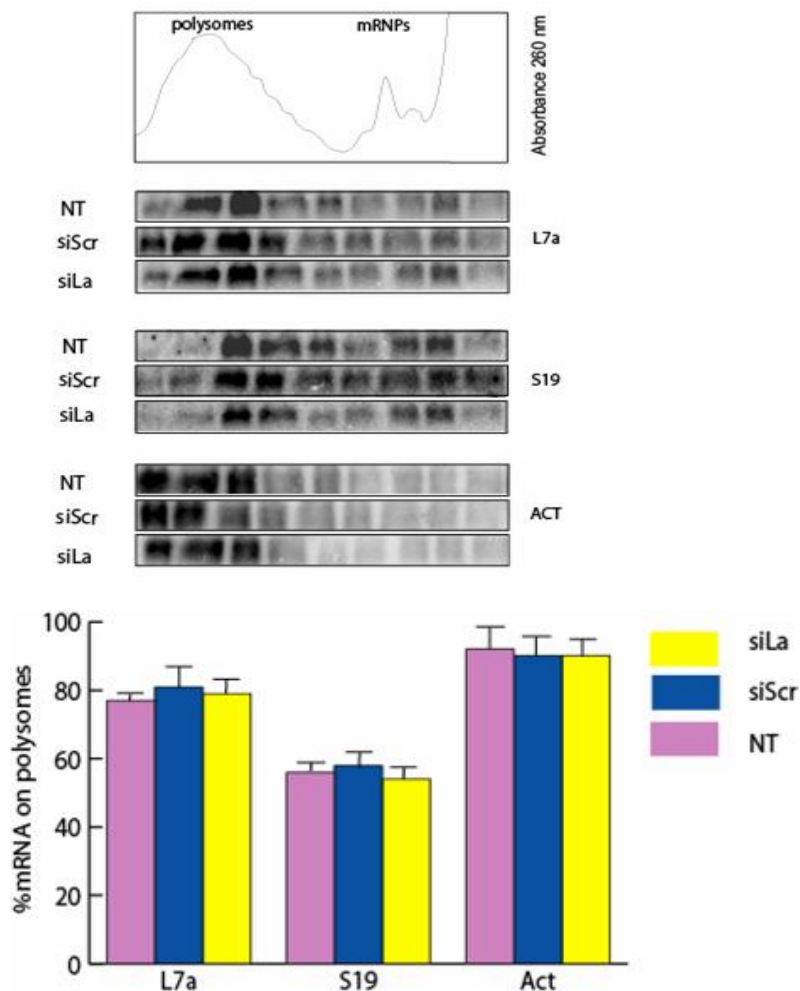


Fig 18: Distribuzione polisomale dei messaggeri TOP in cellule trasfettate con oligo siRNA per La o di controllo (scrambled). Il profilo di assorbanza delle cellule trasfettate con siRNA di controllo o specifici per La è mostrato. L'RNA di ogni frazione è stato analizzato per Northern blot con le sonde per gli mRNA indicati. E' rappresentata la quantizzazione di una tripla analisi polisomi/mRNP. I risultati sono espressi come percentuale di mRNA sui polisomi ottenuti sommando i valori delle frazioni 1-5.

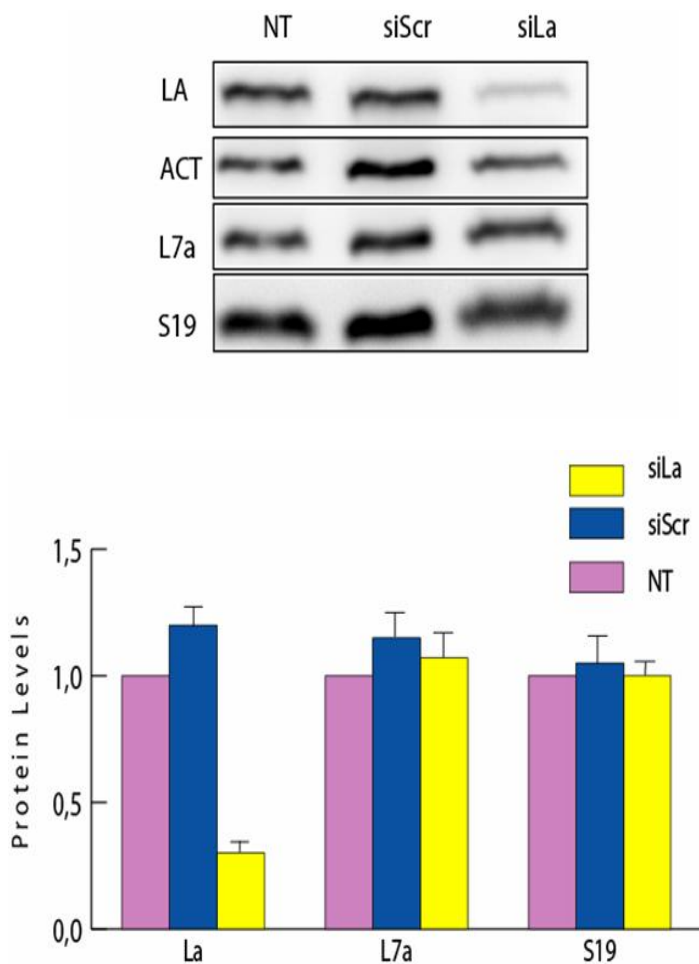


Fig 19: Analisi per Western blot delle proteine TOP S19 ed L7a in cellule trasfettate con oligo siRNA per La o di controllo (scrambled). Cellule HEK-293 sono state trasfettate transientemente con oligo siRNA specifici per La (siLa) e con siRNA di controllo (siScr) come descritto in Materiali e Metodi. Gli estratti cellulari totali sono stati raccolti dopo 120 ore di trasfezione ed analizzati per immunoblot con anticorpi contro La, L7a, S19 e la actina. Le colonne e le barre dell'istogramma rappresentano le medie $\pm$ SEM (errore standard della media) di tre esperimenti ognuno normalizzato ai livelli di actina.

Analisi del profilo di sedimentazione di La, Ro60 e Y1

E' stato precedentemente osservato che la proteina Ro60 è richiesta per l'interazione di La con il 5'UTR dei messaggeri TOP (Pellizzoni et al., 1998). Come già detto nell'Introduzione La e Ro60 sono le proteine "core" del complesso ribonucleoproteico (RNP) di Ro, che include anche una molecola del piccolo RNA non codificante Y (Pruijn et al., 1997). Per studiare una possibile correlazione tra il complesso RNP di Ro ed il controllo traduzionale dei messaggeri TOP, abbiamo analizzato il profilo di sedimentazione di Ro60 e di La in cellule HEK-293 cresciute in assenza ed in presenza di siero (Fig.20).

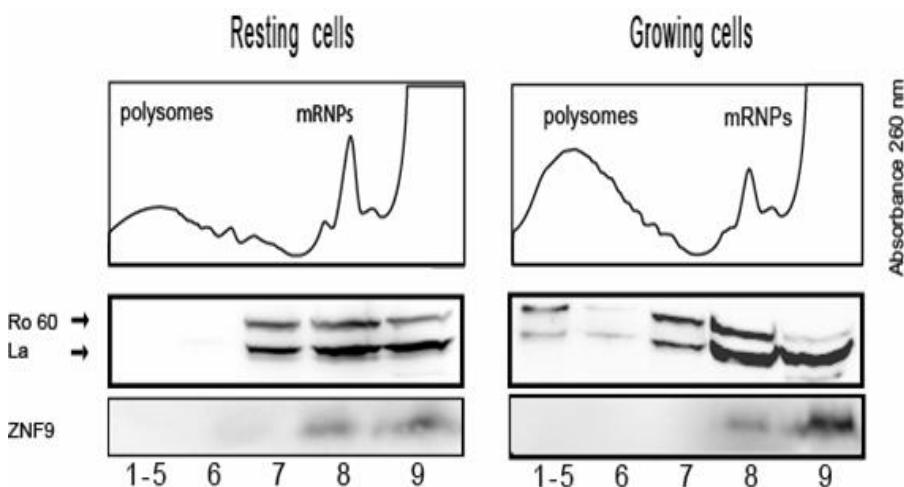


Fig 20: Associazione di La e Ro60 con i polisomi. Estratti citoplasmatici di HEK-293 cresciuti in assenza (resting cells) e in presenza (growing cells) di siero sono stati frazionati su un gradiente 15%-50%. I profili di assorbanza dei gradienti di saccarosio delle cellule in attiva crescita e quiescenti sono mostrati. Le frazioni sono state processate per analisi proteica tramite western Blot usando anticorpi contro Ro60, La e ZNF9. Soltanto 1/10 delle frazioni 8 e 9 sono state analizzate.

Gli estratti citoplasmatici sono stati frazionati su un gradiente di saccarosio 15%-50%. Dalle frazioni raccolte sono state precipitate le proteine che sono state analizzate tramite Western blotting. I risultati dimostrano che in cellule in attiva crescita una piccola parte di La e Ro60 sedimenta con i polisomi, mentre questa frazione non è visibile in condizioni quiescenti (Fig.20). E' da notare che la proteina ZNF9 invece si ritrova sempre nella parte non polisomale del gradiente, a prescindere dalle condizioni di crescita cellulare. Questi dati suggeriscono che il comportamento delle proteine Ro60 e La è simile a quello dei messaggeri TOP in cellule in assenza di siero. Per approfondire la distribuzione del complesso RNP di Ro lungo la parte leggera del gradiente, estratti citoplasmatici di HEK-293 sono stati frazionati su gradiente di saccarosio 15%-30% per separare i polisomi (frazioni P, 1 e 2) dalle subunità ribosomali e dalla parte non ribosomale del gradiente (Fig. 21A). Le frazioni raccolte sono state sottoposte sia ad SDS-PAGE ed immunoblot con anticorpi specifici contro Ro60, La, RPL11, RPS19 e GAPDH, sia a Northern blot con le sonde specifiche per l'RNA Y1 e per gli mRNA S19 e β -actina. I risultati (Fig.21A) indicano che Ro60, La e Y1 sono maggiormente localizzati nella parte non ribosomale del gradiente e possibilmente associati alla subunità piccola ribosomale (40S). Già in un precedente lavoro era stata osservata l'interazione di La con la piccola subunità ribosomale (Peek et al., 1996). Comunque una piccola frazione dei componenti della particella Ro sedimenta con i polisomi, insieme con le proteine ribosomali (RP) ed i TOP mRNAs, mentre la proteina di controllo GAPDH sedimenta interamente nella parte non ribosomale del gradiente. Questi risultati sono stati confermati da esperimenti di centrifugazione in cui una piccola quantità di Ro60 e La si ritrova nella frazione P100, in cui sedimentano i polisomi e le particelle ribosomali, rispetto al controllo GAPDH, unicamente presente nella frazione S100, che contiene le particelle non ribosomali (Fig. 21B).

