



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca



Università degli Studi
di Palermo

Analisi dell'espressione genica e dinamica della cromatina del gene *PlT α 2* in *Paracentrotus lividus*.

TUTOR: Prof. F. Gianguzza

DOTTORANDO: Dott. Marco Emanuele

COORDINATORE: Prof.ssa G. Sconzo

S.S.D.: BIO11

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO – VIALE
DELLE SCIENZE, ED. 16 - PALERMO

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE
(Biologia Cellulare e dello Sviluppo) XXII° CICLO 2008-2010

Introduzione.

I microtubuli: funzione e struttura.

I Microtubuli sono organelli citoplasmatici presenti in tutti gli eucarioti. Essi sono coinvolti in numerosi processi cellulari, quali la mitosi, la motilità di cilia e flagelli e il trasporto di vescicole ed organelli; hanno anche un ruolo importante nella formazione del citoscheletro e quindi, nel mantenimento della morfologia cellulare (Hyams and Lloyd, 1994). Con poche eccezioni, sono composti (in vivo) da 13 filamenti lineari o protofilamenti che, associandosi, formano una struttura cilindrica cava (Wilson and Borisy, 1997) di circa 25 nm di diametro (Wade, Chrétien 1993). La subunità strutturale dei microtubuli è una proteina eterodimerica di 100 kDa, costituita da monomeri di α e β tubulina (Bryan and Wilson 1971, Ludueña et al., 1977), associati tra di loro mediante la formazione di legami non covalenti, con un arrangiamento “testa-coda”. Oltre a questo tipo di interazioni, che porta alla formazione di un protofilamento polarizzato, con la β tubulina in testa e la α tubulina in coda, si instaurano, tra protofilamenti adiacenti, delle ulteriori interazioni laterali. Modelli di struttura a lattice hanno inizialmente fatto pensare che il microtubulo adottasse una struttura di tipo A, con lo sfasamento/sovrapposizione (stagger) tra protofilamenti adiacenti di 3,1 nm, il che porterebbe ad una struttura elicoidale regolare. Un numero crescente di dati sperimentali hanno invece dimostrato che la struttura reale è quella di tipo B, con uno stagger di 0,9 nm, che porta all'introduzione di una discontinuità nell'elica. In questo tipo di struttura i contatti laterali avvengono tra monomeri omologhi ($\alpha - \alpha$, $\beta - \beta$); esiste anche una giuntura (seam) a livello della quale le interazioni avvengono tra subunità eterologhe ($\alpha - \beta$, $\beta - \alpha$), il che porta ad una asimmetria dell'elica del microtubulo, asimmetria che tuttavia ne favorisce la stabilità e l'interazione con proteine accessorie (Nogales, 1998; Sosa e Milligan 1996). Per quanto riguarda la struttura dei singoli monomeri, essa è molto simile ed è costituita da un core di 2 foglietti β circondati da α eliche. Le differenze strutturali tra la α tubulina e la β tubulina consistono nella diversa lunghezza, nella conformazione di alcuni loop, nella diversa densità delle catene laterali e in piccoli spostamenti di alcune strutture secondarie. L'analisi cristallografica (Figura 1) ha evidenziato la presenza di tre domini funzionali all'interno della struttura globulare: la porzione N-terminale contiene il Dominio di Legame al Nucleotide guanilico o NBD (E-site). L'NBD di ciascun monomero è direttamente coinvolto nella polimerizzazione ed è connesso mediante il “core” dell'elica più piccola alla regione intermedia, anch'essa coinvolta nella polimerizzazione. La regione intermedia contiene il secondo dominio funzionale, ovvero quello di legame al taxolo; la regione C-

terminale, infine presenta il dominio di legame per le proteine accessorie. Tale dominio include due eliche antiparallele che definiscono la cresta del protofilamento nella porzione esterna del microtubulo, mentre gli ultimi residui acidi sono disorganizzati e formano una nuvola di cariche negative intorno al microtubulo (Nogales, 1998).

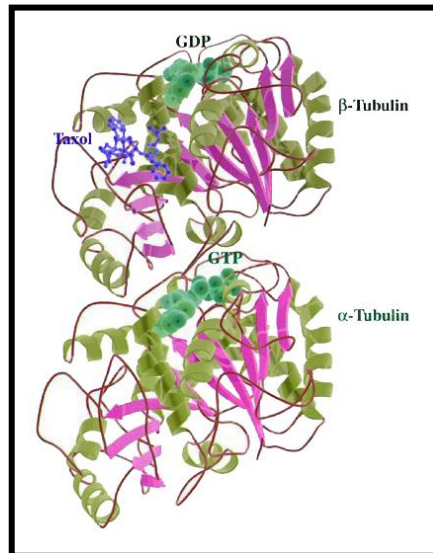


Figura 1: Struttura tridimensionale dell'α e della β tubulina.

Polimerizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli.

I microtubuli sono strutture molto dinamiche nelle quali è possibile distinguere un'estremità positiva o di polimerizzazione formata da subunità di β-tubulina ed una negativa o di depolimerizzazione formata da subunità di α-tubuline, rendendo in questo modo l'intero polimero polare. Malgrado la polimerizzazione dei microtubuli avviene in vitro in maniera spontanea, è noto che in vivo è resa possibile soltanto dalla funzione di nucleazione dei centri di organizzazione dei microtubuli (MTOCs), costituiti dai centrosomi e dai corpi basali. Gli MTOC infatti controllano il numero dei microtubuli e dei protofilamenti, la loro polarità, il movimento ed il luogo dell'assemblaggio. Nella sintesi dei microtubuli è possibile distinguere una fase di accrescimento lento, ed una di accrescimento rapido. Tutti gli MTOCs presentano la γ-tubulina che, associandosi ad una serie di proteine, forma il complesso γ-TuRC (γ-Tubulin Ring Complex) che comprende il sottocomplesso γ-Tubulin Small Complexes, costituito a sua volta da due molecole di γ-tubulina, da una molecola di SPC97 ed una di SPC98, (Job et al. 2003). Il γ-TuRC mima l'estremità del microtubulo, ad esso si legano i dimeri di αβ tubulina.

La γ -tubulina interagisce longitudinalmente con l' α -tubulina (Figura 2 “a” in [ii]) e lateralmente con l' α -tubulina (“b” in [ii]) e con la β -tubulina (“c” in [ii]).

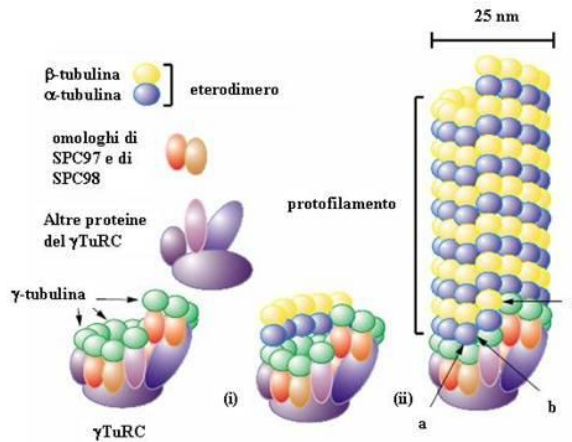


Figura 2: Struttura e sintesi dei microtubuli. Il γ -TuRC mima l'estremità del microtubulo. (i) Dimeri di α - e β -tubulina si legano al γ -TuRC e (ii) si assembla un microtubulo. La γ -tubulina interagisce longitudinalmente con l' α -tubulina (“a” in [ii]) e lateralmente con l' α -tubulina (“b” in [ii]) e con la β -tubulina (“c” in [ii]). E' inoltre mostrato l'eterodimero di α - e β -tubulina, ed i protofilamenti disposti in maniera sfalsata che danno origine al microtubulo di 25 nm di diametro.

Chrétien ed altri hanno dimostrato che il microtubulo in crescita presenta alla sua estremità una struttura a “foglio” aperto, che in seguito si chiude a formare il cilindro. Questi dati hanno fatto ipotizzare che il legame del GTP, a livello dell'E-site, comporti un relativo incremento di stabilità nelle interazioni tra i dimeri di tubulina, che a loro volta inducono la formazione dei contatti laterali, responsabili della chiusura del cilindro (Chrétien et al.1995). Studi strutturali suggeriscono che, dopo la chiusura del microtubulo, il dimero può cambiare leggermente la sua conformazione; infatti in seguito all'idrolisi del GTP, nonostante sia “costretto” all'interno della struttura a lattice (Nogales et al., 2006), il corpo del microtubulo è fondamentalmente costituito da subunità di GDP-tubulina. Analisi di crio-microscopia elettronica, su microtubuli in depolimerizzazione, dimostrano che i protofilamenti si staccano dalle estremità, formando strutture ad anello, simili a quelle dell'autoassemblaggio di dimeri contenenti GDP (Mandelkow E.M.et al.1991; Nogales et al.1998). Nogales ed altri hanno recentemente proposto la seguente ipotesi di modello: il dimero di tubulina esiste in due diverse conformazioni, a seconda del nucleotide (GTP o GDP) legato nell'E-site. Se è presente GTP esso ha una conformazione stabile (gli assi dei due monomeri formano un angolo di 5°) che gli permette di formare i protofilamenti nel

microtubulo; se invece è legato il GDP il dimero presenta una curvatura (gli assi dei due monomeri formano un angolo di 12°), che causa la formazione di protofilamenti curvi o anche di strutture ad anello, impedendo la formazione dei microtubuli (Nogales et al. 2006).

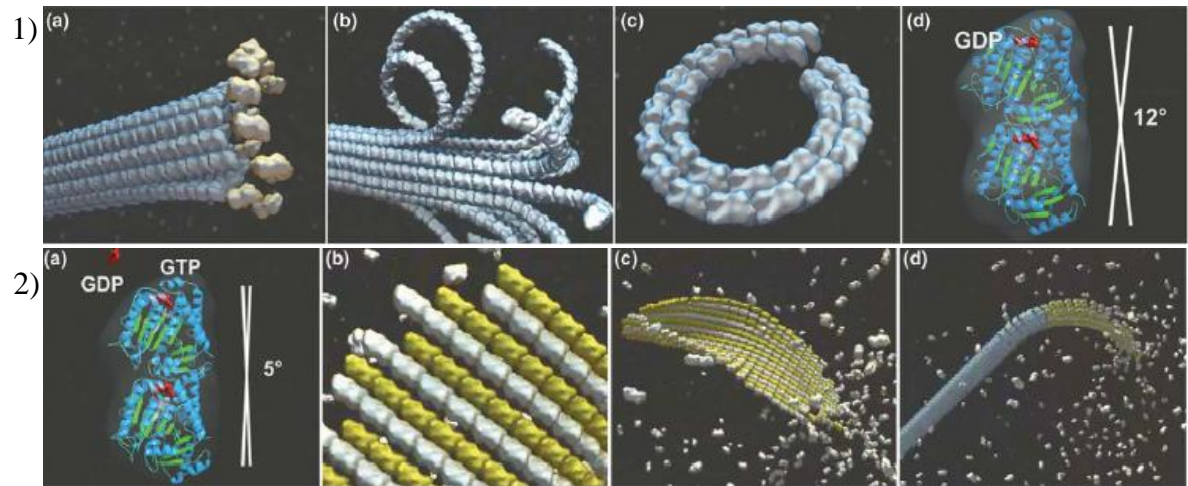


Figura 3: 1- il dimero di tubulina nella conformazione stabile, in seguito allo scambio del GDP con GTP complessato col GTP (a); i dimeri di tubulina stabiliscono delle interazioni laterali (b) e formano una struttura a “foglio” aperto (c), che in seguito si chiude a formare il cilindro (d). 2- in mancanza del “Cap” di GTP (a) i protofilamenti si curvano (b), formando una struttura ad anello (c); come si vede in “d”, nel dimero complessato con il GDP, gli assi dei due monomeri formano tra di loro un angolo di 12° , che rende la struttura instabile (Nogales, 2006).

Ipotesi delle “Multitubuline”.

Behnke e Forer, nel 1967, hanno ipotizzato l'esistenza di differenti forme di tubulina α e β , dopo aver osservato una popolazione di microtubuli con diversa stabilità ad elevate temperature ed alla proteolisi. Fulton e Simpson nel 1976 hanno rielaborato quest'ipotesi come “Ipotesi delle multitubuline”. Inizialmente l'ipotesi si basava sulla conoscenza delle diverse modifiche post-traduzionali a carico della molecola (Eipper 1972), in seguito, con l'avvento delle tecniche di biologia molecolare, si è scoperto che molti eucarioti esprimono diversi isotipi α e β . Nel 1981 è stata infatti pubblicata la sequenza completa delle α e β tubuline, ottenuta col metodo di Edman (Kraush et al. 1981); sempre in questo lavoro sono stati identificati, nelle cellule cerebrali di cavia, quattro isotipi alfa e due beta.

Da notare che con il termine “isotipo” si indicano sia le diverse forme di tubulina α e β codificate da geni diversi, sia le molecole di tubulina che derivano da modifiche post-traduzionali; in ogni caso le diverse isoforme di tubulina possono essere separate per analisi elettroforetica su gel bidimensionale ed “isoelectric focusing”.

Famiglie multigeniche di tubulina nella filogenesi

L'espressione e l'utilizzazione delle diverse isoforme varia notevolmente, se analizzate dal punto di vista filogenetico, ma possono tuttavia essere fatte delle generalizzazioni. Infatti, un tipico pattern d'espressione prevede che uno o più geni codifichino per isotipi espressi ad alti livelli in molti stadi di sviluppo, in tessuti o tipi cellulari diversi (isoforme maggiori), mentre i rimanenti geni codifichino per isotipi espressi a bassi livelli e in pochi tipi cellulari. Bisogna notare che le isoforme maggiori sono anche quelle con una sequenza proteica altamente conservata (conservazione di sequenza riscontrata sia all'interno di un determinato lineage cellulare che in specie diverse), mentre le isoforme minori sono quelle con sequenza aminoacidica divergente (Raff, 1994). Tutte le specie, in cui le famiglie multigeniche di tubulina sono state studiate, presentano un numero abbastanza simile di geni appartenenti alle due diverse famiglie α e β . Le dimensioni di queste famiglie geniche (il numero totale dei geni) tuttavia variano man mano che si sale nella scala evolutiva. Il *Plasmodium falciparum* (un protista, agente eziologico della malaria) presenta un singolo gene β , espresso sia nello stadio sessuale che asessuale dell'organismo; i due geni alfa presentano pattern di espressione diversi, uno è costitutivo, l'altro è espresso solo nel gametocito maschile (Wesseling et al. 1989, Holloway et al. 1990). Il fungo *Aspergillus nidulans* possiede due geni α e due β ; uno dei due geni α è implicato nella divisione nucleare, l'altro nella morfologia cellulare; un isotipo β è espresso in tutto il ciclo vitale, l'altro soltanto durante la sporulazione. Per quanto riguarda le piante, gli isotipi differiscono nella loro espressione tissutale. In *Arabidopsis thaliana* gran parte degli isotipi α è espressa in tutti i tessuti tranne un isotipo localizzato nel polline. Gli isotipi β hanno una distribuzione più complessa: TUB1 è espresso nella radice, TUB2, 3, 4, 7 e 9 nel fiore e TUB5 nella foglia (Chu et al. 1998). Studi condotti sempre in *Arabidopsis* hanno mostrato che alcuni isotipi sono meno stabili di altri a basse temperature, avvalorando l'ipotesi che l'esistenza di isotipi multipli serva ad incrementare il range di adattamento alle condizioni ambientali (Chu et al 1993). Negli *Echinodermi* sono stati identificati 10-12 geni per α e β tubulina, ma il numero di quelli funzionali è più basso, come mostrato dall'identificazione di specifici mRNA e dal clonaggio dei rispettivi cDNA (Alexandraki and Ruderman, 1983; Di Bernardo et al., 1989; Gianguzza et al., 1989, 1990). Gran parte delle differenze tra i vari isotipi sono concentrate nella porzione C-terminale delle proteine, sebbene siano stati trovati altri "punti caldi" di diversità nella sequenza aminoacidica. In particolare in embrioni di *Paracentrotus lividus*, nel nostro laboratorio, sono stati

identificati cinque mRNA codificanti per α e cinque codificanti per β tubulina, espressi in accordo con un programma di regolazione sia materno che embrionale. Entrambe le famiglie multigeniche, presentano geni trascritti soltanto durante l'oogenesi, altri espressi sia nelle uova vergini che nell'embrione in tutti gli stadi di sviluppo ($Pl\alpha_{10}$ e $Pl\beta_3$), altri trascritti in modo variabile durante l'embriogenesi ($Pl\beta_1$, $Pl\beta_2$, $Pl\alpha_1$) ed infine, geni espressi soltanto dallo stadio di blastula in poi ($Pl\alpha_2$). Sono anche stati isolati ed analizzati i cDNA corrispondenti ai trascritti di α e β tubuline espressi nell'embriogenesi di *P. lividus* (Gianguzza et al., 1989, 1990, 1995), ed isolato e parzialmente caratterizzato il gene codificante per l'isotipo neurale α_2 (Costa et al. 2004).

In *Drosophila melanogaster* la famiglia multigenica ha dimensioni intermedie. Troviamo quattro geni α e tre β : α_1 ed α_3 , sebbene codificati da due geni diversi, hanno un'identica sequenza aminoacidica, sono espressi durante l'embriogenesi precoce ad alti livelli, diminuiscono durante la metamorfosi per poi incrementare nuovamente allo stadio di mid-pupa; α_2 è espresso durante la metamorfosi e successivamente viene espresso ad alti livelli nei testicoli e negli organi di senso (Bo and Wensink, 1989). L'isotipo β_3 è particolarmente espresso durante lo sviluppo ed il differenziamento del mesoderma viscerale, in modo particolare nella muscolatura (stadio embrionale e di pupa); nell'adulto è ristretta alle ovaie ed ai testicoli. β_2 è espresso solamente nelle cellule post-mitotiche della linea germinale maschile, è coinvolto nell'assemblaggio del fuso mitotico e nella formazione dell'assonema degli spermatozoi. Infine, nei vertebrati sono state identificate famiglie multigeniche molto ampie, che codificano per sei isotipi α e sette isotipi β , con localizzazioni spaziali diverse e livelli d'espressione altrettanto diversi. Oltre alle famiglie di α e β , sono state identificate altre famiglie di tubulina, coinvolte nella formazione dei MTOC. La γ tubulina è stata identificata in *Aspergillus nidulans* ed è codificata dal gene mipA (Oakley et al. 1989); essa è stata localizzata a livello del materiale pericentriolare e del core del centriolo (Fuller et al. 1995); fa parte dei corpi basali dei ciliati (Liang et al. 1996) e, come ho descritto sopra è coinvolta nella nucleazione dei microtubuli. La presenza della γ -tubulina nei MTOC può essere correlata con la sua capacità di legarsi all'estremità meno dei protofilamenti di tubulina, formando insieme ad altre proteine il complesso ad anello. Studi recenti, condotti in *Trypanosoma brucei*, hanno dimostrato che la γ -tubulina è anche indispensabile per la formazione del flagello, infatti i flagelli che si formano dopo il silenziamento del gene, codificante per l'isotipo γ , sono immobili; i flagelli presentano infatti una struttura 9+0 anziché 9+2, mancando della coppia centrale di

microtubuli (McKean et al., 2003). La δ tubulina è stata identificata in *Clamydomonas*, come prodotto del gene UNI3; è coinvolta nella flagellogenesi, nella formazione del corpo basale e nella divisione cellulare. Il cDNA codificante per la δ tubulina è stato identificato anche in mammifero, dove potrebbe avere una funzione tessuto-specifica. La δ tubulina infatti è associata all'anello perinucleare dei microtubuli del manicotto, unica struttura citoscheletrica trovata negli spermatidi in via di sviluppo (Smrzka O.W. 2000). Anche la ϵ tubulina è stata identificata in *Clamydomonas*, dove viene codificata dal locus BLD2. Esperimenti di silenziamento genico hanno dimostrato che, l'isotipo ϵ è fondamentale per la formazione della struttura corpi basali/centrioli, avendo un ruolo importante nell'allungamento, stabilità e mantenimento di tale struttura (Dutcher S.K. 2003). La ζ tubulina è stata scoperta in *Trypanosoma*, ma successivamente si è visto che anche questo membro della superfamiglia è presente in altri organismi. È stata anche dimostrata una sua localizzazione a livello della regione del corpo basale in *Trypanosoma* e a livello della regione centriolare in alcune cellule animali. La tubulina η è molto meno presente tra i vari organismi, rispetto agli altri isotipi di tubulina; è stato identificato in *Paramecium*, dov'è codificata dal gene *sm19*. Mutanti SM19-1 (in *Paramecium*) mostrano un fenotipo in cui è inibita la duplicazione del corpo basale, è ridotto l'apparato orale e presentano una delocalizzazione della γ tubulina. Sebbene non si abbiano precise informazioni riguardo la funzione, la delocalizzazione della γ tubulina potrebbe indicare un possibile ruolo della η tubulina nel legame della γ tubulina al corpo basale (Chang 2000; Dutcher SK 2003; Vaughan 2000). Per la tubulina ι non si hanno ancora sufficienti dati sperimentali per formulare un'ipotesi riguardo il suo ruolo nella dinamica dei microtubuli.

