

**TESI DI DOTTORATO, 2004**

DOTTORANDO: ANNAPINA RUSSO

Dipartimento di appartenenza: **DIPARTIMENTO DI  
BIOCHIMICA E  
BIOTECNOLOGIE MEDICHE**

TITOLO DELLA TESI: DISTRIBUZIONE ASIMMETRICA DEGLI  
Mrna PER PROTEINE RIBOSOMALI NEL  
CITOPLASMA

RELATORE: Prof. CONCETTA PIETROPAOLO

CORRELATORE: Prof. CONCETTA PIETROPAOLO

COORDINATORE: **PROF. CONCETTA PIETROPAOLO**

## ***Ringraziamenti***

*Il lavoro svolto durante questi anni di dottorato ha stimolato, giorno dopo giorno, la mia curiosità scientifica, arricchendo d'esperienza il mio percorso nella ricerca.*

*Ringrazio, pertanto, la Prof.ssa Concetta Pietropaolo, che mi ha trasmesso la passione per la scienza, consentendomi di partecipare a questo progetto di ricerca.*

*Ringrazio, inoltre, la Prof.ssa Giulia Russo per i suoi preziosi insegnamenti e la Dott.ssa Monica Cuccurese, con la quale ho condiviso la mia crescita professionale.*

## INDICE

<b>Sommario</b>	pag. 1
<b>Summary</b>	pag. 2
<b>Introduzione</b>	
<i>Elementi cis-acting</i>	pag. 6
<i>Fattori trans-acting</i>	pag. 10
<i>Meccanismo molecolare</i>	pag. 13
<i>Localizzazione e traduzione degli mRNA</i>	pag. 19
<i>Eventi nucleari e localizzazione degli mRNA</i>	pag. 21
<i>Conservazione del processo</i>	pag. 22
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 24
<b>MATERIALI E METODI</b>	
<i>Trattamenti con le droghe</i>	pag. 26
<i>Procedure di frazionamento subcellulare</i>	pag. 26
<i>Analisi per immunoblot e immunofluorescenza</i>	pag. 27
<i>Costruzione dei plasmidi chimerici</i>	pag. 28
<i>Esperimenti di transfezione</i>	pag. 29
<i>Estrazione RNA, Northern blotting e RT-PCR semi-quantitativa</i>	pag. 29
<i>Ibridazione in situ</i>	pag. 31
<b>RISULTATI</b>	
<i>Distribuzione asimmetrica degli mRNA per le r-proteine citosoliche</i>	pag. 33
<i>I messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano ai filamenti di actina</i>	pag. 34
<i>I messaggeri per le r-proteine sono associati ai polisomi</i>	pag. 37

<i>Distribuzione subcellulare degli mRNA codificanti per le r-proteine mitocondriali</i>	pag. 39
<i>Il 3'UTR dei messaggeri per le r-proteine è necessario e sufficiente per localizzare un gene reporter</i>	pag. 40
<i>Il 3'UTR del messaggero per la r-proteina citosolica L4 è responsabile del targeting di un gene reporter al citoplasma perinucleare</i>	pag. 42
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 44
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 54

## Sommario

Le cellule eucariotiche sono organizzate in distinti compartimenti subcellulari, contenenti specifiche classi di proteine. La maggior parte delle proteine raggiunge il sito della propria funzione grazie alla presenza di segnali di localizzazione sulla sequenza peptidica. Tuttavia, di recente è stato dimostrato che la localizzazione delle proteine coinvolge un meccanismo post-trascrizionale addizionale: la localizzazione degli mRNA. In questo lavoro di tesi è stata analizzata la distribuzione subcellulare dei messaggeri codificanti per le proteine ribosomiali (r-proteine). Sia le r-proteine citosoliche che quelle mitocondriali prendono parte ad un intenso traffico intracellulare in quanto, una volta trascritte nel nucleo e tradotte nel citoplasma, devono raggiungere il nucleolo e il mitocondrio, rispettivamente, per assemblarsi agli RNA ribosomiali e funzionare nella biogenesi dei ribosomi. La specifica localizzazione degli mRNA per le r-proteine citosoliche nella regione perinucleare e il selettivo posizionamento dei trascritti per la controparte mitocondriale nella periferia dell'organello potrebbe favorire l'efficiente ingresso delle corrispondenti proteine nel proprio sito funzionale. Esperimenti di frazionamento biochimico hanno dimostrato che i messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano preferenzialmente ai polisomi legati al citoscheletro tramite i microfilamenti di actina e che gli mRNA per le r-proteine mitocondriali si accumulano preferenzialmente nella periferia mitocondriale. Esperimenti di transfezione di costrutti, contenenti il 3'UTR dell'mRNA per la r-proteina citosolica *L4* (*GFP/cyL4*) o quello per la r-proteine mitocondriale *S12* (*GFP/mtS12*) a valle del gene *reporter* di *GFP*, hanno mostrato che la localizzazione dei corrispondenti messaggeri si realizza mediante un meccanismo che coinvolge la regione 3'UTR. Inoltre, l'analisi al confocale delle cellule transfettate con *GFP/cyL4*, saggiate per ibridazione *in situ*, ha dimostrato che il risultante trascritto si localizza specificamente al citoscheletro perinucleare. L'insieme dei dati presentati in questa tesi ha consentito di identificare i messaggeri codificanti per le r-proteine come una nuova classe di trascritti localizzati che utilizza un meccanismo di localizzazione comune.

## Summary

Eukaryotic cells are organized into distinct compartments, each with a distinct set of proteins. Most proteins are targeted to their final destination on the basis of signals in the peptide sequence. But, recently it has been shown that the sorting of several proteins involves an additional post-transcriptional mechanism: mRNA localization. In this study it has been analyzed the subcellular distribution of the messengers for ribosomal proteins (r-proteins). Both cytosolic and mitochondrial r-proteins take part to an intensive intracellular trafficking, since once transcribed in the nucleus and translated in the cytoplasm, these proteins have to reach the nucleolus and the mitochondrion, respectively, to assemble with the ribosomal RNA and function in the ribosome biogenesis. The specific localization of the mRNAs for cytosolic r-proteins in the perinuclear region of the cell and the selective distribution of the transcripts for mitochondrial r-proteins in the mitochondrial periphery could promote the efficient import of the corresponding proteins to the region of their function. Experiments of biochemical fractionation showed that the messengers for cytosolic r-proteins associate preferentially with polysomes bound to the cytoskeleton via actin microfilaments, and that mRNAs for mitochondrial r-proteins localize to the proximity of the organelle. Transfections of *GFP reporter* constructs, containing the 3'UTR of the cytosolic r-protein *L4* (*GFP/cyL4*) or the 3'UTR of the mitochondrial r-protein *S12* (*GFP/mtS12*) demonstrated that the localization of corresponding transcripts occurs in a way 3'UTR dependent. Moreover, confocal analysis of the cells transfected with *GFP/cyL4*, assayed by *in situ* hybridization, showed that the resulting transcript specifically localizes to the perinuclear cytoskeleton. All these findings led to identify the mRNAs for r-proteins as a new class of localized transcripts that utilize a common localization mechanism.

## **INTRODUZIONE**

La distribuzione asimmetrica degli mRNA nel citoplasma costituisce un importante meccanismo post-trascrizionale che permette di dirigere il prodotto di un gene al proprio sito di funzione. Sebbene tale processo sia stato inizialmente osservato e in seguito ampiamente studiato nei sistemi polarizzati, esso risulta conservato in molti tipi di organismi e di cellule [Jansen, 2001]. Tale evento citoplasmatico può assumere diversi significati biologici. In molti invertebrati e in alcuni vertebrati, la formazione dell'asse principale dell'organismo si realizza mediante la localizzazione di determinanti morfogenici, indispensabili per il controllo del corretto sviluppo delle diverse regioni dell'embrione. La strategia adottata sia da *Drosophila* che da *Xenopus* per realizzare la diversità cellulare consiste nel posizionamento di tali determinanti ai poli opposti dell'oozita [Bashirullah et al., 1998]. Negli oociti di *Drosophila*, che costituiscono la fonte più ricca di esempi di mRNA localizzati, gli assi antero-posteriori e dorso-ventrali sono essenzialmente definiti dalla localizzazione degli mRNA *bicoid*, *nanos*, *oskar* e *gurken* [Nusslein-Volhard et al., 1987]. Il messaggero *bicoid* si accumula al polo anteriore dove è necessario e sufficiente per lo sviluppo delle strutture anteriori dell'embrione. La traduzione di questo mRNA produce un fattore di trascrizione (*Bicoid*), responsabile della formazione della testa e delle strutture toraciche. Il messaggero *nanos* si accumula al polo posteriore e, in seguito alla fecondazione dell'oozita, viene tradotto nella proteina *Nanos*, la cui diffusione determina la formazione di un gradiente decrescente dal polo posteriore a quello anteriore, che è essenziale per dirigere la formazione dell'addome. Analogamente all'mRNA *nanos*, anche il trascritto *oskar* si accumula al polo posteriore dell'oozita (Fig. 1c) e la corrispondente proteina, diversamente da *Bicoid*, sembra non avere un ruolo diretto nello sviluppo dell'embrione, ma pare agisca richiamando altri RNA e proteine al polo posteriore [Breitweiser et al., 1996]. Durante i primi stadi dell'oogenesi, l'mRNA *gurken* si localizza in prossimità del nucleo lungo la corteccia posteriore dell'oozita, dove viene tradotto in un fattore di crescita *TGF $\alpha$* -



simile (Fig. 1b). Tale fattore induce lo sviluppo delle adiacenti cellule follicolari, permettendo la polarizzazione dell'asse antero-posteriore dell'oocita. Negli ultimi stadi dell'oogenesi, il nucleo dell'oocita migra dal polo posteriore a quello anteriore determinando la redistribuzione dell'mRNA *gurken*. La traduzione di questo messaggero nel nuovo sito di localizzazione produce una seconda proteina, che viene secreta in direzione ortogonale rispetto alla prima, e induce lo sviluppo dei follicoli dorsali portando alla definizione dell'asse dorso-ventrale del futuro embrione. In *Xenopus*, inizialmente sono stati identificati solo quattro trascritti localizzati, che comprendono i messaggeri *An1*, *An2* e *An3* e il messaggero *Vg1* (Fig. 1e), che si localizzano al polo animale e vegetale, rispettivamente. Negli ultimi anni l'elenco di messaggeri localizzati si è arricchito sempre più, includendo RNA localizzati al polo vegetale come *Xcat-2*, *VegT*, *Xcat-3*, *Xdazl*, *Xlsirst*, *Xpat*, e *Xwnt11*, e i messaggeri accumulati al polo animale quali *Oct-60*, *xlan4*, e *x121* [Bashirullah et al., 1998]. La distribuzione subcellulare degli mRNA gioca un ruolo fondamentale anche nel processo di differenziamento cellulare. Ad esempio, nei neuroglioblasti di *Drosophila*, l'mRNA *gcm*, durante la metafase, si localizza asimmetricamente nella cellula e viene ereditato da una sola delle due cellule figlie, dando origine alla glia. La localizzazione degli RNA non si verifica solo durante lo sviluppo e la differenziazione cellulare, ma è un evento che ha luogo anche in tipi cellulari polarizzati pienamente differenziati. Nei neuroni, la specifica distribuzione di alcuni messaggeri nelle regioni dendritiche o assoniche introduce un'asimmetria che determina l'alta polarizzazione delle cellule [Job and Eberwine, 2001]. In base alla propria localizzazione, tali messaggeri possono essere suddivisi in due classi. La prima include messaggeri che si distribuiscono nei dendriti dei neuroni e comprendono gli mRNA *MAP2*, *BC-1*, *BC-200*, *CaMKII $\alpha$* , per il recettore *IP*, e *Arc*, *F1/GAP43*. I trascritti *tau*, *tropomiosina-5*, *vasopressina/oxitocina*, e *prodinorfina* appartengono, invece, alla seconda classe di RNA e si localizzano nelle regioni assoniche delle cellule nervose [Bashirullah et al., 1998]. La trasmissione del segnale a livello sinaptico si realizza attraverso l'aumento dell'espressione di

specifiche proteine, coinvolte nella propagazione del potenziale d'azione a lungo termine. Dopo la stimolazione sinaptica, i prodotti proteici dell'espressione genica, una volta sintetizzati potrebbero diffondere liberamente nel citoplasma per poi essere "reclutati" a livello della specifica sinapsi stimolata. Alternativamente, le sinapsi eccitate potrebbero modulare la propria plasticità inducendo l'aumento dell'espressione di specifiche proteine in determinate regioni di una sinapsi mediante la localizzazione dei corrispondenti messaggeri e la loro traduzione a livello dendritico. A favore di quest'ultima ipotesi, è stato dimostrato che la stimolazione dei neuroni determina, dopo soli 5 minuti, un aumento della proteina chinasi II $\alpha$  calcio/calmodulina dipendente, *CaMKII $\alpha$* , nei dendriti [Ouyang et al., 1999]. Tale rapido effetto suggerisce che l'aumento dei livelli della proteina non sia dovuto al trasporto della proteina dal corpo cellulare, bensì dalla traduzione del corrispondente messaggero localizzato a livello dendritico. La distribuzione subcellulare dei trascritti rappresenta un meccanismo importante anche per prevenire la sintesi della proteina in regioni della cellula in cui potrebbe risultare dannosa. Negli oligodendrociti e nelle cellule di *Schwann*, l'mRNA *MBP* (*Myelin Basic Protein*) si localizza nei processi distali, dove la corrispondente proteina viene incorporata nelle membrane degli assoni ricche di mielina (Fig. 1d) [Trapp et al., 1987]. L'alterazione di tale distribuzione subcellulare potrebbe comportare la traduzione dell'mRNA *MBP* nel corpo cellulare e la conseguente associazione della proteina con altri tipi di membrane, come l'involucro nucleare o le membrane del Golgi. Tale errata associazione potrebbe inibire il movimento della proteina verso la periferia della cellula e interferire con la sua funzione. Nei fibroblasti, la specifica disposizione del trascritto  *$\beta$ -actina* ai confini delle *lamellae* assicura un'alta concentrazione della proteina nella periferia cellulare, essenziale per guidare il movimento della cellula (Fig. 1a) [Kislauskis et al., 1993]. La delocalizzazione del trascritto  *$\beta$ -actina* mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense abolisce la polarità e provoca un disorientamento cellulare [Kislauskis et al., 1994]. La ripartizione asimmetrica degli mRNA è coinvolta anche nel destino delle proteine integrali di membrana. Il

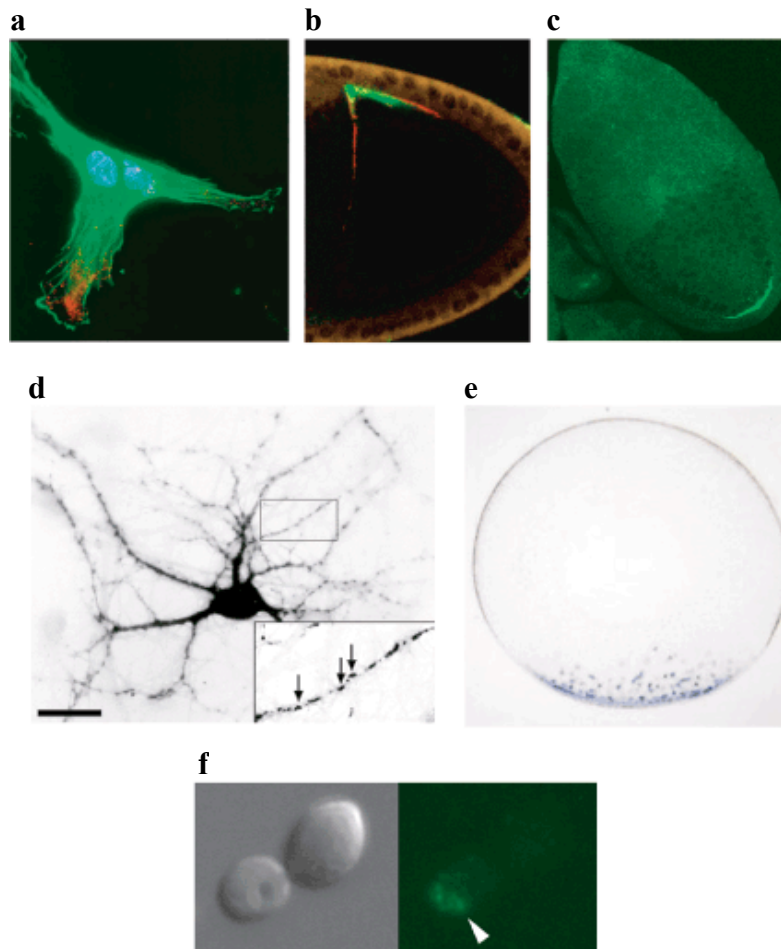


Figura 1. **Esempi di mRNA localizzati in diversi sistemi.**

- (a) L'mRNA *β-actina* si localizza nelle *leading lamellae* dei fibroblasti di pollo. L'mRNA *β-actina* è mostrato in rosso, la proteina actina in verde e il nucleo in blu.
- (b) L'mRNA *gurken* si localizza nell'angolo dorso-ventrale dell'ocita di *Drosophila*. L'mRNA *gurken* è mostrato in verde e la proteina *Gurken* in rosso.
- (c) L'mRNA *oskar* si localizza al polo anteriore dell'ocita di *Drosophila*.
- (d) Localizzazione dell'mRNA *MBP* nel soma e nei dendriti dei neuroni. Nel riquadro ingrandito le frecce indicano i granuli.
- (e) L'mRNA *Vgl* si localizza al polo vegetale dell'ocita di *Xenopus*, durante gli stadi III-IV dell'oogenesi.
- (f) L'mRNA *ASH1* si localizza all'estremità della cellula figlia durante la divisione asimmetrica nel lievito.

messaggero *IST2*, che codifica per un canale ionico, si localizza nella gemma crescente delle cellule di lievito, ove la neo-sintetizzata proteina viene inserita nella membrana plasmatica [Takizawa et al., 2000]. Infine, la distribuzione asimmetrica dei messaggeri è funzionale alla segregazione di specifici mRNA in particolari organelli o strutture subcellulari. L'mRNA che codifica per *c-myc* è arricchito nella regione perinucleare [Hesketh et al., 1994] e nel lievito, il messaggero, che codifica per la proteina *ATMI*, un ABC trasportatore della membrana mitocondriale interna, si accumula in prossimità dell'organello [Corral-Debrinski et al., 2000].

### *Elementi cis-acting*

L'informazione che guida uno specifico messaggero all'interno del citoplasma verso la sua finale destinazione è contenuta nella molecola dell'RNA e consiste di sequenze nucleotidiche denominate *zip-code*. Sebbene in letteratura ci siano esempi di segnali *cis-acting* che risiedono nella regione codificante o nella regione 5'UTR del messaggero, nella maggior parte dei casi un ruolo fondamentale nel controllo spaziale dell'espressione genica è rappresentato dal 3'UTR (tabella 1) [Jansen, 2001]. Una possibile spiegazione per la presenza di segnali di localizzazione in questa regione del trascritto potrebbe essere fornita dal fatto che tale regione può assumere complicate strutture secondarie senza alterare il processo di traduzione. Queste sequenze, che risultano necessarie e sufficienti per la localizzazione di un trascritto, sembrano essere uniche per ciascun mRNA. In alcuni messaggeri, gli elementi *cis-acting* consistono di una singola sequenza nucleotidica, che può comprendere meno di 21 o più di 600 nucleotidi [Chan et al., 1999]. Un segnale di *targeting* di 11 nucleotidi, noto come *RTS* (*RNA Targeting Sequence*), è sufficiente per dirigere il trasporto dell'mRNA *MBP* dal soma ai processi cellulari degli oligodendrociti, mentre un'altra regione di circa 340 nucleotidi, denominata *RLR* (*RNA Localization Region*), media la localizzazione

**Tabella 1.** Elementi di localizzazione *cis-acting*.

Specie	Messaggero	Segnale di localizzazione	Elementi <i>cis-acting</i>	Localizzazione	
<i>Drosophila</i>	<i>bicoid</i>	3'-UTR (817 nt)	625 nt sufficienti	Anteriore	
	<i>Ciclina B</i>	3'-UTR (776 nt)	94 nt + 97 nt sufficienti	Polo posteriore	
	<i>even-skipped</i>	3'-UTR (190 nt)	163 nt sufficienti	Apicale	
	<i>fushi tarazu</i>	3'-UTR (455 nt)	non ancora identificato	Apicale	
	<i>hairy</i>	3'-UTR (816 nt)	non ancora identificato	Apicale	
	<i>Hsp83</i>	3'-UTR (407 nt)	107 sufficienti	Polo posteriore	
	<i>K10</i>	3'-UTR (1400 nt)	44 nt sufficienti	Anteriore	
	<i>nanos</i>	3'-UTR (849 nt)	543 nt sufficienti	Polo posteriore	
	<i>orb</i>	3'-UTR (1200 nt)	280 nt sufficienti	All' interno del pre-oozita	
	<i>oskar</i>	3'-UTR (1043 nt)	924 nt sufficienti	Posteriore	
	<i>wingless</i>	3'-UTR (1083 nt)	363 nt sufficienti	Apicale	
	Mammiferi	<i><math>\beta</math>-actina</i>	3'-UTR (591 nt)	54 nt e 43 nt sufficienti	Coni di crescita
		<i>BCI</i>	regione 5' (152 nt)	62 nt sufficienti	Dendriti
	<i>Xenopus</i>	<i>CaMKIIa</i>	3'-UTR (3200 nt)	non ancora identificato	Dendriti
		<i>tau</i>	3'-UTR (3847 nt)	1395	Assoni
<i>c-myc</i>		3'UTR		Regione perinucleare	
<i>MT-1</i>		3'UTR		Regione perinucleare	
Lievito	<i>Vg1</i>	3'-UTR (1300 nt)	340 nt sufficienti	Corteccia vegetale	
	<i>VegT</i>	3'-UTR	non ancora identificata	Corteccia vegetale	
	<i>Xisrt</i>	3-12 sequenze ripetute (79-81)		Polo vegetale	
Gemma	<i>ASH1</i>	3'-UTR	250 nt sufficienti	Gemma	
	<i>OXAI</i>	3'-UTR (158 nt)		Prossimità mitocondri	

dello stesso mRNA al compartimento mielinico [Munro et al., 1999]. L'analisi dei segnali di localizzazione di diversi trascritti ha rivelato che, nella maggior parte dei casi, la localizzazione degli mRNA non è mediata da singole sequenze nucleotidiche, ma piuttosto da elementi multipli ridondanti [Gavis et al., 1996]. In *Drosophila*, l'mRNA *nanos* contiene quattro differenti segnali nella regione 3'UTR capaci di dirigere il trascritto al polo posteriore [Gavis et al., 1996]. Un elemento presente in singola copia nel trascritto determina una debole localizzazione, mentre due o più elementi ripetuti, inclusi nello stesso mRNA, sono richiesti per ottenere la massima efficienza di localizzazione [Crucis et al., 2000]. Nel lievito, il trascritto *Ash1* contiene quattro elementi di localizzazione, responsabili del suo posizionamento nella gemma di lievito (Fig. 1f). Tre di questi elementi, *E1*, *E2A* e *E2B*, giacciono nella regione codificante del trascritto, mentre uno, *E3*, è localizzato nel 3'UTR [Chartrand et al., 1999]. Una forma di ridondanza più complessa è rappresentata dal 3'UTR di *Vg1*, che contiene un elemento di 340 nucleotidi, definito *VLE (Vg1 Localization Element)*, necessario e sufficiente per la sua localizzazione al polo vegetale dell'oocita. Tale elemento contiene altri due subelementi, costituiti da una sequenza di 85 nucleotidi presente al terminale 5' e un secondo elemento di 135 nucleotidi in prossimità del terminale 3' [Mowry and Melton, 1992]. Dall'analisi della sequenza nucleotidica di tale segnale di localizzazione è emersa l'esistenza di due differenti motivi, costituiti da corte sequenze ripetute, UAUUUCUAC e UUCAC, presenti in più copie. La delezione di tutte le copie di ciascun motivo non abolisce la localizzazione del corrispondente trascritto, indicando che nessuna parte di questa regione è essenziale, ma che la localizzazione di *Vg1* richiede interazioni cooperative tra questi elementi [Mowry and Cote, 1999]. Il 3'UTR del trascritto *orb* costituisce un altro esempio di segnale di localizzazione contenente elementi ridondanti. L'accumulo del trascritto al polo posteriore dell'oocita è conferito da un elemento di 280 nucleotidi [Lantz and Schedl, 1994]. La suddivisione di tale

elemento in due subelementi di uguali dimensioni non altera la localizzazione, bensì ogni singola metà di tale elemento è ancora in grado di guidare la localizzazione del trascritto, ma con minore efficienza. La presenza di entrambi gli elementi potrebbe, innanzitutto, garantire il reclutamento di un numero maggiore di proteine coinvolte nella localizzazione, in quanto ciascun elemento potrebbe fornire il sito di riconoscimento per uno specifico fattore proteico. Inoltre, la presenza di entrambi gli elementi potrebbe risultare necessaria per legare lo stesso fattore proteico ma con maggiore affinità. Elementi multipli sono presenti anche nel 3'UTR dell'mRNA *β-actina*. I primi 54 nucleotidi di questa regione del trascritto sono sufficienti per dirigere la localizzazione di un trascritto eterologo nelle *lamellae* dei fibroblasti e dei mioblasti di pollo. L'analisi della sequenza nucleotidica all'interno del 3'UTR ha rivelato la presenza di un'altra regione, che è omologa all'elemento di localizzazione di 54 nucleotidi e capace anch'essa di mediare, seppur meno efficientemente, la corretta localizzazione del trascritto [Kislauskis et al., 1994]. Dallo studio dei segnali *cis-acting* di diversi mRNA in differenti sistemi non è emersa alcuna sequenza *consensus*, ma recentemente è stato identificato un motivo di localizzazione di nove nucleotidi, YUGUUYCUG, in alcuni messaggeri di *Drosophila* (*bicoid* e *nanos*) e di *Xenopus* (*An2* e *Vg1*) [Bubunencko et al., 2002]. Inoltre, in letteratura ci sono altri esempi di sequenze primarie conservate. Il 3'UTR di *nanos* contiene una sequenza altamente conservata riconosciuta dalla proteina *Smaug* e gli elementi *BREs* (*Bruno Response Elements*) nel trascritto *oskar* contengono sequenze conservate [U(G/A)U(A/G)U(G/A)U] indispensabili per il proprio legame con la proteina *Bruno* [Gavis et al., 1996]. Anche il messaggero *β-actina* contiene due motivi conservati, GGACT e AATGC, che sono presenti in ciascun dei suoi due elementi di localizzazione [Kislauskis et al., 1994]. Oltre alla sequenza primaria anche la formazione di strutture secondarie e terziarie ricche di motivi *stem-loop* può contribuire al processo di localizzazione di un trascritto.