Fig. 21A

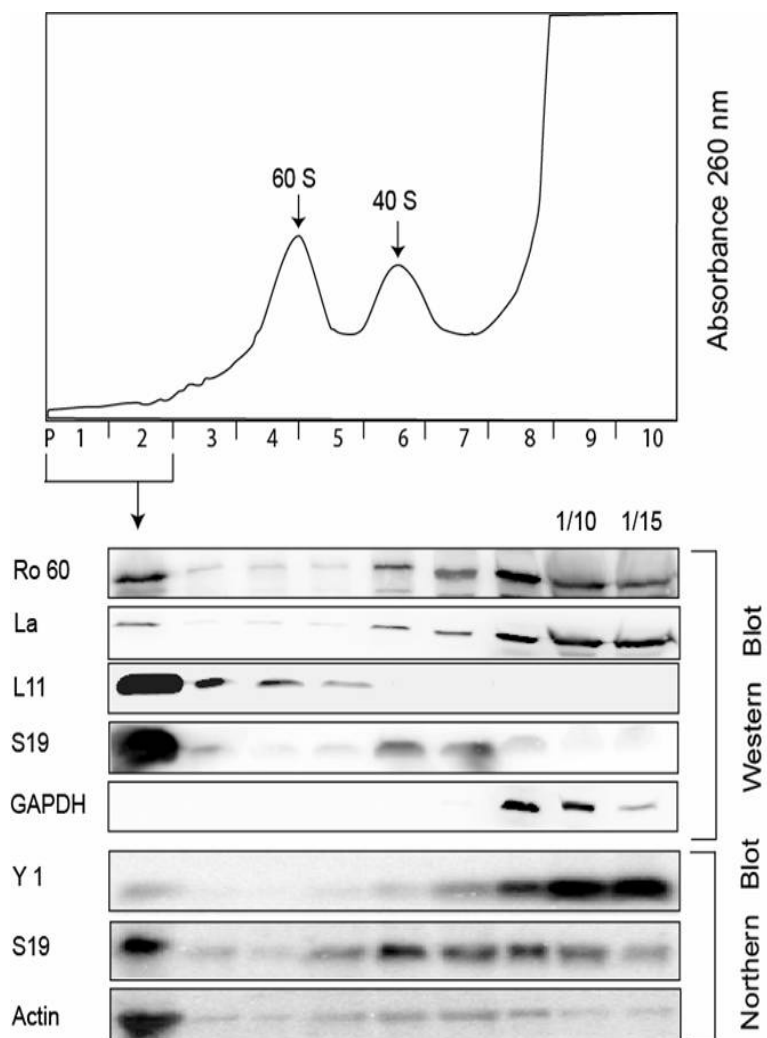


Fig. 21B

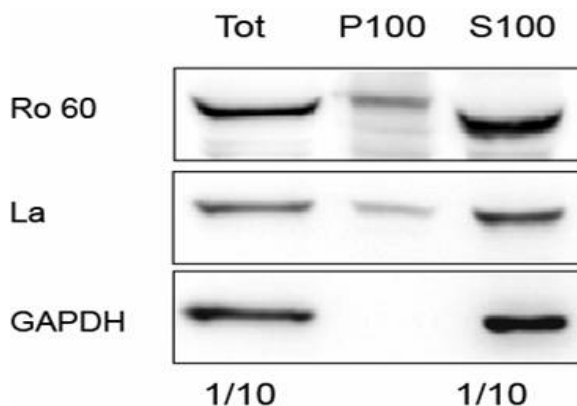


Fig 21: Analisi di sedimentazione di estratti frazionati su gradiente di saccarosio 15%-30% (A) o pellettati mediante centrifugazione (B). (A) Estratti citoplasmatici provenienti da cellule HEK-293 sono stati frazionati su gradiente di saccarosio 15%-30%. Il profilo di assorbanza è mostrato. Le frazioni sono state processate per l'analisi dell'RNA per Northern blot con le sonde per Y1, S19 e actina e per l'analisi proteica per Western blot con anticorpi per Ro60, La, RPL11, RPS19 e GAPDH. Per il Western blot solo 1/10 della frazione 9 e 1/15 della frazione 10 è stato analizzato. P: pellet (B). Estratti citoplasmatici provenienti da cellule HEK-293 sono stati centrifugati a 10×10^5 ottenendo le frazioni P100 ed S100. Le frazioni sono state processate per l'analisi proteica per Western blot con anticorpi contro Ro60, La e GAPDH. Solo 1/10 del totale e di S100 è stato analizzato. Tot: totale

I nostri dati quindi indicano che l'intero complesso Ro RNP (La, Ro60 e Y) sedimenta con i polisomi. Per approfondire la relazione esistente tra i diversi componenti della particella Ro RNP, abbiamo analizzato il comportamento di Ro60 e Y1 in cellule in cui era stato indotta la diminuzione della proteina La tramite interference. Cellule HEK-293 sono

state trasfettate transientemente con gli stessi oligo siRNA specifici per La usati negli esperimenti descritti nei precedenti paragrafi e con siRNA di controllo (scrambled). Una piccola parte degli estratti cellulari è stata sottoposta a Western blot con l'anticorpo contro La per verificare l'avvenuta diminuzione della proteina (Fig. 22A). Il resto degli estratti citoplasmatici è stato frazionato su gradiente di saccarosio 15%-30% per separare i polisomi (frazioni P, 1 e 2) dalle subunità ribosomali e dalla parte non ribosomale del gradiente. Le frazioni raccolte sono state sottoposte ad SDS-PAGE ed immunoblot con anticorpi specifici contro Ro60, La, RPL11, RPS19 e GAPDH. I risultati (Fig.22B) indicano innanzitutto che in cellule in cui è stata indotta la diminuzione di La non varia la distribuzione di questa proteina lungo le frazioni del gradiente e che quindi, ad un suo decremento, corrisponde proporzionalmente la scomparsa della banda relativa alla piccola frazione associata con i polisomi. Sono anche visibili forme di degradazione della proteina stessa. Inoltre anche la proteina Ro60 non sedimenta più con i polisomi quando viene indotto un decremento della proteina La, indicando che la localizzazione polisomale di Ro60 è connessa a quella di La. Questi risultati sono stati confermati da esperimenti di centrifugazione in cui la piccola quantità di Ro60 e La, che si ritrova nella frazione P100 in cellule trasfettate con gli oligo siRNA di controllo, non è più visibile in cellule trasfettate con gli oligo siRNA specifici per La (Fig. 23). Invece i controlli RPL11 e l'actina sedimentano sempre rispettivamente nella frazione P100 ed S100, a prescindere dai quantitativi di La presente nelle cellule. L'analisi per Northern blot inoltre dimostra che in mancanza di La anche l'RNA Y1 non sedimenta più con i polisomi. Nel complesso questi dati indicano che la sedimentazione con i polisomi della particella Ro RNP è un processo che coinvolge tutti i componenti "core" e che non avviene se non c'è sufficiente quantità di La che permetta la localizzazione polisomale della stessa La, di Ro60 e Y1. Non si può escludere che la presenza del complesso Ro60 sui polisomi sia compromessa anche in carenza di uno degli altri due fattori, Ro60 e Y1.

Fig. 22A

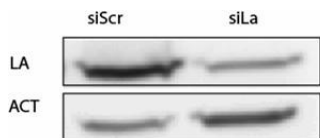


Fig. 22B

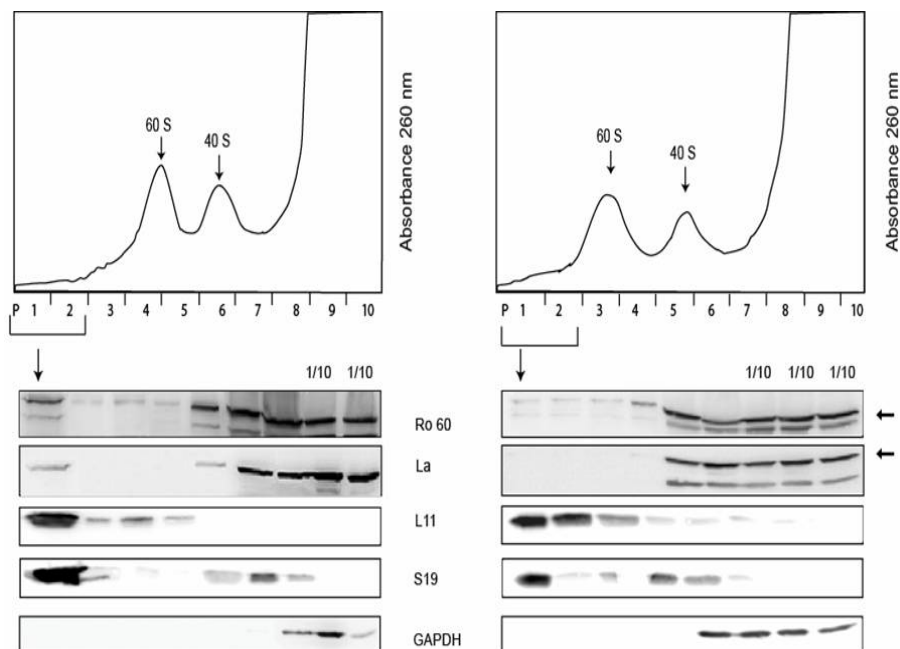


Fig 22: Analisi di sedimentazione di estratti provenienti da cellule in cui è stato indotto il decremento di La). (A) HEK-293 sono state trasfettate transientemente con siRNA specifici per La e siRNA scrambled (siScr). Parte degli estratti cellulari è stata analizzata per Western blot con anticorpi specifici per La e per la β -actina. (B). I rimanenti estratti citoplasmatici sono stati frazionati su gradiente di saccarosio 15%-30%. Il profilo di assorbanza è mostrato. Le frazioni sono state processate per l'analisi proteica per Western blot con anticorpi per Ro60, La, RPL11, RPS19 e GAPDH. Solo 1/10 della frazione 9 e 1/10 della frazione 10 è stato analizzato. P: pellet