Modifiche post-traduzionali della tubulina.

Le tubuline α e β vanno incontro a numerose modifiche post-traduzionali, che generalmente avvengono nell'estremità C-terminale della molecola.

Fosforilazione

La tubulina β presenta un sito di fosforilazione a livello della Ser⁴⁴⁴ (Diaz-Nido et al,1990), non si sa quale sia, in vivo, l'enzima coinvolto nel processo di fosforilazione, ma in vitro la reazione è mediata dalla Caseine kinase II (CkII). Alcuni residui di Tyr sia negli isotipi α

che in quelli β possono essere fosforilati (tubuline di nervi di ratto); la fosforilazione a questi livelli sembra essere correlata col differenziamento del neurone (Cox and Maness,1993).

Acetilazione

Molte α e β tubuline vengono acetilate a livello della Lys⁴⁰, il gruppo acetile è aggiunto in posizione ϵ . Alcuni dati sperimentali indicano una maggiore stabilità delle tubuline acetilate, in presenza di droghe antitubuliniche (Geyp et al., 1996). Studi recenti hanno dimostrato che l'acetilazione delle subunità dei microtubuli influenza il meccanismo e la polarità del traffico vescicolare lungo l'assone dei neuroni, infatti inibendo l'acetilazione della Lys⁴⁰ viene influenzata la capacità della Kinesina-1 di legarsi ai microtubuli. L'incremento dello stato di acetilazione delle tubuline comporta, invece, una variazione nella direzionalità del traffico vescicolare (Reed et al. 2006).

Ciclo di tirosinazione/detirosinazione

Fatta eccezione per la tubulina $\alpha 4$ dei mammiferi, tutti gli altri isotipi sono codificati con un residuo di Tyr in posizione C-terminale. Il residuo è spesso rimosso da una specifica carbossipeptidasi. Un altro enzima, la Tubulina-Tirosina ligasi può aggiungere nuovamente il residuo di tirosina (Gu et al.,1988). La tubulina tirosinata e quella detirosinata possono essere correlate con microtubuli funzionalmente diversi, all'interno della stessa cellula per esempio, in colture di neuroni retinali di pollo, sono stati trovati microtubuli tirosinati in tutto il neurone, mentre quelli detirosinati sembrano essere ristretti al neurite.

Poliglutamilazione

La glutamilazione (come la glicilazione) è la principale modifica post-traduzionale delle α e β tubuline che si trovano nei neurotubuli, nei centrioli e negli assonemi. (Kann et al.,2003). Consiste nell'aggiunta di residui di glutammato, sempre nella regione C-terminale sia delle molecole α che nelle β (Eddè et al, 1990), è una modifica che coinvolge il 45-50% delle tubuline murine e l'85% di quelle cerebrali bovine. L'aggiunta delle catene avviene nel gruppo γ -carbossilico in un residuo di Glu. In *Drosophila melanogaster*, le isoforme di α e β presenti nei microtubuli neurali e nei flagelli degli spermatozoi, sono

fortemente poliglutamilate, diversamente da quelle presenti in altri distretti tissutali. Questi dati hanno fatto ipotizzare un ruolo essenziale della glutamilazione nei processi di differenziamento e nella stabilità dei microtubuli neurali (Bobinnec et al., 1999). Le α e β tubuline che costituiscono i microtubuli delle cellule neurali del pesce artico *Notothenia coriiceps*, presentano questa modifica chimica; ma diversamente da quanto accade in altri organismi (come *drosophila* e mammiferi) dei quattro isotipi di β tubulina presenti nel pesce artico, le forme non glutamilate sono più abbondanti di quelle glutamilate, inoltre l'isotipo neurale dell' α tubulina, pur essendo modificato, presenta una catena di residui acido glutammico molto più corta di quella presente nelle tubuline neurali di mammifero. A partire da questi dati Redeker ed altri hanno ipotizzato un ruolo di tale modifica nella polimerizzazione dei microtubuli a temperature molto basse (da -2 a +2 °C; Redeker, V., 2004). Le β tubuline di classe IVa e di classe I isolate da cervello di topo sono poliglutamilate, le prime a livello del residuo di Glu⁴³⁴, le seconde a livello del residuo di Glu⁴⁴¹, entrambe le modifiche sono localizzate nel dominio C-terminale delle proteine, coinvolto nelle interazioni con le MAPs (Mary, J. 1994).

Poliglicinazione

La poliglicinazione infine si osserva a livello di un residuo di acido glutammico, il numero di glicine aggiunte può variare da 2 a 40. Questa modifica post-traduzionale si ritrova spesso nelle α e β tubuline degli assonemi. La subunità C-terminale delle α e β tubuline degli assonemi contiene dai 3 ai 34 residui di Glicina aggiunti (Redeker et al., Science, 1994). La poliglicinazione degli assonemi sembrerebbe avere un ruolo importante per la formazione dei Tubuli B dell'assonema di cilia e flagelli. Studi condotti in *Tetrahymena* e *Paramecium* hanno dimostrato che lo stato di glicinazione dei microtubuli influenza la stabilità stessa del tubulo B. La variazione del livello di glicinazione può implicare, oltre alla destabilizzazione del microtubulo, l'accumulo di materiale denso nella matrice ciliare e una generale compromissione del trasporto lungo l'assonema (Redeker, V. et al., 2005). Si è ipotizzato che la distribuzione subcellulare delle diverse isoforme poliglicinate delle tubuline dipenda da un meccanismo di regolazione dello stato di glicinazione, infatti sempre in *Paramecium* si è visto che le tubuline citoplasmatiche sono meno poliglicinate rispetto a quelle del flagello, a causa alla presenza, nel citoplasma, di enzimi responsabili della deglicinazione delle subunità di tubulina, (Bre, M.H., 1998). Per quanto riguarda il riccio di mare, sono state isolate le α e β tubuline dello spermio di *P. lividus*. Le α tubuline

sono sia poliglicinate che poliglutamilate; mentre le β tubuline sono solo poliglicinate. A livello della Glu⁴³⁸ del dominio C-terminale delle β tubuline le glicine addizionate sono 11, mentre nelle tubuline α vengono aggiunte 12 glicine, ma a livello della Glu⁴⁴⁵ (Mary et al., 1996).

Organizzazione strutturale dei geni di tubulina

Le α e le β tubuline sono codificate da famiglie multigeniche. Il numero dei geni di ciascuna famiglia varia nelle diverse specie; troviamo infatti da 1-2 geni nei funghi a 20 nei mammiferi e di questi gran parte sono pseudogeni. Si definiscono pseudogeni (o geni non funzionali) sia le sequenze ad alta omologia strutturale con i geni funzionali, che pseudogeni maturati, ovvero provenienti da eventi di retrotrascrizione, a cui recentemente è stato assegnato un possibile ruolo nella progressione del cancro. (Belda-Iniesta 2004).

L'organizzazione strutturale dei geni di α e le β tubulina nei vertebrati è molto conservata (Figura 4). I geni che codificano per le α tubuline presentano generalmente tre introni (a volte il terzo non è presente); il primo introne interrompe la struttura genica generalmente

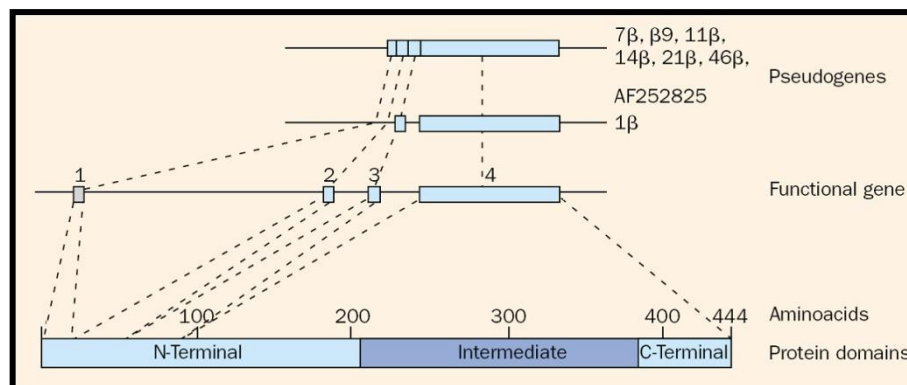


Figura 4: Struttura del gene di tubulina, degli pseudogeni umani, e la loro associazione con i domini della proteina.

dopo il codone codificante per il primo aminoacido; il secondo introne cade dopo il codone codificante il 76° aminoacido, mentre il terzo, se è presente, tra il 125° e il 126° codone. Nei geni codificanti per le tubuline β dei vertebrati si trovano tre introni, che sono localizzati dopo i codoni corrispondenti agli aminoacidi 19, 56 e 95. (Little et al. 1988; Dibb et al. 1989). Sebbene questa sia l'organizzazione genomica più frequente, ci sono anche delle eccezioni; infatti in *Onchocerca gibsoni*, un diptero, sono stati trovati nel gene

di β tubulina 11 introni; in *Microbotryum violaceum* (una pianta) un altro gene di β tubulina presenta ben 14 introni (Shi TL, Perlin MH 2001; Margutti-Pinto ME et al. 1995). Per quanto riguarda la disposizione dei geni di tubulina nel genoma delle varie classi, si sa molto poco, alcune informazioni riguardano gli eucarioti unicellulari che sembrano possedere organizzazioni differenti. *Trypanosoma*, per esempio, presenta un'organizzazione più complessa; infatti alcuni geni sono raggruppati e legati in ripetizioni $(\alpha / \beta)_n$, con un'unità base di ripetizione di lunghezza variabile (Maingon R et al. 1988). Il genere *Leishmania*, invece, ha 7 – 12 geni per famiglia, raggruppati in sequenze ripetute del tipo α_n, β_n , tranne che per *Leishmania major*, dove si hanno i geni α dispersi in un cromosoma, mentre i geni per la β tubulina presentano un locus in un cromosoma, con due copie organizzate in tandem, e le altre disperse in vari cromosomi (Spithill TW, Samaras N 1987). Infine, per quanto riguarda il riccio di mare, Alexandraki e Ruderman (1983), hanno dimostrato che i geni che codificano per le α e le β tubuline non sono organizzati come ripetizioni in tandem di unità identiche, ma sono distribuiti in regioni diverse del genoma.

Gli isotipi neurali della tubulina e la loro regolazione genica.

In quasi tutti gli organismi è stata descritta l'espressione di uno o più isotipi di tubulina specifici per il tessuto neurale; sebbene ciò abbia destato molto interesse al fine di comprendere quale possa essere il loro ruolo funzionale, ben poco si sa sulla regolazione trascrizionale dei geni che codificano per questi isotipi di tubulina. Alcuni dei lavori svolti hanno come modello di studio *Drosophila melanogaster*. Come ho riportato precedentemente, quest'organismo presenta quattro geni che codificano per le α tubuline e tre per le β tubuline. Studi funzionali di trasformazione della linea germinale di *Drosophila*, con costruzioni transgeniche contenenti le sequenze del promotore del gene $\alpha 2$ di tubulina, clonate in frame col gene reporter LacZ, hanno dimostrato che l'isotipo $\alpha 2$ viene espresso, nell'individuo adulto, oltre che nelle gonadi maschili, anche negli organi cordotonali ovvero organi sensoriali del sistema nervoso periferico del moscerino. L'isotipo $\beta 3$ (sempre in *Drosophila*) ha un pattern d'espressione molto complesso; infatti viene espresso in momenti e in tipi cellulari diversi durante tutto lo sviluppo sia embrionale che dell'adulto. Allo stadio di pupa, l'isotipo $\beta 3$ viene espresso esclusivamente e temporaneamente in un unico subset di neuroni, da cui si differenzierà il nervo ottico

dell'adulto; infatti $\beta 3$ viene, insieme a $\beta 1$, co-assemblato nei microtubuli dei neuroni; successivamente, quando si differenzia il nervo ottico dell'adulto, i microtubuli presenteranno soltanto l'isotipo $\beta 1$ (Matthews, 1989; Theurkauf, 1993). La mancata espressione del gene $\beta 3$, ottenuta mediante l'inattivazione del pathway di Hedgehog, ha portato, sin dallo stadio di pupa, alla presenza del sistema visivo dell'adulto, suggerendo che la tubulina $\beta 3$ conferisca transitoriamente particolari caratteristiche ai microtubuli in cui viene incorporata, in particolare, la sua presenza probabilmente impedisce il differenziamento del sistema visivo dell'adulto (Holey H.D., 2000). Il gene che codifica per l'isotipo di tubulina $\beta 1$ presenta un complesso network di regolazione trascrizionale; è trascritto infatti sia durante l'oogenesi, che nell'embriogenesi, dove è espresso a livello del sistema nervoso centrale e negli apodemi, le strutture di attacco dei muscoli somatici di *Drosophila*. Lo studio funzionale del promotore del gene $\beta 1$, ha dimostrato che la corretta espressione ad alti livelli del gene, dipende da tre moduli diversi: la sequenza upstream compresa tra -2348bp e -1136bp; gli elementi del promotore prossimale e la regione al 5' del primo introne. Nessuno di questi 3 moduli da solo è capace di indurre l'espressione genica corretta. L'introne è inoltre fondamentale sia per l'espressione materna, che per quella a livello del sistema nervoso centrale. Analisi funzionali di costruzioni transgeniche delete di tale sequenza, non solo inducono una drastica riduzione dell'espressione del gene reporter, ma anche la mancanza della corretta espressione spaziale del gene. All'interno delle sequenze introniche di $\beta 1$, sono stati identificati due elementi molto conservati, denominati IE1 ed IE2. IE1 è costituito dalla sequenza palindromica "CAAATGGCGTCATTTTG"; l'elemento IE2 contiene gli stessi motivi di IE1 e in più la sequenza "ATTTTG", ripetuta una seconda volta, ma sul filamento complementare. Le analisi funzionali di delezione di ciascuno dei due elementi, hanno dimostrato che IE1 è indispensabile per l'espressione neuronale di $\beta 1$, ma non ha alcun effetto sull'espressione materna, è infatti un enhancer neurospecifico; mentre IE2 è fondamentale per l'espressione materna di $\beta 1$, ma non ha alcun effetto sull'espressione neurospecifica (Köhler, J. 1996). E' noto dalla letteratura che i geni della classe III della β -tubulina sono up-regolati durante la rigenerazione degli assoni nervosi e deregolati in diversi tipi di tumori e di malattie neurodegenerative, pertanto Moody e collaboratori (2002) hanno intrapreso lo studio del promotore del gene che codifica per l'isotipo $\beta 3$ in ratto, dal momento che questo animale costituisce un buon modello per lo studio delle malattie neurodegenerative. Mediante analisi funzionali, condotte utilizzando costruzioni transgeniche contenenti il gene reporter CAT, è stato dimostrato che le prime 131bp del

promotore sono sufficienti ad indurre l'espressione del gene reporter, ma che il livello d'espressione incrementa di quattro volte nelle cellule trasfettate con le costruzioni contenenti altre 490 bp di promotore (elemento distale). Una regione aggiuntiva che contiene ipotetici siti per i fattori trascrizionali AP2, CNE (enhancer del sistema nervoso centrale) e la E-Box.

L'embrione di riccio di mare come sistema di studio.

L'embrione di riccio di mare è stato ampiamente usato per studiare gli eventi precoci dello sviluppo embrionale. Molti aspetti della fecondazione, della segmentazione e della gastrulazione sono stati inizialmente determinati negli embrioni degli echinodermi. (Bisgrove and Burke,1986). Vi sono una serie di motivi, che hanno portato questo sistema ad essere uno tra i modelli embrionali più usati, per lo studio dell'espressione genica; tra questi, l'esistenza di un'ampia letteratura sulla sua embriologia, morfologia e biologia cellulare, la permeabilità dell'uovo e dell'embrione, verso macromolecole esterne precursori e la possibilità di microiniettare l'uovo con molecole biologicamente attive (Giudice, 1995).

Embriogenesi in riccio di mare.

Nell'embrione di riccio di mare si può osservare una segmentazione di tipo conservato e prevedibile. Le prime due divisioni dello zigote avvengono lungo l'asse animale-vegetativo (A-V, già fissato nell'uovo vergine), una perpendicolare all'altra. In *Strongylocentrotus purpuratus*, la riorganizzazione citoplasmatica che segue la fecondazione, porta alla formazione, tra la seconda e la quinta divisione, dell'asse oro-aborale (O-A), il quale forma un angolo di 45°, in senso orario, col primo piano di segmentazione (Cameron et al, 1989). Alla terza divisione le cellule si dividono lungo un piano equatoriale, si separa così, il polo animale da quello vegetativo (Cameron and Davidson,1990). La quarta divisione è radiale, nel polo animale porta alla formazione dell'ottetto di mesomeri; nel polo vegetativo, per divisione disuguale delle cellule, si ottengono quattro macromeri e quattro micromeri. Questi ultimi daranno origine ai "grandi" micromeri ed ai "piccoli" micromeri, durante la quinta divisione (Cameron et al.,1991). Infine, attraverso ulteriori segmentazioni, si arriverà ad uno stadio di 64

blastomeri o blastula precoce. A questo punto dello sviluppo, l'embrione di riccio di mare consta di cinque territori presuntivi, che andranno incontro ad un destino cellulare pre-determinato. Ciascuno di questi territori è composto da cloni cellulari che derivano da uno specifico set di cellule fondatrici (Cameron and Davidson,1990). Negli stadi tardivi dell'embriogenesi, le cellule appartenenti a questi territori policlonali esprimono geni che porteranno al differenziamento dei vari tessuti (Figura 5).

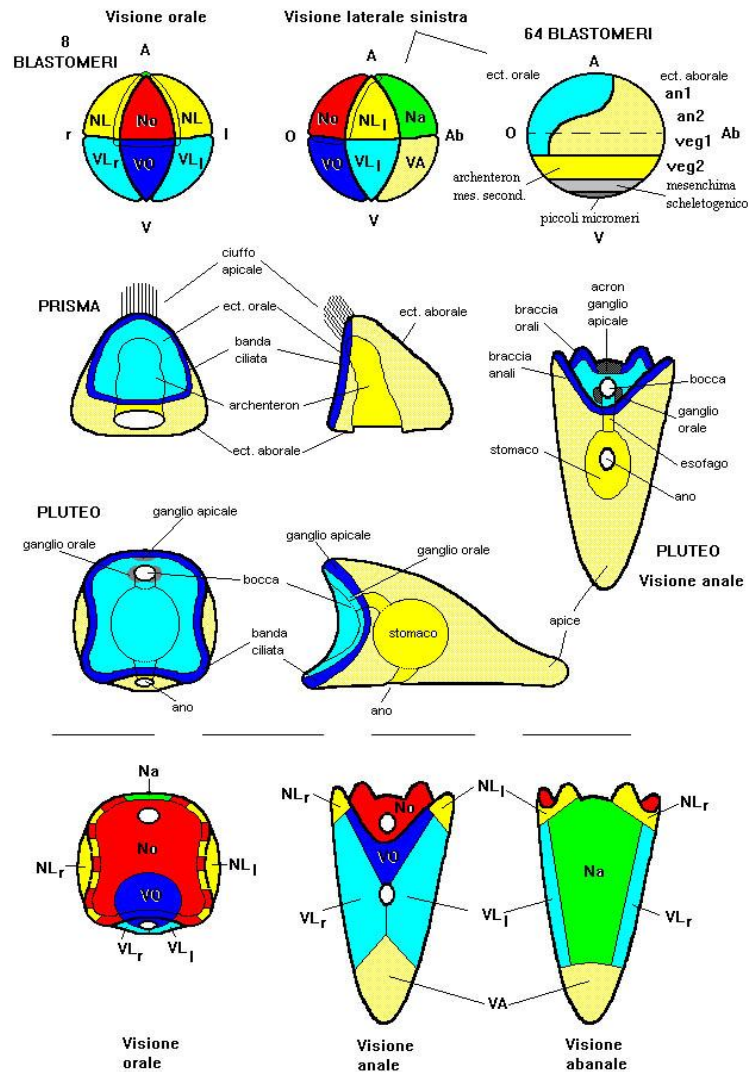


Figura 5: Rappresentazione schematica dello sviluppo del riccio di mare. Nella prima riga, sono evidenziati gli stadi di 8 e 64 blastomeri. In quest'ultimo, si possono osservare i territori policlonali, da cui prenderanno origine tutti i tipi cellulari. Inoltre vengono evidenziate le strutture nervose negli stadi tardivi di sviluppo.