Diversamente dal DNA, le molecole di RNA possono infatti assumere elaborate strutture secondarie. Il ruolo della struttura di un RNA nel processo di localizzazione è stato ampiamente analizzato per l'elemento di localizzazione *BLE* (*Bicoid Localization Element*) presente nel 3'UTR del messaggero *bicoid*. Studi di predizione di struttura secondaria indicano che tale elemento può formare 5 grandi *stem-loop* [MacDonald, 1990]. La regione *BLE1* forma la porzione distale dello *stem-loop* V e tre regioni non contigue dell'RNA corrispondono allo *stem-loop* III e alla regione distale degli *stem-loop* IV e V. Inoltre, il *loop* dello *stem* III può formare appaiamenti di base con una *bulge* interna a questo *stem*, che risultano coinvolti nell'ancoraggio del trascritto al polo anteriore dell'embrione [Ferrandon et al., 1994]. L'importanza sia della sequenza nucleotidica che delle strutture secondarie si può evincere dallo studio dell'elemento di localizzazione dell'mRNA *K10* in *Drosophila* (*TLS*, *Transport/Localization Sequence*). Di fatto, mutazioni di una o più basi coinvolte nella formazione della predetta struttura secondaria inattivano il segnale *TLS* [Serano and Cohen, 1995]. Da notare che, l'elemento *TLS* del trascritto *K10* e gli elementi *HLEs* (*Hairy Localization Elements*) del trascritto *hairy* hanno differenti sequenze nucleotidiche, ma come *HLEs* anche *TLS* è capace di reclutare le proteine *Egalitarian* e *Bicaudal* [Van de Bor and Davis, 2004]. Questi dati indicano che tali trascritti potrebbero condividere simili conformazioni secondarie o terziarie riconosciute dalla stessa molecola proteica, oppure che ciascuno dei due trascritti potrebbe interagire con un differente fattore proteico in grado poi di riconoscere la stessa componente proteica del macchinario di localizzazione. Per la distribuzione del trascritto *Ash1* nel lievito è essenziale la formazione di una specifica struttura *stem-loop*, responsabile sia della localizzazione, che della formazione di particelle ribonucleoproteiche di trasporto [Gonzalez et al., 1999]. Inoltre, in *Xenopus*, è stato dimostrato che *VegT* contiene diverse copie dei domini di RNA binding di *Vg1*, *VMI* e *E2*, anche se studi di comparazione non



rivelano alcuna omologia di struttura [Bubunenko et al., 2002]. Questi risultati lasciano ipotizzare che i segnali di localizzazione di un trascritto siano unici, ma realizzati dalla peculiare disposizione spaziale di specifici motivi ridondanti. Infine, le sequenze all'interno del 3'UTR che controllano la traduzione dei messaggeri localizzati, nei messaggeri *oskar* e *nanos*, coincidono con i propri segnali di localizzazione dei trascritti, *SREs* (*Smaug Recognition Elements*) e *BREs*, rispettivamente [Lipshitz and Smibert, 2000]. La contemporanea presenza di elementi di controllo della traduzione e segnali di localizzazione all'interno della stessa regione di un trascritto, unitamente alla capacità che questa porzione di RNA ha di interagire con altre molecole, RNA e/o proteine, lascia intendere la complessa natura del 3'UTR.

#### *Fattori trans-acting*

I fattori *trans-acting* costituiscono le molecole in grado di riconoscere e decifrare l'informazione contenuta nella molecola di messaggero, determinandone così la corretta distribuzione nel citoplasma. Sebbene i primi studi sul processo di localizzazione dei messaggeri risalgono agli anni ottanta, la maggior parte dei fattori *trans-acting*, coinvolti in tale evento, sono stati identificati solo di recente. Tutti i fattori finora individuati sono costituiti da proteine, ma è probabile che altre molecole, come per esempio i piccoli RNA con funzioni regolatrici, abbiano un ruolo in questo processo. I fattori *trans-acting* variano per la loro composizione, la localizzazione subcellulare e le caratteristiche strutturali con cui riconoscono gli RNA. Le proteine candidate per essere fattori *trans-acting* devono contenere almeno una delle tre classi di motivi di legame con l'RNA, che includono i domini di riconoscimento dell'RNA (*RRM*, *RNA Recognition Motif*), i domini *KH* (*K Homology*) e quelli che riconoscono l'RNA a doppio filamento (*dsRBD*, *double-stranded RNA Binding Domain*) [Burd and Dreyfuss, 1994]. Le proteine, contenenti una o più

copie di questi domini, possono essere raggruppati in tre classi principali: le proteine ribonucleari eterogenee, che comprendono la famiglia di proteine *hnRNPA/B* e quella delle *ZBP1* (*actin Zipcode Binding Protein*), e le proteine *Staufen* (Fig. 2) [Jansen, 2001]. La famiglia di proteine *hnRNPA/B* include *hnRNPA2* e *Squid* (*Sqd*). La proteina *hnRNPA2* interviene in molti processi cellulari, tra cui lo *splicing*, l'*export* nucleare, la regolazione della traduzione, e la stabilità dell'RNA (tabella 2). Inoltre, essa si lega a un elemento *cis-acting* di 21 nucleotidi, denominato *hnRNPA2 response element (A2RE)*, presente nella regione 3'UTR dell'mRNA *MBP* e costituito da due sequenze omologhe parzialmente sovrapposte [Hoek et al., 1998]. Analogamente a *hnRNPA2*, *Sqd* contiene un dominio *M9*, che le consente di muoversi dal compartimento nucleare a quello citoplasmatico. In *Drosophila*, il gene *sqd* è sottoposto ad uno *splicing* alternativo che produce tre differenti isoforme, che mostrano diversi profili di localizzazione. *SqdA* mostra una localizzazione citoplasmatica, mentre *SqdB* e *SqdS* si accumulano nel nucleo [Kelley, 1993]. Sorprendentemente la nucleare *SqdS*, ma non la citoplasmatica *SqdA*, è coinvolta nella localizzazione di *gurken*, indicando così un suo coinvolgimento nel trasporto citoplasmatico del trascritto. Sebbene sia nota l'associazione fra il 3'UTR di *gurken* e *Sqd*, le sequenze nucleotidiche coinvolte in tale interazione non sono ancora state identificate. Proteine omologhe a *Sqd* comprendono la proteina *hnRNPA1* nell'uomo, *Np13* e *Hrp1* in *Saccharomyces cerevisiae*, e *hrp36*, in *Caenorhabditis tentans* (tabella 2) [Farina and Singer, 2002]. I membri della famiglia di proteine *ZBP1* sono proteine altamente conservate (tabella 2) [Deshler et al., 1998], coinvolte in molti aspetti del metabolismo dell'RNA, incluso la localizzazione, la stabilità e il controllo della traduzione di un messaggero. Tutti i componenti della classe di proteine *ZBP1* finora identificati esibiscono una localizzazione citoplasmatica e sono stati trovati in granuli contenenti RNA e elementi del citoscheletro. Recentemente, nella sequenza peptidica di alcune di queste proteine è stata individuata la presenza di segnali sia di localizzazione che di *export* nucleare suggerendo che, al pari della famiglia di proteine *hnRNPA/B*, esse possono traslocare dal nucleo al

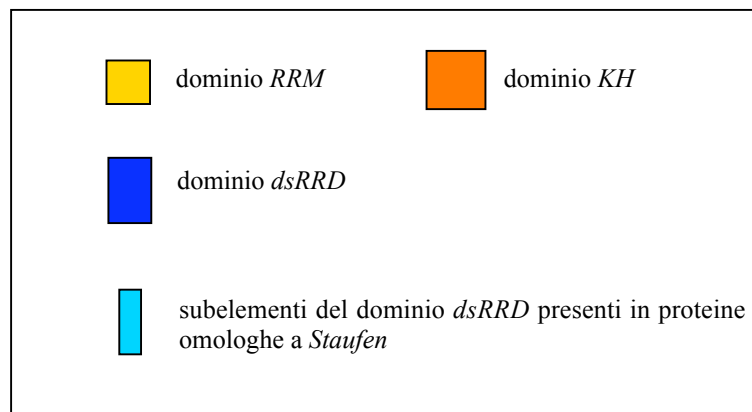
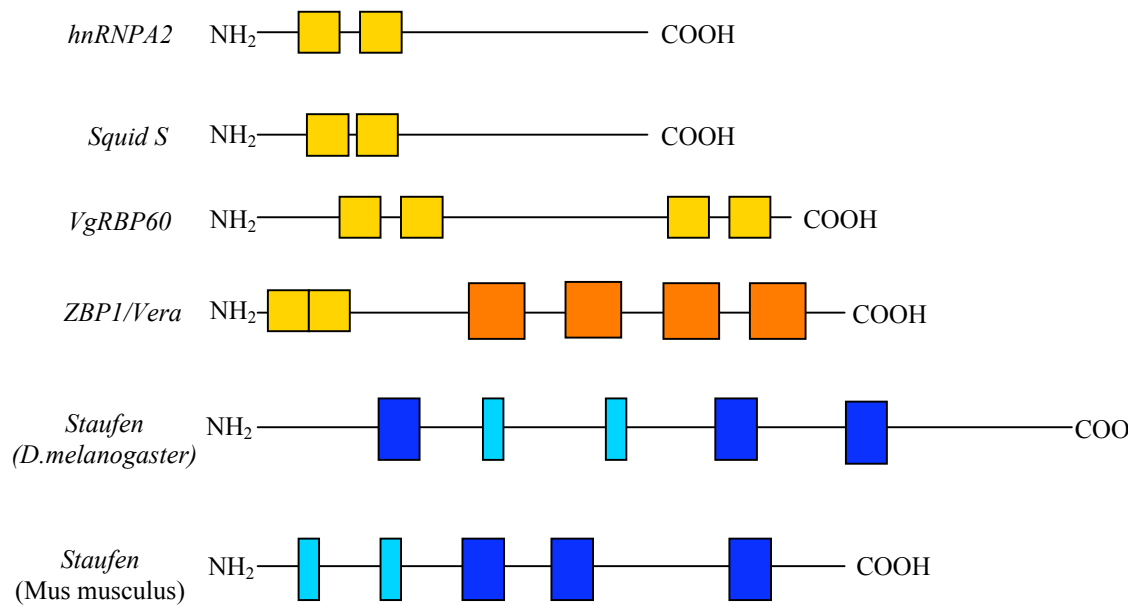


Figura 2. **Struttura modulare dei fattori *trans-acting*.**

In figura sono mostrate le tre classi di proteine *trans-acting*: le proteine *hnRNP* (*hnRNPA2*, *Sqd*) con i domini *RRM*, le proteine della famiglia *ZBP1* (*VgRBP60*, *ZBP1/Vera*) con i domini *RRM* e *KH* e della famiglia *Staufen* con i domini *dsRRD*.

citoplasma. La proteina *ZBP1*, il primo membro di questa famiglia ad essere identificato, è stato isolato sfruttando la sua affinità con l'elemento *cis-acting* di 54 nucleotidi nel 3'UTR dell'mRNA  *$\beta$ -actina* [Ross et al., 1997]. La relazione funzionale fra questo messaggero e la proteina è stata poi confermata utilizzando oligonucleotidi antisenso disegnati contro l'elemento *in cis* di 54 nucleotidi. Infatti, l'uso di tali oligonucleotidi causava la delocalizzazione del trascritto [Kislauskis et al., 1994]. A questa stessa regione del trascritto si lega una seconda proteina della stessa famiglia, *ZBP2*, l'omologo del fattore di regolazione dello *splicing* nell'uomo (*KSRP*, *K Splicing Regulatory Protein*) (tabella 2) [Min et al., 1997]. Analogamente a *KSRP*, *ZBP2* si accumula prevalentemente nel nucleo. Sebbene *ZBP1* e *ZBP2* riconoscono la stessa sequenza sull'mRNA  *$\beta$ -actina*, in esperimenti di *UV-crosslinking* segregano in complessi diversi, suggerendo che tali proteine non si legano in maniera simultanea. Secondo un recente modello [Gu et al., 2002], il trascritto  *$\beta$ -actina* viene riconosciuto da *ZBP1* nel nucleo e trasportato nel citoplasma da *ZBP2*. Un'altra importante proteina appartenente a questa famiglia è *VgIRBP* (*Vg1 mRNA Binding Protein*) o *Vera*. Essa contiene cinque domini di *RNA-binding* suddivisi in un dominio *RRM* e quattro domini *KH* e si lega agli elementi *VLE* degli mRNA *Vg1* e *VegT* [Deshler et al., 1998]. Sia *ZBP1* che *VgIRBP* sono espresse durante lo sviluppo e colocalizzano con i loro *RNA target* mediante un meccanismo che coinvolge il citoscheletro. È interessante notare che, la proteina *VgIRBP/Vera* è omologa (78%) alla *ZBP1*; questo suggerisce che le cellule somatiche e le cellule germinali possono utilizzare gli stessi fattori proteici in *trans* [Havin et al., 1998]. Non è stato ancora stabilito se le proteine *trans-acting* richieste per il trasporto dell'mRNA costituiscano il diretto *link* fra RNA e citoscheletro o se è necessaria la presenza di intermedi. Gli esempi fin qui riportati indicano che l'assemblaggio iniziale del macchinario proteico sulla *zipcode* di un mRNA ha luogo nel nucleo, e che successivamente altre specifiche proteine riconoscono il trascritto nella sua forma complessata a queste proteine nucleari. Infine, una famiglia di fattori *trans-acting*, coinvolta nella localizzazione di molti trascritti in diversi tipi cellulari, è

**Tabella 2.** Proprietà dei fattori *trans-acting*.

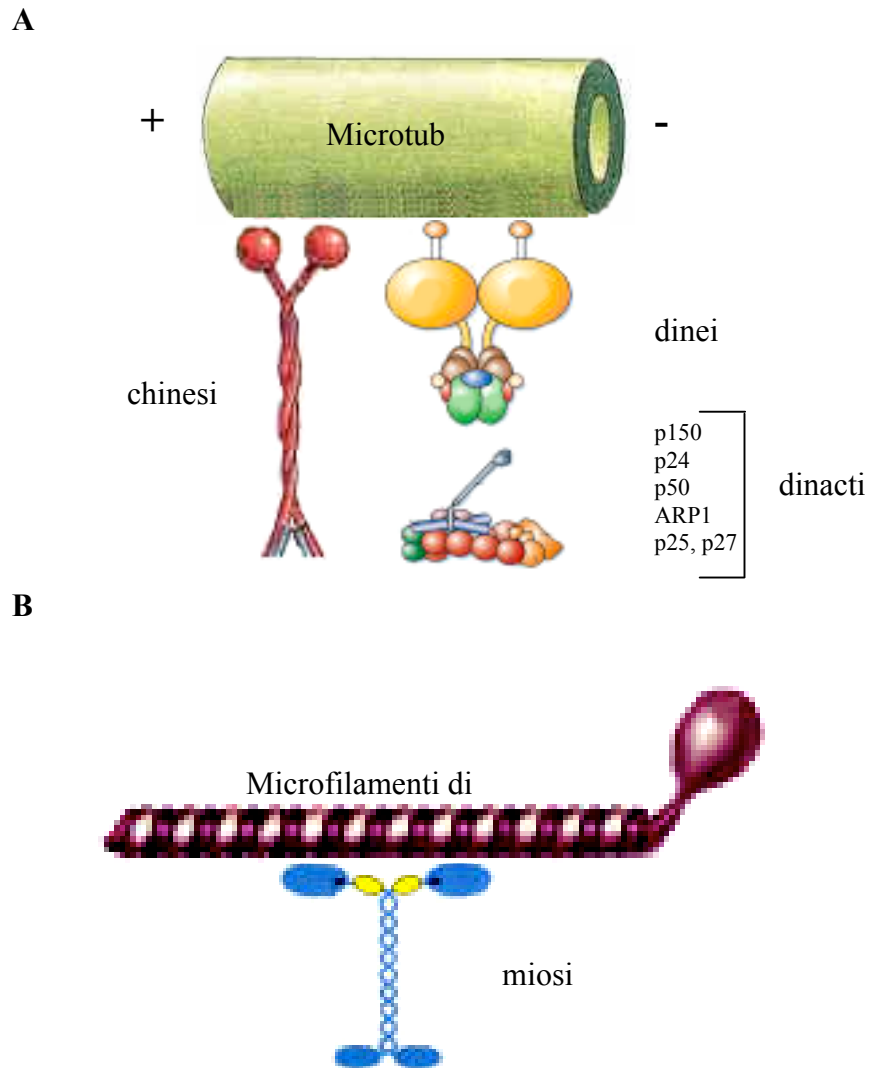
Proteina	Organismo	Tipo cellulare	mRNA	Omologo	Funzioni associate
<b>Famiglia hnRNP A/B</b>					
hnRNPA2	Uomo	Oligodendrociti	<i>MBP</i>		<i>Splicing</i>
<i>Sqd (hrp 40)</i>	<i>Drosophila</i>	Oociti	<i>gurken</i>	<i>hnRNPA1</i> umana, <i>Np 13</i> in <i>S. cerevisiae</i> , <i>hrp36</i> in <i>C. tentans</i> ,	maturazione e trasporto mRNA, <i>NMD</i>
<b>Famiglia ZBP1</b>					
<i>ZBP1</i>	Pollo	Fibroblasti, neuroni	$\beta$ -actina	<i>CRD-BP</i> , <i>IMP1</i> , <i>IMP2</i> , <i>IMP3</i> , <i>KOC</i> , <i>HCC</i> , <i>dIMP</i>	
<i>VgIRBP</i> <i>ZBP2</i>	<i>Xenopus</i> Pollo	Oociti Fibroblasti, neuroni	<i>VgI</i> , <i>Yegt</i> $\beta$ -actina	<i>KSRP</i> , <i>MARTA</i>	<i>Splicing</i>
<i>She2p</i>	<i>S. cerevisiae</i>		<i>ASH1</i>		
<i>Loc-1p</i>	<i>S. cerevisiae</i>		<i>ASH1</i>		
<i>Tsunagi</i>	<i>Drosophila</i>	Oociti	<i>oskar</i>	<i>Y14</i> umana	<i>EJC</i> , <i>NMD</i>

rappresentata dalla classe di proteine *Staufen*. In *Drosophila*, nella proteina *Staufen*, uno dei 5 domini di legame all'RNA, il dominio *dsRBD2*, è diviso in due metà e questa struttura bipartita consente di legare l'RNA a doppio filamento (Fig. 2). *Staufen* rappresenta l'esempio meglio caratterizzato di proteina richiesta per la localizzazione di diversi mRNA in differenti tipi cellulari. Essa è coinvolta nella localizzazione del messaggero *bicoid* al polo anteriore dell'oocita; nel posizionamento actina-dipendente dell'mRNA *prospero* nei neuroblasti; ed infine, riveste un ruolo fondamentale nel trasporto lungo i microtubuli, nell'ancoraggio e nella traduzione del trascritto *oskar* [St Johnston et al., 1991]. La localizzazione di *Staufen* al polo anteriore o posteriore dell'oocita è strettamente legata alla sua interazione con questi trascritti. Di fatto, un aumento dei messaggeri di *bicoid* e *oskar* corrisponde ad un'umentata colocalizzazione di *Staufen* [Ferrandon et al., 1994]. Recentemente, sono stati individuati altri fattori *trans-acting*, *Shep2* e *Loc1p*, che pur non presentando alcuna omologia con le citate classi di proteine e non possedendo alcun conservato motivo di legame con l'RNA, sono responsabili della distribuzione subcellulare di molti trascritti (tabella 2) [Long et al., 2001]. Negli ultimi anni, l'identificazione di numerosi di fattori *trans-acting* sta arricchendo sempre più la lista di proteine coinvolte nella localizzazione degli RNA, la cui caratterizzazione potrà contribuire alla descrizione dettagliata di motivi strutturali già noti o all'individuazione di nuovi domini di riconoscimento dell'RNA, richiesti per le interazioni molecolari che governano questo importante meccanismo post-trascrizionale.