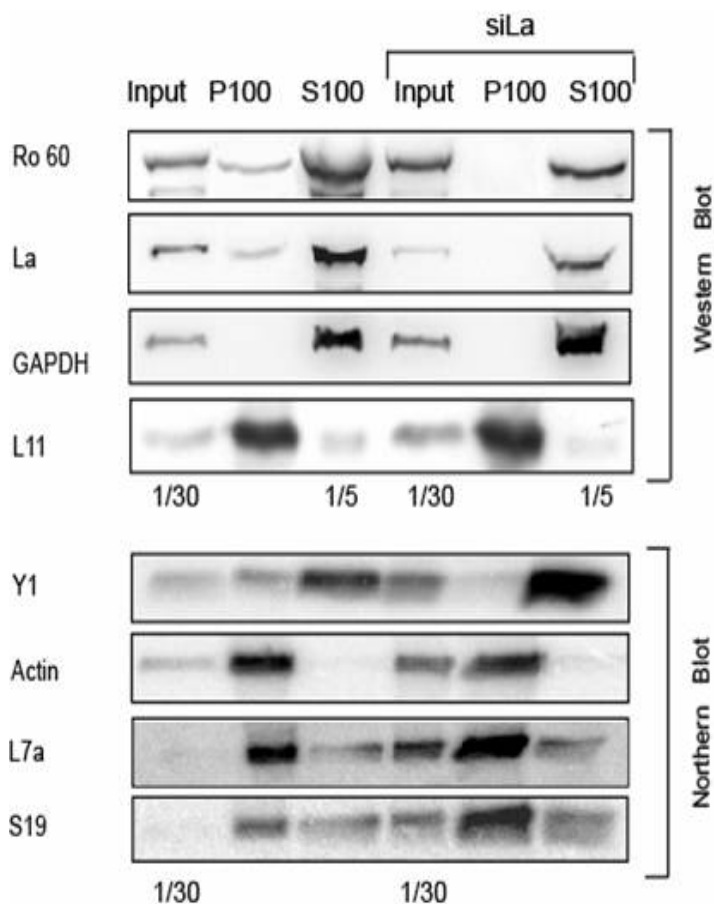


Fig 23: Analisi di sedimentazione tramite centrifugazione di estratti ottenuti da cellule in cui è stato indotto il decremento di La. HEK-293 sono state trasfettate transientemente con siRNA specifici per La (siLa). Gli estratti citoplasmatici sono stati centrifugati a 10×10^5 ottenendo le frazioni P100 ed S100. Le frazioni sono state processate per l'analisi proteica per Western blot con anticorpi contro Ro60, La, RPL11 e GAPDH e per l'analisi Northern con sonde specifiche per l'RNA Y1 e per i messaggeri actina, L7a ed S19. Solo 1/30 del totale (Input) di entrambe le analisi ed 1/5 di S100 dell'analisi Western sono stati analizzati.

La correlazione mostrata tra Ro60, La e Y1 nella loro distribuzione lungo il gradiente rende molto plausibile che la cosedimentazione implichi una interazione tra La e Ro60 (Y1 è conosciuto essere sempre associato a Ro60) nella frazione polisomale. Questo potrebbe spiegare perchè un decremento di La produca la mancata localizzazione di Ro60 con i polisomi, in quanto non ci sarebbe abbastanza La per costituire particelle Ro60-La attive per localizzarsi sui polisomi. Quindi ci proponiamo di verificare prossimamente l'interazione Ro60-La nella frazione P100, attraverso esperimenti di immunoprecipitazione. Al momento abbiamo verificato l'associazione Ro60-La in estratti citoplasmatici totali, già nota in letteratura (Fabini et al., 2000; Peek et al., 1993; Slobbe et al., 1992). Abbiamo eseguito esperimenti di immunoprecipitazione in HEK-293 in cui abbiamo osservato che l'anticorpo anti-La precipita Ro60 (~15%) in maniera specifica, in quanto la resina da sola era incapace di riconoscere la proteina (Fig.24)

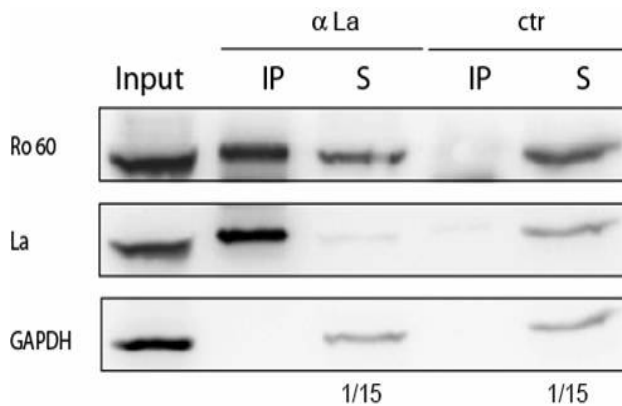


Fig 24: Immunoprecipitazione di Ro60 da parte di La. Estratti citoplasmatici ottenuti da cellule HEK-293 sono stati immunoprecipitati (IP) da un anticorpo monoclonale contro La e da una resina senza anticorpo (ctr); sono stati poi analizzati per immunoblot con anticorpi specifici per Ro60, La ed anche per GAPDH usato come controllo negativo. Solo 1/15 della frazione del supernatante (S) è stata analizzata

Inibizione della proteina Ro60 tramite trasfezione di oligo siRNA

Negli esperimenti di knockdown di La mostrati precedentemente abbiamo dimostrato che la diminuzione di questa proteina non influenza il l'associazione polisomale dei messaggeri TOP. L'analisi del profilo di sedimentazione indica però la localizzazione del complesso Ro60 con i polisomi, suggerendo un possibile ruolo di questa particella nel controllo traduzionale dei TOP. Ci proponiamo allora di analizzare la distribuzione polisomale dei messaggeri TOP in cellule in cui sia stato indotto il decremento simultaneo delle proteine La e Ro60 (Fig.25).

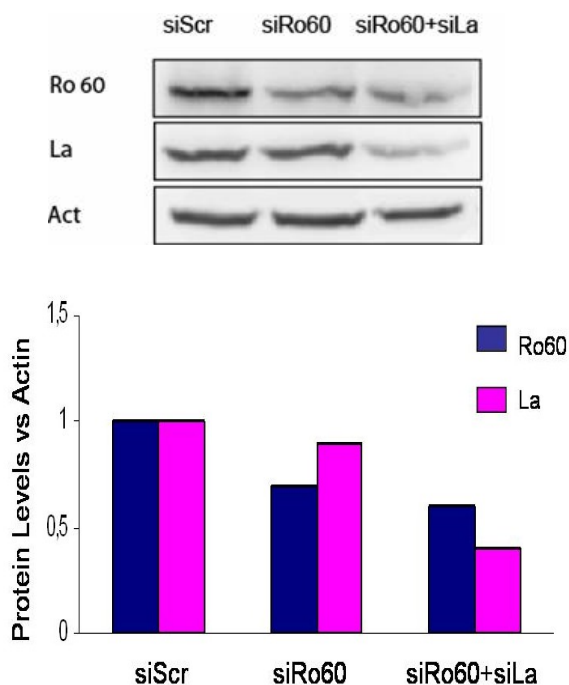


Fig 25: Diminuzione della proteina Ro60 in seguito a trasfezione con oligo siRNA. Cellule HEK-293 sono state trasfettate transientemente con oligo siRNA specifici per La (siLa), per Ro60 (siRo60) e con siRNA di controllo (siScr). Gli estratti cellulari totali sono stati raccolti ed analizzati per immunoblot con anticorpi contro La, Ro60 e la actina. La quantizzazione è mostrata.

Abbiamo così provato ad inibire Ro60 tramite trasfezione con oligo siRNA. Cellule HEK-293 sono state transientemente trasfettate con siRNA per Ro60 e con siRNA per La e gli estratti cellulari totali sono stati sottoposti a Western blot con l'anticorpo contro La e Ro60. Ho potuto osservare una riduzione della proteina Ro60 di circa il 30%, sia in cellule trasfettate con i soli oligo siRNA per Ro60, sia in quelle in cui era stata indotta simultaneamente la diminuzione di La. L'effetto dei siRNA per Ro60 era specifico perchè HEK-293 trasfettate con i siRNA di controllo (scrambled) non mostravano alcun decremento della proteina Ro60 (Fig. 25).