Territori policlonali e meccanismi di regolazione genica.

Nel 2001 Coffman e Davidson hanno dimostrato che nello zigote di *S. purpuratus* vi è un'asimmetria del potenziale redox, che è correlata con la polarità oro/aborale dell'embrione. Alla terza segmentazione, questa polarità è riflessa nel destino dei blastomeri, che daranno origine ai derivati dell'ectoderma orale-aborale; questo territorio allo stadio di blastula si trova a livello del polo animale (Cox et al., 1986, Cameron 1989). Tra ectoderma orale ed ectoderma aborale si stabilisce gradualmente nell'embrione una regione di confine. I segnali che partono dalla piastra vegetativa e le interazioni tra le cellule dell'ectoderma orale e aborale sono necessari non solo per la specificazione, il mantenimento e la formazione di questa regione di confine, ma anche per la stabilizzazione dei territori orale-aborale. (Davidson et al., 1998). L'ectoderma aborale, nell'embrione avanzato e nella larva, darà origine ad un unico tipo cellulare, l'epitelio squamoso, che forma la "parete" esterna della larva. Uno dei geni marcatori di questo territorio è *CyIIIa* (cytoskeletal actin gene), che codifica per una particolare isoforma dell'actina citoscheletrica ed è stato ampiamente studiato in *S. purpuratus*. *CyIIIa* presenta una regione di regolazione, a monte del sito d'inizio della trascrizione, di 2.3 Kb, che conferisce la corretta espressione spaziale e temporale del gene (Figura 6). Questa regione ha un'organizzazione modulare, nel senso che si possono distinguere tre "clusters" di siti

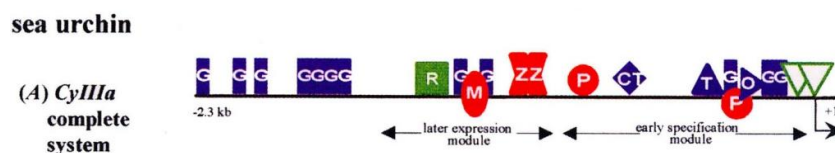


Figura 6: Rappresentazione schematica della regione di regolazione in cis del gene *CyIIIa* di *Strongylocentrotus purpuratus*. +1: sito d'inizio della trascrizione. Ogni simbolo rappresenta un fattore di regolazione legato al proprio sito bersaglio. E' stato determinato il ruolo funzionale di quasi tutti i fattori coinvolti: fattori ubiquitari (blu), regolatori negativi (verde), regolatori positivi (rosso), fattori di cui si conosce la funzione (nero); i fattori la cui attività è direttamente regolata da sistemi di traduzione del segnale sono ombreggiati. Per informazioni più dettagliate vedi Arnone and Davidson, 1998.

targets, per proteine regolatrici; sono stati infatti identificati un modulo prossimale, uno intermedio ed uno distale. Il modulo prossimale si estende per circa 800 bp, è sufficiente a dare inizio alla trascrizione nella segmentazione tardiva e lega sia regolatori positivi sia negativi della trascrizione. All'interno di questo modulo, sono stati identificati diversi

elementi cis-agenti ed i corrispondenti fattori trascrizionali. Per esempio, a livello del sito P3A si lega il fattore Sp3A2, capace di controllare l'espressione di *CyIIIa* nell'ectoderma orale/aborale prima della gastrulazione. Il sito P5 controlla invece la corretta espressione temporale del gene, legando probabilmente il fattore SpTEF-1. E' interessante notare che delezioni del sito P1 portano alla completa inattivazione del modulo prossimale ed influenzano quello intermedio. Quest'ultimo lega regolatori positivi, come SpRunt-1 (che codifica per il fattore Runx), a livello del sito P7I, e regolatori negativi, come SpZ12-1 e SpP7II, rispettivamente ai siti P6 e P7, che reprimono l'azione positiva di Runx. Il modulo intermedio ha il compito d'incrementare i livelli di *CyIIIa* dallo stadio di gastrula in poi (Kirchhammer and Davidson, 1996). Sempre nel modulo intermedio, vicino il sito target per Runx è stato identificato il sito P7II, una sequenza consensus di 63 bp, che viene riconosciuta da un membro della famiglia Myb, cioè *Spmyb*. La funzione di *Spmyb* è quella di reprimere l'espressione del gene *CyIIIa* nell'ectoderma orale e nel mesenchima scheletogenico (Coffman and Davidson, 1997). Il modulo distale, infine, ha un ruolo di enhancer trascrizionale, infatti, la sua presenza in costruzioni contenenti uno degli altri due moduli, determina una variazione consistente del livello d'espressione del gene reporter (Kirchhammer and Davidson, 1996). Inizialmente si credeva che il prodotto del gene *SpRunt-1*, Runx, fosse non solo il transattivatore di *CyIIIa*, ma come questo fosse un gene marker dell'ectoderma aborale e quindi, che grazie ad esso iniziasse il differenziamento di questo territorio. Studi recenti di inattivazione dell'espressione genica, mediante microiniezione di oligo morfolino antisenso per Runx, hanno dimostrato che in realtà questo fattore trascrizionale, non solo è coinvolto nel differenziamento di quasi tutti i territori, ma anche nell'attivazione dei geni che controllano il ciclo cellulare quali quelli che codificano per le cicline B e D (Coffman J.A., 2004). Un altro gene marcatore esclusivo dell'ectoderma aborale è stato identificato in *S. purpuratus*; si tratta di *CyIIIb*, anche questo gene codifica per un'actina citoscheletrica. Nella sua regione al 5' sono stati identificati cinque elementi di regolazione, tra i quali (in posizione -440) è stato individuato il sito di legame, C1R, per il fattore SpCOUP-TF1. SpCOUP-TF1 è omologo del fattore umano COUP-TF e codifica per un recettore degli ormoni tiroidei/steroidi. E' espresso a bassi livelli durante l'oogenesi e l'embriogenesi, ma probabilmente incrementa allo stadio di pluteo. La delezione della regione C1 del promotore determina una riduzione dell'espressione di *CyIIIb* di 2 volte (Chan et al, 1992). Infine, un altro esempio di gene marker di questo territorio embrionale è *Spec2a* di *Strongylocentrotus purpuratus*; *Spec2a* codifica per una proteina intracellulare che lega il calcio. Il gene viene espresso a partire

dagli ultimi eventi della segmentazione esclusivamente nell'ectoderma aborale dell'embrione di riccio. Lo studio funzionale del promotore di tale gene, ha permesso di comprendere che l'espressione territorio-specifica di *Spec2a* è regolata da una sequenza enhancer, posta a monte, lunga circa 700bp, chiamata sequenza "RSR" (repeat-spacer-repeat). L'elemento RSR è molto conservato ed è presente in quasi tutti i geni della famiglia *spec*; esso presenta al suo interno una sequenza di 78bp che guida l'espressione di un gene reporter fuso con un promotore minimo esclusivamente nell'ectoderma aborale. Questa sequenza di 78bp presenta 5 siti ad alta affinità per 5 diversi fattori trascrizionali: due elementi (uno distale e uno prossimale) per *Otx/Gsc* (Gooseoid), che inibiscono l'espressione di *Spec2a* a livello dell'ectoderma orale insieme ad un terzo sito per un altro repressore ectoderma-orale specifico, che lega l'elemento OER (Oral Ectoderm Repressor element) posto tra l'elemento prossimale e quello distale. Sempre in questa regione intermedia sono presenti il sito di legame per il fattore CBP (CAAT-Binding Protein) e per un repressore endoderma-specifico o ENR (Yuh et al.,2001). L'ectoderma orale ha un particolare fenotipo cellulare, distinte funzioni ed un distinto destino morfologico. Tutte le cellule di questo territorio sono di forma allungata e cuboidale. La porzione animale dell'ectoderma orale da origine alla piastra neurogenica apicale, al "cappuccio" orale e infine allo stomodeo, nel punto in cui l'intestino contatta la parete ectodermica (Ransik and Davidson 1998). Anche per l'ectoderma orale sono stati identificati diversi geni marker di questo territorio. Il gene *deadringer* (*dri*) di *S. purpuratus* codifica per un fattore trascrizionale della classe "ARID" (Arginin Rich Domain), espresso in maniera bifasica. *Spdri* è inizialmente espresso a partire dalle 12h fino alla formazione del mesenchima primario, determinando nelle PMC l'attivazione dei geni responsabili della scheletogenesi. Allo stadio di gastrula (20h di sviluppo) invece *Spdri* è espresso esclusivamente nell'ectoderma orale ed è responsabile del differenziamento della banda ciliata dell'embrione. Infatti, inattivando l'espressione genica di *Spdri*, si ha il mancato differenziamento della struttura sensoriale dell'embrione (la banda ciliata) e contestualmente la comparsa di caratteri fenotipici tipicamente aborali. Analisi di Real Time RT-PCR hanno dimostrato che i Knock down funzionali per *Spdri*, presentano elevati livelli del trascritto di *Spec1*, gene marker dell'ectoderma aborale, normalmente represso nell'ectoderma orale. Questi dati hanno suggerito l'ipotesi che *Spdri* sia un'attivatore trascrizionale generico e che tra i suoi geni target possa esserci il repressore tessuto (orale) specifico di *Spec1* (Amore et al., 2003). Un altro esempio di gene che controlla il differenziamento cellulare è *Hnf6*. Il messaggero ha una localizzazione diffusa

in tutto l'embrione negli stadi di sviluppo precoci; successivamente il livello del trascritto diminuisce per incrementare nuovamente negli stadi embrionali tardivi, dove l'espressione genica di *Hnf6* è ristretta a livello dell'ectoderma orale. E' stato dimostrato che il fattore trascrizionale *Hnf6* svolge un ruolo fondamentale per il differenziamento della banda ciliata e per la formazione delle spicole durante la scheletogenesi. Anche in questo caso sono stati condotti esperimenti di inattivazione genica, mediante microiniezione di oligo morfolino antisenso per *Hnf6*, che hanno mostrato una drastica riduzione sia nella formazione della banda ciliata, sia nella formazione del mesenchima scheletogenico; in particolare questo fattore trascrizionale è coinvolto nella regolazione di molti geni responsabili della migrazione e del differenziamento delle cellule PMC, come *delta*, *wnt8*, *krox* e *foxA* (Otim et al. ,2004). Dall'interazione tra ectoderma orale ed aborale, si origina la banda ciliata, che, come vedremo in seguito, è anche il sito del differenziamento delle cellule nervose e dell'origine dei neuroni (Cameron et al.,1990). La ciliogenesi è l'evento morfologico più precoce nello sviluppo del riccio di mare. Infatti, dopo una serie di divisioni e prima dello stadio di blastula alla schiusa, in ogni cellula dell'epitelio squamoso il corpo basale di ciascun blastomero fornisce la base per l'assemblaggio della struttura assonemiale del cilio. L'assonema è un "arrangiamento" di microtubuli e proteine accessorie, racchiuse all'interno di un'estensione della membrana cellulare. Le cilia del riccio di mare non hanno tutte le stesse caratteristiche strutturali e non svolgono la stessa funzione; infatti, il battito delle cilia dell'ectoderma promuove il movimento dell'embrione, le stereocilia del ciuffo apicale, che si forma al polo animale hanno funzione sensoriale (proprio come quelle della banda ciliata negli stadi tardivi); infine, le cilia delle cellule endodermiche, in seguito all'invaginazione delle stesse, diventano cilia del lume e consentono il passaggio del cibo. Gianguzza, Casano et al. hanno ampiamente studiato il processo di ciliogenesi in *Paracentrotus lividus*. In particolare, mediante deciliazione iperosmotica, hanno stabilito che la deciliazione costituisce un evento di stress per il riccio di mare e causa l'induzione di una specifica proteina da stress acidica di circa 40 kDa (1998), che viene fosforilata da parte della p38SAPK (2003) ed induce, inoltre, la sintesi della Hsp 40. Gli stessi autori hanno anche mostrato che la rigenerazione delle cilia, che avviene dopo la deciliazione, implica l'attivazione trascrizionale di specifici geni codificanti per isotipi diversi di tubulina. Mediante analisi di tipo "Northern blot"-Hybridization, eseguita su RNA totali estratti da embrioni rigeneranti le cilia, Gianguzza, Casano et al. hanno mostrato un incremento di circa 2.5 volte del trascritto β_2 , e mediante analisi di tipo "whole mount in situ hybridization" hanno anche dimostrato la

localizzazione del trascritto β_2 nelle cellule dell'epitelio squamoso di embrioni di *Paracentrotus lividus* allo stadio di gastrula (1996). Ciò suggerisce, quindi, il coinvolgimento dell'isotipo β_2 nella formazione delle cilia mobili, rendendo il trascritto β_2 (ed il gene che lo codifica) un ulteriore marcatore del tessuto ectodermico. Il mesenchima scheletogenico, si forma dai "grandi" micromeri, che daranno origine a 32 PMC (cellule del mesenchima primario), ovvero le prime cellule che entrano nel blastocele una volta iniziata l'invaginazione. L'ingresso nel blastocele dei grandi micromeri è aiutato da pulsazioni cellulari, che spingono la porzione basale delle cellule all'interno della cavità celomatica, mentre la membrana apicale rimane temporaneamente attaccata allo strato ialino (Anstrom, 1992). Una volta rotti i contatti con le cellule della piastra vegetativa, le PMC si dividono nuovamente e continuano la loro migrazione. Infine si localizzeranno sulla lamina basale della porzione vegetativa del blastocele, dove interagendo con la parete epiteliale della cavità indurranno la formazione dello scheletro calcareo. La progenie di un singolo micromero non si "disperde" dopo l'ingresso nel blastocele, anzi, la progenie cellulare rimane organizzata in clusters (centri di spicologenesi), all'interno del loro quadrante di origine. Le SMC o cellule del mesenchima secondario entrano nel blastocele durante la seconda parte dell'invaginazione dell'archenteron. Mentre le PMC si differenziano nello scheletro larvale, le SMC si differenziano in diversi tipi cellulari mesenchimali come per esempio le cellule pigmentate e le cellule circumesofagee muscolari. La transizione epitelio-mesenchimale delle PMC e delle SMC si ha in seguito a segnali extracellulari, che utilizzando un recettore a tirosina chinasi, attiveranno il pathway della ERK chinasi (Extracellular Regulator-Kinasi). La forma bifosforilata attiva della ERK chinasi è stata identificata sia nelle PMC che nelle SMC, proprio durante il momento della transizione epitelio-mesenchimale. Nelle PMC l'attivazione della ERK si ha, ad alti livelli tra le 13 e le 15 ore di sviluppo, allo stadio di blastula precoce, e si mantiene alto fino a sei ore dopo, nel momento in cui comincia l'ingresso nel blastocele. La ERK chinasi regola altri due geni necessari per la migrazione e, come vedremo in seguito, la scheletogenesi *alx1* e *ets1*. Nelle SMC viene anche attivato il pathway *delta-notch*; in questo lineage cellulare la ERK ha come target la proteina ERG, coinvolta nel differenziamento delle cellule pigmentate ed ETS1 un fattore presente ad alti livelli durante la gastrulazione. Inoltre la ERK controlla due geni indispensabili per il differenziamento delle fibre muscolari: *actinM* e *sum1*, l'omologo di riccio di MyoD (Fernandez-Serra et al., 2004). Le cellule fondatrici del territorio dei piccoli micromeri, si dividono invece soltanto una volta durante l'embriogenesi, producendo una progenie di 8 cellule; queste

rimarranno “incastonate” passivamente nella piastra vegetativa, fino a quando non verranno trasportate all'interno durante l'invaginazione, posizionandosi all'apice dell'archenteron. Una volta a contatto con l'ectoderma esse inducono il differenziamento di quest'ultimo nell'endomesoderma (Kurihara H., 2005). Successivamente, staccandosi dalla sommità dell'archenteron migrano nella sacca celomatica, che si forma lateralmente alla base dell'esofago. Inizialmente si pensava che dai piccoli micromeri derivassero le cellule della linea germinale, ma dati sperimentali successivi hanno dimostrato che non è così, infatti eliminando microchirurgicamente i piccoli micromeri dagli embrioni, si è visto che essi sono in grado di produrre gameti normali (Ransik, Cameron and Davidson; 1996). Come ho riportato sopra, le PMC sono coinvolte nella scheletogenesi. Lo scheletro degli embrioni di riccio di mare è costituito da spicole di calcite di magnesio ramificate, contenenti anche in piccola quantità, proteine della matrice delle spicole. Lo scheletro è depositato all'interno del blastocele all'inizio della gastrulazione; infatti le PMC clusterizzate secernono, in posizione ventrolaterale, due rudimenti triradiati delle spicole, in seguito ai segnali locali provenienti dalle cellule ectodermiche. Durante la tarda embriogenesi, le tre braccia di ciascun rudimento vanno incontro ad allungamento, dando origine alle spicole ramificate a simmetria bilaterale del pluteo (Cheers, M. S. et al., 2005). Uno dei fattori trascrizionali, fondamentale per l'attivazione dei geni della scheletogenesi di *S. purpuratus* è Alx1; si tratta di un fattore contenente Paired-domain (di 60 aminoacidi); esso presenta inoltre un'elevata omologia di sequenza con la famiglia Cart1/Alx3/Alx4 dei vertebrati, anch'essa contenente omeodominio. Tra i geni target di Alx1 sono stati identificati *Sm50*, *Dri* (Ettensohn et al., 2003), *SpCyp* e *P16*. *SpCyp* codifica per la Ciclofilina, una peptidil-propril cis-trans-isomerasi (PPIase). Il gene per *SpCyp* è espresso durante lo sviluppo nei discendenti dei grandi micromeri e continua fino alla deposizione delle scheletro. E' stata isolata e analizzata la sequenza del promotore di *SpCyp*, lunga 218bp; all'interno di questa sequenza sono stati individuati i siti targets specifici per *Dri* ed *Ets1*; l'analisi funzionale di una costruzione transgenica, contenente il gene reporter GFP, posto sotto il controllo della sequenza del promotore, deleta dei siti per *Dri* e *Ets1*, ha permesso di dimostrare che questi siti sono indispensabili per la corretta espressione spaziale del gene *SpCyp* (Amore, G., 2006); Un altro gene che come *SpCyp*, fa parte della “batteria dei geni” implicati nella formazione delle spicole è *P16*; questo codifica per una piccola proteina acida, ricca in glicina. Nella sua porzione C-terminale contiene un ipotetico dominio transmembrana. *P16* non è coinvolta direttamente nella formazione iniziale delle spicole, ma nel loro allungamento; inattivandone l'espressione

infatti, allo stadio di pluteo si osservano solo i rudimenti delle spicole, anziché le spicole triradiate a simmetria bilaterale. La presenza del dominio transmembrana ha fatto ipotizzare o il coinvolgimento di P16 nella ricezione dei segnali che comportano l'allungamento delle spicole o un ruolo nell'assorbimento e deposizione dei biominerali (Cheers, M. S. et al.,2005). Casano e Gianguzza hanno dimostrato che l'attivazione della p38 MAPK in *P. lividus* è coinvolta non solo nella formazione dei rudimenti iniziali delle spicole, ma anche nel processo di allungamento delle spicole stesse (2003). Anche la piastra vegetativa deriva dai micromeri. Da essa si originano l'intestino della larva e diversi importanti tipi cellulari mesenchimali celomatici. In *S. purpuratus* è stato identificato un marker molecolare di questo tessuto, il gene *Endo16*, che codifica per una glicoproteina di membrana polifunzionale. *Endo16* è attivato nella blastula precoce, ed è espresso nell'archenteron durante la gastrulazione per essere ristretto all'intestino medio nello stadio larvale. E' stato dimostrato che una regione a monte del sito d'inizio della trascrizione, di circa 2300 bp, è sufficiente a generare il corretto pattern di espressione di *Endo16* (Yuh and Davidson,1996). Sono stati identificati 38 siti di legame per fattori trascrizionali specifici ed altri ancora (più di 20) per fattori generali della trascrizione (Figura 7). Anche questo gene, come *CyIIIa*, presenta un'organizzazione modulare del