#### *Meccanismo molecolare*

Studi condotti in diversi sistemi, quali *Drosophila*, *Xenopus*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, neuroni, e altri tipi cellulari suggeriscono l'esistenza di differenti meccanismi di localizzazione, che includono la degradazione dell'mRNA diffuso nel citoplasma e la sua stabilizzazione nel distretto subcellulare di localizzazione; l'iniziale diffusione citoplasmatica del trascritto e il suo

successivo reclutamento al sito funzionale; il trasporto attivo dal sito di sintesi a quello di localizzazione lungo gli elementi del citoscheletro [Kloc et al., 2002]. La delocalizzazione del messaggero *nanos* al polo anteriore dell'oocita non altera l'organizzazione del citoscheletro, escludendo in tal modo l'intervento di un meccanismo di trasporto attivo per tale mRNA [Ephrussi and Lehmann, 1992]. D'altronde, l'elevata stabilità di questo trascritto delocalizzato suggerisce che il suo posizionamento nel citoplasma non ha luogo tramite un meccanismo di protezione locale dalla degradazione, ma piuttosto mediante un meccanismo di generale diffusione seguito dal reclutamento dell'mRNA da parte di specifici fattori di ancoraggio al polo posteriore [Bergsten and Gavis, 1999]. Altri trascritti come *gcl*, *Pgc* e la *ciclina B* [Raff et al., 1990] sembrano localizzarsi in modo simile. Negli oociti fecondati di *Drosophila*, l'mRNA per la *hsp 83* (*heat shock protein 83*) è distribuito uniformemente nel citoplasma. Durante l'embriogenesi, la quantità totale di tale trascritto diminuisce drammaticamente, restando, tuttavia, costante al polo posteriore, ove esso viene protetto dalla degradazione [Bashirullah et al., 1998]. Il controllo spaziale della degradazione permette anche il corretto posizionamento di altri due mRNA, come *hunchback* e *caudal* [Palacios and St Johnston, 2001]. Sebbene per la localizzazione di alcuni messaggeri si possa realizzare una combinazione di tali meccanismi, l'arricchimento asimmetrico degli mRNA nelle diverse regioni dell'ooplasma delle cellule germinali e nel citoplasma delle cellule somatiche dipende dall'integrità del citoscheletro [Lopez de Heredia and Jansen, 2004; Palacios and St Johnston, 2001]. Due diversi costituenti di questa importante rete citoplasmatica, i microfilamenti di actina e i microtubuli, insieme ad un vasto numero di proteine con funzioni motrici (Fig. 3) intervengono, oltre che in processi quali il movimento cellulare, il trasporto e posizionamento degli organelli, la segregazione dei cromosomi, anche nel trasporto e ancoraggio di un trascritto sottoforma di particella ribonucleoproteica (Fig. 4). In generale, i microfilamenti di actina sono richiesti per il trasporto a brevi distanze, mentre i microtubuli per quello a lunghe distanze. I sistemi polarizzati, quali gli oociti e gli embrioni di *Drosophila* e *Xenopus*, gli oligodendrociti e i



**Figura 3. Rappresentazione schematica degli elementi del citoscheletro e dei motori molecolari associati ad essi.** In generale, tutti i motori molecolari sono complessi multiproteici, organizzati in strutture dimeriche. Essi consistono di una testa globulare, che contatta il citoscheletro, e di una coda composta da domini in grado di riconoscere le molecole da trasportare. **(A)** La chinesina in genere dirige l'estremità positiva dei microtubuli, anche se sono note alcuni tipi di chinesine che funzionano come motori per le estremità negative. La dineina è il motore molecolare di maggior dimensioni. Essa comprende un complesso multiproteico accessorio, la dinactina, che è richiesta per la sua processività e per il riconoscimento delle molecole *cargo*. **(B)** Le miosine non muscolari, definite anche non convenzionali, forniscono i motori per i microfilamenti di actina.



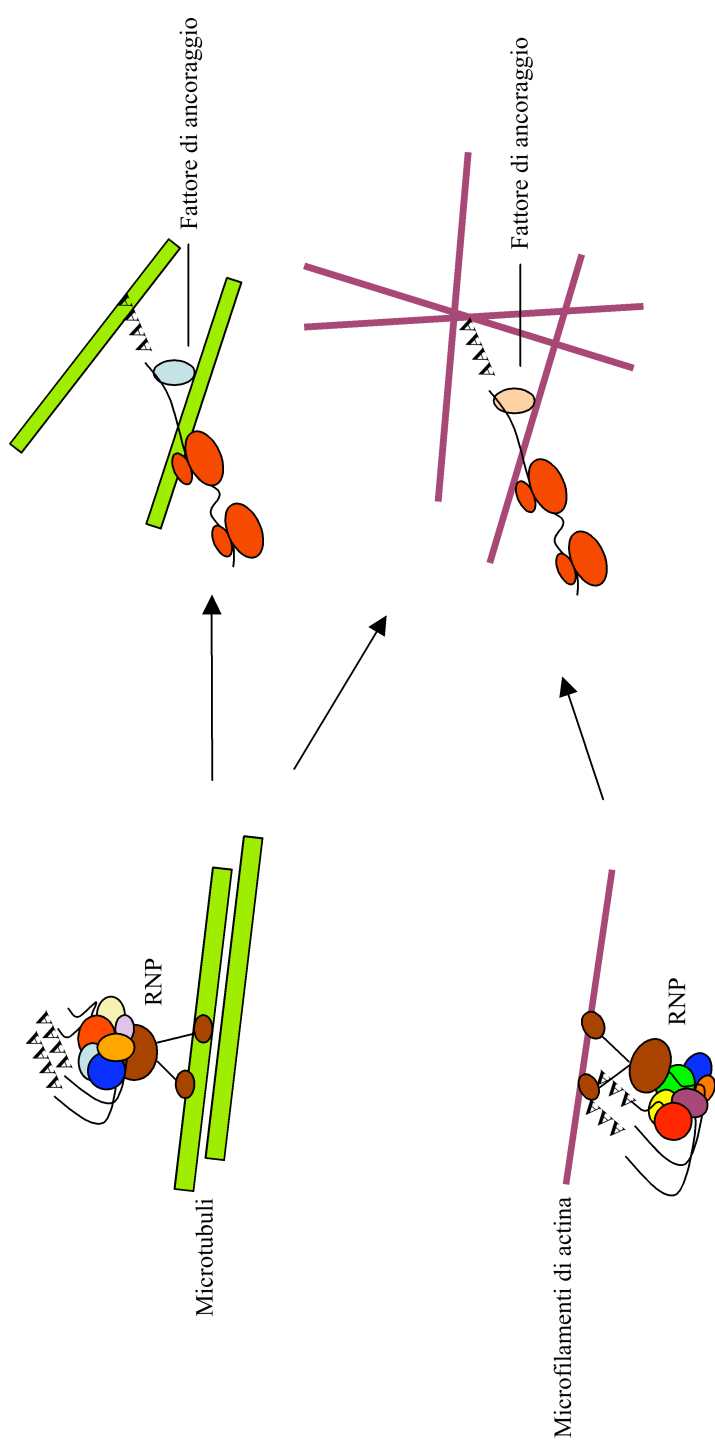


Figura 4. **Differenti tipi di interazioni fra gli mRNA e il citoscheletro.** I messaggeri localizzati sono trasportati sottoforma di particelle ribonucleoproteiche (RNP) attraverso i microtubuli o i microfilamenti di actina. Gli RNA sono successivamente ancorati al citoscheletro tramite proteine (fattori di ancoraggio), associate ai microfilamenti intersecati o ai microtubuli. Sia il trasporto che l'ancoraggio coinvolgono sequenze segnali presenti nel 3'UTR del messaggero.

neuroni, utilizzano i microtubuli e diverse proteine, quali le chinesine e le dineine per localizzare i propri messengeri [Jansen, 1999]. In *Xenopus leavis*, gli RNA si distribuiscono mediante due principali meccanismi [Kloc et al., 2001]. Durante gli stadi I e II dell'oogenesi, il movimento di otto RNA, mRNA e trascritti non codificanti, è realizzato tramite un meccanismo denominato *METRO*, che è basato su una complessa struttura, definita "nuvola mitocondriale", che trasporta gli mRNA all'emisfero vegetale. Durante gli stadi III-V, l'accumulo di alcuni mRNA, come *Vg1* e *fatVg*, al polo vegetale dell'oocita è mediato dai microtubuli [Yisraeli et al., 1990]. Questa classe di filamenti è anche coinvolta nel posizionamento dell'mRNA *MBP* negli oligodendrociti, la cui localizzazione è inibita da oligonucleotidi antisense diretti contro la *Kinesina I*, indicando un coinvolgimento di questa proteina motrice nel suo trasporto [Ainger et al., 1993]. Nei neuroni, la localizzazione del trascritto *tau* negli assoni viene abolita da molecole in grado di depolimerizzare selettivamente i microtubuli [Litman et al., 1996]. Le modalità con cui si realizza l'associazione tra gli mRNA e i componenti del citoscheletro sono tutt'ora oggetto di intensi studi. Tale associazione potrebbe risultare dall'interazione diretta fra un messaggero e le proteine del citoscheletro, oppure potrebbe avvenire in maniera indiretta mediante il coinvolgimento di altri fattori proteici. Uno dei pochi esempi di interazione diretta è rappresentato dal 3'UTR dell'mRNA per l'ormone paratiroideo, che è capace di interagire direttamente con la catena leggera della dineina [Epstein et al., 2000]. L'idea prevalente, invece, è che proteine addizionali siano richieste per creare un'associazione indiretta fra l'RNA *target* e le proteine motrici del citoscheletro. Di fatti, eccetto la chinesina *KIF4* [Wang and Adler, 1995], nessuna proteina motrice sembra contenere sequenze omologhe a quelle presenti nelle proteine capaci di legare il DNA o l'RNA. In *Xenopus*, l'RNA *Vg1* è associato al reticolo endoplasmatico tramite la sua interazione con il fattore *trans-acting Vera* ed è stato proposto che il trasporto del reticolo endoplasmatico, mediato dai microtubuli, sia responsabile dell'utilizzo di questa classe di filamenti per la localizzazione dell'mRNA *Vg1* [Yisraeli et al., 1990]. La purificazione del complesso multiproteico richiesto per la localizzazione di *bicoid* ha consentito di

identificare due proteine RNA binding: il fattore *Swallow* [Wilhelm and Vale, 1993], essenziale per la localizzazione, e *Nod*, un membro della famiglia delle chinesine. Esperimenti di doppio ibrido [Schnorrer et al., 2000] hanno permesso di identificare l'esistenza di un'interazione proteica fra un particolare dominio di *Swallow*, il dominio *coiled-coil*, e la catena leggera della dineina (*Dlc*). Evidenze di tale interazione proteica derivano dall'osservazione che anticorpi diretti contro la proteina *Swallow* coprecipitano *Dlc* da oociti *wilde-type*, ma non da quelli mutati per *Swallow*. Inoltre, la forma mutata della proteina, mancante del dominio *coiled-coil*, non è in grado di localizzare correttamente al polo anteriore, indicando che il dominio coinvolto nell'interazione con *Dlc* è anche necessario per la localizzazione di *Swallow* [Hays and Karess, 2000]. Altre proteine candidate per l'associazione fra proteine motrici e i trascritti comprendono *Bicaudal D* e *Egalitarian*. E' stato proposto che questi fattori funzionano da collegamento indiretto fra i trascritti *pair-rule* e la dineina [Bullock and Ish-Horowicz, 2001]. In alcuni tipi di alghe, amebe, lieviti e anche in cellule somatiche, come i fibroblasti, i mioblasti e i neuroblasti, l'interazione fra gli mRNA e il citoscheletro è mediata dai microfilamenti di actina e proteine motrici appartenenti alla famiglia delle miosine [Jansen, 1999]. La localizzazione degli mRNA nel lievito rappresenta l'esempio meglio caratterizzato della localizzazione dipendente da miosina. La proteina *Ash1p* è un fattore di trascrizione che sopprime l'espressione di *HO*, un'endonucleasi che promuove il *mating-type switching* [Bobola et al., 1996]. La localizzazione dell'mRNA *ASH1* nella gemma, restringe l'espressione di questa proteina a livello della futura cellula figlia e permette il *mating-type switching* solo nella cellula madre [Chartrand et al., 2001; Jansen, 2001]. Nelle cellule di lievito, il movimento delle particelle ribonucleoproteiche, contenenti tale trascritto, può essere visualizzato fondendo all'mRNA in esame la sequenza nucleotidica a cui si lega specificamente la proteina *GFP* [Bertrand et al., 1998]. Questi studi hanno permesso di delucidare il ruolo svolto dai microfilamenti di actina nel movimento di tali complessi ribonucleoproteici dalla cellula madre alla gemma. Una miosina V non convenzionale, *She1/Myo4p*, si associa con i

localizzati mRNA tramite due proteine, *She2p* e *She3p*, un adattatore che lega la miosina con *She2p*. Questo complesso trimerico *She1/Myo4p-Shep2-Shep3* è coinvolto nella localizzazione di altri 21 trascritti oltre a quello di *ASH1* ed è noto come “locosoma” (Fig. 5) [Van de Bor and Davis, 2004]. L’uso preferenziale di un particolare sistema di filamenti per la localizzazione di un trascritto può essere caratteristico per uno specifico tipo cellulare. Ad esempio, nei fibroblasti il trasporto dell’ mRNA  $\beta$ -actina avviene lungo la rete dei microtubuli ed è diretto dalla miosina II [Bassell et al., 1998], mentre lo stesso mRNA è trasportato lungo i microfilamenti nei coni di crescita dei neuroni [Litman et al., 1993]. Dati recenti di *imaging in vivo* della proteina chimerica *ZBP1-GFP* hanno dimostrato un movimento direzionale dei complessi ribonucleoproteici contenenti la proteina di fusione verso la periferia dei fibroblasti. Inoltre, questo movimento veniva rapidamente bloccato dall’aggiunta di un inibitore della Miosina ATPasi [Oleynikov and Singer, 2003]. Tali risultati indicano che il sistema actina-miosina gioca un ruolo importante per il movimento della proteina *ZBP1* e indirettamente del messaggero  $\beta$ -actina. Il duplice ruolo svolto dai microfilamenti e dai microtubuli nel processo di *targeting* dello stesso messaggero è ben rappresentato dalla localizzazione dell’ mRNA *Vg1* al polo vegetale. Il trascritto viene inizialmente trasportato lungo i microtubuli e successivamente ancorato alla corteccia corticale tramite il sistema di filamenti di actina [Yisraeli et al., 1990]. Alcune proteine che legano l’RNA sono in grado di trasportare diverse specie di mRNA mediante il riconoscimento di differenti *zipcode* e di associarsi a più elementi del citoscheletro. Queste proteine sembrano possedere distinti domini di legame per i filamenti di actina e per i microtubuli, e permettono il movimento dell’ mRNA, contenuto nelle particelle ribonucleoproteiche, su tutta la rete citoscheletrica. Ad esempio *Staufen*, che è coinvolta nella localizzazione microtubulo-dipendente degli mRNA negli oociti, è anche richiesta per la localizzazione actina-dipendente del trascritto *prospero* [Palacios and St Johnston, 2001]. Lo stato attuale dell’arte dell’intero processo di localizzazione si basa sul modello proposto da James Wilhelm and Ron Vale nel 1993, secondo il quale tale processo si realizza mediante tre tappe

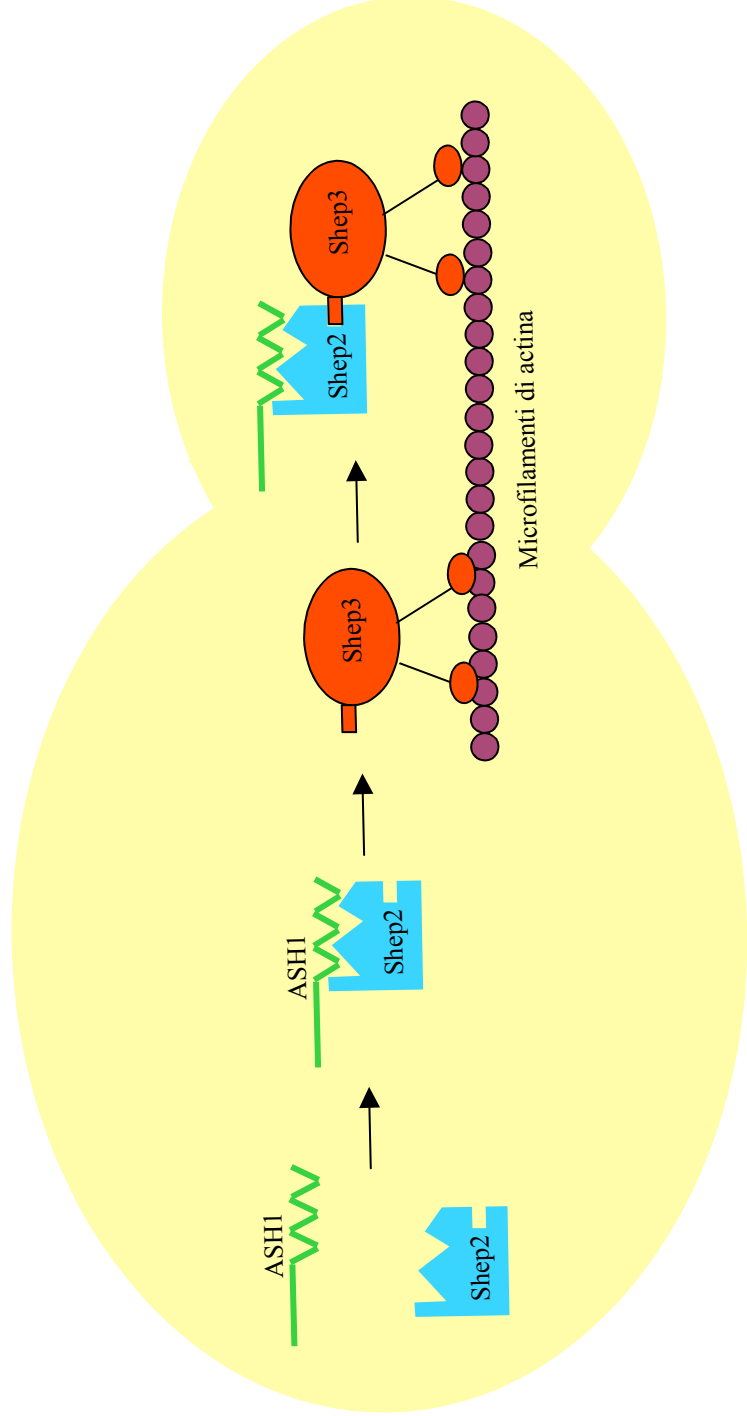


Figura 5. **Meccanismo molecolare per la localizzazione del messaggero ASH1 in lievito.**  
 Le proteine *She* mediano il trasporto e l'ancoraggio del messaggero ASH1 all'actina citoscheletrica.

principali: l'assemblaggio citoplasmatico tra l'mRNA e specifiche *hnRNP*, il trasporto e l'ancoraggio (Fig. 6). Sebbene dati recenti confermano tale modello, altri studi suggeriscono che è necessario aggiungere alcune modifiche volte soprattutto a sottolineare l'essenziale ruolo di una componente nucleare del processo citoplasmatico di localizzazione. Subito dopo la trascrizione di un gene nel nucleo, il suo mRNA inizia una dinamica e complessa associazione [Jansen, 2001]. Terminata la maturazione, il trascritto viene riconosciuto da specifiche proteine che lo assemblano in particelle ribonucleoproteiche, le quali vengono successivamente trasportate dal nucleo al citoplasma attraverso i pori nucleari [Daneholt, 1997]. Durante questo passaggio, alcune proteine restano legate al trascritto, altre lo abbandonano e altre ancora, come alcune proteine richieste per il trasporto, l'ancoraggio, la traduzione, e la degradazione vi si associano nel citoplasma. Nella fase finale di ancoraggio dell'mRNA al proprio sito di funzione, il complesso ribonucleoproteico si distacca dalle proteine motrici e l'mRNA si posiziona in uno specifico compartimento subcellulare tramite l'ausilio di specifiche proteine, per prevenire la diffusione e, in molti casi, per avviare *in loco* il processo di traduzione. La principale caratteristica delle particelle ribonucleoproteiche è rappresentata dalle loro dimensioni. In molti casi, tali complessi risultano più grandi di organelli come i ribosomi [Barbarese et al., 1995]. Queste dimensioni potrebbero risultare funzionali per accomodare nel loro interno un gran numero di molecole di proteine e di RNA, coinvolte a diverso titolo nei differenti momenti della vita di un messaggero. Negli oligodendrociti, studi di localizzazione indicano che nelle particelle ribonucleoproteiche contenenti il trascritto *MBP*, sono presenti anche componenti dell'apparato della traduzione, come il fattore di elongazione *EF1 $\alpha$* , la *tRNA sintetasi* e alcuni ribosomi [Barbarese et al., 1995]. D'altra parte, questi complessi potrebbero essere esclusivamente costituiti da un elevato numero di molecole di RNA da localizzare e da un gran numero di fattori *trans-acting* preposti a tale scopo. Un interessante esempio di particelle ribonucleoproteiche è costituito dai granuli contenenti le proteine *ELAV* (*Embryonic Lethal Abnormal Vision*; *ELAV-RNP*) nelle cellule nervose umane. Le *ELAV-RNP* possono essere presenti in due forme

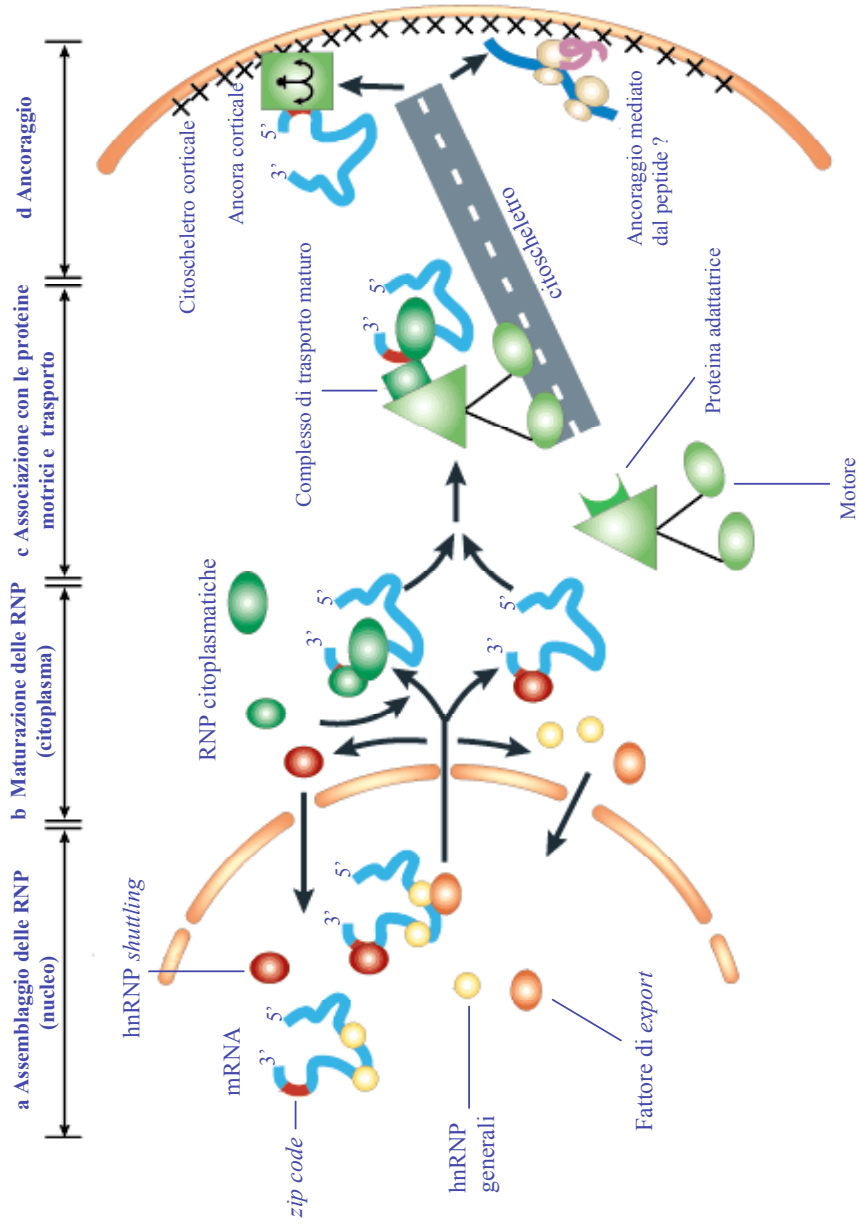


Figura 6. Modello per il trasporto degli mRNA (modificato da *Molecular Cell biology*, 2001).