Discussione

E' stato dimostrato che la sintesi di molte proteine dei mammiferi associate con l'apparato traduzionale è selettivamente regolata a livello traduzionale in maniera dipendente dalle condizioni di crescita (Meyuhas, 2000). I corrispondenti mRNA sono caratterizzati dalla presenza all'estremità 5' terminale di un tratto di oligopirimidine (5'TOP) e sono quindi chiamati TOP mRNA. Il controllo a livello traduzionale dei messaggeri TOP è un sistema usato per modulare in modo rapido e reversibile la produzione delle componenti coinvolte nel processo di sintesi proteica. Attraverso questo meccanismo la cellula può rapidamente inibire o promuovere la biosintesi dell'apparato traduzionale in risposta alla disponibilità di nutrienti o alla presenza di fattori di crescita (Meyuhas, 2000; Thomas, 2000). La sequenza 5'TOP include il nucleo dell'elemento regolatore traduzionale in *cis* di questi mRNAs (Avni et al., 1994). E' stato suggerito che il motivo 5'TOP potrebbe essere riconosciuto da specifici fattori in *trans* in grado di regolare l'inizio traduzionale dei messaggeri TOP. Sebbene siano state identificate molte proteine che legano la sequenza 5'TOP (Kakegawa et al., 2007; Meyuhas, 2000), il significato funzionale di queste interazioni non è chiaro.

L'alterazione del dosaggio di La non modifica significativamente la traduzione dei messaggeri TOP

La è una proteina abbondante, ubiquitaria, evolutivamente conservata e per lo più associata con vari RNA cellulari. E' presente prevalentemente nel nucleo, dove si associa con i nuovi trascritti sintetizzati dalla RNA polimerasi (Pol) III, ed è implicata nella terminazione e nell'inizio di trascrizione della Pol III, nel processamento dei tRNA, e nel trasporto e nella ritenzione nucleare di molti trascritti di Pol III (Maraia and Intine, 2001; Maraia and Intine, 2002; Wolin and Cedervall, 2002). La caratteristica comune a tutti gli RNAs legati da La è la presenza di un tratto di pirimidine, particolarmente di uridine. Nel citoplasma La è stata coinvolta in funzioni connesse con la traduzione. Il ruolo più documentato e meglio studiato della proteina La nel citoplasma è il suo coinvolgimento nell'inizio traduzionale di alcuni RNA virali (Ali et al., 2000; Costa-Mattioli et al., 2004; Meerovitch et al., 1993). Dal momento che, in generale, i virus

parassitano le funzioni cellulari, è plausibile che La svolga delle funzioni nella traduzione di mRNAs cellulari. In accordo con ciò è stato osservato che: 1) La promuove la traduzione IRES dipendente dell'mRNA della proteina inibitrice dell'apoptosi X-linked (XIAP) (Holcik and Korneluk, 2000) e 2) l'associazione di La con un'isoforma dell'mRNA Mdm2, che ha due "open reading frames" a monte, promuove la traduzione di Mdm2 con un conseguente decremento in p53 ed un' incrementata progressione nella leucemia (Trotta et al., 2003).

La proteina La è stata implicata anche nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP dalla scoperta che poteva essere indotto un legame covalente tra la proteina omologa di *Xenopus* ed un piccolo RNA (12 nucleotidi), che consisteva solo della sequenza di oligopirimidine (Pellizzoni et al., 1996). Successivamente Crosio e colleghi (Crosio et al., 2000) hanno riportato in *Xenopus* un effetto positivo modesto ma riproducibile della proteina La sulla traduzione dei messaggeri TOP; in cellule quiescenti l'overespressione di Lawt sposta i messaggeri TOP rp-L4, rp-S7 ed EF-1 α dalle particelle sub-polisomali ai polisomi, mentre l'espressione di una forma troncata di La risulta in una maggior proporzione dei messaggeri TOP nella frazione sub-polisomale. Inoltre è stato mostrato che la proteina La di *Xenopus* co-sedimenta con i polisomi in maniera dipendente dall'RNA ed anche che La è associata specificatamente con i TOP mRNAs nella frazione polisomale (Cardinali et al., 2003). Complessivamente quindi questi dati suggeriscono un modello in cui l'interazione La-TOPmRNAs stimola la traduzione di questi messaggeri. Tuttavia altri risultati indicano un ruolo negativo di La sulla traduzione dei messaggeri TOP. E' stato descritto infatti che La incrementa la frazione subpoliribosomale del messaggero TOP RPL37 (Schwartz et al., 2004) e che può reprimere la traduzione di un TOP mRNA *in vitro* (Zhu et al., 2001). Evidentemente La può interagire con i TOP mRNAs ed è in qualche modo implicata nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP, ma il suo ruolo preciso in questo processo rimane da essere determinato.

Per questo motivo, ho costruito linee cellulari umane che sovraesprimono Lawt o una forma mutata di La, mancante della sequenza di localizzazione nucleare (NLS) (Fig. 8). Una volta verificata la sovraespressione dei geni esogeni ho analizzato l'associazione polisomale dei messaggeri TOP S19 ed L7a. I nostri risultati indicano che, sia in cellule quiescenti sia in attiva crescita, la sovraespressione di La non altera in maniera significativa l'associazione polisomale dei messaggeri TOP (Fig.15). In maniera coerente, non è stato rilevato un effetto significativo anche in esperimenti di

trasfezione transiente, in cui ho cotrasfettato plasmidi codificanti per La e per un TOP-reporter in cellule EBNA/293 (fig.10). Una possibile spiegazione può essere che il livello di sovraespressione ottenuto per i costrutti esogeni (2 volte rispetto al La endogeno) non era sufficiente ad influenzare la traduzione dei messaggeri TOP (Fig.9 e 12). Infatti si dovrebbe considerare che La è una proteina abbondante e questo può porre un limite alla sovraespressione di La esogena e all'effetto della sua sovraespressione. Comunque, in esperimenti simili, altri autori non hanno rilevato alcun effetto della sovraespressione di La sulla traduzione dei messaggeri TOP (Meyuhas, 2000). Come approccio sperimentale alternativo alla sovraespressione abbiamo utilizzato l'RNA interference per indurre un decremento della proteina La. Abbiamo ottenuto oltre il 70% di riduzione nel livello proteico della proteina La ma questa diminuzione non causava conseguenze visibili sulla traduzione dei messaggeri TOP S19 ed L7a (Fig18 e 19). Si può ipotizzare che il 30% di La endogena rimasta dopo il Knockdown possa mantenere le sue funzioni traduzionali, ma comunque i risultati di sovraespressione e di interference suggeriscono, nel loro insieme, che nel nostro sistema sperimentale la proteina La non è un fattore limitante coinvolto nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP. Per conciliare questa conclusione con i dati di altri autori precedentemente riportati si può ritenere che la regolazione dei messaggeri TOP sia un evento complesso che dipende da differenti effettori regolatori che permettono alla cellula di rispondere sia ai vari stimoli esterni, come nutrienti e specifici segnali mitogenici e di crescita, sia a segnali interni che connettono i livelli di sintesi proteica con le necessità dello sviluppo e del differenziamento cellulare, con l'energia fornita dai mitocondri etc. Si può ipotizzare quindi che La è un componente di un complesso che assiste la traduzione dei TOP mRNAs. Soltanto in alcune sconosciute circostanze La può diventare un fattore limitante.

Ro60, La e l'RNA Y1 cosedimentano sui polisomi in differenti condizioni di crescita

I risultati degli esperimenti di sovraespressione e di interference di La ci hanno indotto ad analizzare il coinvolgimento di altri possibili effettori nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP. In particolare ci siamo concentrati sulla proteina Ro60, indicata come fattore richiesto per il legame di La alla sequenza TOP (Pellizzoni et al., 1998). I complessi ribonucleoproteici di Ro (RoRNP) sono piccole particelle prevalentemente citoplasmatiche che furono inizialmente identificate come maggiori targets del “Lupus Eritematoso sistemico” e della sindrome di Sjögren (Youinou et al., 1994). La struttura “core” dei Ro RNPs nell'uomo è composta da una molecola di un piccolo RNA non codificante Y e da due proteine ben caratterizzate, Ro60 e La (Prujn et al., 1997). I complessi Ro RNP sono presenti in tutti gli eucarioti superiori ma la loro funzione è ancora poco chiara. Studi nei nuclei cellulari dei vertebrati hanno rivelato che Ro60 si associa con i piccoli RNAs “misfolded”. In oociti di *Xenopus* Ro60 lega un'ampia popolazione di varianti di pre-5S rRNAs che sono “misfolded”, processati inefficacemente, ed eventualmente degradati (O'Brien and Wolin, 1994; Shi et al., 1996). Recentemente è stato anche dimostrato che Ro60 si lega a varianti U2snRNAs in cellule staminali embrionali di topo (Chen et al., 2003b). Poichè Ro60 è la sola proteina descritta che può interagire con piccoli RNA “misfolded”, è stato proposto un suo ruolo nel controllo di qualità di RNAs non codificanti difettivi (Chen et al., 2003b). Inoltre, sia in cellule di topo sia in cellule batteriche, Ro60 è importante per la sopravvivenza cellulare dopo irradiazione ultravioletta (UV). Sebbene il meccanismo con cui Ro60 protegge le cellule dopo irradiazione UV non è conosciuto, è stato proposto che Ro60 dirige gli RNA danneggiati verso la degradazione (Chen et al., 2000; Chen et al., 2003b). In seguito all'irradiazione UV, sia Ro60 che l'RNA Y subiscono alterazioni nella loro distribuzione subcellulare, diventando prevalentemente nucleari (Chen et al., 2003b). Recentemente Christov e colleghi (Christov et al., 2006) hanno attribuito al piccolo RNA Y un ruolo funzionale nella replicazione del DNA umano. Quindi, nonostante i complessi RNP di Ro siano conservati durante l'evoluzione ed abbiano una localizzazione prevalentemente citoplasmatica, finora sono state descritte solo funzioni nucleari e non ci sono evidenze su un coinvolgimento delle particelle Ro RNP in fondamentali processi citoplasmatici. I nostri esperimenti di cosedimentazione compiuti con estratti citoplasmatici di cellule umane implicano un possibile ruolo del complesso