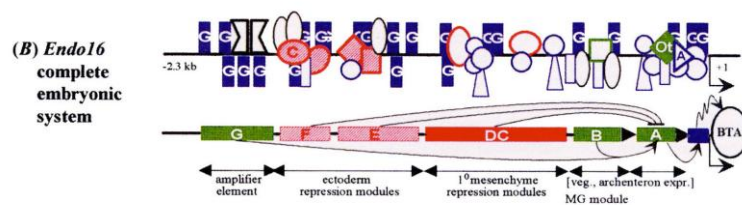


Figura 7: Rappresentazione schematica della regione di regolazione in cis del gene *Endo 16* di *Strongylocentrotus purpuratus* (Arnone and Davidson, 1997). Per la simbologia vedi Figura 6.

promotore, fondamentale per una corretta espressione spazio-temporale. Il modulo prossimale A, da solo, è sufficiente a localizzare l'espressione del gene nella piastra vegetativa e nell'archenteron; esso è essenziale per la regolazione negativa esercitata dai moduli E,F e DC sull'espressione spaziale del gene. I moduli E e F inibiscono l'espressione di *Endo16* nell'ectoderma che circonda la piastra vegetale, mentre il modulo DC inibisce il gene a livello del mesenchima scheletogenico. E' importante sottolineare che nessuno di questi moduli funziona in assenza del modulo A (Yuh et al,1994; Yuh and

Davidson, 1996). Recentemente è stato identificato il gene il cui prodotto regola l'espressione di *Endo 16: Br1/2/4*. Esso viene attivato allo stadio di blastula, ma la sua espressione incrementa di dieci volte allo stadio di gastrula (stadio in cui *Endo 16* viene espresso); *Br1/2/4* codifica per un fattore trascrizionale, il cui dominio POU si lega al modulo B del promotore di *Endo 16*. L'inattivazione dell'espressione genica, mediante microiniezione di oligo morfolino antisenso (MASO) per *Br1/2/4*, ha mostrato che, in assenza di questo fattore trascrizionale, la formazione dell'intestino è fortemente ritardata. Inoltre analisi di Real-Time RT-PCR hanno mostrato che il livello del messaggero di *Endo 16* negli embrioni microiniettati con oligo morfolino è notevolmente ridotto (Yuh et al. 2005). *Br1/2/4*, insieme a *Wnt8*, sembrerebbe essere coinvolto nell'attivazione di un altro gene responsabile della specificazione endomesodermica, *Blimp1/Krox*; esso codifica per un fattore trascrizionale con dominio di legame al DNA Zinc-finger. Esistono due isoforme diverse di questo fattore che provengono da eventi di splicing alternativo. La forma "blimp1/krox b" viene espressa nei primi stadi di sviluppo, durante la segmentazione (6-9 h dopo la fecondazione), si accumula nei grandi micromeri, subito dopo (10 h di sviluppo) il messaggero è confinato nelle *veg2*, le cellule precursori dell'endomesoderma, per scomparire e successivamente essere nuovamente espresso nell'endomesoderma (18h) e nell'intestino dell'embrione (dallo stadio di gastrula in poi). Inattivando l'espressione di *blimp1/krox*, si è visto che in mancanza di questo fattore trascrizionale gli embrioni non formano l'archenteron. Infine, un altro gene *CyIIa* (citoskeletal actine gene), come *Endo16*, viene espresso durante lo sviluppo tardivo nell'intestino intermedio e posteriore (viene, inoltre, attivato in modo transitorio nel mesenchima scheletogenico).

Il complesso pattern d'espressione di *CyIIa* è regolato da una sequenza di circa 450 bp, al cui interno, è stato identificato il sito responsabile della trascrizione del gene negli stadi tardivi. Si tratta dello stesso sito "En" trovato nel modulo B di *Endo16* (CATGAATA), che però in *CyIIa* è presente in doppia copia. Il fattore trascrizionale legato da questi siti è lo stesso di *Endo16*, ovvero SpGCF1.

Gene Regulatory Network.

I meccanismi di regolazione genica di riccio di mare, che ho fin qui descritto, sono in realtà, solo una piccola parte di quelli già noti e di quelli attualmente in studio.

L'embrione di *Strongylocentrotus purpuratus* già da diversi anni, viene utilizzato come sistema di studio per il progetto “Gene Regulatory Network” (GRN).

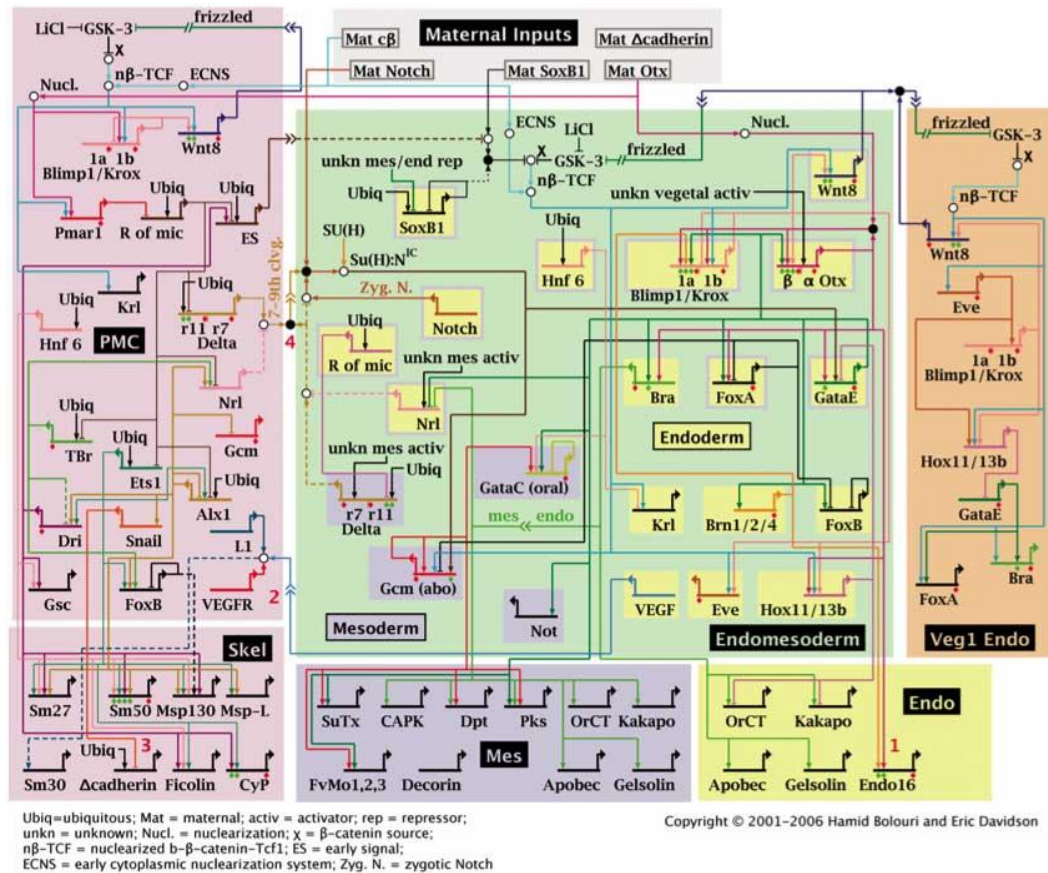


Figura 8: Schema rappresentativo del Gene Regulatory Network di *Strongylocentrotus purpuratus*. (Davidson e collaboratori 2006)

Questo progetto, portato avanti da Davidson e collaboratori, prevede l'identificazione di tutti quei geni che codificano per fattori regolatori dello sviluppo embrionale; Infatti lo sviluppo embrionale, in tutte le sue fasi, è il prodotto di una vasta e articolata “rete” (o network) di controllo genico, costituita appunto dall'insieme dei geni regolatori i cui prodotti “condizionano” il funzionamento sia di altri geni regolatori, che dei geni strutturali posti a valle e responsabili della comparsa di tutti quei caratteri morfologici che sono caratteristici di ogni individuo (o specie). Il “compito” che ognuno di questi geni svolge all'interno del network viene identificato mediante “perturbatazione sperimentale”, facendo o il “Knock-down” funzionale (mediante microiniezione di oligo morfolino antisense) del gene oppure sostituendo il prodotto genico con una forma dominante negativa. Uno schema rappresentativo di GNR è riportato in Figura. 8.

Il sistema nervoso in riccio di mare.

Il sistema nervoso nel riccio di mare è coinvolto nel controllo del nuoto, della nutrizione e della metamorfosi. Le strutture neurali delle larve degli echinodermi sono costituite da: il ganglio apicale, i gangli orali, i gangli laterali e la banda ciliata. Fino ad oggi non è ancora stato chiarito se esiste, e quale sia, un processo di differenziamento del sistema nervoso dell'individuo adulto da quello della larva, nè quali siano le correlazioni tra i sistemi nervosi delle diverse larve degli echinodermi (Nakajima et al. 2004). La banda ciliata è una struttura sensoriale che regola la motilità degli embrioni e la direzionalità del nuoto, mentre il ciuffo apicale permette all'embrione di captare la presenza delle barriere fisiche. Studi, condotti su *Dendraster excentricus*, hanno mostrato che il tessuto nervoso di quest'organismo si origina da un piccolo numero di cellule della piastra animale, allo stadio di gastrula tardiva. Queste cellule, incrementando in numero, porteranno alla formazione dei neuroni e di tratti di assoni che si trovano all'interno della banda ciliata, localizzata nella porzione orale del pluteo (Bisgrove and Burke, 1986). Più precisamente, prima della formazione della bocca, si ha l'appiattimento di un lato della gastrula (stadio di prisma), questo origina il campo orale, che si trova separato dall'ectoderma aborale per mezzo della banda ciliata. In seguito, si assiste al piegamento dell'asse animale-vegetativo, l'ectoderma aborale si estende e si forma un nuovo piano di simmetria del corpo della larva (Hörstadius, 1973; Giudice, 1986; Davidson, 1986). Lungo l'anello ciliato si formano le braccia orali e anali, che presentano una frangia ciliare sul loro margine. A livello di questa fascia si trovano molte cellule nervose, raggruppate in due gangli. Il ganglio apicale si trova tra le braccia orali (nell'acron), i gangli orali, invece, nell'orlo inferiore della bocca, associati ai muscoli esofagei. Nakajima ha evidenziato la presenza di cilia avvolte (o coiled), sommerse sotto lo strato ialino presente sulla superficie della larva. Una volta che questo strato viene rimosso con tripsina, le cilia dell'ectoderma orale emergono e mostrano una funzione sensoriale. L'arrangiamento dei microtubuli è in generale simile a quello evidenziato nelle cilia motili, tuttavia in quelle "coiled", non sono stati evidenziati ponti di dineina e possono trovarsi organizzazioni dei microtubuli del tipo "9+2" o "9+0" (Nakajima, 1986). Yaguchi e Katow (nel 2000) hanno dimostrato che le prime cellule che si differenziano nel ciuffo apicale sono i neuroni serotonergici (SAG), che proiettano i loro neuriti al neuropilo centrale, negli embrioni allo stadio di gastrula precoce. Il numero delle cellule neurali varia da uno a quattro da individuo ad individuo. Sebbene gran parte delle cellule serotonergiche siano localizzate ad entrambi i lati dell'asse antero-posteriore

dell'embrione, in alcuni casi esse si trovano esattamente lungo l'asse, suggerendo che la localizzazione non è determinata in modo preciso. Il numero delle cellule SAG, nell'embrione, varia durante lo sviluppo, più precisamente mentre allo stadio di gastrula, il numero delle cellule apicali serotonergiche è di due o tre, alle 48 ore di sviluppo il numero incrementa fino a cinque-sette, per arrivare a 10 alle 72 ore di sviluppo (Yaguchi, S. 2000). Le cellule SAG non sono tra di loro fittamente stipate, ma separate l'una dall'altra da poche cellule epiteliali non serotonergiche. I gangli laterali, che si trovano sul lato destro e sinistro della larva tra la banda ciliata pre-orale e post-orale, sono costituiti da un cluster di neuroni dopaminergici associati con la banda ciliata laterale (Bisgrove e Burke, 1986). In *Paracentrotus lividus* sono stati identificati gli isotipi assonemali, neurospecifici di tubulina α_2 e β_3 , espressi inizialmente nelle cellule SAG del dominio apicale ed in un secondo tempo sia nei neuroni serotonergici che dopaminergici dei diversi gangli, nonché nelle cellule che costituiscono la banda ciliata. Mediante tecniche d'ibridazione in situ (Figura 9), si è visto, infatti, che sia il messaggero di PIT α_2 che quello di β_3 allo stadio di

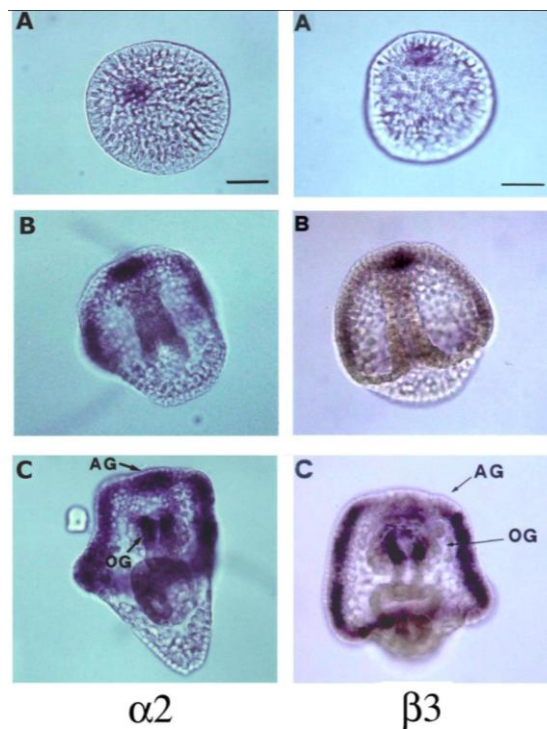


Figura 9: Localizzazione spaziale del trascritto α_2 e β_3 . E' evidente allo stadio di blastula la localizzazione in poche cellule epiteliali sottostanti il ciuffo apicale; allo stadio di gastrula è confermata questa localizzazione e il trascritto di α_2 inizia a localizzarsi anche a livello della banda ciliata; localizzazione quest'ultima ancora più evidente allo stadio di prisma, infine allo stadio di pluteo oltre ad una netta localizzazione a livello della banda ciliata, si può notare una localizzazione a livello dei gangli orali ed apicali. La localizzazione del trascritto β_3 è coincidente con quella di α_2 in tutte le strutture neurali.

blastula sono localizzati nelle cellule SAG sottostanti al ciuffo apicale. L'espressione di entrambi i geni aumenta progressivamente negli stadi embrionali successivi ed allo stadio di prisma si estende in tutta la banda ciliata. Infine, nel pluteo i due trascritti sono presenti, oltre che nel ganglio apicale, anche a livello dei gangli orali e nei gangli laterali (Casano et al, 1996).

Struttura della Cromatina.

L'espressione genica degli eucarioti è il risultato dell'azione conflittuale di meccanismi di attivazione repressione/silenziamento, ed il meccanismo di compattamento e decompattamento del DNA cromosomale rappresenta un meccanismo proto tipico di questa azione conflittuale. Il DNA cromosomale si organizza, infatti, in una struttura che può assumere diversi livelli sequenziali di condensazione, che prende il nome di cromatina: una fibra composta da DNA e da proteine, istoniche e non istoniche. Alla famiglia istonica appartengono piccole proteine basiche ricche in arginina e lisina, mentre le proteine non istoniche, molto diverse tra loro, possiedono attività strutturale, enzimatica e regolativa. La subunità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, costituito da segmento di DNA di 146 bp, che si avvolge attorno ad un ottamero istonico (core particle). L'ottamero consiste di due copie di ognuna delle quattro proteine istoniche, H2A, H2B, H3 e H4; in particolare esso deriva dall'assemblaggio iniziale di due etero dimeri H3/H4, che formano un tetramero cui si associano due eterodimeri H2A/H2B. Più particelle nucleosomali sono connesse tra loro mediante un segmento di DNA (DNA linker), di lunghezza variabile, a formare una struttura a filo di perle o fibra di 11 nm. La fibra di 11 nm può andare incontro ad ulteriore condensazione formando la fibra di 30 nm, per successiva interazione con l'istone H1 (interazione che può essere "aiutata" o "contrastata" dall'azione delle code degli istoni dell'ottamero) . La struttura molecolare della fibra di 30 nm può essere rappresentata da un'organizzazione a solenoide, con sei-otto nucleosomi per giro, oppure da un'organizzazione a zig-zag. L'istone H1, che non fa parte dell'ottamero istonico, è presente in numero dimezzato rispetto agli altri istoni (del core nucleo somale) e probabilmente si associa all'esterno del nucleosoma, a livello del DNA linker. La fibra di 30 nm, a sua volta, si avvolge a formare anse ancorate ad uno scaffold proteico (fibra di 300 nm) che costituiscono singole unità strutturali/funzionali della cromatina, ed infine la fibra si condensa ulteriormente (fibra di 700 nm) fino a

costituire il cromosoma metafasico. La presenza di vari livelli di compattamento della cromatina permette di suddividerla in due organizzazioni strutturali funzionalmente distinte: l'eucromatina e l'eterocromatina. L'eucromatina presenta un'organizzazione strutturale meno compatta, rispetto a quelle dell'eterocromatina, ed è sede dei processi trascrizionali. Nella cromatina si possono anche identificare unità cromatiniche funzionalmente indipendenti, delimitate da elementi di confine che servono a "proteggere" i geni da essi delimitati dagli effetti di variegazione di posizione (PEV), cioè contro l'avanzamento e la formazione di eterocromatina. Una caratteristica peculiare dell'eucromatina è la presenza di siti di ipersensibilità alle nucleasi, che etichettano le sequenze legate da fattori proteici nucleari, coinvolti nell'attivazione trascrizionale che interrompono la regolare distribuzione dei nucleosomi (fase nucleosomale). L'eterocromatina è invece una regione cromosomica altamente condensata i cui geni risultano silenti, e che al contrario dell'eucromatina presenta una ridotta sensibilità all'azione della DNasi. Possono essere distinte due classi di eterocromatina: eterocromatina costitutiva ed eterocromatina facoltativa. L'eterocromatina costitutiva è presente in tutti gli eucarioti superiori e permane costantemente nello stato condensato, quindi rappresenta DNA permanentemente silente. L'eterocromatina facoltativa corrisponde a porzioni di cromatina che sono specificatamente inattivate durante delle fasi della vita di un organismo.

La Cromatina e la regolazione dell'espressione genica.