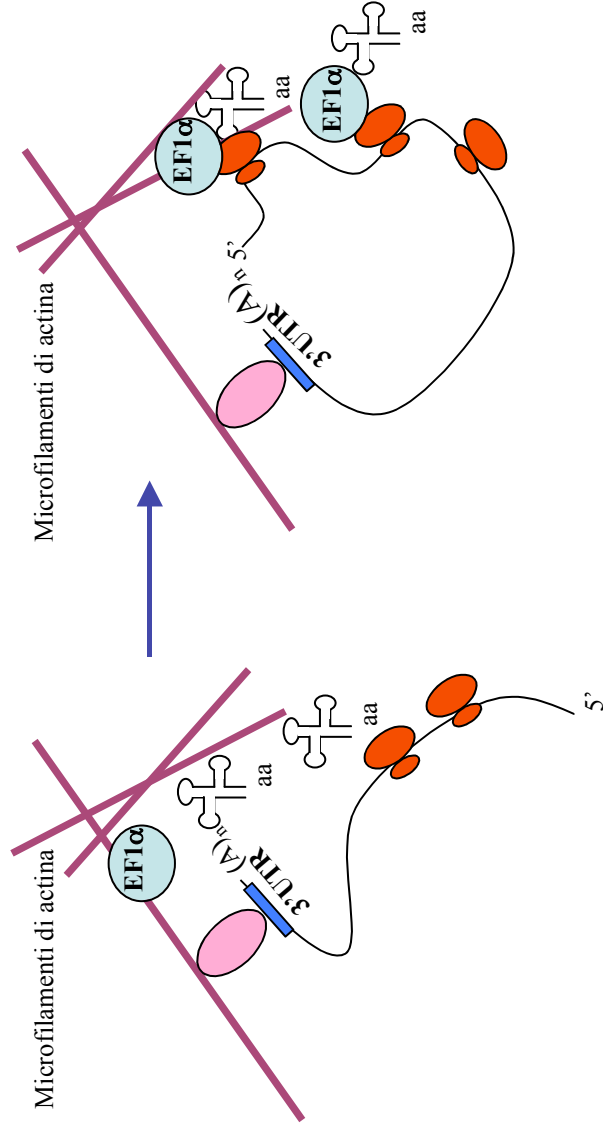
diverse, che comprendono i complessi  $\alpha$ , formati da RNA *poly* (A) e circa 20 polipeptidi e i complessi  $\beta$ , contenenti complessi  $\alpha$  e polisomi [Antic and Keene, 1998]. Infine, alcuni dati sperimentali come la dimostrazione che la proteina *Vera* lega il messaggero *Vg1* al reticolo endoplasmatico, consentono di avanzare un'altra ipotesi, secondo cui l'assemblaggio delle RNP potrebbe coinvolgere strutture subcellulari macromolecolari [Yisraeli et al., 1990]. A differenza della tappa di trasporto, poco è noto riguardo quella di ancoraggio. Di recente gli RNA non codificanti *Xlirt* sono stati proposti come fattori di ancoraggio, anche se non sono ancora noti i meccanismi attraverso i quali questo processo possa realizzarsi [Heasman et al., 2001]. In conclusione, gli elementi del citoscheletro forniscono, per alcune classi di mRNA, il percorso da intraprendere per raggiungere il sito funzionale, ove esplicare la propria funzione. Nella maggior parte dei casi, il citoscheletro offre una solida struttura per sequestrare l'mRNA localizzato ed esporlo al riconoscimento di fattori di regolazione prevenendone il movimento casuale nel citoplasma.

#### *Localizzazione e traduzione degli mRNA*

Sebbene la biosintesi delle proteine non richiede un citoscheletro funzionale, l'efficienza della traduzione di alcune classi di mRNA aumenta in seguito all'associazione spazialmente chiusa dei trascritti e di diversi fattori dell'apparato di traduzione. Studi di istochimica e immunoistochimica hanno dimostrato un'associazione tra gli mRNA, i polisomi e il fattore di elongazione *EF1 $\alpha$*  con i filamenti di actina. *EF1 $\alpha$*  è un fattore proteico che lega l'actina e il suo ruolo nella traduzione si realizza quando esso si dissocia dall'actina, in seguito soprattutto a variazioni di pH, e interagisce così con i componenti dell'apparato di traduzione [Liu et al., 1996]. Il legame di *EF1 $\alpha$*  con i filamenti di actina sembra dar vita ad un microcompartimento coinvolto nell'ancoraggio degli mRNA, mentre la sua successiva interazione con i vari l'amminoaciltRNA pare contribuire a



determinare un'alta concentrazione dei fattori di traduzione *in loco* facilitando l'efficienza del processo di biosintesi delle proteine (Fig. 7). Negli ultimi anni, si stanno accumulando numerosi dati che suggeriscono l'esistenza di un'intima associazione sia dal punto di vista meccanicistico che da quello funzionale tra la localizzazione di un trascritto e la regolazione della sua traduzione. In particolare, l'associazione tra l'RNA e il citoscheletro potrebbe fornire una regolazione a *feedback* negativo inducendo, in seguito alla saturazione dei siti subcellulari, la degradazione o la repressione della traduzione degli mRNA non ancora associati al citoscheletro. Inoltre, l'inefficiente localizzazione potrebbe rendere necessaria la repressione della traduzione per quegli mRNA, che sono sfuggiti ai fattori che costituiscono il macchinario di localizzazione. In aggiunta al suo ruolo nel processo di localizzazione, il 3'UTR è anche capace di reprimere la traduzione di un messaggero finché esso non abbia raggiunto la propria finale destinazione. In *Drosophila*, il trascritto *nanos* costituisce un esempio di messaggero tradotto solo quando correttamente localizzato e represso nella sua forma di trasporto non localizzata. Tale repressione è mediata dall'interazione fra l'elemento di controllo della traduzione, *TCE (Tradutional Control Element)*, presente all'interno del 3'UTR e la proteina *Smaug*. L'attivazione della traduzione richiede invece la proteina *Oskar*. Dati sperimentali indicano che il dominio di legame all'RNA di *Smaug* coincide con il suo dominio di interazione con *Oskar*, suggerendo che l'inattivazione di *Smaug* sia dovuta alla capacità di *Oskar* di spiazzare l'mRNA competendo per lo stesso sito di legame all'RNA. In questo modo l'attivazione della traduzione risulterebbe dallo spiazzamento dei repressori della traduzione dal macchinario di localizzazione [Lipshitz and Smibert, 2000]. Questi esempi indicano che le sequenze richieste per la repressione della traduzione possono sovrapporsi a quelli di localizzazione. Un altro aspetto interessante della relazione funzionale fra localizzazione e traduzione è dato dal fatto che i prodotti della traduzione di un trascritto possono controllare la sua localizzazione.



**Figura 7. Aumento dell'efficienza di traduzione tramite il reclutamento di molecole di mRNA e fattori della traduzione.**

Gli mRNA si associano ai microfilamenti di actina tramite un fattore di ancoraggio, che riconosce il segnale di localizzazione presente nel 3'UTR. Il fattore *ERF1α* è anch'esso associato all'actina. Alcune variazioni del microambiente (es: pH) causano il rilascio di tale fattore, aumentando la locale concentrazione e permettendo il suo assemblaggio al macchinario di traduzione.

Nel lievito, è stato dimostrato che un gene *reporter* fuso alla regione codificante e al 3'UTR di *ASH1* viene correttamente localizzato nelle gemme. L'introduzione di un codone di terminazione della traduzione a monte della regione codificante diminuisce l'efficienza di localizzazione. Tale effetto non si osserva quando è co-espresso il trascritto *ASH1*, indicando che la proteina *Ash Ip* è un regolatore *cis-acting* della localizzazione del proprio mRNA [Gonzalez et al., 1999]. L'insieme di queste osservazioni ci consentono di concludere che la localizzazione dei trascritti e la regolazione della traduzione sono meccanismi di controllo post-trascrizionali intimamente associati per il controllo dell'espressione genica, nello spazio e nel tempo.

#### *Eventi nucleari e localizzazione degli mRNA*

Recenti dati supportano l'esistenza di una connessione tra l'architettura nucleare e la localizzazione citoplasmatica dei trascritti [Farina and Singer, 2002]. Studi condotti in *Chlamydomonas reinhardtii* indicano che i pori nucleari possono essere asimmetricamente distribuiti nei diversi stadi dello sviluppo, concentrandosi in prossimità del lato posteriore del nucleo quando il trascritto  $\beta_2$ -*tubulina* si accumulano posteriormente [Colon-Ramos et al., 2003]. Inoltre, in alcuni casi, la migrazione del nucleo facilita il posizionamento di un mRNA. Ad esempio, lo spostamento del nucleo nell'oocita di *Drosophila* dall'emisfero posteriore a quello anteriore aumenta l'efficienza di localizzazione dell'mRNA *gurken* [Januschke et al., 2002]. Inoltre, l'abilità della maggior parte di fattori nucleari di passare dal nucleo al citoplasma e viceversa, lascia ipotizzare che alcuni di essi potrebbero associarsi nel nucleo ai trascritti per mediarne l'*export* e/o per divenire parte integrante del complesso ribonucleoproteico di trasporto e accompagnare l'mRNA al sito finale di localizzazione. Un ottimo esempio di tali proteine è fornito dalle famiglie di proteine *hnRNP* e *ZBP1* [Van de Bor and Davis, 2004],

precedentemente discusse. Un interessante fattore nucleare che sembra prendere parte al processo di distribuzione dei messaggeri è rappresentato da *Y14*. Questa proteina interagisce con *Magoh* dando origine, nel nucleo, a un complesso eterodimerico stabile. Entrambe le proteine sono componenti della giunzione esone-esone, presenti negli mRNA sottoposti a *splicing* e funzionano nel processo *NMD* (*Non sense-Mediated Decay*), un meccanismo di controllo che degrada gli mRNA che contengono codoni di terminazione prematuri [Farina and Singer, 2002]. Recentemente, è stato dimostrato che *Y14* mantiene questa associazione durante la sua traslocazione nel citoplasma [Farina and Singer, 2002]. Infine, l'importanza dello *splicing* alternativo delle sequenze che dirigono la localizzazione di un trascritto è ben rappresentato dal trascritto *ciclina B* in *Drosophila*. Lo *splicing* alternativo della regione 3'UTR di questo messaggero genera due isoforme che differiscono di 393 nucleotidi. La variante più corta viene sintetizzata durante i primi stadi dell'oogenesi e diffonde all'interno del pre-oocita, mentre l'isoforma più lunga è sintetizzata nelle cellule *nurse* negli ultimi stadi dell'oogenesi e si localizza al polo posteriore [Ding and Lipshitz, 1993]. La sempre più diffusa idea che processi metabolici come lo *splicing* nucleare e la localizzazione citoplasmatica siano connessi pone nuovi e interessanti interrogativi sui complessi eventi biologici che intervengono nel metabolismo di una molecola di RNA.

#### *Conservazione del processo*

Molte caratteristiche del processo di localizzazione degli RNA sono conservate durante l'evoluzione, suggerendo che tale evento sia un meccanismo antico per l'introduzione dell'asimmetria citoplasmatica. Per esempio, la comparazione di diversi trascritti *bicoid*, che sono lontani nella scala evolutiva, suggerisce che la struttura secondaria del 3'UTR di tale trascritto si sia conservata in specie di *Drosophila*

distanti tra loro più di 60 milioni di anni (*melanogaster*, *teissieri*, *virilis*) [Ferrandon et al., 1994]. Il 3'UTR del messaggero *tau*, che guida tale trascritto negli assoni dei neuroni di ratto, è anche capace di mediare la localizzazione di alcuni trascritti al polo vegetale di *Xenopus* [Litman et al., 1996]. L'elemento di localizzazione del messaggero *MBP* mostra il 70% di omologia tra uomo, topo e ratto, e le sue predette strutture secondarie risultano conservate in tutte e tre le specie [Ainger et al., 1997]. Recenti dati indicano che il ruolo del 3'UTR dei trascritti destinati al mitocondrio è conservato tra lievito e uomo. Ad esempio, esperimenti di frazionamento biochimico hanno dimostrato che il trascritto *Oxa1*, codificante per la proteina *Oxa1p*, la componente chiave della biogenesi della membrana mitocondriale interna, è arricchito in polisomi associati ai mitocondri sia in *S. cerevisiae* che in cellule *HeLa* attraverso un meccanismo che in entrambi i sistemi richiede la regione 3'UTR. Inoltre, il 3'UTR del trascritto *Oxa1* umano risulta capace di indirizzare un trascritto eterologo in prossimità dei mitocondri in cellule di lievito, dimostrando che le proteine di lievito coinvolte nel processo di segregazione degli mRNA sono in grado di riconoscere l'omologo 3'UTR [Sylvestre et al., 2003]. Questi dati suggeriscono che il macchinario di localizzazione essenziale per la biogenesi degli organelli si è conservato lungo l'evoluzione.

## **SCOPO DELLA TESI**

L'obiettivo della mia tesi di dottorato è quello di studiare il contributo della disposizione spaziale degli mRNA nel *targeting* delle proteine. Come modello sperimentale, sono stati utilizzati i messaggeri per le proteine ribosomali (r-proteine), citosoliche e mitocondriali. La biogenesi dei ribosomi è un importante e complesso evento che ha luogo nei nucleoli e nei mitocondri di una cellula eucariotica. Durante tale processo, le r-proteine si assemblano agli RNA ribosomali per formare i ribosomi. È noto che le r-proteine, citosoliche e mitocondriali, una volta trascritte nel nucleo e tradotte nel citoplasma, partecipano ad un intenso traffico intracellulare per raggiungere le sedi di sintesi dei ribosomi, il nucleolo o il mitocondrio. Il trasporto di tali proteine è stato attribuito a sequenze segnale presenti sulla molecola proteica. Dati recenti in letteratura indicano che la localizzazione delle proteine in specifici distretti subcellulari non è dovuta esclusivamente alla presenza di segnali proteici ma anche alla distribuzione subcellulare delle corrispondenti molecole di messaggero [Kloc et al., 2002]. Un'indicazione indiretta della ripartizione asimmetrica dei messaggeri per r-proteine nel citoplasma deriva dall'osservazione che alcuni messaggeri per altre proteine nucleari e mitocondriali, tra cui *c-myc* [Hesketh et al., 1994] e *OXA1* [Corral-Debrinski et al., 2000], localizzano in prossimità dei siti funzionali delle corrispondenti proteine, vale a dire in prossimità del nucleo e del mitocondrio, rispettivamente. Tale distribuzione risulta funzionale per la localizzazione delle rispettive proteine. Inoltre, è stato dimostrato che tutte le componenti del citoscheletro, i microfilamenti di actina, i microtubuli e i filamenti intermedi, sono coinvolti nel trasporto e/o nell'ancoraggio degli mRNA localizzati [Kloc et al., 2002]. Questi dati supportano l'ipotesi secondo cui i trascritti per le r-proteine non diffondono liberamente nel citoplasma, ma sono trasportati lungo il citoscheletro in prossimità del sito funzionale delle corrispondenti proteine. In particolare, le r-proteine citosoliche potrebbero accumularsi preferenzialmente nella regione perinucleare e i messaggeri per la controparte mitocondriale nella periferia dei mitocondri, per rendere più efficiente la sintesi e il conseguente trasferimento delle corrispondenti proteine nel nucleolo o nel mitocondrio. La prima parte del progetto è finalizzata allo studio della

distribuzione subcellulare degli mRNA per le r-proteine, citosoliche e mitocondriali, e della relazione funzionale fra la localizzazione di tali messaggeri e la loro traduzione. La seconda parte prevede la definizione delle sequenze *cis-acting* e, in particolare, l'analisi del ruolo della regione 3'UTR.



## **MATERIALI E METODI**

### *Trattamenti con le droghe*

Per studiare l'associazione dei messaggeri che codificano per le r-proteine citosoliche con il citoscheletro, cellule *HeLa*, mantenute in coltura su piastre da 3,5 cm in mezzo *DMEM* (Gibco), contenente il 10% *FBS* (*Fetal Bovine Serum*, Gibco), 5 mM L-glutamina, 50 µg/ml di streptomicina e 50 µg/ml di penicillina, in un'atmosfera di 5% CO<sub>2</sub>, sono state incubate per 20 minuti a 37°C con composti in grado di distruggere l'integrità dei singoli componenti del citoscheletro. In particolare le cellule sono state trattate con 5 µM di *Latrunculin A* (*Lat A*, Calbiochem) o 40 µM di *Nocodazolo* (*Noc*, Calbiochem) allo scopo di depolimerizzare i microfilamenti di actina o i microtubuli, rispettivamente. La selettività e l'efficacia di queste droghe sono state verificate mediante esperimenti di Western blotting e di immunofluorescenza.

### *Procedure di frazionamento subcellulare*

Allo scopo di studiare la distribuzione subcellulare degli mRNA per le r-proteine citosoliche, cellule *HeLa*, cresciute su piastre da 3,5 cm, sono state sottoposte a frazionamento biochimico per ottenere una frazione solubile (S) e una frazione citoscheletrica (Ck). Le cellule sono state lavate con PBS 1X freddo, e incubate con un tampone di estrazione freddo (10 mM PIPES, pH 6.8, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% TX-100) a 4°C per un minuto. Il materiale raccolto corrispondeva alla frazione solubile. Successivamente, le cellule sono state raccolte in un tampone di estrazione del citoscheletro freddo (20 mM HEPES, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 30 mM Mg-acetato, 0.5% deossicolato, and 1% Tween-20) e lasciate per 5 minuti in ghiaccio. La sospensione ottenuta è stata siringata ripetute volte e poi centrifugata per 5 minuti a 4°C a 13,000 rpm. Il surnatante corrispondeva alla frazione citoscheletrica. In queste frazioni è stata misurata l'attività

dell'enzima lattico deidrogenasi usando un *kit* commerciale (Sigma-Aldrich). Per analizzare la distribuzione subcellulare degli mRNA per le r-proteine mitocondriali sono stati condotti esperimenti di frazionamento cellulare utilizzando un protocollo di isolamento dei mitocondri, leggermente modificato [Tapper et al., 1983]). Nello specifico, quattro piastre da 10 cm di cellule *HeLa* sono state lavate una volta con PBB 1X freddo, raccolte in 1.3 ml di PBS 1X freddo e centrifugate a 1,500 rpm per 10 min a 4°C. Il *pellet* è stato risospeso in 10 volumi di 0.133 M NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, e la corrispondente sospensione è stata centrifugata a 1,500 rpm per 10 min at 4 °C. Il nuovo *pellet* è stato risospeso in 500 µl di 10 mM NaCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, e lasciato in ghiaccio per 15 min. Successivamente, è stato aggiunto un uguale volume di 0.7 M saccarosio, 0.21 M mannitolo, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, e i nuclei e i detriti cellulari sono stati rimossi mediante due successive centrifugate a 2,500 rpm per 10 min at 4°C. I mitocondri sono stati isolati per centrifugazione a 13,000 rpm per 30 min at 4°C; lavati una volta con 1 ml di 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM EDTA, e risospesi in un volume finale di 300 µl dello stesso tampone immediatamente prima dell'isolamento degli acidi nucleici.

#### *Analisi per immunoblot e immunofluorescenza*

Aliquote (30 µg) delle proteine, estratte dalle frazioni S e Ck, sono state analizzate mediante *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroporesis*), utilizzando un gel di poliacrilamide denaturante al 12%. Prima del caricamento i campioni, ai quali è stato addizionato il *loading buffer* (36% Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 15% mercaptoetanolo, 6% SDS, 30% glicerolo, 10% blue di bromofenolo in acqua distillata), sono stati denaturati a 90°C per cinque minuti. Terminata la corsa elettroforetica, le proteine sono state

elettrotrasferite su filtro di nitrocellulosa (Schleicher and Schuell). Le membrane ottenute sono state incubate per due ore a 37°C in una soluzione contenente latte in polvere al 10%, 0.1% TritonX-100 in PBS 1X. L'antisiero specifico è stato diluito in tale soluzione e aggiunto al filtro. Quest'ultimo è stato poi lavato per cinque volte con una soluzione di 0.1% TritonX-100 in PBS 1X e successivamente incubato per un'ora con un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di barbabetola e diluito 1:2000 (Amersham). La rivelazione del segnale è stata effettuata per chemiluminescenza, aggiungendo una soluzione contenente luminolo, un substrato della perossidasi, e liquidi che amplificano il segnale (*ECL*, Amersham). La luminescenza sviluppata è stata impressionata su lastra autoradiografica. Per i saggi di immunofluorescenza, le cellule, cresciute su vetrini, sono state fissate per 10 minuti con paraformaldeide 4% in PBS 1X e permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 in PBS 1X per 2 minuti a 4°C. Successivamente, le cellule sono state incubate con 30 µl di PBS 1X, contenente 0.1 µg/mL di falloidina rodaminata (Sigma-Aldrich) per 45 minuti al buio a temperatura ambiente e lavate tre volte con PBS 1X. I vetrini sono stati montati con *Mowiol* (Calbiochem) e analizzati al microscopio a fluorescenza AXIOVERT 200M (Zeiss), usando un obiettivo 63X.

#### *Costruzione dei plasmidi chimerici*

I 3'UTR degli mRNA per la r-proteina citosolica *L4* e per quella mitocondriale *S12* sono stati retro-trascritti e amplificati per PCR, usando come stampo l'RNA totale, isolato da cellule *HeLa*, e specifici oligonucleotidi (tabella 3). I frammenti ottenuti sono stati successivamente inseriti a valle del gene *reporter GFP* nel vettore di espressione *pEGFP-C1* (Clontech), usando i siti di clonaggio per gli enzimi di restrizione *Kpn I* and *BamH I* per il 3'UTR di *cyL4* e quelli per *Hind III* and *BamH I* per il 3'UTR di *mtS12*. I plasmidi di fusione,

preparati usando un *kit* commerciale (QIAGEN), sono stati sequenziati per verificarne l'accuratezza.

### *Esperimenti di transfezione*

Gli esperimenti di transfezione sono stati condotti utilizzando il reagente *LipofectAMINE™ 2000* (Invitrogen). Le cellule sono state fatte crescere in coltura in piastre da 3.5 cm fino ad ottenere una confluenza dell'80-90% e incubate con una miscela di 4 µg of DNA di interesse e 10 µl di *LipofectAMINE*, in accordo con le istruzioni della casa produttrice. Le cellule sono state analizzate 24h dopo la transfezione per RT-PCR e per ibridazione *in situ*.

### *Estrazione di RNA, Northern blotting e RT-PCR semi-quantitativa*

Tutte le frazioni ottenute da esperimenti di frazionamento biochimico sono state trattate con 200 µg/ml di proteinasi K (Roche) in 0.5% SDS per 30 min a 37°C e l'RNA totale è stato purificato tramite ripetuti cicli di estrazione con fenolo/cloroformio (v/v 1:1) e precipitati in etanolo. L'analisi della distribuzione degli mRNA che codificano per le r-proteine citosoliche fra la frazione solubile (S) e quella citoscheletrica (Ck) è stata condotta mediante esperimenti di Northern blotting. Aliquote (20 µg) dell'RNA totale per ciascuna frazione sono state separate per elettroforesi attraverso un gel di agarosio all'1.5 % in condizioni denaturanti (formaldeide) e poi trasferite su un filtro di nylon carico positivamente (Millipore) mediante capillarità. Le membrane ottenute sono state ibridate con sonde radioattive per l'mRNA *β-actina* e per gli mRNA per le r-proteine citosoliche *L3*, *L4*, *L7a*, *L12*, *L15*. Tali sonde sono frammenti retro-trascritti e amplificati per PCR con specifici oligonucleotidi (tabella 3), usando l'RNA totale di cellule *HeLa* come stampo. La marcatura dei frammenti di DNA

così ottenuti è stata effettuata mediante reazioni di *random priming*, usando [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP. L'ibridazione con le sonde è stata condotta come descritto da *Church and Gilbert* nel 1984. Per correggere gli errori di caricamento stato usato un oligonucleotide sintetico per il 28S rRNA. L'abbondanza relativa di ciascuna specie di mRNA è stata determinata usando il sistema *Storm PhosphorImager* (Molecular Dynamics). L'analisi dei livelli dei trascritti nella frazione citosolica e in quella mitocondriale è stata valutata per RT-PCR. L'RNA, ottenuto da ciascuna frazione, è stato incubato con 10U di DNasi RNasi *free* (Roche) per 15 minuti a 37°C per eliminare tracce di DNA genomico. L'enzima è stato inattivato a -20°C per 1 ora e l'RNA è stato precipitato con isopropanolo a -20°C per tre ore. 1  $\mu$ g di RNA è stato retro-trascritto in cDNA mediante la tecnica degli esameri *random* con 200 Unità di Trascrittasi Inversa (Invitrogen). La reazione è stata condotta a 42°C per 50 minuti e arrestata riscaldando a 75°C per 15 minuti. Dieci dei 40  $\mu$ l di questa reazione sono stati amplificati per PCR in un volume finale di 50  $\mu$ l, usando 5  $\mu$ M di ciascun specifico oligonucleotide (tabella 3), 10 mM di ciascun dNTP, e 0,5 unità di Taq DNA polimerasi (Invitrogen) in un appropriato tampone di reazione. Un tipico ciclo di amplificazione consisteva di 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C, 3 minuti a 72°C e di un ciclo finale di 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C e 10 minuti a 72°C. Generalmente, sono stati effettuati 25-30 cicli di amplificazione. In esperimenti preliminari, è stato accertato che il numero di cicli fosse all'interno dell'intervallo lineare di amplificazione. I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio 1-2% contenente il colorante fluorescente *Vista-Green* (Amersham Pharmacia Biotech) [Gramolini et al., 2001]. L'intensità del segnale dei prodotti di PCR, lineare alla quantità di DNA, è stato successivamente quantificato usando il sistema *Storm PhosphorImager* (Molecular Dynamics).