di Ro60 nel metabolismo dei messaggeri TOP. Noi abbiamo trovato infatti, sia frazionando gli estratti citoplasmatici su gradienti di saccarosio sia separandoli per centrifugazione, che Ro60, La e Y1 colocalizzano con i polisomi (Fig 20, 21A e B). Le componenti del complesso di Ro60 cosedimentano in maniera specifica con la frazione polisomale in quanto su gradiente di saccarosio 15%-30% la differente intensità dei segnali nelle diverse frazioni indica una distribuzione non casuale lungo il gradiente del complesso di Ro60 (Fig.21A). L'associazione polisomale di Ro60 e di La è stata analizzata anche in differenti condizioni di crescita cellulare. Come già detto nell'Introduzione, in cellule in attiva crescita i messaggeri TOP sono maggiormente associati con i polisomi rispetto a cellule in condizioni quiescenti in cui si ritrovano in massima parte sequestrati in particelle ribonucleoproteiche. Noi abbiamo mostrato che la localizzazione con i polisomi di La e di Ro60 è caratteristica di cellule in attiva crescita, mentre non è riscontrabile in cellule cresciute in carenza di siero (Fig.20). Ciò indica una possibile connessione funzionale tra il complesso Ro60 e la regolazione traduzionale dei messaggeri TOP. I nostri risultati sono in accordo con un precedente lavoro che mostrava l'associazione di La con i messaggeri TOP sulle frazioni polisomali in *Xenopus* (Cardinali et al., 2003). Sarebbe interessante verificare se anche nel nostro sistema sperimentale La è legata ai messaggeri TOP quando si trova sui polisomi per correlare in maniera più specifica il comportamento del complesso RNP di Ro con quello dei TOP in differenti condizioni di crescita. Poichè il legame di La alla sequenza TOP è stato provato da molti gruppi indipendenti, si può ipotizzare che La recluti il complesso di Ro sui messaggeri TOP. Anche se questa ipotesi deve essere provata, noi abbiamo dimostrato che Ro60 e Y1 non cosedimentano con i polisomi quando è indotto un decremento della proteina La, indicando che la localizzazione polisomale di Ro60 e di Y1 non prescinde da quella di La (Fig.22 e 23). Dalla nostra analisi di cosedimentazione non possiamo affermare se la localizzazione polisomale dei singoli componenti del complesso implichi un'interazione tra La, Ro60 e Y1 e successivi esperimenti di coimmunoprecipitazione potranno chiarirlo. Se la coimmunoprecipitazione indicasse il legame tra La, Ro60 e Y1 quando si ritrovano sui polisomi, questo potrebbe spiegare perchè un decremento di La produce la mancata localizzazione di Ro60 e di Y1 con i polisomi, in quanto non ci sarebbe abbastanza La per costituire particelle Y1-Ro60-La attive per localizzarsi sui polisomi. Non si può escludere comunque che la presenza del complesso Ro60 sui polisomi possa essere compromessa anche in carenza di uno degli altri due fattori, Ro60 e Y1 .

E' stato proposto che La non associa con i piccoli RNA Y in assenza di Ro60 *in vivo* (Mamula et al., 1989; Peek et al., 1993) e che, quando esportate nel citoplasma, alcune componenti del complesso RNP di Ro60 possano essere rilasciate dai loro RNAs Y ed eventualmente essere implicate in vari processi regolatori (Belisova et al., 2005). E' stata dimostrata infatti attività di RNA "chaperone" solo per La e per altre due componenti del complesso, hnRNP I e hnRNP K (Belisova et al., 2005). I nostri dati invece indicano che anche l'RNA Y1, insieme a La e a Ro60, cosedimenta con i polisomi, preservando l'integrità del "core" del complesso. Alla luce di questi risultati e di quelli di sovraespressione e di knockdown di La, abbiamo in mente di approfondire maggiormente il ruolo del complesso di Ro60 nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP effettuando saggi di associazione polisomale di messaggeri TOP in cellule in cui è stato indotto il simultaneo decremento di La e di Ro60. Mentre sono presenti in letteratura esempi di diminuzione di La in cellule umane tramite interference (Costa-Mattioli et al., 2004; Domitrovich et al., 2005), non sono noti esperimenti di decremento della proteina Ro60. Noi finora siamo riusciti ad indurre una diminuzione di Ro60 del 30% attraverso trasfezione transiente di oligo siRNA specifici per Ro60 (Fig.25). Ora ci proponiamo di analizzare se il decremento simultaneo di Ro60 e di La possa far abbassare il caricamento polisomale dei messaggeri TOP, e questo risultato sarebbe in accordo con i nostri dati di localizzazione polisomale e con i precedenti lavori che propongono un ruolo positivo di La nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP (Cardinali et al., 2003; Crosio et al., 2000; Pellizzoni et al., 1998).

Materiali e Metodi

Colture cellulari

Le cellule HEK-293 sono state cresciute in adesione in terreno DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complementato con glutammina 2 mM, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, penicillina 50 unità/ml e streptomicina 50 µg/ml e mantenute a 37°C e 5% di CO₂. Per inibire la traduzione le cellule HEK-293 sono state incubate in presenza di cicloesimide alla concentrazione di 30 µg/ml. E' stato dimostrato che a questa concentrazione la cicloesimide inibisce il 93% della traduzione dopo 4 ore (Rajavel and Neufeld, 2001).

La linea cellulare Flp-In TREx -293 è stata cresciuta in presenza di 100 µg/ml di zeocina e 15 µg/ml di blasticidina, e le linee cellulari TREx-LaWT e TREx-LaΔ373 in presenza di 15 µg/ml di blasticidina e di 70 µg/ml di igromicina B. L'aggiunta dell'analogo della tetraciclina doxiciclina al terreno di coltura alla concentrazione di 1µg/ml è stata usata per esprimere le sequenze La esogene. Per gli esperimenti di deprivazione le cellule sono state trasferite in terreno privo di siero e incubate per 2 ore. Per gli esperimenti di stimolazione è stato aggiunto il siero al terreno e l'incubazione è continuata per altre 2 ore.

Le cellule EBNA/293 sono state cresciute in adesione in terreno DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complementato con glutammina 2 mM, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, penicillina 50 unità/ml, streptomicina 50 µg/ml, G418 0,25 mg/ml e puromicina 0,5 µg/ml a 37°C e 5% di CO₂.

Trasfezione dei plasmidi

Le cellule EBNA/293 sono state trasfettate transientemente con il reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) secondo le indicazioni fornite. I plasmidi pTRE2-Lawt e pTRE2-LaΔ373 (circa 1 γ ciascuno) sono stati cotrasfettati ognuno con il plasmide pEF1αGEF1α (0,5 γ). Dopo 24 ore le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza per monitorare l'efficienza di trasfezione e successivamente raccolte per estrarre le proteine da utilizzare in esperimenti di Western blotting. Le cellule EBNA/293 sono state trasfettate stabilmente con il metodo del CaPO₄ (Tratschin et al., 1985; Wigler et al., 1979). I plasmidi pTRE2-Lawt e pTRE2-LaΔ373 (20 γ

ciascuno) sono stati cotrasfettati ognuno con il plasmide pTK-Hygro (2 µg). La selezione è stata condotta aggiungendo igromicina nel terreno alla concentrazione finale di 90 µg/ml. Anche le cellule Flp-In TREx -293 sono state trasfettate stabilmente con il metodo del CaPO₄ (Tratschin et al., 1985; Wigler et al., 1979). I plasmidi pcDNA5/FRT/TO Lawt e pcDNA5/FRT/TO LaΔ373 sono stati cotrasfettati con il plasmide di espressione pOG44 Flp recombinasi alle medesime quantità descritte sopra per la trasfezione stabile nelle cellule EBNA/293. I cloni delle cellule trasfettate sono stati isolati dopo un periodo di quattro settimane in presenza di 125 µg/ml di igromicina B. L'RNA e le proteine totali sono stati estratti dalle cellule non indotte o dopo 24 e 120 ore di induzione (presenza nel terreno di 1 µg/ml di doxicielina) e analizzati tramite Northern blot e tramite Western blot per valutare il livello di espressione dei costrutti La wild-type e La delecto in ogni clone cellulare.

Trasfezione degli oligo siRNA per La e per Ro60

Le sequenze target degli oligo siRNA per La sono state disegnate usando il Database Proligo e acquistate dalla Sigma-Proligo. Le sequenze dei siRNA utilizzati sono le seguenti: primer senso La siRNA: 5'-UGCUAGUGAUGAUGAACAUdTdT-3'; primer antisenso La siRNA: 5'-AUGUUCAUCAUCACUAGCAdTdT-3'; primer senso Scrambled: 5'-GCUUAGUGUAUGGAUCAAAdTdT-3'; primer antisenso Scrambled: 5'-UUUGAUCCAUAACACUAAGC dTdT-3'. Il giorno antecedente la trasfezione le cellule HEK-293 sono state tripsinizzate, risospese in terreno senza antibiotici, e trasferite in piastrine 6-well a circa il 30% di confluenza. Gli esperimenti di trasfezione sono stati compiuti utilizzando il reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Per ogni trasfezione 5 µl del duplex siRNA (il duplex della Sigma-Proligo è 50 µM) sono stati miscelati con 250 µl di OPTIMEM (Invitrogen). In un tubo separato 10 µl di Lipofectamina 2000 per miscela di reazione è stata aggiunta a 250 µl di OPTIMEM ed incubata 5' a temperatura ambiente. Le due soluzioni sono state unite ed incubate per altri 20' a temperatura ambiente per permettere la formazione dei complessi. La soluzione finale è stata poi aggiunta alle cellule nelle 6 well. La concentrazione finale dei siRNA era 125 nmol/µl. Le cellule sono state incubate a 37°C in presenza della soluzione di trasfezione per 24 ore. Il giorno seguente è stata compiuta un'altra trasfezione nelle stesse condizioni descritte sopra. Le cellule sono state incubate a 37°C in presenza

della soluzione di trasfezione per 48 ore. La trasfezione degli oligo siRNA per Ro60 è stata eseguita con le stesse modalità di quella per La, eccetto che la concentrazione finale dei siRNA per Ro60 era 250 nmol/μl. Le sequenze dei siRNA utilizzati per Ro60 sono le seguenti: primer senso Ro60 siRNA: 5'-CAAAUCACUUAAGUCUAAAdTdT-3'; primer antisenso Ro60 siRNA: 5'-UUAGACUUUAAGUGAUUUGdTdT-3'.