È adesso assolutamente chiaro che l'organizzazione del DNA in cromatina non ha solamente una funzione strutturale di impacchettamento, ma questa essa è intimamente legata a processi cellulari come la replicazione del DNA, il riparo, la ricombinazione, la segregazione cromosomica e la regolazione della trascrizione. Dal punto di vista funzionale negli anni passati sono state accumulate numerose evidenze circa il ruolo dei nucleosomi come repressori generali della trascrizione (Han e Grunstein, 1988). È tuttavia diventato sempre più evidente che la struttura della cromatina, ed in particolare la sua dinamicità, gioca un ruolo attivo anche nella repressione e/o nell'attivazione temporale e tessuto specifica di specifici geni. La regolazione dinamica della trascrizione mediata dalla cromatina coinvolge diversi meccanismi come il posizionamento dei nucleosomi, il rimodellamento cromatinico e la modificazione post-trascrizionale degli istoni (Kornberg e

Lorch, 1999). La competizione per i siti di legame al DNA fra i nucleosomi ed i fattori di trascrizione è un tema comune della regolazione della trascrizione all'interno di un contesto che riguardi la cromatina. Ad esempio, il nucleosoma posizionato nel gene codificante l'rRNA 5S copre la regione da -70 a +91, di conseguenza include la regione interna di controllo (-45/+95), e si colloca sul sito di riconoscimento per il fattore basale di trascrizione TFIIB immediatamente sulla sua estremità (+81/+91; Simpson e Stafford, 1983). I nucleosomi sono stati trovati a ricoprire le cassette TATA dei geni repressi trascritti dall'RNA polimerasi II. Questo è stato osservato ad esempio per il gene del lievito codificante l'alcol deidrogenasi II, *ADH2* (Verdone *et al.*, 1996). La presenza di un nucleosoma sulla TATA box si ritiene possa inibire l'accesso della TBP al suo sito di legame. Durante l'attivazione il DNA nucleosomale del promotore di questi due geni (5S e *ADH2*) diventa più accessibile agli enzimi di restrizione o alla DNA endonucleasi (Verdone *et al.*, 1996). In entrambi i casi il rimodellamento cromatinico è stato visto precedere la trascrizione vera e propria (Verdone *et al.*, 1996). Questo indica che un'apertura della cromatina è necessaria come pre-requisito durante l'attivazione, e non come conseguenza della trascrizione. Studi recenti hanno dimostrato che vari complessi proteici coinvolti nella regolazione trascrizionale operano delle modificazioni chimiche degli istoni ed un'alterazione della struttura cromatinica. Questa ri-organizzazione o rimodellamento della cromatina, generalmente dipendente da complessi multiproteici, ed è definita come una stabile alterazione della struttura dei nucleosomi e del posizionamento del DNA. I complessi proteici coinvolti nel rimodellamento cromatinico possono essere divisi in due gruppi principali: complessi ATP-dipendenti, che utilizzano l'energia ottenuta dall'idrolisi di ATP per alterare le interazioni fra istoni e DNA e complessi responsabili delle modificazioni covalenti delle estremità amino terminali dei singoli istoni. Tutti i complessi appartenenti al primo gruppo possono "rimodellare" i nucleosomi in maniera ATP-dipendente. Questi sono complessi formati da più sub-unità con un peso molecolare che va da 220 kDa fino a 2 MDa. Questi complessi ricadono in tre principali categorie che dipendono dalla loro attività ATPasica. In particolare la prima classe comprende la famiglia di proteine SWI/SNF2, che è stata trovata nel complesso SWI2/SNF2 di lievito ed in RSC (Cairns *et al.*, 1994), la seconda classe di complessi rimodellatori (ACF, NURF e RSF) è definita dalla presenza della ATPasi ISWI, omologa ad ISWI di *D. melanogaster* e, per concludere, la classe Mi-2 caratterizzata da un'ATPasi simile alla CHD. Una seconda caratteristica dell'ATPasi di queste tre classi è il dominio proteico presente all'estremità C-terminale. I complessi SWI/SNF presentano un bromodominio, i complessi ISWI

presentano un dominio SANT SANT e la classe Mi-2 un cromodominio. A questi domini, che sono peraltro conservati, è stato associato un possibile ruolo nel riconoscimento di specifiche strutture cromatiniche mediante l'interazione con le code N-terminali degli istoni. Per quanto riguarda i complessi responsabili delle modificazioni covalenti delle code N-terminali degli istoni presenti nella cellula, essi sono numerosi e possono determinare diverse modificazioni delle code istoniche. Le funzioni più caratterizzate di questi complessi di modificazione sono quelle delle HAT (histone acetyl-transferases) e delle HADC (histone deacetylases) responsabili dei livelli di acetilazioni degli N-termini istonici (Kuo *et al.*, 1998).

Il codice istonico.

La maggior parte delle modificazioni della coda N-terminale degli istoni sono mediate da proteine (o complessi proteici) identificate inizialmente come co-attivatori o co-repressori trascrizionali. Proteine (o complessi) che, reclutate dai regolatori trascrizionali (attivatori o repressori), mediante interazioni con l'apparato trascrizionale basale ne determinano o una stabilizzazione (co-attivatori) o una destabilizzazione (co-repressori). Negli anni passati le modificazioni post-traduzionali degli istoni sono state studiate intensamente ed è stato proposto un modello che tenta riassumere e far luce sulle complesse relazioni che legano tali modifiche ai metabolismi del DNA. Secondo questa ipotesi differenti modificazioni delle code istoniche lavorano sequenzialmente o combinatoriamente per costruire un vero e proprio "codice" istonico implicato nella modulazione dei processi cellulari (Strahl e Allis, 2000). In accordo con il modello del codice istonico, le modificazioni delle code istoniche che interessano la struttura della cromatina, rendono quest'ultima più o meno accessibile ai fattori trascrizionali generali del macchinario basale, funzionando così da "recettori" per complessi multiproteici. Le modificazioni delle code istoniche identificate e caratterizzate sono: metilazione, acetilazione, ADP-ribosilazione, ubiquitinazione e fosforilazione. Considerando solamente le componenti elettrostatiche dell'assemblamento cromatinico, una modificazione come l'acetilazione che neutralizza le cariche positive degli istoni, o la fosforilazione, la quale aggiunge cariche negative, possono dare l'avvio alla decondensazione della fibra cromatinica. Di conseguenza, una combinazione di un certo numero di differenti modificazioni delle code istoniche può essere usata per amplificare il segnale che porta ad un ampio cambiamento nella struttura cromatinica permettendo il

legame dei fattori trascrizionali. Poiché la stessa modifica può avvenire su differenti residui aminoacidici presenti sulle code N-terminali numerosi studi hanno evidenziato che una stessa modificazione che riguarda residui aminoacidici differenti o che avviene in combinazione con modificazioni diverse, può essere la causa di diversi stati di attivazione della cromatina. Ad esempio, l'acetilazione della lisina K16 della coda N-terminale dell'istone H4 è presente in un dominio di cromatina trascrizionalmente attiva, mentre l'acetilazione di K12 dello stessa coda si trova in regioni eterocromatiniche o in istoni neosintetizzati (Allis *et al.*, 1985). Un esempio differente è rappresentato dalla metilazione di alcuni residui dell'istone H3. Nel caso della metilazione gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando anticorpi specifici contro le lisine metilate K9 e K4 dell'istone H3. Il risultato mostra come la trimetilazione di H3-K4 si manifesti in regioni di cromatina in attiva trascrizione mentre invece la metilazione H3-K9 sia specifica per le regioni silenziose di eterocromatina (Noma *et al.*, 2001). È noto inoltre che le modificazioni istoniche, poiché possono reclutare proteine specifiche per una particolare condizione della cromatina, servono anche ad "etichettare" uno specifico dominio di cromatina. La forma metilata di H3-K9 recluta, ad esempio, la proteina eterocromatinica HP1 attraverso il suo cromodominio, favorendo così l'assemblaggio e la stabilizzazione dell'eterocromatina (Bannister *et al.*, 2001).

Acetilazione e deacetilazione degli istoni.

I processi di acetilazione e deacetilazione degli istoni rappresentano una tappa fondamentale nella regolazione della trascrizione; sono processi complessi e specifici, ma sono anche processi reversibili. L'acetilazione è catalizzata da una famiglia di enzimi: le HAT (Histone Acetyltransferases), che trasferiscono un gruppo acetilico dall'acetil-CoA ad uno o più residui di lisina, presente nelle code N-terminali degli istoni. L'acetilazione è una modifica istonica capace di indurre una struttura cromatinica più rilassata, che favorisce la possibilità di associazione dei fattori trascrizionali, come dimostrato ad esempio da un aumento di sensibilità all'azione della DNasi I (Hebbes *et al.*, 1994). Gli effetti dell'acetilazione si possono spiegare con il fatto che la neutralizzazione dei residui di lisina carichi positivamente, riduce l'affinità dell'ottamero istonico per il DNA carico negativamente. In particolare l'acetilazione di H2A e H2B indebolisce le interazioni del dimero con le estremità del DNA nucleo somale, mentre l'acetilazione di H3 e H4 fa sì che

i superavvolgimenti del DNA vengano parzialmente rilasciati nel nucleosoma. Così come la metilazione, anche l'acetilazione serve ad etichettare uno specifico di cromatina: uno stato acetilato favorisce le interazioni tra DNA nucleosomale e fattori di trascrizione (Davie JR, 1997), proteine regolative che possiedono il bromo dominio si legano ad un dominio di cromatina acetilato riconoscendo il tag "acetilazione" (Berger S, 1999). La deacetilazione (mediata dalle HDAC – Histone deacetylases), che ha il compito di deacetilare le code istoniche mediante un meccanismo inverso a quello dell'acetilazione, provoca invece la repressione/silenziamento della cromatina. La deacetilazione stabilizza la struttura nucleosomale, per rimozione dei gruppi acetile a livello delle lisine delle code N-terminali , favorendo l'interazione DNA-istoni e istone-istone, ed inducendo un maggiore compattamento della cromatina. Il maggiore compattamento riduce/impedisce l'accessibilità dei gTFs e quindi dell'apparato trascrizionale basale, il che comporta appunto una repressione della trascrizione. Da notare che acetilazione e deacetilazione non riguardano esclusivamente le proteine istoniche ma possono anche riguardare i TFs regolandone la capacità di legare il DNA, la stabilità e la capacità di legare i coattivatori trascrizionali, quindi anche da questo punto di vista acetilazione e de acetilazione costituiscono un evento di regolazione estremamente importante per i processi trascrizionali.

Metilazione degli istoni

La metilazione delle estremità N-terminali degli istoni riguarda essenzialmente due diversi residui aminoacidici: la lisina e l'arginina. Per quanto riguarda l'istone H3 la metilazione può avvenire sulle Lys-4, Lys-9, Lys-27, Lys 36 e Lys 79; per quanto riguarda l'istone H4 sulla Lys-20. Numerosi studi hanno associato la metilazione della Lys-9 e della Lys- alla formazione di regioni eterocromatiniche. Ad esempio la proteina SUV39, la prima metiltrasferasi (HMT) ad essere stata identificata, metila selettivamente la Lys-9, riconosciuta come sito di legame per il fattore HP1 (heterochromatin-associated protein), il cui reclutamento è necessario per il silenziamento trascrizionale (Bannister et al, 2001; Grewal and Rice, 2004). La proteina HP1 potrebbe determinare la repressione indirizzando sul promotore un set di attività enzimatiche come le deacetilasi da cui dipende il successivo silenziamento. La deacetilazione e la metilazione degli istoni sembrano essere attività coordinate, poichè attività deacetilasiche e metilasiche sono entrambi presenti in numerosi

complessi. Ad esempio è stato dimostrato che il fattore Su(var)3-9 di *Drosophila* si associa con la deacetilasi HDAC1, sia in vitro che in vivo, formando una barriera tra regioni di eucromatina ed eterocromatina (PEV) (Czermin et al, 2001). La metilazione della lisina 4 dell'istone H3, a differenza di quanto avviene per la lisina 9, è stata correlata invece a meccanismi di attivazione trascrizionale (Litt et al, 2001), in modo particolare la sua trimetilazione della Lys-4 (Santos-Rosa et al, 2002). Ad esempio la trimetilazione, della Lys-4 di H3 in *S.cerevisiae*, ad opera del fattore Set1 è stata riscontrata in regioni codificanti, dove si ha il legame della RNA polimerasi II per la trascrizione genica. Anche la metilazione della Lys-79 di H3 è stata correlata con l'attivazione trascrizionale, ad esempio in lievito previene l'associazione dei complessi deacetilasici Sir. Nei nucleosomi dell'eucromatina, infatti, sono state identificate diverse modifiche istoniche, tra cui elevati livelli di metilazione nella Lys-4 e Lys-79 dell'istone H3 (Gaszner and Felsenfeld, 2006).

Rapporto tra struttura della cromatina ed espressione genica.

I promotori dei geni di classe II rappresentano l'esempio più chiaro del rapporto esistente tra struttura della cromatina ed espressione genica. Negli Eucarioti l'espressione dei geni è soggetta a livelli di controllo multipli, ma l'inizio della trascrizione rappresenta il primo e uno dei più importanti livelli di regolazione. Per un accurato inizio di trascrizione non è richiesta però solo l'RNA polimerasi II, ma sono necessari una serie di fattori generali, alcuni condivisi da tutte le RNA polimerasi, che servono a identificare le sequenze del promotore e quindi a reclutare l'oloenzima in maniera corretta. Una specifica distribuzione di nucleosomi (una specifica fase nucleosomale) a livello di un promotore può rendere a volte inaccessibili ai fattori di trascrizione i siti regolativi sul DNA, impedendo al PIC e all'oloenzima dell'RNA polimerasi II di svolgere la propria funzione. Negli Eucarioti i geni inducibili possono presentarsi in due stati funzionali diversi a seconda appunto di come i nucleosomi sono disposti lungo la regione del promotore (Wallrath *et al.*, 1994). Una prima classe contiene i geni "predisposti" (preset) in cui le regioni regolative del promotore sono lasciate libere da nucleosomi durante l'assemblaggio della cromatina; su questi geni predisposti, subito dopo il processo di replicazione quando i regolatori positivi si legano ad essi, l'induzione della trascrizione avviene molto rapidamente. La seconda classe, i geni cosiddetti "rimodellabili", presenta invece un altro stato funzionale: l'intera regione del promotore è coperta da nucleosomi e quindi, affinché si possa verificare la

trascrizione, è necessario che questi vengano preliminarmente disassemblati per permettere il legame degli attivatori trascrizionali agli elementi cis-agenti; in questo caso è quindi fondamentale l'azione dei complessi di rimodellamento. In entrambi i casi dunque la posizione precisa dei nucleosomi lungo la regione del promotore è critica per la corretta regolazione genica. Fra i geni "preset" già da tempo sono stati catalogati i geni "heat shock" di *Drosophila melanogaster*, chiamati così in quanto la loro espressione è indotta pochi minuti dopo uno shock provocato da calore. Il gene hsp 26 è l'esempio meglio studiato. Prima dell'induzione, sul promotore si identificano due siti ipersensibili alla DNasiI in corrispondenza delle due sequenze chiamate HSE "Heat Shock elements", necessarie per l'induzione. L'RNA polimerasi è stata reclutata e ha superato la fase iniziale di inizi abortivi andando verso la fase di allungamento, tuttavia raggiunta la posizione +25 va in stallo (Rougvie e Lis, 1990). Dopo lo shock termico il fattore HSF "Heat shock Factor", che viene fosforilato, riconosce e lega le sequenze HSE inducendo l'RNA polimerasi II a superare la fase di stallo. Sul promotore di questo gene non si osserva dunque rimodellamento della cromatina, in quanto le regioni regolative non sono coperte da nucleosomi stabilmente posizionati, ed a questo meccanismo contribuisce chiaramente anche il reclutamento/stallo dell'RNA polimerasi II. Questo stato di sequenze del promotore libere da nucleosomi è pre-determinato dalla presenza di due elementi (CT)_n che sono i siti di legame del fattore GAGA (Lu *et al.*, 1993). Sono stati condotti diversi esperimenti per comprendere come il fattore GAGA possa determinare questo stato ed è stato visto che esso contrasta soprattutto la repressione mediata dall'istone H1 (Kerrigan *et al.*, 1991); l'esclusione dei nucleosomi così determinata permette un'efficiente formazione del complesso d'inizio. Il gene PHO5 di *Saccharomyces cerevisiae* costituisce invece un esempio di gene rimodellabile. Questo gene viene attivato quando nel mezzo di crescita sono presenti basse concentrazioni di fosfato inorganico, in quanto esso codifica per una fosfatasi acida. Il suo promotore presenta un'organizzazione di cromatina precisa: sei nucleosomi coprono l'intero promotore ed in particolare il secondo nucleosoma è posizionato in modo tale da rendere inaccessibili i siti regolativi su cui si devono legare i regolatori positivi PHO2 e PHO4 necessari per l'espressione genica. Nella regione libera da nucleosomi, compresa tra il secondo ed il terzo nucleosoma, esiste un secondo sito di legame per PHO4 a cui esso si lega con modalità "indotte" dalle basse concentrazioni di fosfato che rendono necessaria l'attivazione genica. Il legame di PHO4 a questo elemento cis perturba la fase nucleosomale di 4 dei nucleosomi presenti, ed in particolare di quei

nucleosomi la cui posizione impedisce sia il legame di PHO2/4 che della TBP (Fascher *et al.*, 1990).

Il gene $T\alpha 2$ di *Paracentrotus lividus*.

Nel laboratorio nel quale ho sviluppato il mio progetto di dottorato, negli anni passati, è stato isolato da una libreria di cDNA costruita sui trascritti recuperati da embrioni di *P. lividus* allo stadio di gastrula, un clone codificante per l'isotipo neurale di tubulina $\alpha 2$ (PIT $\alpha 2$). A partire da tale clone sono state preparate mediante la tecnica della PCR due sonde, una sulla sequenza leader ed una sul 3'-UTR (queste, oltre alle sequenze introniche, sono le regioni maggiormente variabili tra i vari geni di tubulina). Queste due sonde più una terza, corrispondente alle sequenze del cDNA codificanti per l'estremità N-terminale degli isotipi di α -tubulina di *P. lividus*, sono state utilizzate per effettuare lo screening di una libreria genomica di *P. lividus*, in tal modo è stato individuato un clone genomico contenente l'intera ORF del gene, le sequenze 5'- e 3'-UTR, che corrispondono a quelle individuate precedentemente nel cDNA, e una regione posta a monte dell'ATG di 4.5 kb. Le sequenze genomiche individuate sono organizzate in tre esoni e due introni, i tre esoni (1374 bp) costituiscono l'ORF completa della proteina (costituita da 458 aa), 1150 bp

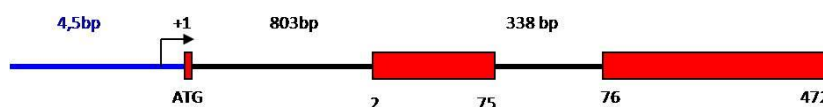


Figura 10: Schema del gene PIT $\alpha 2$.

costituiscono i due introni e 4.5 kb di sequenze aggiuntive al 5', contengono la presunta regione regolatrice. In particolar modo, il primo esone contiene una sequenza leader di 92 bp ed il sito di inizio della traduzione (ATG), il primo introne è di 803 bp, il secondo esone comprende i codoni da 2 a 75, il secondo introne è di 338 bp ed infine il terzo esone comprende i codoni da 76 a 458 (tutta la regione C-terminale della proteina) nonché il 3'-UTR di 89 bp ed il sito di poliadenilazione. Inoltre esperimenti di primer extension hanno permesso di identificare il sito di inizio della trascrizione in una "C" posizionata 95 bp a monte della ATG; mentre analisi comparative con le sequenze in banca dati, hanno messo in luce, all'interno della regione di 4.5 kb posta a monte del primo esone, una canonica TATA box in posizione -22/-29 che si trova 18 bp a valle di una canonica CAAT box

invertita. Successivamente sono state effettuate analisi biochimiche utilizzando estratti proteici preparati da nuclei di embrioni di *P. lividus* allo stadio di morula e di gastrula sulle prime 720 bp di promotore. Con questo approccio è stato possibile identificare allo stadio di gastrula, mediante analisi E.M.S.A. (Electrophoretic Mobility Shift Assay), siti di legame specifici per proteine all'interno del presunto promotore. Tali siti, sono stati ulteriormente caratterizzati mediante analisi di DNase I Footprinting, in tal modo sono stati individuati potenziali siti di legame per AP1, CREB, TCF1, ATF ed un fattore della famiglia homeobox Nkx2.

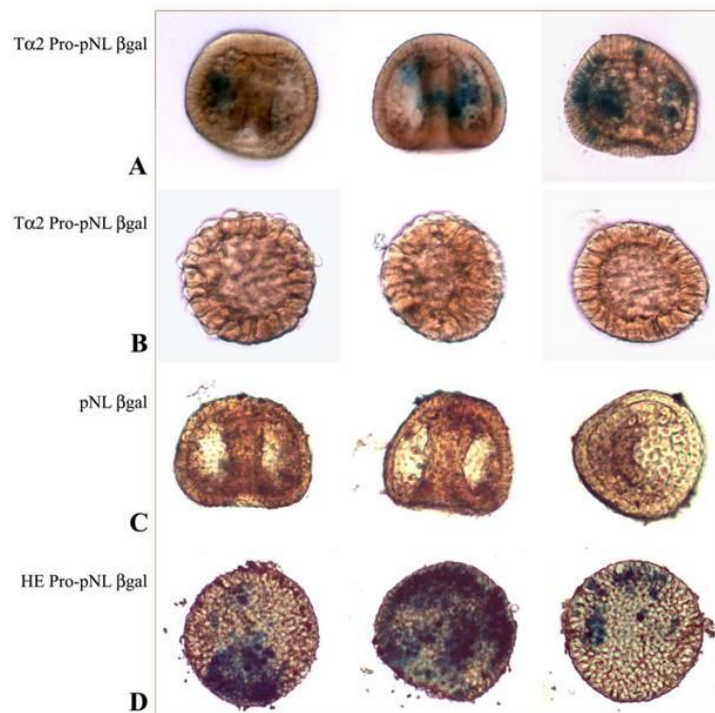


Figura 11: Lo sviluppo della colorazione, dimostra che *Ta2propNL-βgal* è capace d'indurre l'espressione del gene reporter *LacZ*, allo stadio di Gastrula, ma non allo stadio di Morula, stadio in cui il trascritto di *PITa2* non è espresso (rispettivamente A e B). La proteina di fusione infatti, $\alpha 2$ - β Gal viene evidenziata per reazione colorimetrica, usando il substrato cromogeno X-gal. La microiniezione della costruzione priva della sequenza del promotore, non ha dato colorazione (C, controllo negativo). Come controllo positivo (D) è stata microiniettata la costruzione *HE-pNL-βgal* (hatching enzyme).