### *Ibridazione in situ*

Cellule *HeLa*, cresciute su vetrini, sono state lavate tre volte con PBS 1X contenente 5 mM MgCl<sub>2</sub> freddo; fissate per 10 minuti con paraformaldeide 4% in PBS 1X e permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 in PBS 1X per 2 minuti a 4°C. Successivamente, le cellule sono state incubate in 50% formamide, SSC 2X (1X SSC: 15 mM sodio citrato, 150 mM NaCl pH 7.4), a 55°C per 2 h e ibridate con 500 ng di sonda ad RNA, corrispondente al trascritto *GFP* marcato con digossigenina in 50% formamide, 2X SSC, 10% Dextran solfato, 10 mM NaPHO<sub>4</sub>, 250 µg/ml tRNA and 100 µg/ml di DNA di sperma di aringa per tutta la notte a 55°C in atmosfera umida. La sonda *GFP* è stata ottenuta per trascrizione *in vitro*, partendo dall'intero cDNA di *GFP* subclonato nel vettore *pGEM-4Z*. 2 µg di tale vettore, linearizzato con opportune endonucleasi di restrizione, sono stati trascritti in orientamento senso (controllo) e antisenso, usando le polimerasi *Sp6* e *T7* (Roche), rispettivamente e adoperando un *DIG RNA labeling kit* (Roche Molecular Biochemicals), nelle condizioni consigliate dalla ditta produttrice. Al termine della reazione sono state aggiunte 3 unità di *RQ1 RNas-Free DNase* (Roche Molecular Biochemicals) per degradare il DNA utilizzato come stampo e la miscela è stata incubata per 30 minuti a 37°C. La sonda è stata purificata mediante precipitazione con isopropanolo e LiCl 4M. Dopo l'ibridazione, le cellule sono state lavate due volte con 2X SSC e 50% formamide per 20 minuti a 55°C, una volta in 2X SSC a 55°C e due volte a temperatura ambiente. L'eccesso di sonda legata aspecificamente è stato rimosso mediante trattamento con 40 µg/ml di RNasi A nel tampone di lavaggio (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,4M NaCl and 5 mM EDTA), condotto per 20 minuti a 37°C. I vetrini sono stati successivamente lavati con 2X SSC per 10 minuti a 37°C e incubati con BSA 1:100 (Roche), FBS 2% (Gibco) in PBS 1X, contenente MgCl<sub>2</sub> 5mM per 30 minuti a temperatura ambiente. I trascritti marcati sono stati rivelati incubando frammenti Fab anti-

digossigenina coniugati a rodamina diluiti 1:100 (Roche Diagnostics), in accordo con le istruzioni del foglietto illustrativo. L'eccesso di anticorpo è stato eliminato con quattro lavaggi ripetuti di PBS 1X, contenente  $MgCl_2$  5mM, per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in acqua sterile contenente 0.1% di dietilpirocarbonato, i vetrini sono stati montati con *Mowiol* (Calbiochem) e il segnale è stato visualizzato usando un microscopio confocale (Zeiss) e un obiettivo 63X.



## **RISULTATI**

### *Distribuzione asimmetrica degli mRNA per le r-proteine citosoliche*

Le interazioni fra alcuni mRNA e gli elementi del citoscheletro sono responsabili della distribuzione spaziale di diversi trascritti nelle cellule somatiche di mammifero [Hesketh and Pryme, 1991; Levadoux et al., 1999]. Per comprendere se, in analogia ai trascritti che codificano per altre proteine nucleari, come *c-myc* e *metallothioneina-I (MT-I)* [Hesketh et al., 1994; Mahon et al., 1997], anche i messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano con il citoscheletro, è stato usato, come approccio di carattere biochimico, una procedura di frazionamento subcellulare. Il trattamento delle cellule con basse concentrazioni di detergente non ionico causa la solubilizzazione della membrana plasmatica e il rilascio dei componenti citosolici corrispondenti alla frazione solubile (S). L'aumento della forza ionica e la solubilizzazione dei lipidi del reticolo endoplasmatico, ottenuta mediante l'uso del deossicolato, provoca il rilascio della matrice cellulare corrispondente alla frazione arricchita in elementi del citoscheletro (Ck). Tali frazioni sono state sottoposte a diversi controlli per verificarne la natura e la composizione. In particolare, in entrambe le frazioni è stata misurata l'attività della lattico deidrogenasi [Gramolini et al., 2001], un enzima citosolico, e, come atteso, più del 90% della sua attività è stata riscontrata nella frazione S (tabella 4). L'integrità degli elementi del citoscheletro è stata valutata mediante l'analisi degli estratti proteici, ottenuti da entrambe le frazioni, tramite esperimenti di Western blotting. La presenza del segnale sia per la  $\beta$ -actina che per la  $\beta$ -tubulina nella frazione Ck e la loro assenza nella frazione S ha confermato che la procedura di frazionamento impiegata non ha alterato l'organizzazione dei microfilamenti e dei microtubuli (Fig. 8A). Dopo aver verificato il successo dell'avvenuta separazione subcellulare, l'RNA totale, estratto da ciascuna delle due frazioni, è stato analizzato per Northern blotting. Le membrane ottenute sono state ibridate con diverse sonde di cDNA, corrispondenti a cinque

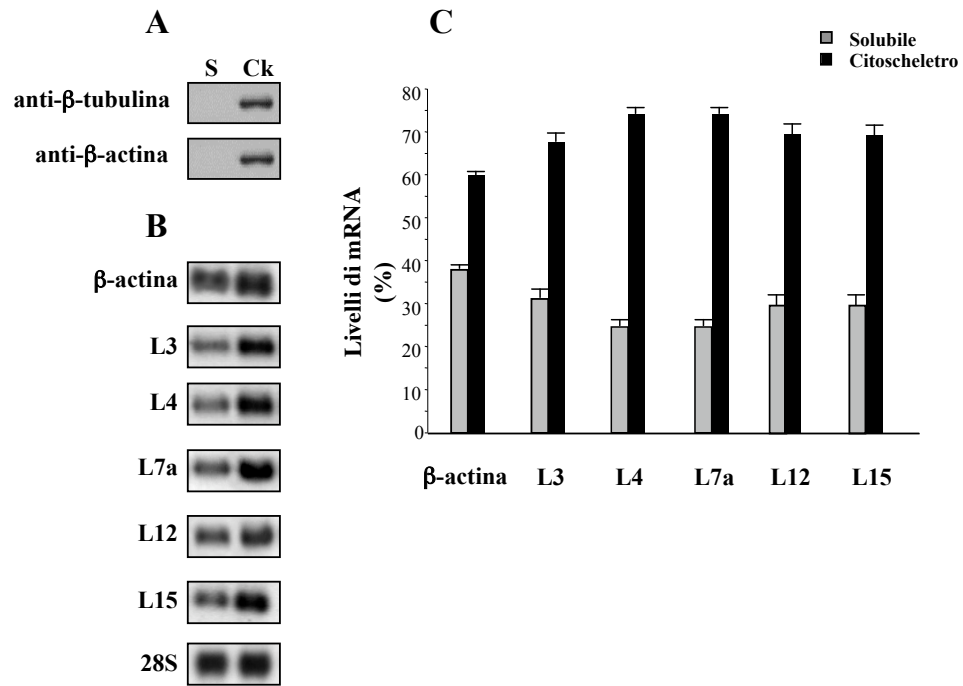
**Tabella 3. Sequenze degli oligonucleotidi**

	5'Primer (5'-	3'Primer (3'-
$\beta$ -	ggcaccaccttct	caggaggacaat
<i>cyL</i>	atgtctcacagaaa	agctccttcttctt
<i>cyL</i>	atacgccatctgttc	tgtttggtttag
<i>cyL7</i>	atatgaagtacagaccaga	tgtgaaggcgacat
<i>cyL1</i>	ggaggccaaggtgc	actggctgggcattcc
<i>cyL1</i>	agtcacaagcgcac	ttgaacaacctctac
<i>GF</i>	taccggtcgccacca	cttgtagcctcgtc
<i>COX</i>	ttattctagaacca	ggctctagagggggt
<i>cyL4</i>	cctgctgcataaac	catgtttctcactgc
<i>mtS12</i>	ctcagaagaagtgc	cacagaagaagtgcg

**Tabella 4. Attività della lattico deidrogenasi**

	Frazio	
	Solubi	Citoschelet
<b>Control</b>	95.5 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.3
<b><i>Lat</i></b>	93.1 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 0.3
<b><i>No</i></b>	94.8 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 0.5
<b><i>GF</i></b>	92.4 $\pm$ 0.5	7,6 $\pm$ 0.6
<b><i>GFP/cy</i></b>	96.8 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.5
<b><i>GFP/mtS</i></b>	97.8 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 0.5

Aliquote degli estratti proteici, ottenuti da ciascuna frazione, sono state saggiate per misurare l'attività della lattico deidrogenasi. Come atteso, la maggior parte della sua attività è stata rilevata nella frazione solubile. I dati sono espressi come percentuale dell'attività totale dell'enzima. In tabella sono indicati gli esperimenti condotti in questo studio: cellule *HeLa* non trattate (controllo), trattate con *Latrunculina A* (*Lat A*), con *Nocodazolo* (*Noc*), e cellule transfettate con il vettore *GFP* (*GFP*), con i costrutti



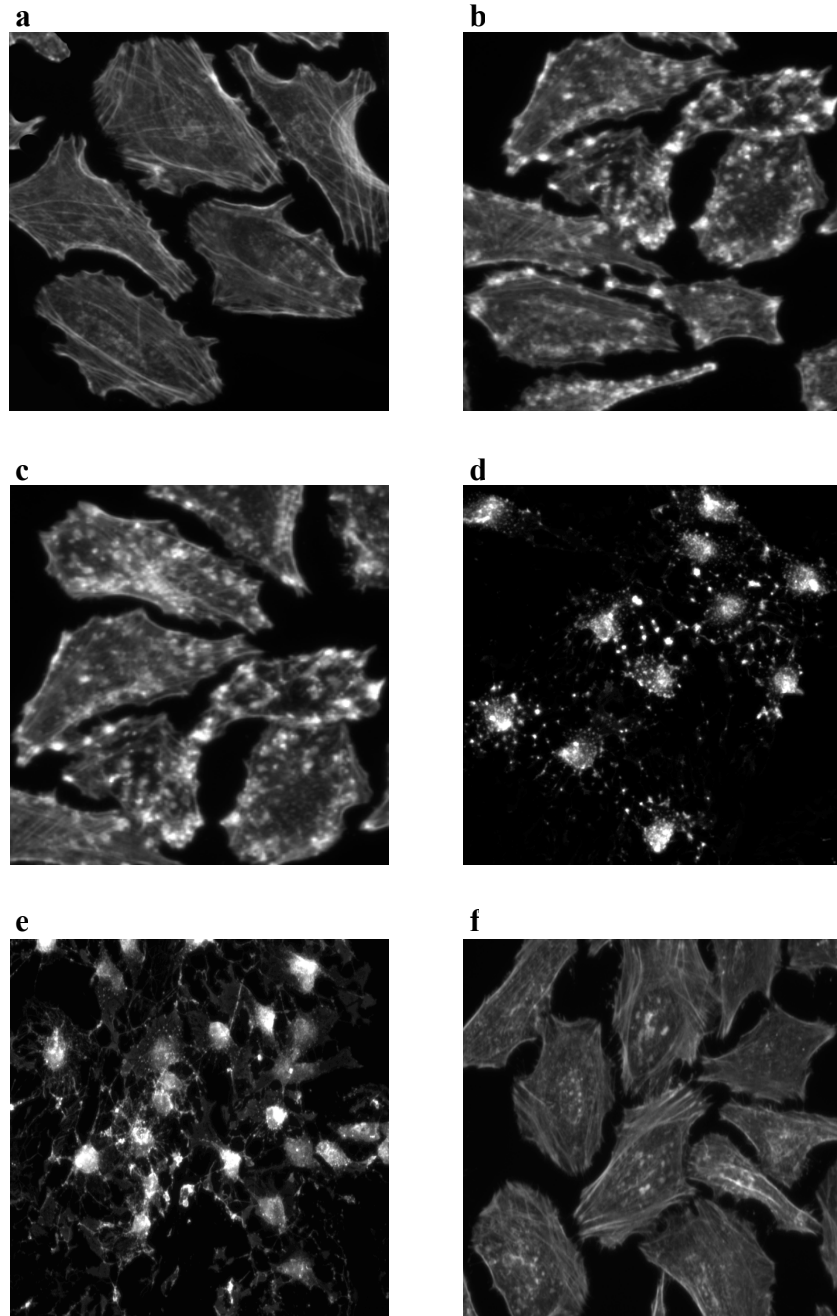
**Figura 8. Distribuzione asimmetrica degli mRNA per le r-proteine citosoliche fra la frazione solubile e la frazione citoscheletrica.** Cellule *HeLa* sono state sottoposte a frazionamento biochimico per separare la frazione solubile (S) e la frazione citoscheletrica (Ck), come descritto in Materiali e Metodi. **(A)** Western blotting per l'analisi della distribuzione delle proteine  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina fra le frazioni. **(B)** Aliquote (20  $\mu$ g) di RNA totale, estratto da ciascuna frazione, sono state analizzate per Northern blotting, usando sonde per differenti messaggeri per r-proteine citosoliche (tabella 3). L'ultimo riquadro in basso mostra il segnale del normalizzante 28S rRNA. L'mRNA  $\beta$ -actina è stato usato come esempio di mRNA associato al citoscheletro. **(C)** La quantizzazione dei segnali di ibridazione è stata effettuata mediante l'uso del sistema *PhosphorImager STORM 840* (Amersham). Per un dato mRNA, la somma dei segnali in entrambe le frazioni, dopo la normalizzazione, costituisce il 100% del segnale e i livelli di mRNA sono stati espressi come percentuale del totale. I risultati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

diversi messaggeri per le r-proteine citosoliche, scelti arbitrariamente (*L3*, *L4*, *L7a*, *L12* e *L15*). Come esempio di messaggero associato al citoscheletro e, pertanto, come controllo della frazione Ck è stato usato l'mRNA  $\beta$ -actina. Di fatto, in esperimenti precedenti è stato dimostrato che tale trascritto si accumula nella frazione citoscheletrica [Mallardo et al., 2001]. Come atteso, circa il 60% di questo mRNA è stato ritrovato nella frazione Ck (Fig. 8C). L'analisi del profilo di distribuzione degli mRNA in esame ha mostrato che i trascritti per *L3*, *L4*, *L7a*, *L12* e *L15* seguivano lo stesso profilo di distribuzione, arricchendosi significativamente nella frazione Ck (Fig. 8B). In particolare, l'analisi quantitativa ha rivelato che questi messaggeri mostravano un accumulo di circa il 70% nella frazione Ck rispetto alla frazione S (Fig 8C). Sorprendentemente, questi dati dimostrano che i messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano al citoscheletro in maniera più affine (circa il 70%) rispetto al controllo actina (circa il 60%) (Fig. 8C). Questi risultati consentono di affermare che i cinque messaggeri in esame sono associati al citoscheletro.

*I messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano ai filamenti di actina*

L'associazione tra un messaggero e il citoscheletro si può realizzare mediante il coinvolgimento di due importanti classi di componenti citoscheletrici: i microfilamenti e/o i microtubuli [Kloc et al., 2002]. Allo scopo di valutare quale specifica classe degli elementi del citoscheletro sia richiesta per la localizzazione dei trascritti codificanti per le r-proteine citosoliche, è stato usato un approccio sperimentale farmacologico. La strategia adottata è stata quella di distruggere selettivamente l'integrità dei filamenti di actina o dei microtubuli, per poi valutare l'effetto della depolimerizzazione sulla distribuzione intracellulare dei messaggeri in esame. Numerosi dati in letteratura suggeriscono che i microfilamenti di actina svolgono un ruolo

fondamentale per il trasporto e l'ancoraggio degli mRNA [Jansen, 1999]. Un agente farmacologico in grado di depolimerizzare selettivamente i microfilamenti di actina, ampiamente utilizzato in esperimenti analoghi, è rappresentato dalla *Latrunculina A* (*Lat A*). Questo macrolide, presente in *Latrunculia magnifica*, è in grado di disassemblare i microfilamenti sequestrando i monomeri di actina [Spector et al., 1989]. Allo scopo di individuare la dose ottimale di *Lat A*, corrispondente alla massima azione farmacologica e al minimo effetto tossico, da utilizzare negli esperimenti di frazionamento biochimico, sono stati condotti saggi di immunofluorescenza. In particolare, cellule *HeLa* sono state incubate con concentrazioni crescenti di *Lat A* (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 7 $\mu$ M), fissate, colorate con falloidina rodaminata e visualizzate al microscopio a fluorescenza. Per verificare l'assenza di un eventuale effetto secondario dovuto alla natura del solvente (*DMSO*), le cellule sono state incubate anche con 1-7% di *DMSO*, corrispondenti alle quantità somministrate alle concentrazioni 1-7  $\mu$ M di *Lat A*. L'analisi delle immagini al microscopio ha permesso di concludere che le concentrazioni pari a 1 $\mu$ M e a 3 $\mu$ M risultavano insufficienti nell'indurre una completa depolimerizzazione dei microfilamenti di actina (Fig. 9b,c). D'altra parte, la concentrazione 7  $\mu$ M causava oltre alla disorganizzazione dei filamenti di actina anche un significativo danno citologico, determinando un'alterazione profonda della morfologia cellulare (Fig. 9e). Questi studi hanno consentito di identificare come dose ottimale di lavoro quella corrispondente a 5  $\mu$ M (Fig. 9d). Pertanto, dopo il trattamento con 5  $\mu$ M di *Lat A*, le cellule sono state sottoposte a frazionamento biochimico per isolare una frazione S e una frazione Ck. Allo scopo di controllare la selettività dell'azione depolimerizzante della *Lat A*, gli estratti proteici raccolti da ciascuna frazione sono stati saggiati mediante esperimenti di Western blotting, condotti usando anticorpi contro la  $\beta$ -actina e la  $\beta$ -tubulina. La presenza del segnale per la  $\beta$ -actina esclusivamente nella frazione S conferma l'azione disaggregante dei microfilamenti di actina, indotta



**Figura 9. Analisi al microscopio a fluorescenza di cellule *HeLa* trattate con *Lat A*.**

Cellule *HeLa* sono state incubate con dosi crescenti di *Lat A* e successivamente sottoposte ad esperimenti di immunofluorescenza. In figura sono mostrate le immagini delle cellule non trattate (controllo, **a**), delle cellule trattate con *Lat A* 1  $\mu\text{M}$  (**b**), 3  $\mu\text{M}$  (**c**), 5  $\mu\text{M}$  (**d**), 7  $\mu\text{M}$  (**e**) e delle cellule trattate con DMSO 7% (**f**).

dalla *Lat A*, mentre l'assenza del segnale per la  $\beta$ -tubulina nella frazione S e la sua presenza nella frazione Ck conferma la specificità d'azione di questo agente. (Fig. 10A). Dopo aver verificato l'integrità del citoscheletro, l'analisi dell'RNA totale, estratto da ciascuna frazione, è stata condotta mediante Northern blotting. Precedenti studi hanno mostrato che la distruzione dei filamenti di actina da parte di agenti farmacologici blocca l'associazione dell'mRNA  $\beta$ -actina ai microfilamenti [Sundell and Singer, 1991]. L'analisi della ripartizione di questo mRNA fra le due frazioni ha, di fatto, rivelato che tale trascritto in seguito all'esposizione della *Lat A* veniva in parte rilasciato dalla frazione Ck per accumularsi nella frazione S (Fig. 10B), confermando la sua associazione ai filamenti di actina. Il trattamento con *Lat A* risultava anche in una drammatica ridistribuzione degli mRNA per le r-proteine citosoliche associati al citoscheletro. Infatti, tutti i messaggeri in esame, in presenza dell'agente depolimerizzante, si dissociavano dalla rete citoscheletrica e migravano dalla frazione Ck a quella S. (Fig. 10B). La quantizzazione dei segnali ottenuti per ciascun trascritto ha mostrato che circa il 70% dei trascritti per le r-proteine citosoliche *L3*, *L4*, *L7a*, *L12* e *L15* risultava presente nella frazione S (Fig. 10C). I dati così ottenuti non solo confermano l'associazione dei messaggeri con il citoscheletro, ma indicano anche che i filamenti di actina giocano un ruolo essenziale nel mantenere un legame tra questi trascritti e il citoscheletro. E' ipotizzabile che tali microfilamenti prendano parte sia al trasporto che all'ancoraggio di questa classe di mRNA o che essi siano coinvolti in una sola delle tappe del processo di localizzazione. Alcuni dati, presenti in letteratura, indicano che i diversi elementi del citoscheletro possono prendere parte a diversi momenti della localizzazione di un trascritto. Ad esempio, in *Xenopus*, il trasporto di *Vg1* è mediato dai microtubuli, mentre il suo ancoraggio dai microfilamenti [Yisraeli et al., 1990]. Per valutare il ruolo dei microtubuli nella distribuzione asimmetrica degli mRNA per le r-proteine citosoliche è stato utilizzato, come agente depolimerizzante, il



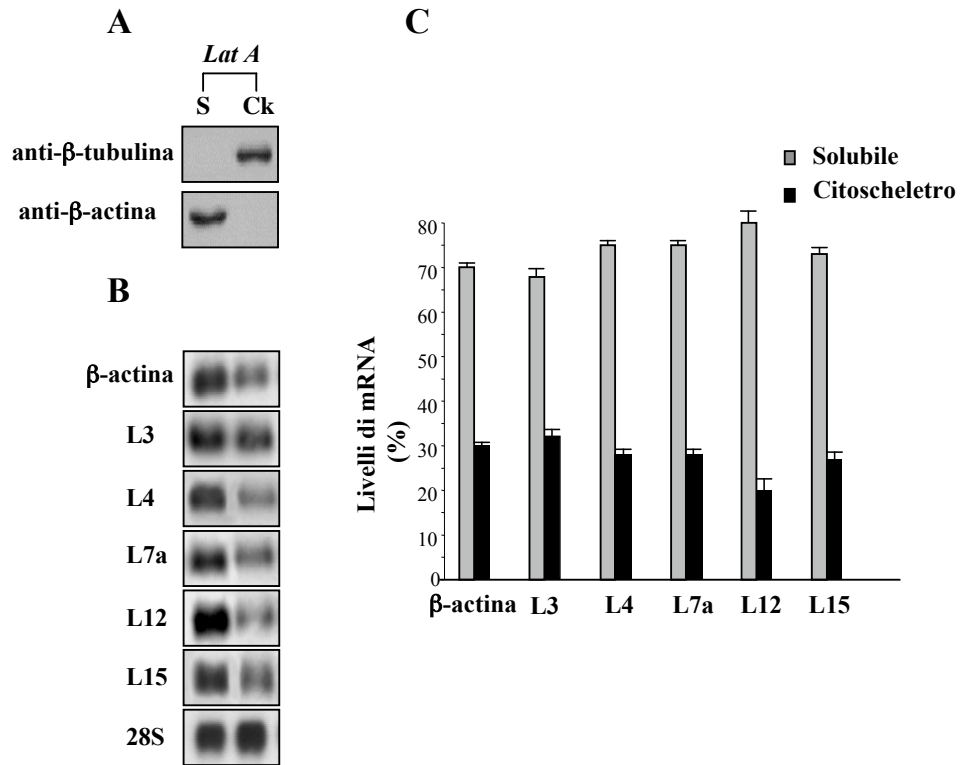


Figura 10. **I messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano specificamente ai microfilamenti di actina.** Cellule *HeLa* sono state incubate con *Lat A* e sottoposte a frazionamento biochimico per isolare la frazione solubile (S) e la frazione citoscheletrica (Ck), come descritto in Materiali e Metodi. **(A)** Western blotting delle proteine  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina nelle frazioni S e Ck. **(B)** Northern blotting dell'RNA totale, estratto da ciascuna frazione, come descritto nella leggenda della figura 8 (B). **(C)** Quantizzazione dei segnali di ibridazione condotta come descritto nella leggenda della figura 8 (C). I risultati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

*Nocodazolo (Noc)*. La dose di *Noc* impiegata negli esperimenti di frazionamento è stata quella suggerita in studi precedenti [Mallardo et al., 2001]. Pertanto, cellule *HeLa* sono state trattate con 40  $\mu$ M *Noc* e gli estratti proteici delle frazioni S e Ck, ottenute dopo frazionamento biochimico, sono stati analizzati per Western blotting. L'assenza del segnale della  $\beta$ -*tubulina* nella frazione Ck conferma l'azione disaggregante del *Noc* a carico dei microtubuli. Tuttavia, la presenza di un debole segnale della  $\beta$ -*actina* nella frazione S indica un'aspecificità d'azione del *Noc*, che comporta una parziale depolimerizzazione dei microfilamenti di actina (Fig. 11A). L'RNA totale, estratto da queste frazioni, è stato analizzato per Northern blotting e i risultati di questi esperimenti hanno mostrato che la depolimerizzazione dei microtubuli, indotta dal trattamento delle cellule con *Noc*, non ha causato una significativa redistribuzione dei messaggeri tra le frazioni (Fig. 11B). Lo spostamento di una piccola percentuale (10-15%) del segnale dei messaggeri per le r-proteine citosoliche in esame dalla frazione Ck a quella S sembra non essere dovuto alla disorganizzazione dei microtubuli, bensì alla parziale depolimerizzazione dei microfilamenti di actina, come suggerito dai risultati ottenuti mediante Western blotting. Questi dati indicano che la distribuzione dei messaggeri per le r-proteine citosoliche non richiede il coinvolgimento di microtubuli intatti.