Costruzione di plasmidi di espressione

I costrutti Lawt e LaΔ373 sono stati amplificati tramite PCR dal vettore pGEM-Teasy- hLa (Promega) usando i seguenti primers: un primer al 5' che comprende il sito di restrizione di Bam H1 (CCGGATCCGTAATGGCTGAAAATGGTG) e un primer al 3' che include la sequenza di Hind III (La wild-type: CCAAGCTT TAAACTACTGGTCTCCAGCA e LaΔ373: GCATAAGCTTAAT GTTCAT CATGTTCATCATC). Dopo digestione BamH1/HindIII i prodotti sono stati clonati nel vettore di espressione inducibile pTRE2 (Clontech) digerito anch'esso BamH1/HindIII. Per il clonaggio nel vettore pcDNA5/FRT/TO i vettori pTRE2-Lawt e pTRE2-LaΔ373 sono stati digeriti BamH1/EcoRV ed i costrutti Lawt e LaΔ373 così ottenuti sono stati clonati nel vettore pcDNA5/FRT/TO a sua volta tagliato BamH1/EcoRV. I vettori pcDNA5/FRT/TO e pOG44 Flp, come anche la linea cellulare Flp-In T-Rex -293, sono stati un gentile regalo del Prof. G. Cesareni (Università di Tor Vergata, Roma, Italia).

Preparazione di estratti nucleari e citoplasmatici

Le cellule sono state raccolte, lavate una volta con PBS freddo e lisate (10^7 cellule/ 300 μl buffer di lisi) in 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.05% NP-40, aprotinina 1 μg/mL, leupeptina 1 μg/mL, pepstatina A 1 μg/mL, e PMSF 100 1 μg/mL. Dopo incubazione in ghiaccio per 5', gli estratti sono stati centrifugati in una centrifuga fredda (1500 x g for 2 min) ed il supernatante solubile 0.05% NP-40 è stato recuperato. Il pellet nucleare è stato lavato tre volte con lo stesso buffer, risospeso in 20 mM Tris HCl 7.5, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glicerolo, supplementato con gli inibitori di proteasi descritti sopra e fatto girare gentilmente su ruota a 4°C per 45 min. I campioni sono

poi stati centrifugati per 10' a 15000g ed i supernatanti erano gli estratti nucleari.

Analisi polisomale

Le cellule (5×10^6 per i gradienti di saccarosio 15%-50% e $2-3 \times 10^7$ per i gradienti di saccarosio 15%-30%) sono state lavate una volta con PBS freddo, lisate direttamente in piastra con 300 μ l di buffer di lisi (10 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% DOC, 0.2 units/ μ l inibitore dell'RNAsi (Promega), and 1mM dithiothreitol (DTT)) e trasferite in un tubo da microcentrifuga. Dopo 2 minuti di incubazione in ghiaccio, gli estratti sono stati centrifugati per 3 min a 13000 rpm a 4°C ed il supernatante è stato congelato in azoto liquido o caricato su un gradiente lineare di saccarosio 15%-50% o 15%-30% contenente 30mM Tris HCl 7.5, 100mM NaCl, and 10 mM $MgCl_2$. Poi gli estratti caricati sono stati centrifugati in un rotore SW41 in un'ultracentrifuga Beckman per 110 min. a 37000 rpm (per il gradiente di saccarosio 15%-50%) e per 4 ore a 37000 (per il gradiente di saccarosio 15%-30%). Si sono raccolte frazioni del gradiente di 1 ml ciascuna mentre veniva monitorato a 260 nm il profilo di densità ottica. Per l'analisi del solo RNA le frazioni sono state direttamente trattate con proteinasi K, per l'analisi delle sole proteine le frazioni sono state precipitate con 10% di acido tricloroacetico. Per l'analisi di RNA e proteine per il gradiente di saccarosio 15%-30% , 1/6 del pellet e 1/6 delle frazioni del gradiente sono state trattate con proteinasi K e la rimanente parte di ogni frazione è stata precipitata per l'analisi proteica.

Estrazione dell'RNA e Northern Blotting

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule o dalle frazioni dei gradienti precipitate con etanolo attraverso il metodo della proteinasi K (Sambrook et al., 1989). Per l'analisi Northern l'RNA è stato frazionato su un gel formaldeide-agarosio e trasferito sulla membrana GeneScreen Plus (PerkinElmer Life Sciences). Il Northern Blot è stato effettuato essenzialmente come raccomandato dalla casa produttrice. Gli mRNAs usati come sonda che sono stati analizzati sono i messaggeri TOP L7a ed S19, il messaggero non-TOP actina , e il piccolo RNA Y1. Questi probes sono stati preparati tramite la tecnica del "random primer" (Sambrook et al., 1989)

usando prodotti di RT-PCR. La quantizzazione del Northern blot è stata compiuta tramite PhosphorImager con il programma ImageQuant 5.0 (Amersham Biosciences).

Estrazione delle proteine e Western Blotting

Per gli estratti cellulari totali le cellule sono state lavate una volta con PBS freddo e direttamente lisate nel buffer di caricamento SDS-PAGE (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerolo, 1% SDS, 2.5% bromofenolo-blue). I lisati sono stati incubati a 95°C per 5 min. e chiarificati per centrifugazione per 10 min. a 10000 rpm. Le proteine provenienti dalle frazioni dei gradienti sono state precipitate con 10% di acido tricloroacetico. Il pellet è stato lavato con acetone, asciugato, e risospeso nel buffer di caricamento SDS-PAGE. Per i gradienti 15%-30% il pellet e le prime due frazioni (polisomi) sono state raggruppate e caricate interamente in una singola lane, mentre solo 1/10 e 1/15 delle frazioni 9 e 10 rispettivamente è stato caricato sul gel. Per i gradienti 15%-50% sono state raggruppate le prime 5 frazioni e caricate interamente in una singola lane, mentre solo 1/10 delle frazioni 8 e 9 è stato caricato sul gel. Le proteine sono state separate su un gel di poliacrilammide al 12% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Gli anticorpi usati sono stati : monoclonale di topo anti -hLa (Pruijn et al., 1995), policlonale di coniglio anti-ZNF9 (Botta et al., 2006), anti β -actina di coniglio (Sigma-Aldrich), anti β -tubulina di coniglio (Santa Cruz Biotechnology), siero umano anti -Ro60 (un gentile regalo del Dr. Ger J.M Pruijn, Radboud Università Nijmegen, Paesi Bassi), policlonale di coniglio anti-L11 (un gentile regalo di Sinisa Volarevic, Università di Rijeka, Croazia), monoclonale di topo anti S19 (Orzu et al., 2007),policlonale di coniglio anti-L7a (un gentile regalo di Giulia Russo, Università di Napoli FedericoII, Italia), anti B23 di capra (Everest Biotech) e monoclonale di topo GAPDH (Chemicon International). La rivelazione è stata effettuata tramite il reagente SuperSignal (Pierce) e la quantificazione è stata compiuta con il programma Image Quant 5.0 (Amersham Biosciences).

Analisi P100-S100

Le cellule (1×10^7) sono state lisate nel buffer di lisi 10 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% di Triton X-100, aprotinina 1

μg/mL, leupeptina 1 μg/mL, pepstatina A 1 μg/mL, e PMSF 100 1 μg/mL. Dopo 2 minuti di incubazione in ghiaccio, gli estratti sono stati centrifugati per 10 min a 13000 rpm a 4°C. Il pellet (i nuclei) non viene considerato ed il supernatante è stato caricato su un cuscinetto di saccarosio al 15%. Si centrifuga 1 ora e 30 min. a 40000 rpm a 4°C e poi si fa un ulteriore lavaggio di 30 min. sempre centrifugando a 40000 rpm a 4°C. Il pellet (P100) è stato risospeso in 50 μl di buffer di caricamento SDS-PAGE (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerolo, 1% SDS, 2.5% bromofenolo-blue). Il supernatante è stato precipitato con 10% di acido tricloroacetico. Il pellet è stato lavato con acetone, asciugato, e risospeso in 300 μl di buffer di caricamento SDS-PAGE.

Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione con l'anticorpo monoclonale anti -La è stata eseguita come descritto per gli anticorpi accoppiati alle biglie proteina A-Sefarosio (Amersham Pharmacia Biotech). L'anticorpo monoclonale (10 μl) è stato accoppiato alle biglie proteina A-Sefarosio (80 μl) attraverso incubazione su ruota a 4°C nel buffer IPP-150 (Tris HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, NP40 0,1%). Simultaneamente è stato compiuta una pre-chiarificazione dell'estratto cellulare incubando circa 1 mg di estratto cellulare di HEK-293 con 50 μl di resina proteina A-Sefarosio per 1 ora a 4°C nel buffer IPP-150. Successivamente l'estratto chiarificato (diluito nel buffer IPP-150) è stato diviso in due parti ed una parte è stata incubata con l'anticorpo immobilizzato e la rimanente parte con la resina proteina A-Sefarosio per 2 ore. In seguito, le biglie sono state lavate 4 volte per 10'' con il buffer IPP-150. Si tiene il primo supernatante di cui verrà caricato 1/15 su gel di poliacrilammide. Si aggiungono 30 μl di buffer di caricamento SDS-PAGE (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerolo, 1% SDS, 2.5% bromofenolo-blue); la resina viene bollita per 5' a 100°C, si centrifuga al massimo e si carica il supernatante (per non caricare la resina) sul gel. Come Input si caricano 50 γ, cioè 1/10 di quello usato nella IP.

Bibliografia

Abe, Y., Chen, W., Huang, W., Nishino, M., and Li, Y. P. (2006). CNBP regulates forebrain formation at organogenesis stage in chick embryos. *Dev Biol* 295, 116-127.