Per verificare che questa regione (promotore più leader) fosse in grado di indurre l'espressione del gene *PITa2*, sono stati intrapresi studi funzionali, clonando l'intera sequenza di 720 bp, il primo codone e il primo introne a monte ed in frame col gene reporter *LacZ* (nel vettore plasmidico pNLβgal). La scelta di clonare anche la sequenza dell'introne è stata dettata dalla presenza in letteratura di molti studi, condotti su isotipi neurospecifici di tubulina in *Drosophila* ($\beta 1$ e $\beta 3$), che hanno mostrato la presenza

all'interno del primo introne, di sequenze enhancer molto conservate nel corso dell'evoluzione, la cui delezione compromette gravemente l'espressione genica (Köhler, J., *et al*,1996). La costruzione transgenica ottenuta è stata microiniettata in uova di *P. lividus*. Gli embrioni microiniettati sono stati fissati allo stadio di morula o di gastrula e sottoposti a reazione colorimetrica, in presenza del substrato cromogeno X-gal. La colorazione blue negli embrioni allo stadio di gastrula dimostra che le sequenze regolatrici analizzate sono in grado di indurre l'espressione temporale del gene reporter con modalità sovrapponibile a quelle che regolano l'espressione temporale del gene *PITα2*. Probabilmente tali sequenze sono in grado di indurre soltanto una espressione basale (cioè contengono almeno il promotore basale, Figura 11) (Costa *et al*.2004). Sono quindi stati condotti esperimenti di microiniezione utilizzando come gene reporter le sequenze codificanti per GFP a monte delle quali è stata clonata l'intera regione di 4.5 kb più il primo esone e il primo introne. Questa costruzione plasmidica (*-4.5kba2GFP*, Figura 12) è stata microiniettata in uova di *P. lividus*. Visualizzando gli embrioni microiniettati con un microscopio a fluorescenza è



Figura 12: Rappresentazione schematica della costruzione transgenica 4.5kba2GFP.

stato rilevato che la regione regolatrice estesa (4,5 Kb) analizzata in questi esperimenti è necessaria e sufficiente a determinare una espressione tessuto specifica del gene reporter sovrapponibile a quella del gene endogeno *PITα2* (Figura 13). Infatti, la proteina fluorescente di fusione $\alpha2$ -GFP si localizza a livello degli organi sensoriali dell'embrione e più precisamente allo stadio di gastrula a livello del dominio apicale e nelle cellule al confine tra ectoderma orale ed aborale, dove si differenzierà la banda ciliata. Allo stadio di pluteo, la fluorescenza è ristretta ad un esiguo numero di cellule a livello delle braccia e della banda ciliata. In seguito allo scopo di identificare le sequenze minime sufficienti a dirigere la corretta espressione temporale e spaziale della proteina di fusione fluorescente, utilizzando come stampo il clone plasmidico *-4.5kba2GFP* sono stati generati una serie di cloni che mancano di regioni al 5' progressivamente più ampie. L'analisi funzionale mediante microiniezione di uno di questi cloni, (*-1.8kba2-GFP*, Figura 14), che delle originali 4,5 Kb di sequenze upstream ne contiene soltanto 1,8 Kb (prossimali al promotore basale) ha consentito di comprendere che tutte le sequenze regolative necessarie e sufficienti sono comprese tra -1830bp e +803bp (rispetto al punto di inizio della

trascrizione). Successivamente, analisi di genomica comparata condotte su *PITalfa2* e il gene ortologo di *S. purpuratus*, e analisi funzionali condotte mediante microiniezioni di specifiche costruzioni (promotore-introne-GFP/ promotore-GFP) indicavano che le sequenze capaci di regolare in maniera tessuto specifica l'espressione del gene *PITalfa2* si trovavano nel primo introne.

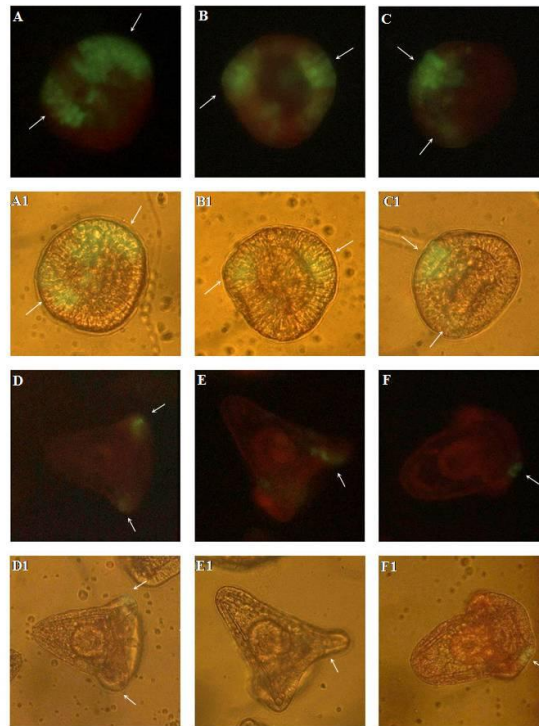


Figura 13: Embrioni microiniettati con la costruzione 4.6kbproa2GFP. A,B e C allo stadio di gastrula gli embrioni mostrano un'intensa fluorescenza a livello dell'ectoderma orale (a livello quindi della banda ciliata) e come si vede in particolare in B e C anche nelle strutture sottostanti il ciuffo apicale. D, E ed F embrioni allo stadio di pluteo. Come si vede dalle immagini la fluorescenza è localizzata in poche cellule che si trovano a livello della banda ciliata

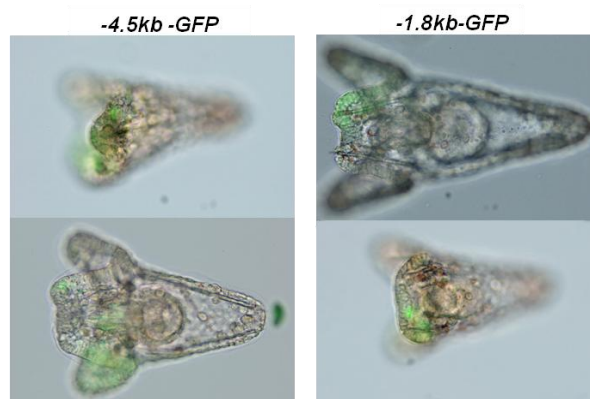


Figura 14: embrioni allo stadio di pluteo microiniettati con le costruzioni -4.5kb -GFP e -1,8kb-GFP

Risultati e Discussione.

Il progetto sviluppato durante i tre anni della mia tesi di dottorato riguarda l'analisi della struttura cromatinica del gene PIT α 2 nel corso delle diverse fasi dello sviluppo embrionale. Per comprendere se meccanismi di rimodellamento/modificazione sono effettivamente coinvolti nella regolazione trascrizionale del gene PIT α 2 ho deciso inizialmente di indagare la presenza di siti ipersensibili alla DNaseI per evidenziare l'esistenza o meno di un'accessibilità del promotore correlata con la finestra temporale di espressione. I siti ipersensibili alla DNaseI sono infatti da sempre considerati come marcatori dei geni trascrizionalmente attivi. Evidenze sperimentali mostrano infatti, nelle regioni in cui sono evidenti siti accessibili alle nucleasi, la presenza di enhancer o elementi del promotore. Possono quindi essere considerati come delle regioni che grazie alla loro accessibilità servono come sito d'ingresso nel DNA di numerosi fattori responsabili della regolazione genica (Reinke, 2004). Per questo motivo ho deciso di effettuare l'analisi dei siti ipersensibili nel promotore in embrioni a differenti stadi dello sviluppo (morula, stadio nel quale PIT α 2 non è espresso, e gastrula stadio nel quale invece PIT α 2 è espresso). A tal

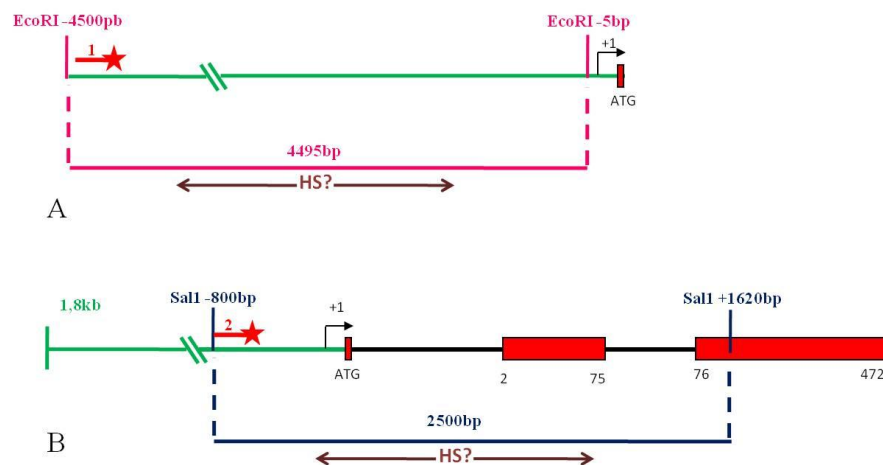


Figura 15: A) disegno sperimentale per l'individuazione di siti ipersensibili alla DnaseI a monte del sito d'inizio della trascrizione. I siti per l'enzima di restrizione EcoRI determinano una regione di 4495bp all'interno della quale mediante la Sonda 1 è possibile determinare la presenza di siti ipersensibili (HS). B) disegno sperimentale per l'individuazione di siti ipersensibili alla DnaseI a valle del sito d'inizio della trascrizione. I siti per l'enzima di restrizione SalI determinano una regione di 2500bp all'interno della quale mediante la Sonda 2 è possibile determinare la presenza di siti ipersensibili (HS).

fine, sono state effettuate estrazioni di nuclei da colture di embrioni di *Paracentrotus lividus* ai due differenti stadi di sviluppo. I nuclei sono stati quindi trattati con concentrazioni crescenti di DNaseI, il DNA è stato successivamente estratto, digerito con un enzima di restrizione ed in seguito ad un esperimento di Southern Blot Hybridization ibridato con una sonda, marcata con un isotopo radioattivo, disegnata in modo opportuno

per determinare la presenza di siti ipersensibili. Al fine di evidenziare la presenza di siti ipersensibili alla DNaseI sia a monte che a valle del sito di inizio della trascrizione sono stati utilizzati due diversi disegni sperimentali (Figura 15). Per identificare eventuali siti ipersensibili presenti a monte del sito di inizio della trascrizione (Figura 15-A) il DNA estratto dai nuclei precedentemente trattati con DNaseI è stato digerito con l'enzima di restrizione EcoRI, che determina la formazione di una banda dal peso molecolare di circa 4500 bp, e ibridato con la sonda 1. Come si vede dal risultato dell'esperimento di Southern Blot Hybridization mostrato in Figura 16, la digestione con DnaseI non evidenzia la presenza di bande di peso molecolare differente da quelle presenti nel DNA nucleare non trattato con DNaseI ma digerito con EcoRI (Figura 16, corsia 1A e corsia 1B) sia per i nuclei estratti da embrioni allo stadio di morula (Figura 16 B, corsie 2, 3, 4) che per i nuclei estratti da embrioni allo stadio di gastrula (Figura 16 A, corsie 2, 3, 4). Pertanto nelle regioni analizzate non sembrano essere presenti siti ipersensibili alla DNaseI. La presenza di bande di peso molecolare differente da 4500bp fa supporre che la regione in questione sia ricca di polimorfismi. Dati presenti in letteratura descrivono la presenza nel

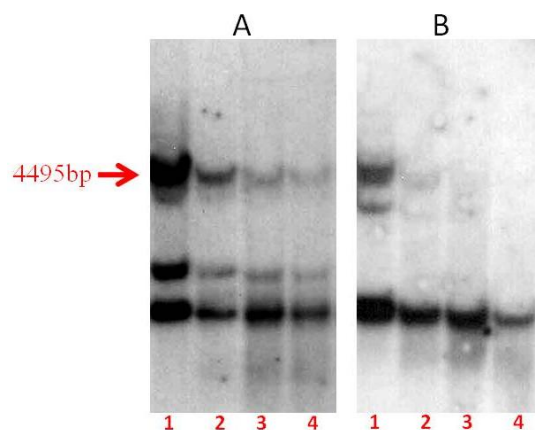


Figura 16: *Figura 16: A) Corsia 1 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di gastrula trattato con l'enzima di restrizione EcoRI. Corsie 2, 3, 4 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di gastrula incubati con quantità crescenti di DnaseI e trattati con l'enzima di restrizione EcoRI. B) Corsia 1 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di morula trattato con l'enzima di restrizione EcoRI. Corsie 2, 3, 4 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di morula incubati con quantità crescenti di DnaseI e trattati con l'enzima di restrizione EcoRI.*

genoma di riccio di mare di un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) ogni 100 paia di basi e in una frequenza paragonabile variazioni causate dalla presenza di inserzioni e delezioni (Britten *et al*, 1978). Per verificare che effettivamente questa variabilità fosse dovuta alla presenza di polimorfismi è stato condotto un esperimento di Southern Blot Hybridization utilizzando DNA genomico estratto dagli spermatozoi di 4 individui differenti di

Paracentrotus lividus, digerito con l'enzima di restrizione EcoRI e ibridato con la sonda 1 (Figura 15). Come si vede dalla Figura 17, i 4 individui presentano una configurazione genomica differente.

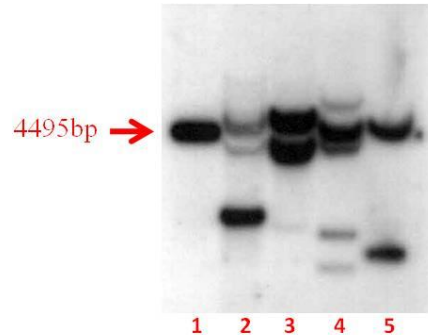


Figura 17: Corsia 1 - marcatore di peso molecolare. Corsie 2,3,4,5 - DNA genomici estratti da sperma di quattro individui differenti di *Paracentrotus lividus* e trattati con l'enzima di restrizione EcoRI.

Per identificare eventuali siti ipersensibili presenti a valle del sito di inizio della trascrizione (Figura 15-B) il DNA estratto dai nuclei precedentemente trattati con DnaseI è stato digerito con l'enzima di restrizione SalI, che taglia una regione di circa 2500 bp, e ibridato con la sonda 2. Come si vede dal risultato dell'esperimento di Southern Blot Hybridization mostrato in Figura 15, la digestione con DNaseI non evidenzia la presenza di bande di peso molecolare differente da quelle presenti nel DNA nucleare non trattato con DnaseI ma digerito con SalI (Figura 18, Pannello A, corsia 1) per i nuclei estratti da embrioni allo stadio di morula (Figura 18, Pannello A, corsie 2, 3, 4,5). Invece per quanto riguarda gli embrioni allo stadio di gastrula si evidenzia la presenza, nei punti con maggiore concentrazione dell'enzima DnaseI (Figura 18, pannello B, corsie 4 e 5), la presenza di almeno quattro bande dal peso molecolare differente da quelle presenti nel DNA nucleare non trattato con DnaseI ma digerito con SalI (Figura 18, pannello B, corsia 1). Come mostrato in Figura 18 pannello C, tre di questi probabili siti ipersensibili alla DnaseI cadono all'interno del primo introne, il quarto cade all'interno del secondo introne. I risultati ottenuti sono in accordo con dati presenti in letteratura condotti su isotipi neurospecifici di tubulina in *Drosophila* ($\beta 1$ e $\beta 3$), che hanno mostrato la presenza all'interno delle sequenze introniche, di elementi enhancer molto conservati nel corso dell'evoluzione, la cui delezione compromette gravemente l'espressione genica (Köhler, J., *et al*,1996).

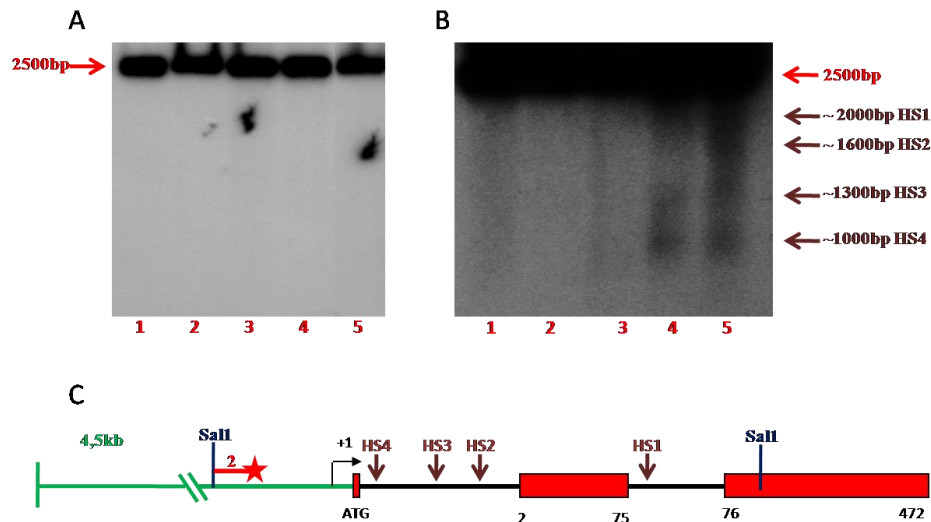


Figura 18: A) Corsia 1 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di morula trattato con l'enzima di restrizione *Sall*. Corsie 2, 3, 4,5 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di morula incubati con quantità crescenti di *DNaseI* e trattati con l'enzima di restrizione *Sall*.
 B) Corsia 1 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di gastrula trattato con l'enzima di restrizione *Sall*. Corsie 2, 3, 4,5 - DNA estratto da nuclei di embrioni allo stadio di gastrula incubati con quantità crescenti di *DNaseI* e trattati con l'enzima di restrizione *Sall*.
 C) Disposizione dei probabili siti ipersensibili alla *DNaseI* (HS) lungo il gene *PITa2*.