#### *I messaggeri per le r-proteine sono associati ai polisomi*

Precedenti studi hanno dimostrato che alcune classi di mRNA, inclusi i messaggeri per le proteine nucleari *c-fos*, *c-myc*, *ciclina A* e *MT-I*, si associano ad una particolare popolazione di polisomi, i polisomi legati al citoscheletro (*CBP, Cytoskeletal-Bound Polysomes*) [Hovland et al., 1995; Mahon et al., 1997; Zambetti et al., 1990]. Inoltre, altri studi indicano che alcuni mRNA sono tradotti solo se correttamente localizzati [Lipshitz and Smibert, 2000] e che il blocco della

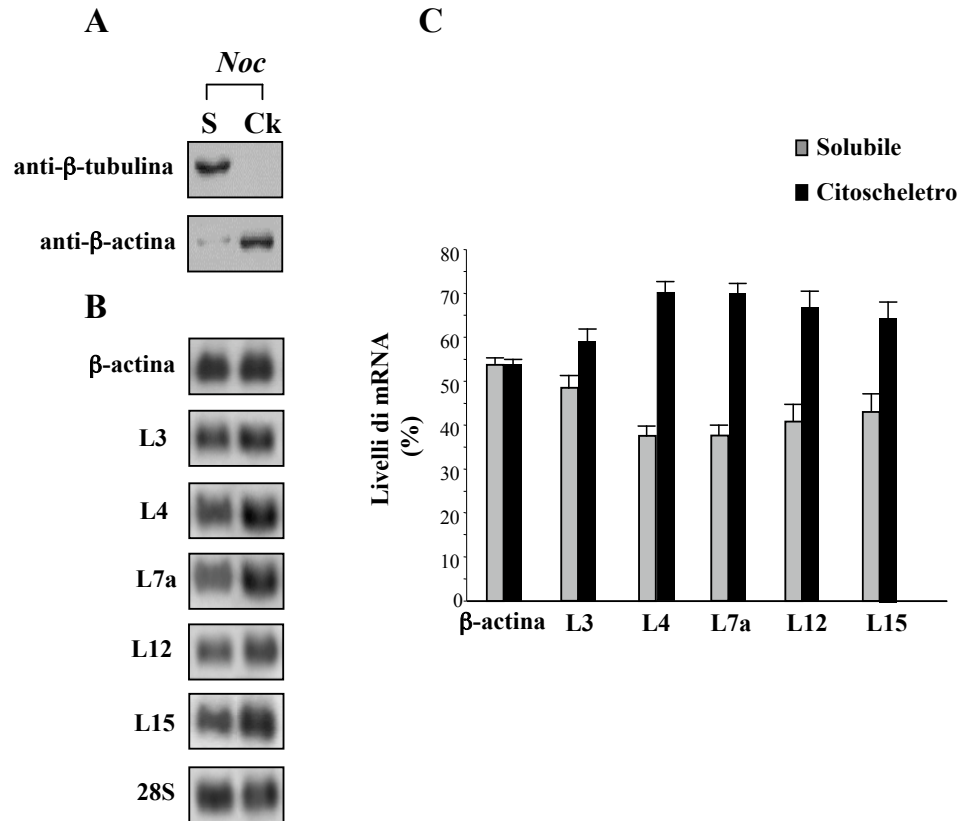


Figura 11. **La depolimerizzazione dei microtubuli non influenza la localizzazione dei messaggeri per le r-proteine citosoliche.** Cellule *HeLa* sono state incubate con *Noc* e successivamente sottoposte a frazionamento biochimico per separare la frazione solubile (S) e la frazione citoscheletrica (Ck), come descritto in Materiali e Metodi. **(A)** Western blotting per l'analisi della distribuzione delle proteine  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina fra le frazioni. **(B)** L'RNA totale, estratto da ciascuna frazione, è stato analizzato per Northern blotting, come descritto nella leggenda della figura 8 (B). **(C)** Quantizzazione dei segnali di ibridazione condotta come descritto nella leggenda della figura 8 (C). I risultati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

traduzione determina il rilascio non solo dei messaggeri ma anche dei polisomi dalla matrice cellulare [Ornelles et al., 1986]. Alla luce di queste osservazioni, per verificare se i polisomi possano fungere da collegamento tra i messaggeri per le r-proteine e il citoscheletro, è stato utilizzato un particolare inibitore della sintesi proteica, la puromicina. Questa molecola è in grado di indurre il rilascio del nascente polipeptide e la dissociazione dei messaggeri dai polisomi. Cellule *HeLa* sono state incubate con 100 µg/ml di puromicina, e frazionate biochimicamente per estrarre la frazione S e la frazione Ck. L'RNA totale, estratto da ciascuna frazione, è stato esaminato mediante esperimenti di Northern blotting. In studi precedenti è stato dimostrato che, in cellule *HeLa*, l'mRNA  $\beta$ -actina si associa ai polisomi legati al citoscheletro [Bird and Sells, 1986]. Lo spostamento del segnale della  $\beta$ -actina dalla frazione Ck a quella S, in presenza della puromicina, indica che la frazione Ck contiene non solo il citoscheletro ma anche i polisomi e conferma l'interazione fra il trascritto  $\beta$ -actina e i polisomi (Fig. 12A). L'analisi della ripartizione del messaggero per la r-proteina citosolica *L4*, come esempio di mRNA per r-proteine citosoliche, ha mostrato che gran parte del segnale di tale trascritto, e in misura maggiore (70%) rispetto al controllo (58-60%), risultava presente nella frazione S (Fig. 12B). L'inibizione della sintesi proteica potrebbe causare il rilascio degli mRNA normalmente associati al citoscheletro tramite i polisomi oppure interferire con la selettività del macchinario di trasporto di modo che i messaggeri normalmente associati alla rete citoscheletrica sono erroneamente trasportati in altre regioni subcellulari. Poco è noto sul macchinario di trasporto dei trascritti e i risultati ottenuti suggeriscono che la presenza dei polisomi nella matrice cellulare potrebbe servire da collegamento fra i messaggeri e il citoscheletro e garantire la traduzione delle classi di mRNA localizzati sul citoscheletro.

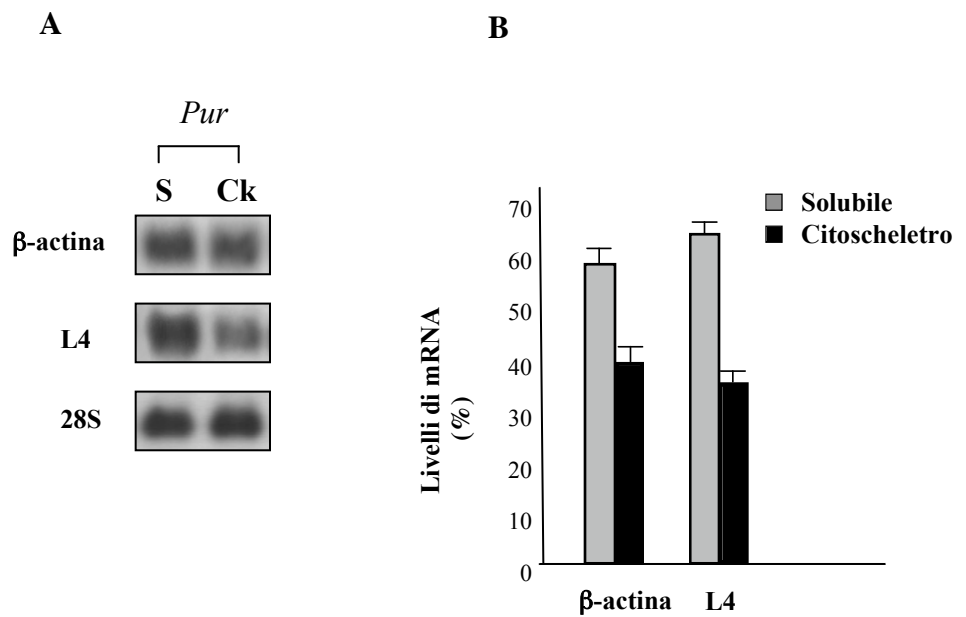


Figura 12. **I messaggeri per le r-proteine citosoliche si associano ai polisomi.** Cellule *HeLa* sono state incubate con 100  $\mu\text{g/ml}$  di puromicina (*Pur*) prima di essere sottoposte a frazionamento biochimico per isolare la frazione solubile (S) e la frazione citoscheletrica (Ck), come descritto in Materiali e Metodi. **(A)** L'RNA totale, estratto da ciascuna frazione, è stato analizzato per Northern Blotting, come descritto nella leggenda della figura 8 (B). **(B)** I livelli di RNA in ciascuna frazione sono stati misurati come descritto nella leggenda della figura 8 (C). I risultati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

*Distribuzione subcellulare degli mRNA codificanti per le r-proteine mitocondriali*

Precedenti studi sulla localizzazione degli mRNA in lievito hanno dimostrato che i trascritti mitocondriali, codificati dal nucleo, sono localizzati in prossimità dei mitocondri [Corral-Debrinski et al., 2000]. Tutte le r-proteine mitocondriali sono codificate dal genoma nucleare. Allo scopo di comprendere se i trascritti per tale classe di proteine non sono diffusi nel citoplasma, ma si accumulano piuttosto in specifiche regioni subcellulari, sono stati eseguiti esperimenti di frazionamento biochimico per separare la frazione citosolica (Cy) e la frazione mitocondriale (Mt) da cellule *HeLa*. L'RNA totale, estratto da ciascuna frazione, è stato analizzato per RT-PCR. Per verificare l'efficienza di frazionamento sono stati usati differenti controlli. Come *marker* della frazione Mt è stato utilizzato l'mRNA *COX II*, che codifica per la *citocromo ossidasi II*. Come precedentemente dimostrato, tale trascritto è risultato prevalentemente presente nella frazione Mt (Fig. 13A). Infatti, l'analisi densitometrica ha rilevato che circa l'85% del suo segnale è stato trovato in tale frazione e solo un piccolo segnale nella frazione Cy (Fig. 13B). Questi dati indicano che la frazione Mt è stata arricchita in mitocondri e che la frazione S contiene piccole contaminazioni della componente mitocondriale. Il messaggero  $\beta$ -actina e il trascritto per la r-proteina citosolica *L4* sono stati usati come controlli della frazione Cy. La presenza dei segnali di questi trascritti esclusivamente in tale frazione conferma, da un lato, la purezza della frazione Cy e, dall'altro, esclude un'eventuale contaminazione dei componenti solubili nella frazione Mt (Fig. 13A). L'analisi della distribuzione fra queste due frazioni degli mRNA per le r-proteine mitocondriali è stata condotta seguendo il profilo di distribuzione del trascritto per la r-proteina mitocondriale *S12*. Tale messaggero mostrava una ripartizione simile all'mRNA *COX II*. Di fatti, circa l'80% del contenuto totale di questo trascritto è risultato presente nella frazione Mt (Fig. 13B). Questi risultati suggeriscono che

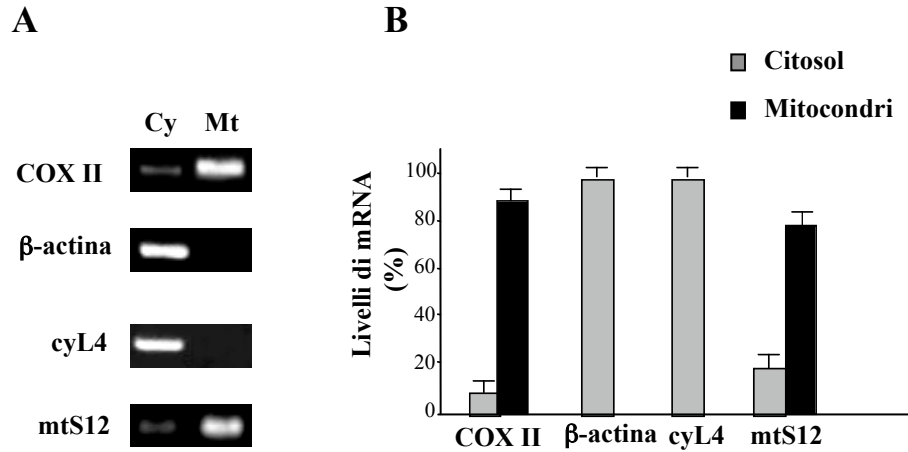


Figura 13. L'mRNA per la r-proteina mitocondriale *S12* si localizza in prossimità dei mitocondri. **(A)** Esempi di gel di agarosio, colorati con *Vista-Green*, che mostrano i prodotti di amplificazione, ottenuti mediante reazioni di RT-PCR da RNA totale estratto dalla frazione citosolica (Cy) e da quella mitocondriale (Mt), ottenute come descritto in Materiali e Metodi. I messengeri per le proteine  $\beta$ -actina e *cyL4*, e l'mRNA per *COX II* sono stati usati come controlli della frazione Cy e di quella Mt, rispettivamente. **(B)** I livelli dei trascritti in ciascuna frazione sono stati determinati come descritto nella leggenda della figura 8 (C). I risultati mostrati sono la media di quattro esperimenti indipendenti.

i messaggeri che codificano per le r-proteine mitocondriali esibiscono una localizzazione selettiva nel citoplasma e, in particolare, si localizzano in prossimità dei mitocondri.

*Il 3'UTR dei messaggeri per le r-proteine è necessario e sufficiente per localizzare un gene reporter*

La localizzazione della maggior parte degli mRNA in specifiche regioni subcellulari si basa su un meccanismo molecolare che coinvolge sequenze segnale presenti nei loro 3'UTR [Palacios and St Johnston, 2001]. Avendo dimostrato che i messaggeri per le r-proteine, citosoliche e mitocondriali, costituiscono una classe di messaggeri distribuiti asimmetricamente nel citoplasma, si è voluto investigare il meccanismo molecolare responsabile di questo selettivo posizionamento citoplasmatico. In particolare, allo scopo di individuare gli elementi *cis-acting* responsabili della preferenziale distribuzione dei messaggeri in esame, è stato analizzato il ruolo dei 3'UTR della r-proteina citosolica *L4* (*cyL4*) e di quella mitocondriale *S12* (*mtS12*). La strategia adottata per comprendere se tali regioni contenessero segnali di localizzazione citoscheletrica o mitocondriale è stata quella di dirigere un trascritto *reporter* verso il citoscheletro o il mitocondrio, inserendo a valle di questo il 3'UTR di *cyL4* o il 3'UTR di *mtS12*, rispettivamente. Come trascritto *reporter* è stato scelto l'mRNA per *GFP*, un messaggero che risulta diffuso nel citoplasma [Bermano et al., 2001]. Le regioni 3'UTR utilizzate sono state isolate mediante reazioni di RT-PCR (Fig. 14), usando come stampo l'RNA totale, estratto da cellula *HeLa*, e successivamente sono stati inseriti a valle del gene *GFP* per ottenere i costrutti chimerici *GFP/cyL4* e *GFP/mtS12* (Fig. 15A). Per l'analisi della distribuzione del trascritto *GFP/cyL4*, le cellule, transfettate in transiente con il costrutto *GFP/cyL4*, sono state frazionate biochimicamente per ottenere le frazione S e Ck. Le stesse cellule sono state transfettate in transiente



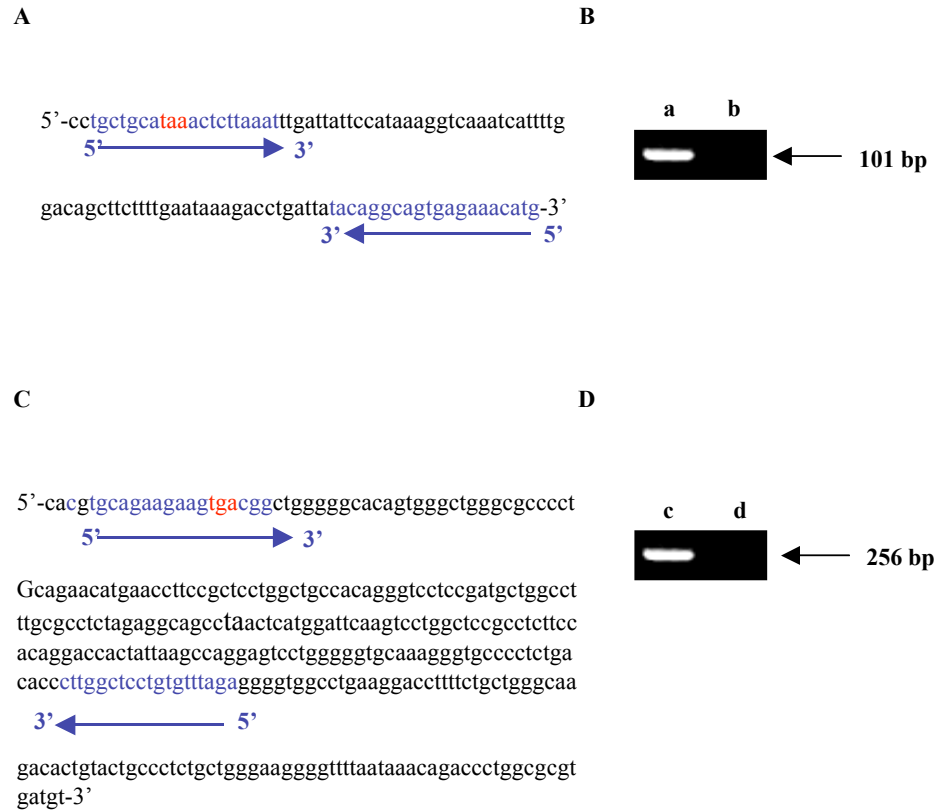
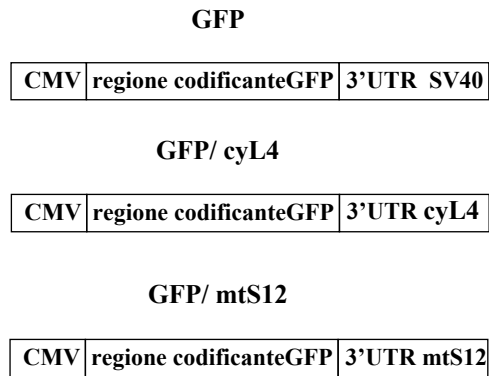


Figura 14. **Regioni 3'UTR dei messaggeri per la r-proteina citosolica *L4* e per quella mitocondriale *S12*.** Sequenza nucleotidica del 3'UTR dell'mRNA per la r-proteina citosolica *L4* (*cyL4*) (A), del 3'UTR dell'mRNA per la r-proteina mitocondriale *S12* (*mtS12*) (C) e rappresentazione schematica degli oligonucleotidi (tabella 3). (B, D) Esempi di gel di agarosio, colorati con etidio bromuro, che mostrano il prodotto di amplificazione di 110 bp (a), corrispondente al 3'UTR del trascritto per *cyL4* e di 256 bp (c), corrispondente al 3'UTR del messaggero per *mtS12*. In figura sono mostrati i bianchi delle reazioni (b, d).

con il costrutto *GFP/mtS12* e sottoposte a frazionamento biochimico per isolare le frazioni Cy e Mt, allo scopo di esaminare la ripartizione del corrispondente trascritto. L'RNA totale, estratto dalle varie frazioni, è stato analizzato per RT-PCR mediante l'uso di specifici oligonucleotidi (tabella 3). In questi esperimenti, l'analisi delle varie frazioni subcellulari ottenute, ha mostrato che in cellule transfettate con il costrutto controllo (*GFP*, Fig. 15A) non è stato osservato alcun segnale per *GFP* né nella frazione Ck né in quella Mt. Esso risultava presente invece nella frazione S e in quella Cy, confermando l'assenza di segnali di localizzazione citoscheletrici o mitocondriali nel trascritto (Fig. 15B). L'aggiunta del 3'UTR della *cyL4* all'mRNA *reporter* causava una profonda redistribuzione del corrispondente trascritto. Di fatto, questo messaggero chimerico risultava presente esclusivamente nella frazione Ck, indicando che il 3'UTR della *cyL4* contiene l'informazione essenziale per indirizzare il trascritto *reporter* al citoscheletro (Fig 15B). Le cellule transfettate con il costrutto chimerico *GFP/mtS12* mostravano che il corrispondente messaggero acquisiva la capacità di dirigersi in prossimità dei mitocondri accumulandosi nella frazione Mt (Fig. 15B). Questi risultati suggeriscono che anche negli mRNA per le r-proteine, citosoliche e mitocondriali, l'informazione *cis-acting* capace di guidare questi messaggeri verso il citoscheletro o il mitocondrio, risiede nella regione 3'UTR. Tutto ciò ha consentito di identificare un meccanismo di localizzazione comune ad entrambe le sottoclassi di messaggeri per le r-proteine, che coinvolge informazioni contenute nella stessa molecola del messaggero, che in termini di sequenza nucleotidica o di struttura, è responsabile di indirizzare un trascritto *reporter* verso il citoscheletro o il mitocondrio.