Ali, N., Pruijn, G. J., Kenan, D. J., Keene, J. D., and Siddiqui, A. (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 275, 27531-27540.

Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2249-2254.

Aloni, R., Peleg, D., and Meyuhas, O. (1992). Selective translational control and nonspecific posttranscriptional regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver. *Mol Cell Biol* 12, 2203-2212.

Alspaugh, M. A., and Tan, E. M. (1975). Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 55, 1067-1073.

Amaldi, F., and Pierandrei-Amaldi, P. (1990). Translational regulation of the expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis*. *Enzyme* 44, 93-105.

Avni, D., Biberman, Y., and Meyuhas, O. (1997). The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 25, 995-1001.

Avni, D., Shama, S., Loreni, F., and Meyuhas, O. (1994). Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol Cell Biol* 14, 3822-3833.

Ayukawa, K., Taniguchi, S., Masumoto, J., Hashimoto, S., Sarvotham, H., Hara, A., Aoyama, T., and Sagara, J. (2000). La autoantigen is cleaved in the

COOH terminus and loses the nuclear localization signal during apoptosis. *J Biol Chem* 275, 34465-34470.

Bai, C., and Tolias, P. P. (2000). Genetic analysis of a La homolog in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 28, 1078-1084.

Barth-Baus, D., Stratton, C. A., Parrott, L., Myerson, H., Meyuhas, O., Templeton, D. J., Landreth, G. E., and Hensold, J. O. (2002). S6 phosphorylation-independent pathways regulate translation of 5'-terminal oligopyrimidine tract-containing mRNAs in differentiating hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* 30, 1919-1928.

Baum, E. Z., and Wormington, W. M. (1985). Coordinate expression of ribosomal protein genes during *Xenopus* development. *Dev Biol* 111, 488-498.

Bayfield, M. A., Kaiser, T. E., Intine, R. V., and Maraia, R. J. (2007). Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation. *Mol Cell Biol* 27, 3303-3312.

Belisova, A., Semrad, K., Mayer, O., Kocian, G., Waigmann, E., Schroeder, R., and Steiner, G. (2005). RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs. *Rna* 11, 1084-1094.

Biberman, Y., and Meyuhas, O. (1997). Substitution of just five nucleotides at and around the transcription start site of rat beta-actin promoter is sufficient to render the resulting transcript a subject for translational control. *FEBS Lett* 405, 333-336.

Boire, G., and Craft, J. (1990). Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J Clin Invest* 85, 1182-1190.

Botta, A., Caldarola, S., Vallo, L., Bonifazi, E., Fruci, D., Gullotta, F., Massa, R., Novelli, G., and Loreni, F. (2006). Effect of the [CCTG]_n repeat expansion on ZNF9 expression in myotonic dystrophy type II (DM2). *Biochim Biophys Acta* 1762, 329-334.

Broekhuis, C. H., Neubauer, G., van der Heijden, A., Mann, M., Proud, C. G., van Venrooij, W. J., and Pruijn, G. J. (2000). Detailed analysis of the

phosphorylation of the human La (SS-B) autoantigen. (De)phosphorylation does not affect its subcellular distribution. *Biochemistry* 39, 3023-3033.

Buchholz, F., Angrand, P. O., and Stewart, A. F. (1996a). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 24, 3118-3119.

Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F., and Stewart, A. F. (1996b). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 24, 4256-4262.

Cardinali, B., Campioni, N., and Pierandrei-Amaldi, P. (1987). Ribosomal protein, histone and calmodulin mRNAs are differently regulated at the translational level during oogenesis of *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 169, 432-441.

Cardinali, B., Carissimi, C., Gravina, P., and Pierandrei-Amaldi, P. (2003). La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *J Biol Chem* 278, 35145-35151.

Cardinali, B., Di Cristina, M., and Pierandrei-Amaldi, P. (1993). Interaction of proteins with the mRNA for ribosomal protein L1 in *Xenopus*: structural characterization of in vivo complexes and identification of proteins that bind in vitro to its 5'UTR. *Nucleic Acids Res* 21, 2301-2308.

Chen, W., Liang, Y., Deng, W., Shimizu, K., Ashique, A. M., Li, E., and Li, Y. P. (2003a). The zinc-finger protein CNBP is required for forebrain formation in the mouse. *Development* 130, 1367-1379.

Chen, W., Wang, Y., Abe, Y., Cheney, L., Udd, B., and Li, Y. P. (2007). Haploinsufficiency for *Znf9* in *Znf9*^{+/-} mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy. *J Mol Biol* 368, 8-17.

Chen, X., Quinn, A. M., and Wolin, S. L. (2000). Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 14, 777-782.

Chen, X., Smith, J. D., Shi, H., Yang, D. D., Flavell, R. A., and Wolin, S. L. (2003b). The Ro autoantigen binds misfolded U2 small nuclear RNAs and

assists mammalian cell survival after UV irradiation. *Curr Biol* 13, 2206-2211.

Chen, X., and Wolin, S. L. (2004). The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J Mol Med* 82, 232-239.

Christov, C. P., Gardiner, T. J., Szuts, D., and Krude, T. (2006). Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* 26, 6993-7004.

Copela, L. A., Chakshusmathi, G., Sherrer, R. L., and Wolin, S. L. (2006). The La protein functions redundantly with tRNA modification enzymes to ensure tRNA structural stability. *Rna* 12, 644-654.

Costa-Mattioli, M., Svitkin, Y., and Sonenberg, N. (2004). La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24, 6861-6870.

Crosio, C., Boyl, P. P., Loreni, F., Pierandrei-Amaldi, P., and Amaldi, F. (2000). La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res* 28, 2927-2934.

Domitrovich, A. M., Diebel, K. W., Ali, N., Sarker, S., and Siddiqui, A. (2005). Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* 335, 72-86.

Dong, G., Chakshusmathi, G., Wolin, S. L., and Reinisch, K. M. (2004). Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *Embo J* 23, 1000-1007.

Fabini, G., Raijmakers, R., Hayer, S., Fouraux, M. A., Pruijn, G. J., and Steiner, G. (2001). The heterogeneous nuclear ribonucleoproteins I and K interact with a subset of the ro ribonucleoprotein-associated Y RNAs in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276, 20711-20718.

Fabini, G., Rutjes, S. A., Zimmermann, C., Pruijn, G. J., and Steiner, G. (2000). Analysis of the molecular composition of Ro ribonucleoprotein complexes. Identification of novel Y RNA-binding proteins. *Eur J Biochem* 267, 2778-2789.

Fan, H., Goodier, J. L., Chamberlain, J. R., Engelke, D. R., and Maraia, R. J. (1998). 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol Cell Biol* 18, 3201-3211.

Flink, I. L., and Morkin, E. (1995). Alternatively processed isoforms of cellular nucleic acid-binding protein interact with a suppressor region of the human beta-myosin heavy chain gene. *J Biol Chem* 270, 6959-6965.

Fok, V., Friend, K., and Steitz, J. A. (2006). Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol* 173, 319-325.

Fouraux, M. A., Bouvet, P., Verkaar, S., van Venrooij, W. J., and Pruijn, G. J. (2002). Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* 320, 475-488.

Fumagalli, S., and Thomas, G. (2000). S6 phosphorylation and signal transduction. In *translational control of gene expression* (Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. and Sonenberg N., eds). Cold Spring Harbor Laboratory press, 695-717.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.

Hendrick, J. P., Wolin, S. L., Rinke, J., Lerner, M. R., and Steitz, J. A. (1981). Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1, 1138-1149.

Holcik, M., and Korneluk, R. G. (2000). Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol Cell Biol* 20, 4648-4657.

Hornstein, E., Git, A., Braunstein, I., Avni, D., and Meyuhas, O. (1999). The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif. *J Biol Chem* 274, 1708-1714.

Intine, R. V., Dundr, M., Misteli, T., and Maraia, R. J. (2002). Aberrant nuclear trafficking of La protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs. *Mol Cell* 9, 1113-1123.

Intine, R. V., Sakulich, A. L., Koduru, S. B., Huang, Y., Pierstorff, E., Goodier, J. L., Phan, L., and Maraia, R. J. (2000). Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366. *Mol Cell* 6, 339-348.

Intine, R. V., Tenenbaum, S. A., Sakulich, A. L., Keene, J. D., and Maraia, R. J. (2003). Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol Cell* 12, 1301-1307.

Jacks, A., Babon, J., Kelly, G., Manolaridis, I., Cary, P. D., Curry, S., and Conte, M. R. (2003). Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure* 11, 833-843.

Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* 16, 3693-3704.

Jefferies, H. B., Reinhard, C., Kozma, S. C., and Thomas, G. (1994a). Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4441-4445.

Jefferies, H. B., Thomas, G., and Thomas, G. (1994b). Elongation factor-1 alpha mRNA is selectively translated following mitogenic stimulation. *J Biol Chem* 269, 4367-4372.

Kakegawa, T., Ohuchi, N., Hayakawa, A., Hirata, S., Matsuda, M., Kogure, K., Kobayashi, H., Inoue, A., and Kaspar, R. L. (2007). Identification of AUFI as a rapamycin-responsive binding protein to the 5'-terminal oligopyrimidine element of mRNAs. *Arch Biochem Biophys* 465, 274-281.

Kato, S., Sekine, S., Oh, S. W., Kim, N. S., Umezawa, Y., Abe, N., Yokoyama-Kobayashi, M., and Aoki, T. (1994). Construction of a human full-length cDNA bank. *Gene* 150, 243-250.

Kenan, D. J., and Keene, J. D. (2004). La gets its wings. *Nat Struct Mol Biol* 11, 303-305.

Kenan, D. J., Query, C. C., and Keene, J. D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 16, 214-220.

Kim, Y. K., Back, S. H., Rho, J., Lee, S. H., and Jang, S. K. (2001). La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic Acids Res* 29, 5009-5016.

Kufel, J., Allmang, C., Chanfreau, G., Petfalski, E., Lafontaine, D. L., and Tollervey, D. (2000). Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Mol Cell Biol* 20, 5415-5424.