Poiché lo stato di compattamento/rimodellamento della cromatina, come precedentemente descritto, è intimamente correlato con modifiche post-traduzionali che avvengono a carico delle code aminoterminali degli istoni, secondo uno specifico codice di modificazione, un altro aspetto che ho voluto analizzare è stato quello di determinare se, ancora una volta nei due stadi di morula e gastrula, esistono modifiche post-traduzionali diverse sui nucleosomi assemblati sulle sequenze del promotore del gene *PITa2* che possano essere correlate con gradi diversi di compattamento della cromatina e quindi con una diversa accessibilità. A tale scopo ho utilizzato la tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), una delle tecniche più efficaci per lo studio della regolazione genica e per lo studio della struttura della cromatina *in vivo*. È una metodica ampiamente usata per identificare le proteine specifiche connesse con una regione del genoma, o al contrario, per identificare le regioni del genoma connesse con le proteine specifiche. Queste proteine possono essere isoforme degli istoni modificati in un residuo specifico ma anche altre proteine associate alla cromatina. Quando vengono utilizzati anticorpi che riconoscono le modifiche delle code amminoterminali degli istoni, la ChIP può essere usata per determinare la frequenza di tali modifiche. Mediante l'utilizzo di anticorpi che riconoscono specifiche modifiche

delle code N-terminali degli istoni questa tecnica può essere utilizzata ad esempio per valutare il livello di acetilazione e metilazione degli istoni presenti lungo le sequenze del gene *PlTa2* e conseguentemente per valutare eventuali differenze dello stato di compattamento della cromatina a differenti stadi di sviluppo. Per la preparazione della cromatina di riccio di mare *Paracentrotus lividus* gli embrioni sono stati fatti crescere fino allo stadio di morula o gastrula, e successivamente fissati con formaldeide. La formaldeide è infatti un agente cross-legante che reagisce con gli immino ed ammino gruppo delle proteine e del DNA. L'azione della formaldeide è stata bloccata con l'aggiunta di glicina 125 mM finale. Gli embrioni sono stati lavati e lisati utilizzando opportune soluzioni (vedi materiali e metodi) e la cromatina ottenuta è stata frammentata per sonicazione, mettendo a punto le condizioni ottimali per ottenere frammenti delle dimensioni comprese tra 100 e 1000 bp, e aliquotata; un'aliquota è stata utilizzata per controllare le dimensioni della cromatina ottenuta. Le diverse aliquote di cromatina di entrambi gli stadi di sviluppo sono state utilizzate per le reazioni di immunoprecipitazione effettuate con un anticorpo in grado di riconoscere modifiche specifiche delle code N-terminali dell'istone H3 (la lisina 9 dimetilata -*Anti-H3lys9me2*-), e con un anticorpo in grado di riconoscere in modo più generico l'acetilazione di diversi residui della coda N-terminale dell'istone H3 (-*Anti-H3Ac*-). La scelta è ricaduta su tali modifiche della lisina 9 dell'istone H3 perché, come

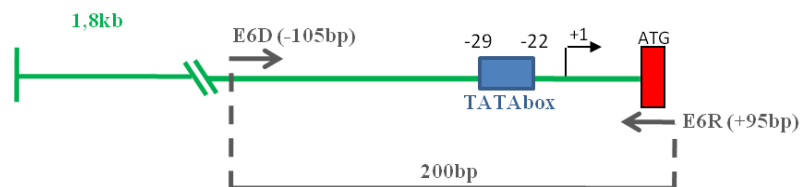


Figura 19: I primers *E6D* ed *E6R* amplificano la regione del promotore contenente la *TATAbox*.

spiegato più in dettaglio nell'introduzione, sono caratteristici o di uno stato represso (H3K9me2) o di una stato trascrizionalmente attivo (H3K9ac). Sono stati eluiti i complessi, formati per l'interazione degli anticorpi con gli specifici residui riconosciuti ed è stata effettuata la reversione del cross-linking, a cui sono stati sottoposti anche campioni di cromatina (Input) non soggetti ad immunoprecipitazione. Il DNA così recuperato è stato poi analizzato per PCR, utilizzando per l'amplificazione una coppia di primers, *E6D* ed *E6R*, che permettono di amplificare la regione del promotore basale contenente la *TATAbox* (Figura 19). Come si può osservare in Figura 20, per quanto

riguarda la cromatina estratta dagli embrioni allo stato di morula (Figura 20, pannello A) sono stati ottenuti gli amplificati della dimensione attesa di 200bp nelle reazioni in cui il template era il DNA Input (corsia 1) e il DNA recuperato dall'eluizione e reversione dei complessi immunoprecipitati con *-Anti-H3lys9me2-* (corsia 2). I controlli negativi (corsie 4 e 5) e il DNA recuperato dall'eluizione e reversione dei complessi con *-Anti-H3ac-* (corsia 3) non hanno dato amplificati. Per quanto riguarda la cromatina estratta dagli embrioni allo stadio di gastrula (Figura 20, Pannello B) sono stati ottenuti gli amplificati della dimensione attesa di circa 200bp nelle reazioni in cui il template era il DNA Input (corsia 1) e il DNA recuperato dall'eluizione e reversione dei complessi immunoprecipitati con *-Anti-H3ac-* (corsia 3). Il DNA recuperato dall'eluizione e reversione dei complessi con *-Anti-H3lys9me2-* (corsia 2) e i controlli negativi (corsie 4 e 5) non hanno dato amplificati. Questi risultati sembrano interessanti perché fanno supporre che lo stato di acetilazione del promotore basale (genericamente correlabile con l'attivazione trascrizionale del gene) sia sovrapposto con il profilo di espressione del gene *PIT α 2* e che lo stato di dimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 possa essere uno stato transitorio.

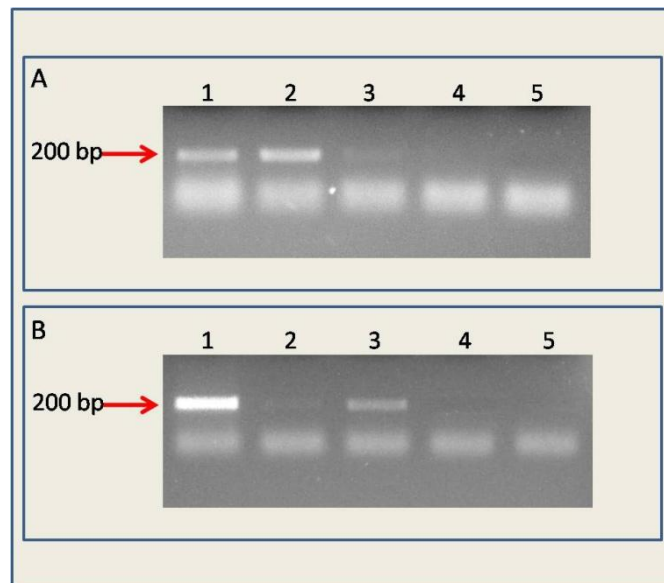


Figura 20: Analisi mediante P.C.R. dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni allo stadio di morula (Pannello A) e gastrula (Pannello B). Corsie 1 - Input. Corsie 4 e 5 - controlli negativi delle reazioni di immunoprecipitazione. Corsie 2 - campioni immunoprecipitati con *Anti-H3lys9me2*. Corsie 3 - campioni immunoprecipitati con *Anti-H3ac*.

Per verificare questa ipotesi, ovvero per analizzare se specifiche modifiche degli istoni correlate con uno stato inaccessibile della cromatina (metilazione della lisina 9 e monometilazione della lisina 4 dell'istone H3) o con lo stato accessibile della cromatina

(acetilazione della lisina 9 e trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3) variano durante lo sviluppo embrionale in maniera correlata con il profilo di espressione del gene *PIT α 2* ho pensato di effettuare degli esperimenti di ChIP (ChIP time-course) utilizzando la cromatina di embrioni bloccati dopo 4 ore (morula), 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 dalla fecondazione per analizzare la presenza di tali modifiche lungo le varie fasi dello sviluppo embrionale. Diverse aliquote di cromatina di tutti gli stadi di sviluppo sono stati utilizzati per le reazioni di immunoprecipitazione effettuate con l'anticorpo in grado di riconoscere la lisina 9 dimetilata dell'istone H3 -*Anti-H3lys9me2*-. Sono stati eluiti i complessi, formati per l'interazione degli anticorpi con gli specifici residui riconosciuti ed è stata effettuata la reversione del cross-linking, a cui sono stati sottoposti anche campioni di cromatina (Input) non soggetti ad immunoprecipitazione. Il DNA così recuperato è stato poi analizzato per PCR, utilizzando per l'amplificazione la coppia di primers, E6D ed E6R (Figura 19). Per quanto riguarda la metilazione della lisina 9 dell'istone H3, come si vede dalla Figura 21, sono stati ottenuti gli amplificati della dimensione attesa di circa 200bp nelle reazioni in cui il template era il DNA Input proveniente dagli embrioni di tutte le fasi di sviluppo (Figura 21, Pannello A; corsie i-M, i-20, i-22, i-24, i-36 e i-48) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati dopo 4 ore (Figura 21, Pannello A; corsia M) e 20 ore (Figura 21, Pannello A; corsia 20) dalla fecondazione. I controlli negativi (Figura 21, Pannello B; corsie M, 20, 22, 24, 36 e 48) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati a 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 ore (Figura 21, Pannello A; corsie 22, 24, 36 e 48) non hanno dato amplificati. La stessa analisi è stata quindi condotta utilizzando l' anticorpo in grado di riconoscere in modo più generico l'acetilazione di diversi residui della coda N-terminale dell'istone H3 -*Anti-H3Ac*-. Come si vede dalla Figura 22 sono stati ottenuti gli amplificati della dimensione attesa di circa 200bp nelle reazioni in cui il template era il DNA Input proveniente dagli embrioni di tutte le fasi di sviluppo (Figura 22, Pannello A; corsie i-M, i-20, i-22, i-24, i-36 e i-48) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati dopo 20 ore, 22 ore, 24 ore e 36 ore dalla fecondazione. I controlli negativi (Figura 22, Pannello B; corsie M, 20, 22, 24, 36 e 48) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati a 4 ore e 48 ore (Figura 22, Pannello A; corsie 4 e 48) non hanno dato amplificati.

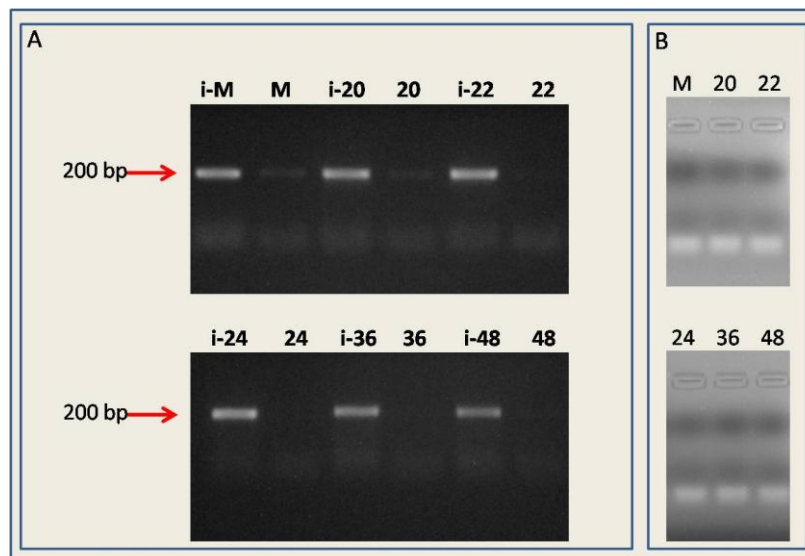


Figura 21: Analisi mediante P.C.R. dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. A) Corsie i-M, i-20, i-22, i-24, i-36 e i-48: Input. Corsie M, 20, 22, 24, 36 e 48: campioni immunoprecipitati con Anti-H3lys9me2. B) Corsie M, 20, 22, 24, 36 e 48: controlli negativi delle reazioni di immunoprecipitazione.

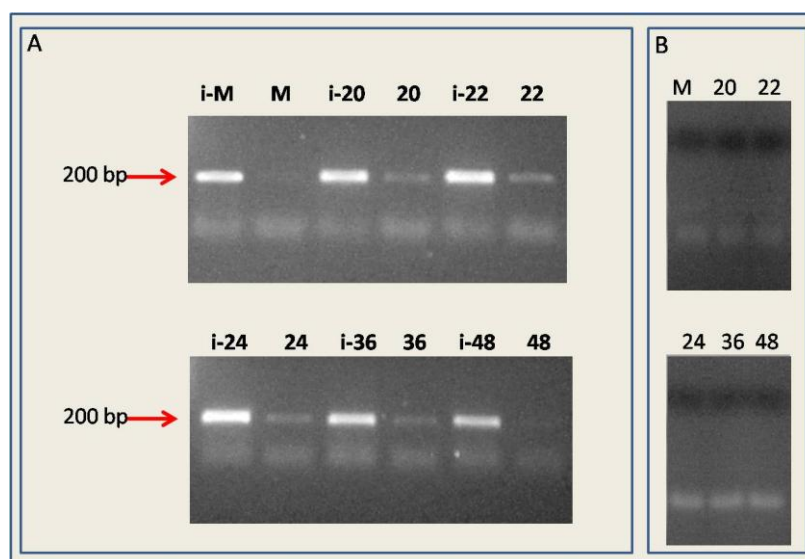


Figura 22: Analisi mediante P.C.R. dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. A) Corsie i-M, i-20, i-22, i-24, i-36 e i-48: Input. Corsie M, 20, 22, 24, 36 e 48: campioni immunoprecipitati con Anti-H3ac. B) Corsie M, 20, 22, 24, 36 e 48: controlli negativi delle reazioni di immunoprecipitazione.

Questo risultato è interessante perché mette in evidenza che lo stato di acetilazione del promotore basale si sovrappone con il profilo di espressione del gene *PlTα2* e che lo stato di dimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 è uno stato transitorio che corrisponde alle prime fasi di attivazione del gene. La presenza di questa particolare modifica della coda istonica potrebbe da un lato essere dovuta a un processo di demetilazione progressiva della lisina 9 di H3 che è il presupposto della sua acetilazione, dall'altro essere genericamente correlato con il reclutamento della RNAPolII (Tachibana *et al*, 2002). Poiché è noto che l'acetilazione della lisina 9 dell'istone H3 è sicuramente associabile con uno stato di attiva trascrizione ho deciso di effettuare delle reazioni di immunoprecipitazione sulla cromatina di embrioni di *Paracentrotus lividus* utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere la lisina 9 acetilata dell'istone H3 -*Anti-H3lys9Ac*-. Inizialmente per mettere a punto il sistema con questo anticorpo specifico ho effettuato un'analisi preliminare utilizzando la cromatina di embrioni bloccati dopo 4 ore (morula) e 24 ore (gastrula) dalla fecondazione. Diverse aliquote di cromatina di entrambi gli stadi di sviluppo sono stati utilizzati per le reazioni di immunoprecipitazione effettuate con l'anticorpo -*Anti-H3lys9Ac*-. Sono stati eluiti i complessi, formati per l'interazione degli anticorpi con gli specifici residui riconosciuti ed è stata effettuata la reversione del cross-linking, a cui sono stati sottoposti anche campioni di cromatina (Input) non soggetti ad immunoprecipitazione. Il DNA così recuperato è stato poi analizzato per PCR, utilizzando per l'amplificazione la coppia di primers, RealProm1D e RealProm1R (Figura 23). Come si vede dalla Figura 24 sono stati

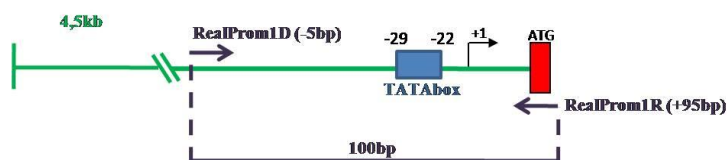


Figura 23: I primers RealProm1D e RealProm1R amplificano la regione del promotore contenente la TATAbox.

ottenuti gli amplificati della dimensione attesa di circa 100bp nelle reazioni in cui il template era il DNA Input proveniente dagli embrioni di entrambe le fasi di sviluppo (Figura 24, corsie 2 e 5) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati dopo 24 ore (Figura 24, corsia 6). I controlli negativi (Figura 24, corsie 4 e 7) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati dopo 4 ore (Figura 24, corsia 3) non hanno dato amplificati.

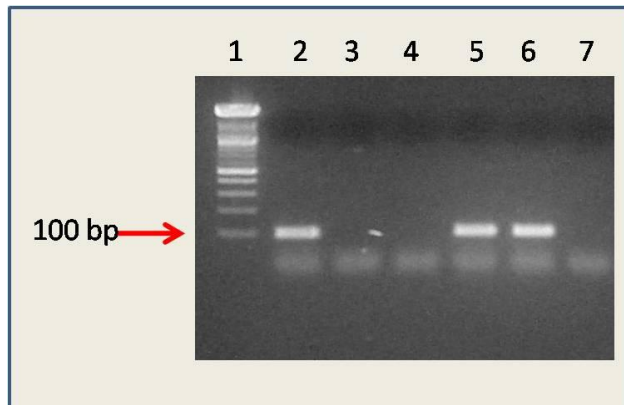


Figura 24: Analisi mediante P.C.R. dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni allo stadio di morula e gastrula. Corsia 1 -Marker. Corsie 4 e 7 - controlli negativi delle reazioni di immunoprecipitazione. Corsie 3 e 6 - campioni immunoprecipitati con Anti-H3lys9ac. Corsie 2 e 5 -Input.

Una volta messo a punto il sistema ho effettuato anche con questo anticorpo un'analisi di tipo time-course ChIP. In particolare ho deciso di utilizzare la cromatina di embrioni bloccati dopo 4 ore (morula), 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 dalla fecondazione. Diverse aliquote di cromatina di tutti gli stadi di sviluppo sono stati utilizzati per le reazioni di immunoprecipitazione effettuate con l'anticorpo *-Anti-H3lys9Ac-*. Sono stati eluiti i complessi, formati per l'interazione degli anticorpi con gli specifici residui riconosciuti ed è stata effettuata la reversione del cross-linking, a cui sono stati sottoposti anche campioni di cromatina (Input) non soggetti ad immunoprecipitazione. Il DNA così recuperato è stato poi analizzato per PCR, utilizzando per l'amplificazione la coppia di primers, RealProm1D e RealProm1R (Figura 23). Come si vede dalla Figura 25 sono stati ottenuti gli amplificati della dimensione attesa di circa 100bp nelle reazioni in cui il template era il DNA Input proveniente dagli embrioni di tutte le fasi di sviluppo (Figura 25, corsie i4, i20, i22, i24, i36 e i48) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati dopo 20 ore, 22 ore, 24 ore e 36 ore dalla fecondazione (Figura 25, corsie 4Ac, 20Ac, 22Ac, 24Ac e 36Ac). I controlli negativi (Figura 25, corsie 4c, 20c, 22c, 24c, 36c e 48c) e il DNA immunoprecipitato proveniente dagli embrioni fissati a 4 ore e 48 ore (Figura 25, corsie 4Ac e 48Ac) non hanno dato amplificati.

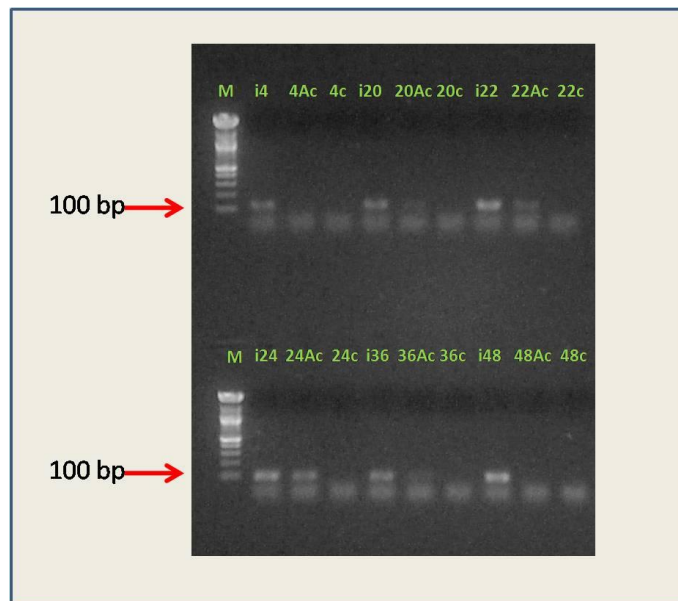


Figura 25: Analisi mediante P.C.R. dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Corsie i4, i20, i22, i24, i36 e i48: Input. Corsie 4, 20, 22, 24, 36 e 48: campioni immunoprecipitati con *Anti-H3K9ac*. Corsie 4c, 20c, 22c, 24c, 36c e 48c: controlli negativi delle reazioni di immunoprecipitazione.

Poiché la tecnica della P.C.R. non fornisce dati di tipo quantitativo, e poiché i risultati ottenuti sembrano promettenti in quanto suggeriscono una stretta associazione tra specifiche modificazioni degli istoni e il diverso stato di espressione/non espressione del gene alfa 2 nel corso ho deciso di associare agli esperimenti di time course CHIP la tecnica della Real Time P.C.R.. La Real Time P.C.R. è una P.C.R. in cinetica in cui l'amplificazione ed il rilevamento dell'amplificato avvengono nello stesso momento. Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di una molecola fluorescente (ad esempio il SYBR green), che ci da la possibilità di seguire la reazione da un punto di vista visivo, grazie all'ausilio di un apposito thermal cycler in grado di misurare la quantità di fluorescenza emessa. Poiché la molecola fluorescente ha un picco di emissione quando è intercalata all'interno di un doppio filamento di DNA, la quantità di fluorescenza sarà direttamente proporzionale alla quantità di DNA a doppio filamento presente. Ho deciso di applicare questa tecnica alle immunoprecipitazioni effettuate con gli anticorpi *-Anti-H3lys9Ac-* e *-Anti-H3lys9me2-*. In questo caso ho deciso di utilizzare la cromatina di embrioni bloccati dopo 1 ora, 4 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 ore dalla fecondazione. Diverse aliquote di cromatina di tutti gli stadi di sviluppo sono stati

utilizzati per le reazioni di immunoprecipitazione effettuate con gli anticorpi *-Anti-H3lys9Ac-* e *-Anti-H3lys9me2-*. Sono stati eluiti i complessi, formatisi per l'interazione degli anticorpi con gli specifici residui riconosciuti ed è stata effettuata la reversione del cross-linking, a cui sono stati sottoposti anche campioni di cromatina (Input) non soggetti ad immunoprecipitazione. Il DNA così recuperato è stato poi analizzato per Real Time PCR, utilizzando per l'amplificazione la coppia di primers, RealProm1D ed RealProm1R (Figura 23). Il buon esito della reazione è stato controllato mediante una curva di melting. I risultati ottenuti, normalizzati mediante il metodo della percentuale di input (Haring et al., 2007), sono mostrati nelle Figure 26 e 27. Per quanto riguarda i frammenti di DNA immunoprecipitati con l'anticorpo *-Anti-H3lys9Ac-* si vede come allo stadio di morula (4 ore) questa modifica della lisina 9 dell'istone H3 sia praticamente assente. È invece presente dopo 20 ore di sviluppo e raggiunge il picco massimo alle 24 ore di sviluppo. Successivamente la percentuale di DNA immunoprecipitato decresce (36 ore) fino a raggiungere, a 48 ore dalla fecondazione, gli stessi livelli dello stadio più precoce (Figura 26).