**A**



**B**

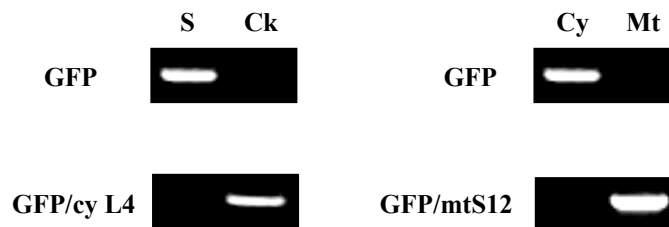
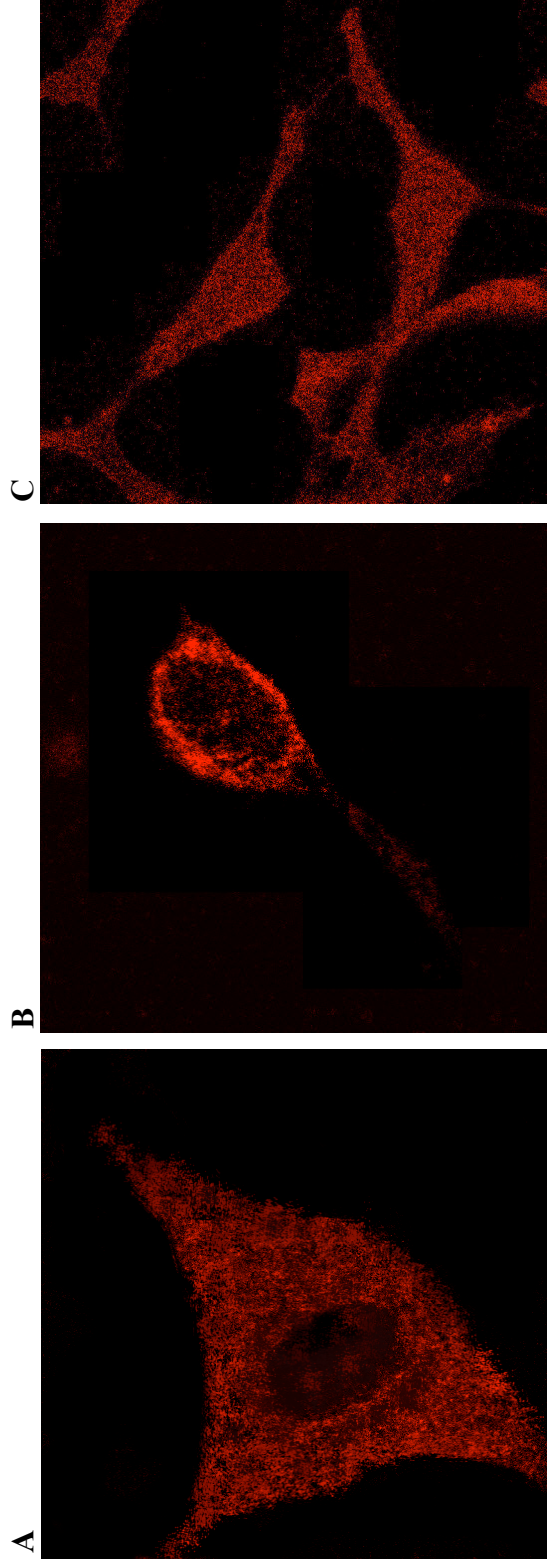


Figura 15. **Le regioni 3'UTR degli mRNA per le r-proteine sono necessari e sufficienti per dirigere l'mRNA *GFP* in una specifica regione subcellulare.** (A) Rappresentazione schematica dei costrutti studiati. In tutti i plasmidi il gene *GFP* è espresso sotto il controllo del promotore *CMV* e nei costrutti chimerici il 3'UTR del trascritto *SV40* è stato sostituito con il 3'UTR del messaggero per la r-proteina citosolica *L4* (*GFP/cyL4*) o con il 3'UTR del messaggero per la r-proteina mitocondriale *S12* (*GFP/mtS12*). (B) Cellule *HeLa* sono state transfettate in transiente con i costrutti descritti in (A) e l'RNA totale, estratto dalle frazioni solubile (S) e citoscheletrica (Ck), o dalle frazioni citosolica (Cy) e mitocondriale (Mt), è stato analizzato per RT-PCR con oligonucleotidi per *GFP* (tabella 3). In figura sono mostrati esempi di gel di agarosio, colorati con *Vista-Green*, che mostrano le bande corrispondenti al prodotto di amplificazione *GFP* per ogni frazione.

*Il 3'UTR del messaggero per la r-proteina citosolica L4 è responsabile del targeting di un gene reporter al citoplasma perinucleare*

Studi di localizzazione subcellulare hanno mostrato che alcuni messaggeri per le proteine nucleari, come *c-myc*, si accumulano nella regione perinucleare e tale localizzazione è funzionale al trasferimento nel nucleo della proteina appena sintetizzata [Hesketh et al., 1994]. Una delle risposte di una cellula ad uno stimolo di crescita è l'aumento immediato della sintesi di ribosomi [Thomas, 2000]; in queste condizioni le r-proteine di nuova sintesi devono essere rapidamente trasportate dal citoplasma al nucleo dove si associano agli RNA ribosomali per formare i ribosomi. Una localizzazione perinucleare dei messaggeri per le r-proteine citosoliche potrebbe favorire la sintesi delle corrispondenti proteine in questa sede e il loro successivo ingresso nel nucleo per funzionare nel processo di biosintesi dei ribosomi. Allo scopo di visualizzare la localizzazione spaziale dei messaggeri codificanti per tali proteine, è stato utilizzato come approccio sperimentale la tecnica dell'ibridazione *in situ*, che consente di individuare la localizzazione di molecole di RNA *in vivo*. Pertanto, cellule *HeLa*, transfettate in transiente con il costrutto *GFP/cyL4*, sono state fissate e ibridate con una sonda di RNA marcata con digossigenina, preparata mediante una reazione di trascrizione *in vitro*. Come stampo è stato usato il cDNA della regione codificante di *GFP*, in maniera da discriminare gli RNA transfettati da quelli endogeni. Questo inserto è stato subclonato nel vettore di trascrizione *pGEM4Z* e, sfruttando la presenza dei siti di riconoscimento per le polimerasi *T7* e *Sp6* fiancheggianti l'inserto, è stato sintetizzato il trascritto sia in orientamento senso (controllo negativo) che antisenso. L'utilizzo di sonde di RNA comporta la formazione di ibridi RNA-RNA molto stabili termodinamicamente e resistenti alla digestione enzimatica dell'*RNasi*. Tali caratteristiche hanno consentito di poter eseguire, dopo l'ibridazione, una digestione con questo enzima per ridurre i

segnali dovuti alle ibridazioni aspecifiche. La rivelazione dei segnali è stata ottenuta usando anticorpi contro digossigenina coniugati con rodamina e la microscopia confocale. Dall'analisi delle immagini è emerso che le cellule transfettate con il costrutto *GFP* mostravano una colorazione diffusa nel citoplasma, confermando i risultati ottenuti con il frazionamento biochimico (Fig. 16A); quelle transfettate con il costrutto *GFP/cyL4* e ibridate con la sonda *GFP* antisenso mostravano una redistribuzione del trascritto da una diffusa localizzazione citoplasmatica ad un'intenso accumulo perinucleare. Una specifica colorazione a forma di anello era chiaramente visibile intorno al nucleo con un minimo segnale di fondo nella periferia della cellula (Fig. 16B). Una colorazione minima e diffusa è stata osservata nelle cellule transfettate con lo stesso costrutto e ibridate con la sonda *GFP* nell'orientamento senso (Fig. 16C). Inoltre, l'analisi delle sezioni *z* del nucleo ha mostrato l'assenza di segnale in prossimità e all'interno del nucleo, confermando la specificità del segnale nella regione circostante il nucleo (Fig. 17). Questi risultati indicano che il 3'UTR della r-proteina citosolica *L4* contiene l'informazione essenziale per trasportare un trascritto chimerico nella regione perinucleare del citoplasma.



**Figura 16. Il 3'UTR del messaggero per la r-proteina citosolica L4 dirige un trascritto reporter alla regione perinucleare.** Cellule *HeLa* sono state transfettate in transiente con il costrutto *GFP* (A, controllo) e con *GFP/cyL4* (B) e i corrispondenti trascritti sono stati rivelati mediante esperimenti di ibridazione *in situ*, usando una sonda di RNA per *GFP* marcata con digossigenina nell'orientamento antisenso (A, B) e senso (C) e anticorpi contro digossigenina coniugati a rodamina. La distribuzione dei prodotti fluorescenti è stata analizzata mediante microscopia confocale. In figura sono mostrate le immagini delle sezioni *z* da 0.5  $\mu\text{m}$  delle cellule.

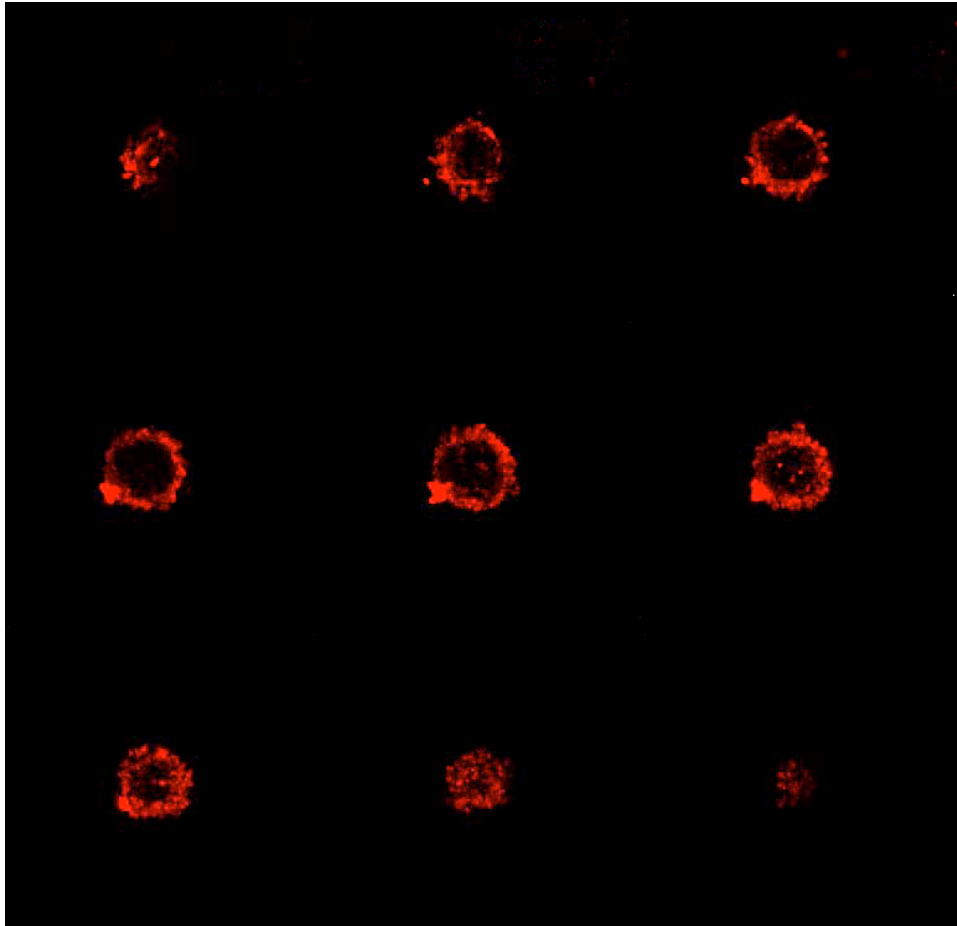


Figura 17. **Sezionamento ottico del campione mostrato in figura 9 (B).** Immagini al microscopio confocale delle sezioni  $z$  da  $0.5 \mu\text{m}$  del nucleo.

## **DISCUSSIONE**



La distribuzione asimmetrica di specifiche proteine in particolari compartimenti subcellulari costituisce un importante evento per la determinazione dell'asimmetria morfologica e funzionale della cellula. Il trasporto delle proteine dal sito di sintesi ai diversi distretti cellulari è stato ampiamente studiato e, nella maggior parte dei casi, è stato attribuito a sequenze segnali presenti nella catena polipeptidica [Chook and Blobel, 2001]. Ad esempio, le proteine che prendono parte ai diversi eventi nucleari, quali la trascrizione, lo *splicing*, la biogenesi dei ribosomi, raggiungono il nucleo guidate da segnali peptidici di localizzazione nucleare (*NLS*), in grado di interagire con il complesso macchinario di *import* nel nucleo. Le proteine mitocondriali, codificate dal genoma nucleare, possiedono un segnale di *import* mitocondriale nella regione amino-terminale del peptide, responsabile del loro ingresso nell'organello. Tuttavia, negli ultimi anni, è stato osservato in diversi organismi e tipi cellulari, un meccanismo di localizzazione proteica addizionale, che si realizza a livello post-trascrizionale, e per il quale la presenza di una proteina nel proprio sito di funzione è assicurata, oltre che da segnali presenti sulla molecola proteica, anche dalla disposizione spaziale delle rispettive molecole di RNA messaggero [Kloc et al., 2002]. Numerosi messaggeri cellulari non mostrano, infatti, una distribuzione omogenea nel citoplasma, ma si accumulano in distretti cellulari specifici, corrispondenti al sito funzionale delle rispettive proteine. La localizzazione di un trascritto risulta vantaggiosa rispetto a quella della corrispondente proteina, poiché una singola molecola di RNA può fungere da stampo per numerosi cicli di traduzione e garantire un'alta concentrazione della proteina al sito di funzione. Sebbene il processo di distribuzione subcellulare degli mRNA sia stato ampiamente studiato nei sistemi polarizzati, soprattutto per il ruolo che esso svolge nel determinare asimmetrie cellulari negli oociti e negli embrioni, pochi RNA localizzati sono stati identificati finora in cellule non polarizzate. Un

interessante modello per lo studio del posizionamento dei trascritti in tali cellule è rappresentato dai messaggeri per le r-proteine, citosoliche e mitocondriali. Di fatto, tali proteine, una volta codificate dal genoma nucleare, prendono parte ad un intenso traffico all'interno della cellula per raggiungere le regioni del citoplasma dove svolgono la loro funzione. Le r-proteine citosoliche, sintetizzate nel citoplasma, sono trasportate al nucleo per assemblarsi, nel nucleolo, con il nascente rRNA. Successivamente, le subunità ribosomali sono trasportate al citoplasma per funzionare nella biosintesi delle proteine. E' stato osservato che un trasporto veloce nel nucleo è molto importante dato che le r-proteine non assemblate risultano tossiche per la cellula e sono rapidamente degradate [Pierandrei-Amaldi et al., 1985]. Per queste ragioni, una localizzazione perinucleare degli mRNA per le r-proteine citosoliche potrebbe favorire un efficiente ingresso delle proteine neo-sintetizzate nel nucleo. D'altra parte, la biogenesi dei mitocondri necessita dell'espressione sia del genoma nucleare che di quello mitocondriale. Le r-proteine mitocondriali sono codificate dal nucleo e, appena sintetizzate, devono essere trasportate al mitocondrio prontamente e in sincronia con il processo di biogenesi dei mitocondri. E' probabile che, come ipotizzato per la controparte citosolica, anche i trascritti per le r-proteine mitocondriali si localizzino in prossimità dei mitocondri per assicurare la presenza dei corrispondenti polipeptidi nell'organello. Sebbene siano stati identificati diversi meccanismi molecolari per la localizzazione degli mRNA, la maggior parte dei trascritti si distribuisce nelle diverse regioni subcellulari utilizzando gli elementi del citoscheletro [Lipshitz and Smibert, 2000]. Tale associazione può risultare vantaggiosa per rendere più efficiente il movimento degli RNA e/o per ottenere un'efficiente sintesi delle proteine in compartimenti subcellulari specifici [Jansen, 1999]. Allo scopo di verificare se i messaggeri per le r-proteine non diffondano liberamente nel citoplasma, ma si associno preferenzialmente al citoscheletro, sono stati condotti esperimenti di frazionamento biochimico. Sono state così isolate una frazione solubile S, contenente

soprattutto componenti citosolici, e una frazione Ck arricchita in elementi del citoscheletro. L'analisi della distribuzione degli mRNA fra queste due frazioni ha dimostrato chiaramente che gli mRNA per le r-proteine citosoliche *L3*, *L4*, *L7a*, *L12* e *L15* sono asimmetricamente distribuiti nel citoplasma (Fig. 8A). In particolare, questa classe di messaggeri si accumula per circa il 70% nella frazione Ck (Fig. 8B). Per identificare la natura dei filamenti citoscheletrici coinvolti in tale associazione è stata utilizzata una strategia farmacologica, basata sull'uso di agenti in grado di destabilizzare selettivamente i componenti del citoscheletro, allo scopo di mimare il blocco del processo di localizzazione. La selettiva depolimerizzazione dei microfilamenti di actina ad opera della *Lat A* causa, infatti, una profonda redistribuzione dei trascritti in esame, che risulta nel loro rilascio dalla frazione Ck alla frazione S (Fig. 10B, C). Questi dati suggeriscono che la distribuzione intracellulare dei messaggeri per le r-proteine citosoliche richiede il coinvolgimento dei microfilamenti di actina. L'actina potrebbe costituire il motore responsabile per il trasporto di tali trascritti e/o il sistema di ancoraggio, capace di confinarli in una specifica regione del citoplasma. Il trattamento delle cellule con il *Noc*, invece, non causa la delocalizzazione dei messaggeri in esame (Fig. 11B, C), suggerendo che il trasporto e/o l'ancoraggio di tali mRNA non richiede il sistema dei microtubuli. Il trattamento della matrice cellulare con basse concentrazioni di detergente non ionico determina la rottura del citoscheletro e il rilascio non solo di componenti citoscheletrici e di RNA, ma anche di polisomi. Questi ultimi rappresentano una particolare classe di polisomi ricchi in messaggeri per molte proteine nucleari, quali *c-myc*, *MT-I*, *c-fos* [Dagleish et al., 2001; Hesketh et al., 1994; Mahon et al., 1997]. È stato dimostrato che, durante il trasporto, l'RNA è impacchettato in particelle ribonucleoproteiche ed è in uno stato traduzionalmente represso per evitare l'inappropriata sintesi proteica. In alcuni casi, questi complessi macromolecolari contengono, oltre all'RNA e specifiche proteine che legano l'RNA, anche componenti

dell'apparato traduzionale, che possono essere rilasciati con l'RNA una volta raggiunto il sito di localizzazione [Barbarese et al., 1995]. Alla luce di queste osservazioni, l'associazione dei messaggeri per le r-proteine citosoliche al citoscheletro potrebbe risultare funzionale per la loro traduzione. Per comprendere se nell'associazione fra tali mRNA e il citoscheletro fossero coinvolti anche i polisomi, sono stati condotti esperimenti di frazionamento biochimico in presenza di puomicina. L'analisi della distribuzione del messaggero per la r-proteina citosolica *L4* fra la frazione S e quella Ck, mostra che, in tali condizioni sperimentali, il trascritto in esame si accumula in modo preferenziale nella frazione S (Fig. 12A, B). Questi risultati suggeriscono che la classe di polisomi legati al citoscheletro possa fungere da ancora, collegando alcuni mRNA alla rete citoscheletrica, e intervenire nella loro traduzione *in loco*. Nei mammiferi, il DNA mitocondriale codifica per tredici polipeptidi essenziali per la catena respiratoria e il sistema di fosforilazione ossidativa, mentre la maggior parte delle proteine mitocondriali sono codificate dal genoma nucleare e importate nel mitocondrio dal cytosol. L'ingresso delle proteine citosoliche nell'organello è un processo molto complesso e richiede differenti meccanismi. Molte proteine, destinate al mitocondrio, possiedono un segnale di *targeting* mitocondriale (*MTS*, *Mitochondrial Targeting Signal*), localizzato di solito nella regione amino-terminale del peptide, noto come peptide *leader*, che viene scisso all'interno dell'organello per rilasciare la proteina matura [Pfanter, 2000]. Negli ultimi anni, numerosi dati sono stati accumulati riguardo un gran numero di proteine mitocondriali, codificate dal nucleo, le quali non sono trasportate al mitocondrio dopo la traduzione, ma piuttosto sono traslocate nell'organello in contemporanea al processo di traduzione [Ni et al., 1999; Nobumoto et al., 1998]. A questo proposito, precedenti studi hanno dimostrato che la superficie esterna dei mitocondri, isolati da lieviti trattati con inibitori della sintesi proteica, è ricoperta di polisomi citoplasmatici arricchiti in trascritti codificanti per proteine mitocondriali. Complessivamente questi dati hanno

consentito di ipotizzare che gli mRNA per le r-proteine mitocondriali, appena sintetizzati nel nucleo, non diffondono nel citoplasma, ma si posizionano specificamente nella periferia mitocondriale. L'analisi della distribuzione del messaggero per la r-proteina mitocondriale *S12* fra la frazione Cy, contenente soprattutto componenti citosolici, e la frazione Mt, arricchita in mitocondri, ha dimostrato che tale messaggero non si ripartisce in maniera simmetrica tra le due frazioni, bensì si localizza preferenzialmente in prossimità del mitocondrio (Fig. 13A, B). La presenza di specifici mRNA nella frazione citoscheletrica o in quella mitocondriale richiede un meccanismo in grado di dirigere le molecole di RNA a questi specifici compartimenti piuttosto che in altre regioni subcellulari. È stato precedentemente osservato che alcuni mRNA esogeni, microiniettati negli oociti, venivano correttamente localizzati, indicando che l'informazione necessaria era contenuta nella molecola dell'RNA [Yisraeli and Melton, 1988]. Inoltre, l'analisi dei segnali che mediano il processo di localizzazione di diversi trascritti ha rivelato che il 3'UTR costituisce la regione contenente le sequenze *cis-acting* coinvolte nel *targeting* della maggior parte dei trascritti [Bashirullah et al., 1998]. Per esempio, il 3'UTR della *MT-I* può dirigere un mRNA *reporter* al citoscheletro perinucleare [Mahon et al., 1997] e, nel lievito, il 3'UTR di *ATP2* è essenziale nell'indirizzare un trascritto chimerico al mitocondrio [Margeot et al., 2002]. Pertanto, per comprendere se la localizzazione dei messaggeri per le r-proteine dipendesse da sequenze segnali è stato analizzato il ruolo dei loro 3'UTR. La strategia utilizzata è stata quella di verificare se i 3'UTR dei trascritti in esame contenessero specifiche informazioni capaci di modificare il profilo di localizzazione di un mRNA *reporter*. A tale scopo, sono stati generati costrutti chimerici, contenenti il 3'UTR di *cyL4* o quello di *mtS12*, inseriti a valle del gene *GFP* (Fig. 14, 15A). Le cellule, transfettate in transiente, sono state poi frazionate biochimicamente. L'analisi per RT-PCR delle varie frazioni mostra che l'aggiunta del 3'UTR di *mtS12* guida l'mRNA *GFP* in prossimità del mitocondrio, mentre

l'informazione contenuta nel 3'UTR della *cyL4* destina lo stesso mRNA al citoscheletro (Fig. 15 B). Questi dati suggeriscono che i 3'UTR degli mRNA per le r-proteine contengono sequenze segnali capaci di dirigere un trascritto alla sua finale destinazione. I 3'UTR di alcuni messaggeri codificanti per le proteine nucleari, come *c-myc* e *MT-I*, sono responsabili dell'associazione di tali messaggeri con il citoscheletro perinucleare e che tale localizzazione risulta funzionale al trasferimento nel nucleo delle proteine appena sintetizzate [Hesketh et al., 1994; Mahon et al., 1997]. I dati ottenuti sono in linea con queste evidenze sperimentali e permettono di ipotizzare che le r-proteine citosoliche, non sono prima sintetizzate nel citoplasma per poi raggiungere il nucleo, piuttosto si originano dalla traduzione dei corrispondenti messaggeri correttamente localizzati sul citoscheletro perinucleare. Tale ipotesi è stata verificata da esperimenti di ibridazione *in situ*. In particolare, nelle cellule *HeLa* transfettate in transiente con il costrutto *GFP/cyL4*, in cui il trascritto *GFP* era fuso al 3'UTR della *cyL4*, il corrispondente messaggero chimerico si accumula specificamente nella regione perinucleare (Fig. 16B). L'analisi al microscopio confocale delle sezioni *z* del nucleo esclude la presenza di segnale aspecifico all'interno del nucleo e nella periferia della cellula, confermando la specificità del segnale (Fig. 17). L'esatto meccanismo molecolare con cui si realizza la distribuzione asimmetrica degli mRNA per le r-proteine non è ancora noto. E' probabile che le regioni 3'UTR dei trascritti in esame assumano strutture secondarie, riconosciute da specifiche proteine *trans-acting*, direttamente o mediante particolari strutture subcellulari, quali gli elementi del citoscheletro. Nel tentativo di definire un motivo strutturale conservato, coinvolto nel *targeting* dei messaggeri per le r-proteine, sono stati condotti studi di predizione di strutture secondarie dei 3'UTR di diversi trascritti per r-proteine [Zuker, 1989]. Sebbene da questa analisi non è emersa alcuna sequenza *consensus*, la struttura secondaria predetta di una piccola regione del 3'UTR di *mtS12* (dal nucleotide 956 al nucleotide 976) ha mostrato la formazione di una