Ledda, M., Di Croce, M., Bedini, B., Wannenes, F., Corvaro, M., Boyl, P. P., Caldarola, S., Loreni, F., and Amaldi, F. (2005). Effect of 3'UTR length on the translational regulation of 5'-terminal oligopyrimidine mRNAs. *Gene* 344, 213-220.

Lerner, M. R., Boyle, J. A., Hardin, J. A., and Steitz, J. A. (1981). Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 211, 400-402.

Levy, S., Avni, D., Hariharan, N., Perry, R. P., and Meyuhas, O. (1991). Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3319-3323.

Lin-Marq, N., and Clarkson, S. G. (1998). Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *Embo J* 17, 2033-2041.

Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.

Loreni, F., and Amaldi, F. (1992). Translational regulation of ribosomal protein synthesis in *Xenopus* cultured cells: mRNA relocation between polysomes and RNP during nutritional shifts. *Eur J Biochem* 205, 1027-1032.

Loreni, F., Francesconi, A., and Amaldi, F. (1993). Coordinate translational regulation in the syntheses of elongation factor 1 alpha and ribosomal proteins in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* 21, 4721-4725.

Loreni, F., Iadevaia, V., Tino, E., Caldarola, S., and Amaldi, F. (2005). RACK1 mRNA translation is regulated via a rapamycin-sensitive pathway and coordinated with ribosomal protein synthesis. *FEBS Lett* 579, 5517-5520.

Mamula, M. J., Silverman, E. D., Laxer, R. M., Bentur, L., Isacovics, B., and Hardin, J. A. (1989). Human monoclonal anti-La antibodies. The La protein resides on a subset of Ro particles. *J Immunol* 143, 2923-2928.

Maraia, R. J., and Bayfield, M. A. (2006). The La protein-RNA complex surfaces. *Mol Cell* 21, 149-152.

Maraia, R. J., and Intine, R. V. (2001). Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* 21, 367-379.

Maraia, R. J., and Intine, R. V. (2002). La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. *Gene Expr* 10, 41-57.

Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. H. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J* 272, 2118-2131.

Mattioli, M., and Reichlin, M. (1974). Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum* 17, 421-429.

Meerovitch, K., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkiewicz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., Agol, V. I., Keene, J. D., and Sonenberg, N. (1993). La

autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol* 67, 3798-3807.

Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267, 6321-6330.

Meyuhas, O., Avni, D., and Shama, S. (1996). Translational control of ribosomal protein mRNAs in eukaryotes. In *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. and Sonenberg, N., eds). Cold Spring Harbor Laboratory press, 363-388.

Meyuhas, O., Thompson, E. A., Jr., and Perry, R. P. (1987). Glucocorticoids selectively inhibit translation of ribosomal protein mRNAs in P1798 lymphosarcoma cells. *Mol Cell Biol* 7, 2691-2699.

O'Brien, C. A., and Wolin, S. L. (1994). A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev* 8, 2891-2903.

O'Gorman, S., Fox, D. T., and Wahl, G. M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251, 1351-1355.

Orru, S., Aspesi, A., Armiraglio, M., Caterino, M., Loreni, F., Ruoppolo, M., Santoro, C., and Dianzani, I. (2007). Analysis of the ribosomal protein S19 interactome. *Mol Cell Proteomics* 6, 382-393.

Park, J. M., Kohn, M. J., Bruinsma, M. W., Vech, C., Intine, R. V., Fuhrmann, S., Grinberg, A., Mukherjee, I., Love, P. E., Ko, M. S., *et al.* (2006). The multifunctional RNA-binding protein La is required for mouse development and for the establishment of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 26, 1445-1451.

Peek, R., Pruijn, G. J., van der Kemp, A. J., and van Venrooij, W. J. (1993). Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci* 106 (Pt 3), 929-935.

Peek, R., Pruijn, G. J., and Van Venrooij, W. J. (1996). Interaction of the La (SS-B) autoantigen with small ribosomal subunits. *Eur J Biochem* 236, 649-655.

Pellizzoni, L., Cardinali, B., Lin-Marq, N., Mercanti, D., and Pierandrei-Amaldi, P. (1996). A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation. *J Mol Biol* 259, 904-915.

Pellizzoni, L., Lotti, F., Maras, B., and Pierandrei-Amaldi, P. (1997). Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs. *J Mol Biol* 267, 264-275.

Pellizzoni, L., Lotti, F., Rutjes, S. A., and Pierandrei-Amaldi, P. (1998). Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *J Mol Biol* 281, 593-608.

Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2004). S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24, 3112-3124.

Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N., Beccari, E., Bozzoni, I., and Amaldi, F. (1982). Expression of ribosomal-protein genes in *Xenopus laevis* development. *Cell* 30, 163-171.

Pruijn, G. J., Simons, F. H., and van Venrooij, W. J. (1997). Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components. *Eur J Cell Biol* 74, 123-132.

Pruijn, G. J., Thijssen, J. P., Smith, P. R., Williams, D. G., and Van Venrooij, W. J. (1995). Anti-La monoclonal antibodies recognizing epitopes within the RNA-binding domain of the La protein show differential capacities to immunoprecipitate RNA-associated La protein. *Eur J Biochem* 232, 611-619.

Rajavashisth, T. B., Taylor, A. K., Andalibi, A., Svenson, K. L., and Lusi, A. J. (1989). Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element. *Science* 245, 640-643.

Rajavel, K. S., and Neufeld, E. F. (2001). Nonsense-mediated decay of human HEXA mRNA. *Mol Cell Biol* 21, 5512-5519.

Reinisch, K. M., and Wolin, S. L. (2007). Emerging themes in non-coding RNA quality control. *Curr Opin Struct Biol* 17, 209-214.

Ruvinsky, I., and Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 31, 342-348.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 19, 2199-2211.

Sambrook, j., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Schwartz, E. I., Intine, R. V., and Maraia, R. J. (2004). CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate rpL37 5'-terminal oligopyrimidine mRNA metabolism. *Mol Cell Biol* 24, 9580-9591.

Severson, W. E., Mascolo, P. L., and White, M. W. (1995). Lymphocyte p56L32 is a RNA/DNA-binding protein which interacts with conserved elements of the murine L32 ribosomal protein mRNA. *Eur J Biochem* 229, 426-432.

Shama, S., Avni, D., Frederickson, R. M., Sonenberg, N., and Meyuhas, O. (1995). Overexpression of initiation factor eIF-4E does not relieve the translational repression of ribosomal protein mRNAs in quiescent cells. *Gene Expr* 4, 241-252.

Shi, H., O'Brien, C. A., Van Horn, D. J., and Wolin, S. L. (1996). A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *Rna* 2, 769-784.

Simons, F. H., Broers, F. J., Van Venrooij, W. J., and Pruijn, G. J. (1996). Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. *Exp Cell Res* 224, 224-236.

Slobbe, R. L., Pluk, W., van Venrooij, W. J., and Pruijn, G. J. (1992). Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J Mol Biol* 227, 361-366.

Stefano, J. E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 36, 145-154.

Stein, A. J., Fuchs, G., Fu, C., Wolin, S. L., and Reinisch, K. M. (2005). Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. *Cell* 121, 529-539.

Stolovich, M., Tang, H., Hornstein, E., Levy, G., Cohen, R., Bae, S. S., Birnbaum, M. J., and Meyuhas, O. (2002). Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22, 8101-8113.

Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J., and Meyuhas, O. (2001). Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 21, 8671-8683.

Terada, N., Patel, H. R., Takase, K., Kohno, K., Nairn, A. C., and Gelfand, E. W. (1994). Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11477-11481.

Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat Cell Biol* 2, E71-72.

Thomas, G., and Thomas, G. (1986). Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins. *J Cell Biol* 103, 2137-2144.

Tratschin, J. D., Miller, I. L., Smith, M. G., and Carter, B. J. (1985). Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5, 3251-3260.

Trotta, R., Vignudelli, T., Candini, O., Intine, R. V., Pecorari, L., Guerzoni, C., Santilli, G., Byrom, M. W., Goldoni, S., Ford, L. P., *et al.* (2003). BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell* 3, 145-160.

Van Horn, D. J., Yoo, C. J., Xue, D., Shi, H., and Wolin, S. L. (1997). The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *Rna* 3, 1434-1443.

van Niekerk, E. A., Willis, D. E., Chang, J. H., Reumann, K., Heise, T., and Twiss, J. L. (2007). Sumoylation in axons triggers retrograde transport of the RNA-binding protein La. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12913-12918.

Warden, C. H., Krisans, S. K., Purcell-Huynh, D., Leete, L. M., Daluiski, A., Diep, A., Taylor, B. A., and Lusic, A. J. (1994). Mouse cellular nucleic acid binding proteins: a highly conserved family identified by genetic mapping and sequencing. *Genomics* 24, 14-19.

Wigler, M., Sweet, R., Sim, G. K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S., and Axel, R. (1979). Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* 16, 777-785.

Wolin, S. L., and Cedervall, T. (2002). The La protein. *Annu Rev Biochem* 71, 375-403.

Xue, D., Robinson, D. A., Pannone, B. K., Yoo, C. J., and Wolin, S. L. (2000). U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *Embo J* 19, 1650-1660.

Xue, D., Shi, H., Smith, J. D., Chen, X., Noe, D. A., Cedervall, T., Yang, D. D., Eynon, E., Brash, D. E., Kashgarian, M., *et al.* (2003). A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7503-7508.

Yoo, C. J., and Wolin, S. L. (1994). La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Mol Cell Biol* 14, 5412-5424.

Yoo, C. J., and Wolin, S. L. (1997). The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* 89, 393-402.

Youinou, P., Adler, Y., Muller, S., Lamour, A., Baron, D., and Humbel, R. L. (1994). Anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Clin Rev Allergy* 12, 253-274.

Zhu, J., Hayakawa, A., Kakegawa, T., and Kaspar, R. L. (2001). Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1521, 19-29.