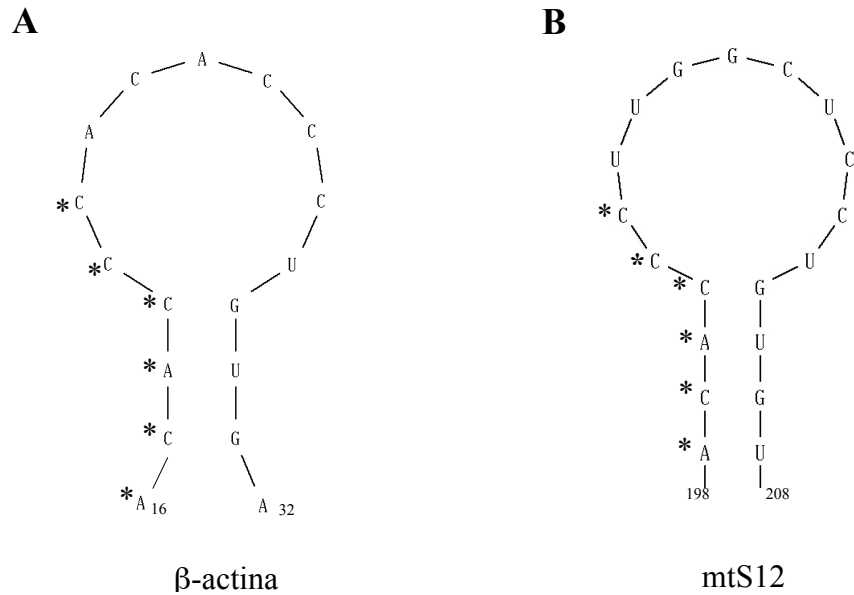


Figura 18. **Strutture secondarie predette del 3'UTR dei messaggeri  $\beta$ -actina e mtS12 [Zuker, 1989]. (A) struttura secondaria di una regione della *zip-code* del trascritto  $\beta$ -actina di pollo, che mostra la sequenza *consensus* prossimale ACACCC [Ross et al., 1997]. (B) Struttura secondaria di una regione del 3'UTR del messaggero mtS12 umano. I nucleotii sono numerati a partire dal codone di terminazione.**

struttura *stem-loop*, contenente la sequenza *consensus* prossimale ACACCC del trascritto  $\beta$ -actina di pollo (Fig. 18). Questa sequenza è stata proposta essere essenziale per l'associazione dell'mRNA  $\beta$ -actina con il citoscheletro e anche per il suo trasporto dal nucleo al citoplasma [Ross et al., 1997]. In base a tali osservazioni, è ipotizzabile che questa sequenza possa anche essere usata dai messaggeri per le r-proteine mitocondriali per interagire con gli elementi del citoscheletro e/o come segnale di *export* nucleare. Ulteriori esperimenti sono richiesti per identificare le proteine *trans-acting*, coinvolte nel processo di localizzazione di questa classe di messaggeri e caratterizzare nel dettaglio il meccanismo molecolare. L'insieme dei risultati presentati in questa tesi consente di formulare alcune ipotesi sul significato biologico della distribuzione asimmetrica dei messaggeri per le r-proteine nel citoplasma. La localizzazione degli mRNA risulta spesso ridondante con segnali di trasporto proteici che dirigono la proteina verso lo stessa regione subcellulare. Un chiaro esempio di ridondanza fra segnali di localizzazione del trascritto e della proteina è dato da *Prospero*, un fattore di trascrizione che nella più piccola delle due cellule figlie, prodotte dall'asimmetria cellulare dei neuroblasti, è richiesto per la differenziazione della GMC (*Ganglion Mother Cell*) [Li et al., 1997]. In altri casi, però, la distribuzione intracellulare del trascritto non coincide con la localizzazione della proteina e ciò è quanto i dati raccolti in questa tesi sembrano suggerire per i messaggeri per le r-proteine. Gli mRNA per le r-proteine citosoliche, una volta trascritti nel nucleo, guidati dall'informazione contenuta nel proprio 3'UTR, sono trasportati lungo i microfilamenti di actina verso la regione perinucleare. Tale selettiva localizzazione potrebbe risultare funzionale per rendere l'ingresso delle neosintetizzate proteine nel nucleo più veloce ed efficiente. Successivamente, i trascritti, ancorati al citoscheletro perinucleare, potrebbero servire da stampo per diversi cicli di traduzione dalla classe di polisomi associati al citoscheletro (*CBP*) [Moss et al., 1994]. Alti livelli delle corrispondenti proteine, dirette dal loro segnale di



localizzazione nucleare (*NLS, nuclear localization sequences*), e poi nucleolare (*NOS, nucleolar localization sequences*), potrebbero entrare nel nucleo e, da qui nel nucleolo, per funzionare nel processo di biogenesi dei ribosomi. D'altra parte, la specifica distribuzione subcellulare degli mRNA per le r-proteine mitocondriali potrebbe avere un ruolo nella biogenesi dei mitocondri. Questo complesso processo richiede l'espressione concertata del genoma nucleare e di quello mitocondriale. I trascritti di geni nucleari destinati ai mitocondri, una volta abbandonato il nucleo, si dirigono verso l'organello e possono essere tradotti prima dell'ingresso nel mitocondrio su polisomi liberi nel citosol oppure su polisomi associati alla membrana esterna dell'organello. Recentemente, è stato dimostrato che una sequenza di 100 nucleotidi nel 3'UTR di *ATP2* è essenziale per il proprio *targeting* ai polisomi associati ai mitocondri [Margeot et al., 2002]. Inoltre, sulla membrana esterna del mitocondrio è stata identificata una proteina chinasi di ancoraggio, *AKAP121 (A-Kinase Anchor Protein 121)*, capace di legarsi ai 3'UTR di due mRNA di origine nucleare, che codificano per proteine mitocondriali: il trascritto che codifica per la subunità *Fo-f* della *ATP sintetasi* mitocondriale e l'mRNA della *MnSOD* [Ginsberg et al., 2003]. Sebbene dalla comparazione delle sequenze nucleotidiche tra questi 3'UTR e quello del messaggero per la proteina ribosomale mitocondriale *S12* non è emersa alcuna omologia, queste e le precedenti osservazioni ci consentono di ipotizzare che i trascritti per le r-proteine mitocondriali, una volta giunti in prossimità dell'organello, indirizzati dalla sequenza segnale presente nel 3'UTR, potrebbero essere ancorati da un fattore proteico presente sulla membrana mitocondriale esterna, con funzione simile a quella svolta da *AKAP121*, tradotti e contemporaneamente traslocati nel mitocondrio guidati dal classico segnale di localizzazione mitocondriale, presente nella regione amminotermine della corrispondente proteina. La presenza dei messaggeri per le r-proteine mitocondriali in prossimità dell'organello potrebbe far parte del

controllo dell'attività mitocondriale. Infatti, questa selettiva localizzazione potrebbe efficientemente rispondere alla necessità che le r-proteine mitocondriali hanno di entrare nell'organello per garantire la biosintesi delle proteine codificate dal genoma mitocondriale, indispensabili per il corretto assemblaggio e funzionamento dell'organello. Inoltre, alcune alterazioni dell'apparato traduzionale del mitocondrio sembrano essere responsabili di molti stati patologici. Ad esempio, la mutazione di un allele del gene nucleare per la r-proteina mitocondriale *S12* in *Drosophila* comporta ritardo dello sviluppo, anomalie del corteggiamento, difetti della risposta al suono, e costituisce un buon modello per lo studio di tali disordini nell'uomo [Toivonen et al., 2001]. Tuttavia il meccanismo molecolare responsabile di questi disturbi non è ancora stato identificato. La delucidazione dei meccanismi che regolano l'espressione delle proteine mitocondriali potrebbe contribuire alla comprensione della patogenesi e offrire bersagli molecolari per eventuali terapie farmacologiche. Inoltre, negli eucarioti, la biosintesi dei ribosomi, nel nucleolo e nel mitocondrio, richiede quantità equimolari di proteine e RNA ribosomali, che sono omeostaticamente controllate da una complessa regolazione dei geni per le r-proteine a differenti livelli della loro espressione. Sebbene il controllo trascrizionale abbia un ruolo centrale in questa regolazione, recenti evidenze hanno dimostrato che alcune r-proteine regolano post-trascrizionalmente l'espressione dei propri geni, modulando la produzione di trascritti alternativi che sono bersaglio del meccanismo *NMD* (*Non-sense Mediated Decay*) [Mitrovich and Anderson, 2000][Cuccurese et al., dati non ancora pubblicati]. A livello traduzionale, i messaggeri per le r-proteine sono regolati in risposta allo stato di crescita o alla stimolazione fisiologica [Kaspar et al., 1992; Loreni and Amaldi, 1992]. Di fatto, l'analisi della transizione di diversi tipi cellulari tra stato di crescita e di non-crescita, in risposta a vari stimoli fisiologici, mostra lo spostamento dei messaggeri per le r-proteine dai polisomi, in cellule in rapida crescita, a particelle mRNP, in cellule quiescenti

[Loreni et al., 1993]. I meccanismi molecolari alla base di questo controllo traduzionale non sono ancora completamente chiariti, ma l'indicazione sperimentale che alcuni messaggeri sono tradotti solo se correttamente localizzati [Palacios and St Johnston, 2001] suggerisce che la particolare organizzazione spaziale dei messaggeri per le r-proteine e la loro traduzione *in loco* possano offrire un addizionale stadio di controllo nella complessa regolazione della loro espressione a livello post-trascrizionale. Tale controllo risulterebbe al tempo stesso spaziale e temporale, in quanto la molecola proteica verrebbe non solo prodotta nel sito in cui svolge la propria funzione, ma anche sintetizzata in risposta alle esigenze della cellula nei diversi momenti della sua vita.

In conclusione, in questo lavoro di tesi è stato dimostrato che: gli mRNA che codificano per le r-proteine citosoliche si associano al citoscheletro perinucleare mediante i microfilamenti di actina; gli mRNA che codificano per le r-proteine mitocondriali si accumulano in prossimità dei mitocondri; i messaggeri per le r-proteine, citosoliche e mitocondriali, si distribuiscono asimmetricamente nel citoplasma attraverso un meccanismo molecolare che coinvolge sequenze segnale presenti nella regione 3'UTR. Gli obiettivi futuri sono rivolti all'identificazione dei componenti molecolari che contribuiscono ai diversi aspetti del processo di localizzazione dei messaggeri, allo scopo di caratterizzare in dettaglio il meccanismo molecolare per comprendere in pieno il significato biologico di questo importante evento cellulare.

## **BIBLIOGRAFIA**

Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH (1997): Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* 138:1077-87.

Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E, Carson JH (1993): Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123:431-41.

Antic D, Keene JD (1998): Messenger ribonucleoprotein complexes containing human ELAV proteins: interactions with cytoskeleton and translational apparatus. *J Cell Sci* 111 ( Pt 2):183-97.

Barbarese E, Koppel DE, Deutscher MP, Smith CL, Ainger K, Morgan F, Carson JH (1995): Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J Cell Sci* 108 ( Pt 8):2781-90.

Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD (1998): RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67:335-94.

Bassell GJ, Zhang H, Byrd AL, Femino AM, Singer RH, Taneja KL, Lifshitz LM, Herman IM, Kosik KS (1998): Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18:251-65.

Bergsten SE, Gavis ER (1999): Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development* 126:659-69.

Bermano G, Shepherd RK, Zehner ZE, Hesketh JE (2001): Perinuclear mRNA localisation by vimentin 3'-untranslated region requires a 100 nucleotide sequence and intermediate filaments. *FEBS Lett* 497:77-81.

Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM (1998): Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 2:437-45.

Bird RC, Sells BH (1986): Cytoskeleton involvement in the distribution of mRNP complexes and small cytoplasmic RNAs. *Biochim Biophys Acta* 868:215-25.

Bobola N, Jansen RP, Shin TH, Nasmyth K (1996): Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84:699-709.

Breitweiser W, Markussen FH, Horstmann H, Ephrussi A (1996): Oskar protein interaction with VASA represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev* 10:2179-88.

Bubunenko M, Kress TL, Vempati UD, Mowry KL, King ML (2002): A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 248:82-92.

Bullock SL, Ish-Horowicz D (2001): Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature* 414:611-6.

Burd CG, Dreyfuss G (1994): Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265:615-21.

Chan AP, Kloc M, Etkin LD (1999): *fatvg* encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 126:4943-53.

Chartrand P, Meng XH, Singer RH, Long RM (1999): Structural elements required for the localization of *ASH1* mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol* 9:333-6.

Chartrand P, Singer RH, Long RM (2001): RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:297-310.

Chook YM, Blobel G (2001): Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11:703-15.

Colon-Ramos DA, Salisbury JL, Sanders MA, Shenoy SM, Singer RH, Garcia-Blanco MA (2003): Asymmetric distribution of nuclear pore complexes and the cytoplasmic localization of *beta2-tubulin* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Dev Cell* 4:941-52.

Corral-Debrinski M, Blugeon C, Jacq C (2000): In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of *ATM1* is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* 20:7881-92.

Crucis S, Chatterjee S, Gavis ER (2000): Overlapping but distinct RNA elements control repression and activation of *nanos* translation. *Mol Cell* 5:457-67.

Dalgleish G, Veyrune JL, Blanchard JM, Hesketh J (2001): mRNA localization by a 145-nucleotide region of the *c-fos* 3'-untranslated region. Links to translation but not stability. *J Biol Chem* 276:13593-9.

Daneholt B (1997): A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88:585-8.

Deshler JO, Highett MI, Abramson T, Schnapp BJ (1998): A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol* 8:489-96.

Ding D, Lipshitz HD (1993): Localized RNAs and their functions. *Bioessays* 15:651-8.

Ephrussi A, Lehmann R (1992): Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358:387-92.

Epstein E, Sela-Brown A, Ringel I, Kilav R, King SM, Benashski SE, Yisraeli JK, Silver J, Naveh-Many T (2000): Dynein light chain binding to a 3'-untranslated sequence mediates parathyroid hormone mRNA association with microtubules. *J Clin Invest* 105:505-12.

Farina KL, Singer RH (2002): The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol* 12:466-72.

Ferrandon D, Elphick L, Nusslein-Volhard C, St Johnston D (1994): Stauf protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-32.

Gavis ER, Curtis D, Lehmann R (1996): Identification of cis-acting sequences that control nanos RNA localization. *Dev Biol* 176:36-50.

Ginsberg MD, Feliciello A, Jones JK, Avvedimento EV, Gottesman ME (2003): PKA-dependent binding of mRNA to the mitochondrial AKAP121 protein. *J Mol Biol* 327:885-97.

Gonzalez I, Buonomo SB, Nasmyth K, von Ahsen U (1999): ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* 9:337-40.

Gramolini AO, Belanger G, Jasmin BJ (2001): Distinct regions in the 3' untranslated region are responsible for targeting and stabilizing utrophin transcripts in skeletal muscle cells. *J Cell Biol* 154:1173-83.

Gu W, Pan F, Zhang H, Bassell GJ, Singer RH (2002): A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol* 156:41-51.

Havin L, Git A, Elisha Z, Oberman F, Yaniv K, Schwartz SP, Standart N, Yisraeli JK (1998): RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev* 12:1593-8.

Hays T, Karess R (2000): Swallowing dynein: a missing link in RNA localization? *Nat Cell Biol* 2:E60-2.

Heasman J, Wessely O, Langland R, Craig EJ, Kessler DS (2001): Vegetal localization of maternal mRNAs is disrupted by VegT depletion. *Dev Biol* 240:377-86.

Hesketh J, Campbell G, Piechaczyk M, Blanchard JM (1994): Targeting of c-myc and beta-globin coding sequences to cytoskeletal-bound polysomes by c-myc 3' untranslated region. *Biochem J* 298 ( Pt 1):143-8.

Hesketh JE, Pryme IF (1991): Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. *Biochem J* 277 ( Pt 1):1-10.

Hoek KS, Kidd GJ, Carson JH, Smith R (1998): hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* 37:7021-9.

Hovland R, Campbell G, Pryme I, Hesketh J (1995): The mRNAs for cyclin A, c-myc and ribosomal proteins L4 and S6 are associated with cytoskeletal-bound polysomes in HepG2 cells. *Biochem J* 310 ( Pt 1):193-6.

Jansen RP (1999): RNA-cytoskeletal associations. *Faseb J* 13:455-66.

Jansen RP (2001): mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:247-56.

Januschke J, Gervais L, Dass S, Kaltschmidt JA, Lopez-Schier H, St Johnston D, Brand AH, Roth S, Guichet A (2002): Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr Biol* 12:1971-81.

Job C, Eberwine J (2001): Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat Rev Neurosci* 2:889-98.

Kaspar RL, Kakegawa T, Cranston H, Morris DR, White MW (1992): A regulatory cis element and a specific binding factor involved in the mitogenic control of murine ribosomal protein L32 translation. *J Biol Chem* 267:508-14.

Kelley RL (1993): Initial organization of the *Drosophila* dorsoventral axis depends on an RNA-binding protein encoded by the squid gene. *Genes Dev* 7:948-60.

Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, Taneja KL (1993): Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol* 123:165-72.

Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH (1994): Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* 127:441-51.

Kloc M, Bilinski S, Chan AP, Allen LH, Zearfoss NR, Etkin LD (2001): RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol* 203:63-91.



Kloc M, Zearfoss NR, Etkin LD (2002): Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108:533-44.

Lantz V, Schedl P (1994): Multiple cis-acting targeting sequences are required for orb mRNA localization during *Drosophila* oogenesis. *Mol Cell Biol* 14:2235-42.

Levadoux M, Mahon C, Beattie JH, Wallace HM, Hesketh JE (1999): Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. *J Biol Chem* 274:34961-6.

Li P, Yang X, Wasser M, Cai Y, Chia W (1997): Inscuteable and Staufien mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90:437-47.

Lipshitz HD, Smibert CA (2000): Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10:476-88.

Litman P, Barg J, Rindzoonski L, Ginzburg I (1993): Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* 10:627-38.

Litman P, Behar L, Elisha Z, Yisraeli JK, Ginzburg I (1996): Exogenous tau RNA is localized in oocytes: possible evidence for evolutionary conservation of localization mechanisms. *Dev Biol* 176:86-94.

Liu G, Edmonds BT, Condeelis J (1996): pH, EF-1alpha and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 6:168-71.

Long RM, Gu W, Meng X, Gonsalvez G, Singer RH, Chartrand P (2001): An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol* 153:307-18.

Lopez de Heredia M, Jansen RP (2004): mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 16:80-5.

Loreni F, 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* 205:1027-32.

Loreni F, Francesconi A, Amaldi F (1993): Coordinate translational regulation in the syntheses of elongation factor 1 alpha and ribosomal proteins in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* 21:4721-5.

MacDonald PM (1990): bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* 110:161-71.

Mahon P, Partridge K, Beattie JH, Glover LA, Hesketh JE (1997): The 3' untranslated region plays a role in the targeting of metallothionein-I mRNA to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. *Biochim Biophys Acta* 1358:153-62.

Mallardo M, Schleich S, Krijnse Locker J (2001): Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol Biol Cell* 12:3875-91.

Margeot A, Blugeon C, Sylvestre J, Vialette S, Jacq C, Corral-Debrinski M (2002): In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *Embo J* 21:6893-904.

Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL (1997): A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev* 11:1023-36.

Mitrovich QM, Anderson P (2000): Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Dev* 14:2173-84.

Moss R, Pryme IF, Vedeler A (1994): Free, cytoskeletal-bound and membrane-bound polysomes isolated from MPC-11 and Krebs II ascites cells differ in their complement of poly(A) binding proteins. *Mol Cell Biochem* 131:131-9.

Mowry KL, Cote CA (1999): RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *Faseb J* 13:435-45.

Mowry KL, Melton DA (1992): Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* 255:991-4.

Munro TP, Magee RJ, Kidd GJ, Carson JH, Barbarese E (1999): Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J Biol Chem* 274:34389-95.

Ni L, Heard TS, Weiner H (1999): In vivo mitochondrial import. A comparison of leader sequence charge and structural relationships with the in vitro model resulting in evidence for co-translational import. *J Biol Chem* 274:12685-91.

Nobumoto M, Yamada M, Song S, Inouye S, Nakazawa A (1998): Mechanism of mitochondrial import of adenylate kinase isozymes. *J Biochem (Tokyo)* 123:128-35.

Nusslein-Volhard C, Frohnhofer HG, Lehmann R (1987): Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238:1675-81.

Oleynikov Y, Singer RH (2003): Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13:199-207.

Ornelles DA, Fey EG, Penman S (1986): Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol Cell Biol* 6:1650-62.

Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, Kennedy MB (1999): Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:7823-33.

Palacios IM, St Johnston D (2001): Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:569-614.

Pfanner N (2000): Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol* 10:R412-5.

Pierandrei-Amaldi P, Campioni N, Gallinari P, Beccari E, Bozzoni I, Amaldi F (1985): Ribosomal-protein synthesis is not autogenously regulated at the translational level in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 107:281-9.

Raff JW, Whitefield WG, Glover DM (1990): Two distinct mechanisms localise cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. *Development* 110:1249-61.

Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997): Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17:2158-65.

Schnorrer F, Bohmann K, Nusslein-Volhard C (2000): The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat Cell Biol* 2:185-90.

Serano TL, Cohen RS (1995): A small predicted stem-loop structure mediates oocyte localization of *Drosophila* K10 mRNA. *Development* 121:3809-18.

Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989): Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13:127-44.

St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C (1991): Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66:51-63.

Sundell CL, Singer RH (1991): Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* 253:1275-7.

Sylvestre J, Margeot A, Jacq C, Dujardin G, Corral-Debrinski M (2003): The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell* 14:3848-56.

Takizawa PA, DeRisi JL, Wilhelm JE, Vale RD (2000): Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290:341-4.

Tapper DP, Van Etten RA, Clayton DA (1983): Isolation of mammalian mitochondrial DNA and RNA and cloning of the mitochondrial genome. *Methods Enzymol* 97:426-34.

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

Toivonen JM, O'Dell KMC, Petit N, Irvine SC, G.K. K, Lehtonen M, Longmuir M, Luoto K, Touraille S, Wang Z, Alziari s, Zahid HS, Jacobs HT (2001): *technical knockout*, a *Drosophila* Model of Mitochondrial Deafness. *Genetics* 159:241-254.

Trapp BD, Moench T, Pulley M, Barbosa E, Tennekoon G, Griffin J (1987): Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7773-7.

Van de Bor V, Davis I (2004): mRNA localisation gets more complex. *Curr Opin Cell Biol* 16:300-7.

Wang SZ, Adler R (1995): Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. *J Cell Biol* 128:761-8.

Wilhelm JE, Vale RD (1993): RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol* 123:269-74.

Yisraeli JK, Melton DA (1988): The maternal mRNA Vg1 is correctly localized following injection into *Xenopus* oocytes. *Nature* 336:592-5.

Yisraeli JK, Sokol S, Melton DA (1990): A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108:289-98.

Zambetti G, Fey EG, Penman S, Stein J, Stein G (1990): Multiple types of mRNA-cytoskeleton interactions. *J Cell Biochem* 44:177-87.

Zuker M (1989): Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol* 180:262-88.