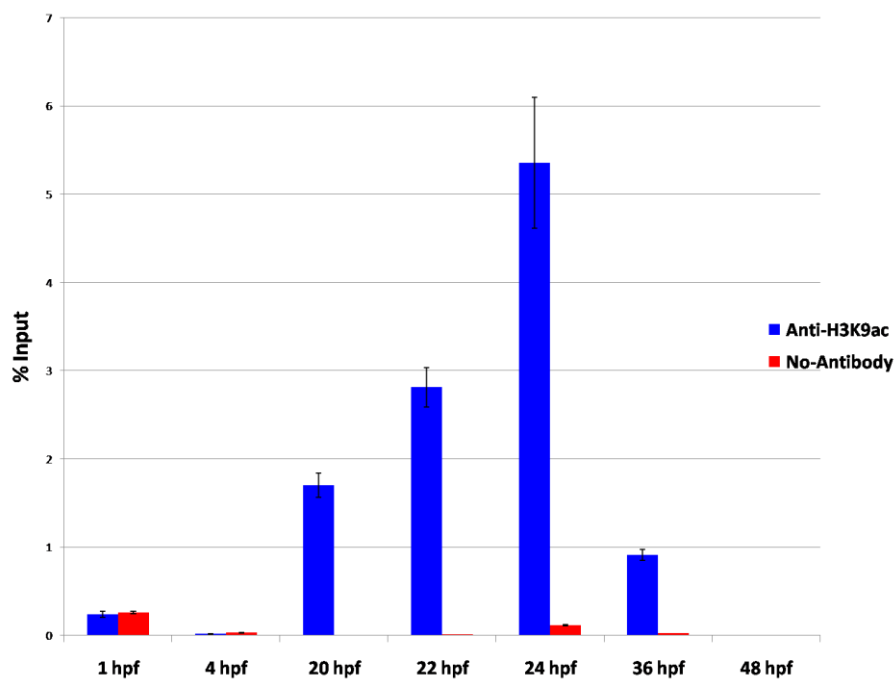


Figura 26: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-H3K9ac (blu) e senza anticorpo (rosse).

Per quanto riguarda i frammenti di DNA immunoprecipitati con l'anticorpo *-Anti-H3lys9me2-* si nota come la dinamica sia praticamente inversa. Infatti si osserva il picco massimo dopo le prime 4 ore di sviluppo. Successivamente la percentuale di input immunoprecipitato decresce fino al raggiungimento del valore più basso dopo 24 ore di sviluppo. Si osserva nuovamente un aumento dopo 36 e 48 ore dalla fecondazione (Figura 27).

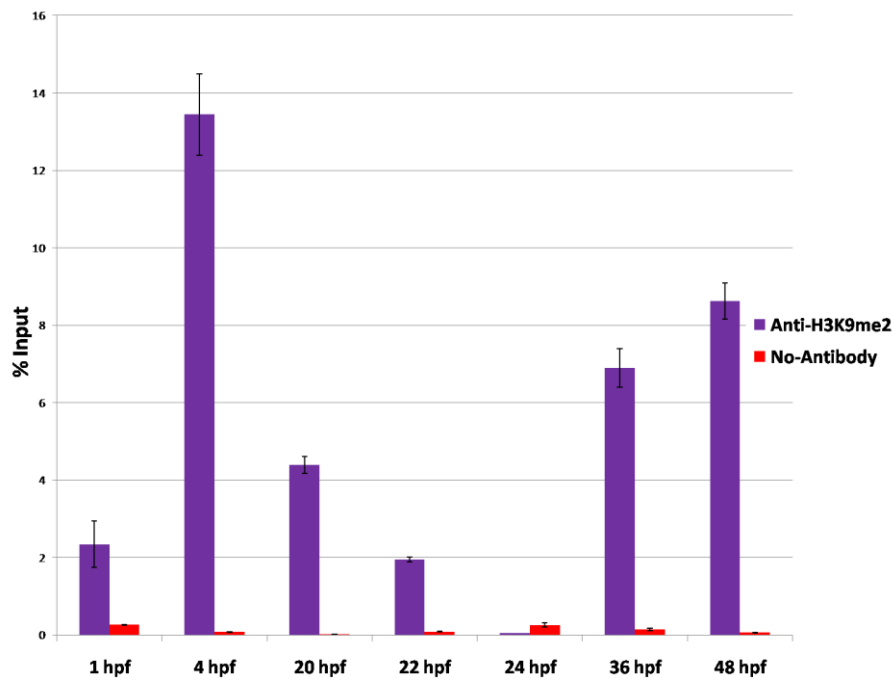


Figura 27: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con *Anti-H3K9me2* (viola) e senza anticorpo (rosse).

Per verificare che lo stadio di dimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 derivasse da un precedente stato di trimetilazione, ho deciso di effettuare una reazione di immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere la trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 *-Anti-H3lys9me3-*. Ho deciso di utilizzare la cromatina di embrioni bloccati dopo 1 ora, 4 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 ore dalla fecondazione. Diverse aliquote di cromatina di tutti gli stadi di sviluppo sono stati utilizzati per le reazioni di immunoprecipitazione effettuate con l'anticorpo *-Anti-H3lys9me3-*. Sono stati eluiti i complessi, formati per l'interazione degli anticorpi con gli specifici residui riconosciuti ed è stata effettuata la reversione del cross-linking, a cui sono stati sottoposti anche campioni di cromatina (Input) non soggetti ad immunoprecipitazione. Il DNA così recuperato è stato poi analizzato per Real Time PCR, utilizzando per l'amplificazione la coppia di primers, RealProm1D ed RealProm1R (Figura 23). Il buon esito della reazione è

stato controllato mediante una curva di melting. I risultati ottenuti sono stati normalizzati mediante il metodo della percentuale di input (Haring et al., 2007). Come si vede in Figura 28 si osserva il picco massimo dopo la prima ora di sviluppo. Successivamente la percentuale di input immunoprecipitato decresce fino al raggiungimento del valore più basso dopo 24 ore di sviluppo. Si osserva nuovamente un aumento dopo 48 ore dalla fecondazione.

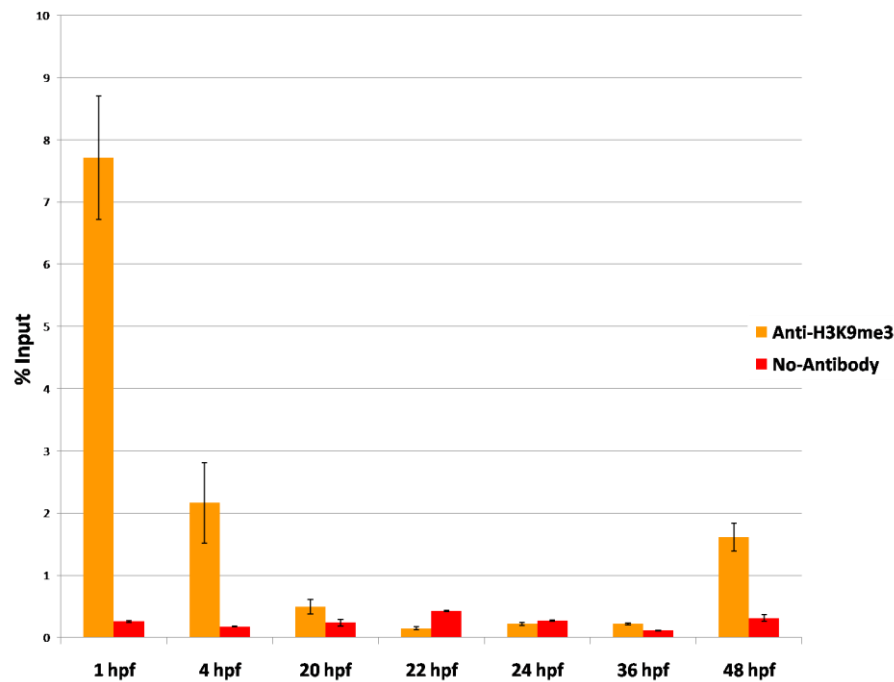


Figura 28: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-H3K9me3 (arancione) e senza anticorpo (rosse).

Successivamente, per verificare che lo stato di acetilazione fosse realmente correlato a uno stato di attivazione trascrizionale ho effettuato un'immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere specificamente l'RNA polimerasi II. Anche in questo caso ho deciso di utilizzare la cromatina di embrioni bloccati dopo 1 ora, 4 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 dalla fecondazione. Come si vede dalla Figura 29, dopo 1 ora e dopo 4 ore dalla fecondazione non è presente DNA immunoprecipitato. È invece presente dopo 20 ore di sviluppo e raggiunge il picco massimo alle 24 ore di sviluppo. Successivamente la percentuale di DNA immunoprecipitato decresce (36 ore) fino a raggiungere, a 48 ore dalla fecondazione, gli stessi livelli dello stadio più precoce. Osservando la Figura 14 possiamo osservare come l'andamento dell'acetilazione della lisina 9 e la presenza sul promotore basale dell'RNA polimerasi II siano praticamente sovrapponibili.

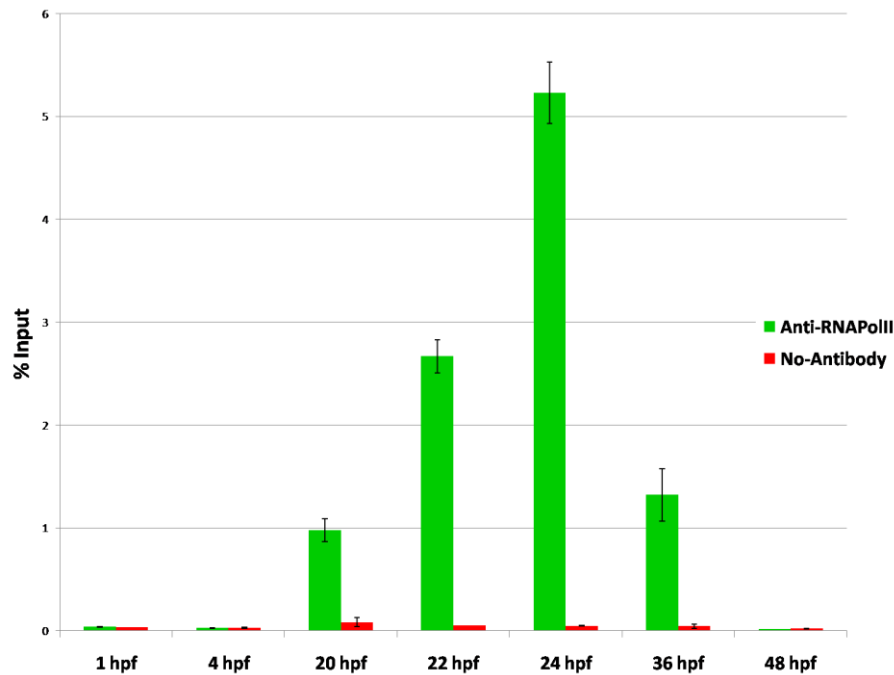


Figura 29: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-RNAPolII (verde) e senza anticorpo (rosso).

Dati presenti in letteratura (Robertson *et al*, 2008; Rudolph *et al*, 2007; Dijk *et al*, 2005) dimostrano un ruolo fondamentale della lisina 4 dell'istone H3 nella regolazione trascrizionale. In particolare è stato messo in luce il ruolo dualistico della metilazione di questo residuo: in presenza della lisina 4 monometilata la cromatina si trova in una configurazione di tipo chiuso, mentre in presenza della lisina 4 trimetilata la cromatina si trova in una configurazione di tipo aperto e quindi accessibile ai diversi fattori che permettono la trascrizione. Ho pertanto deciso di verificare il ruolo di queste modifiche post-traduzionali dell'istone H3 nel nostro modello sperimentale. A tale scopo ho condotto delle reazioni di immunoprecipitazioni utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere lo stato monometilato della lisina 4 dell'istone H3 -*Anti-H3K4me1*- e un anticorpo in grado di riconoscere lo stato trimetilato della lisina 4 dell'istone H3 -*Anti-H3K4me3*-. Anche in questo caso ho deciso di utilizzare la cromatina di embrioni bloccati dopo 1 ora, 4 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 dalla fecondazione. Come si vede in Figura 30, per quanto riguarda le immunoprecipitazioni effettuate con l'anticorpo -*Anti-H3K4me1*- si osserva il picco massimo dopo le prime 4 ore di sviluppo. Successivamente la percentuale di input immunoprecipitato decresce fino al raggiungimento del valore più basso dopo 24 ore di sviluppo. Si osserva nuovamente un aumento dopo 48 ore dalla fecondazione.

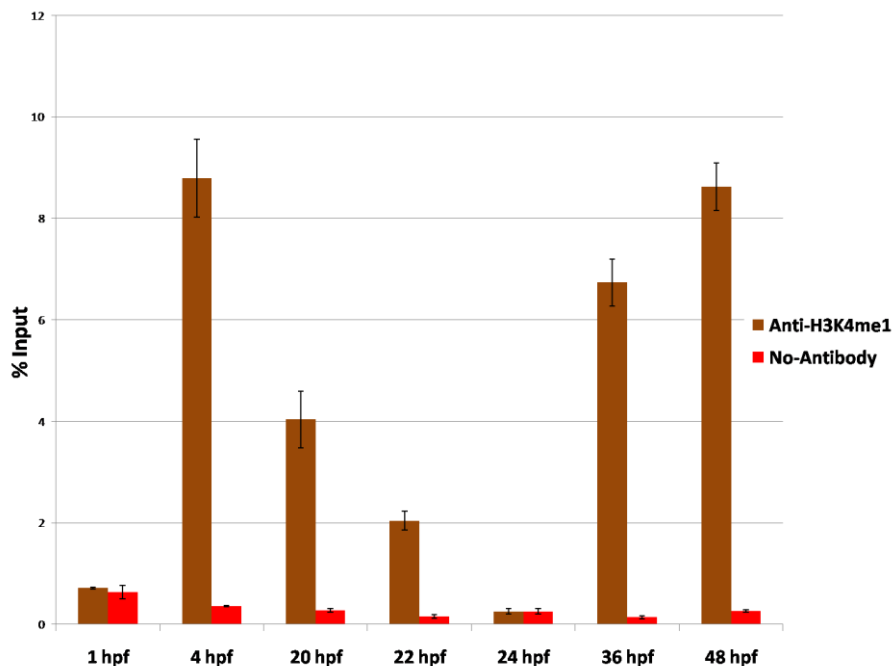


Figura 30: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-H3K4me1 (marrone) e senza anticorpo (rosso).

Invece, utilizzando l'anticorpo *-Anti-H3K4me3-*, si vede come dopo 1 ora e dopo 4 ore dalla fecondazione questa modifica della lisina 4 dell'istone H3 sia praticamente assente. È invece presente dopo 20 ore di sviluppo e raggiunge il picco massimo alle 24 ore di sviluppo. Successivamente la percentuale di DNA immunoprecipitato decresce (36 ore) fino a raggiungere, a 48 ore dalla fecondazione, gli stessi livelli dello stadio più precoce (Figura 31). Successivamente ho deciso di analizzare la metilazione della lisina 27, una modifica delle code amino-terminali degli istoni nota per la funzione regolativa di tipo negativo della trascrizione. Anche in questo caso ho deciso di utilizzare la cromatina di embrioni bloccati dopo 1 ora, 4 ore, 20 ore, 22 ore, 24 ore, 36 ore e 48 dalla fecondazione. Come si vede in Figura 32, ad esclusione della reazione effettuata con la cromatina preparata dagli embrioni bloccati dopo un'ora dalla fecondazione, tutte le reazioni hanno dato una quantità equivalente di DNA immunoprecipitato. Questo risultato sorprendente ci ha portato a ipotizzare che la metilazione della lisina 27 presente durante tutti gli stadi di sviluppo fosse responsabile del silenziamento del gene PIT α 2 in tutti quei territori dell'embrione non correlati con lo sviluppo neuronale.

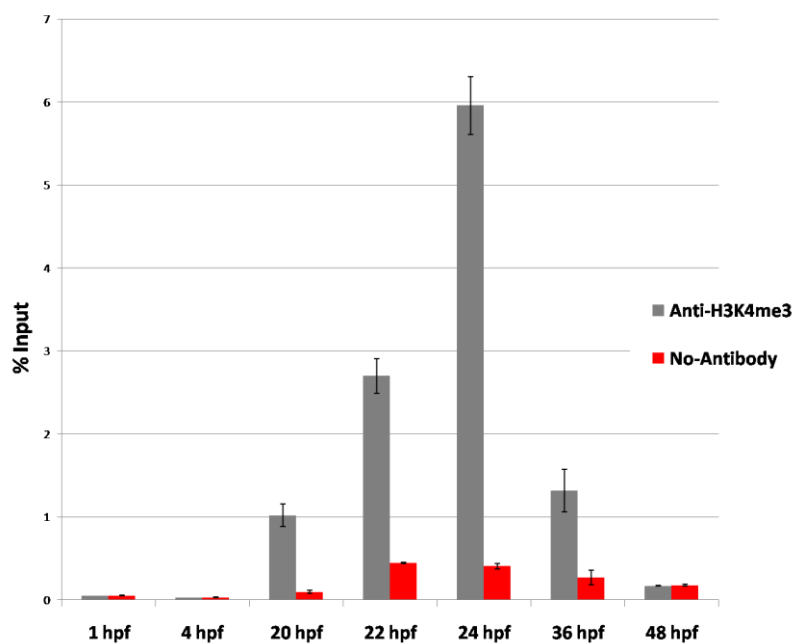


Figura 31: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-H3K4me3 (grigio) e senza anticorpo (rosso).

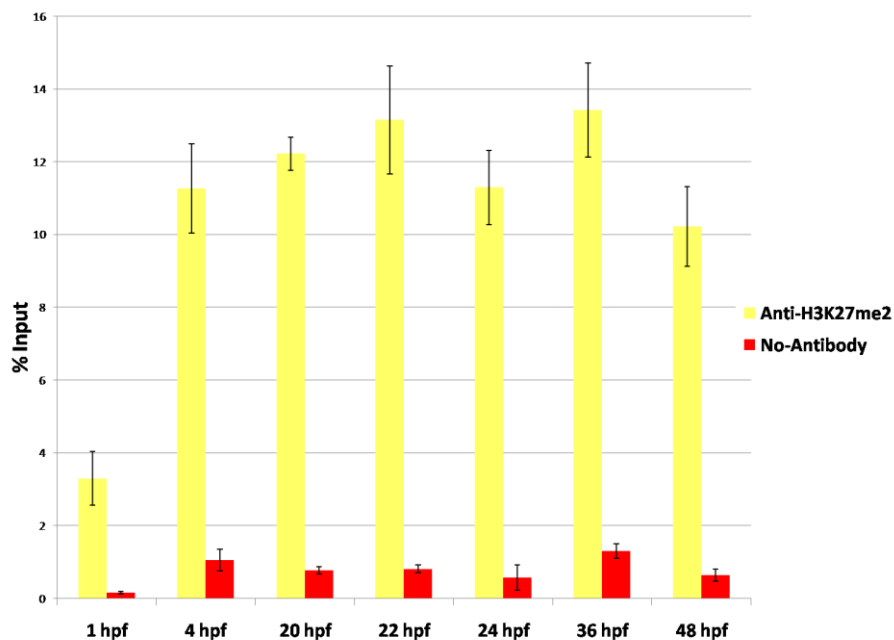


Figura 32: Analisi mediante qChIP dei campioni immunoprecipitati estratti da embrioni a differenti stadi di sviluppo. Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-H3K27me2 (giallo) e senza anticorpo (rosso).

Per verificare la nostra ipotesi ho deciso di mettere a punto una reazione di doppia immunoprecipitazione (Re-ChIP) per escludere la presenza della metilazione della lisina 27 nella cromatina delle regioni trascrizionalmente attive dell'embrione. Per fare questo, la prima reazione di immunoprecipitazione è stata effettuata sulla cromatina estratta da embrioni bloccati dopo 24 ore dalla fecondazione (quindi uno stadio in cui il gene PIT α 2 è attivo) con l'anticorpo in grado di riconoscere specificatamente l'RNA polimerasi II. In Figura 33 (ChIP) si può osservare il buon esito della reazione. Dopo opportuni lavaggi necessari per l'eliminazione dell'eccesso del primo anticorpo (Geisberg et Al., 2004), la

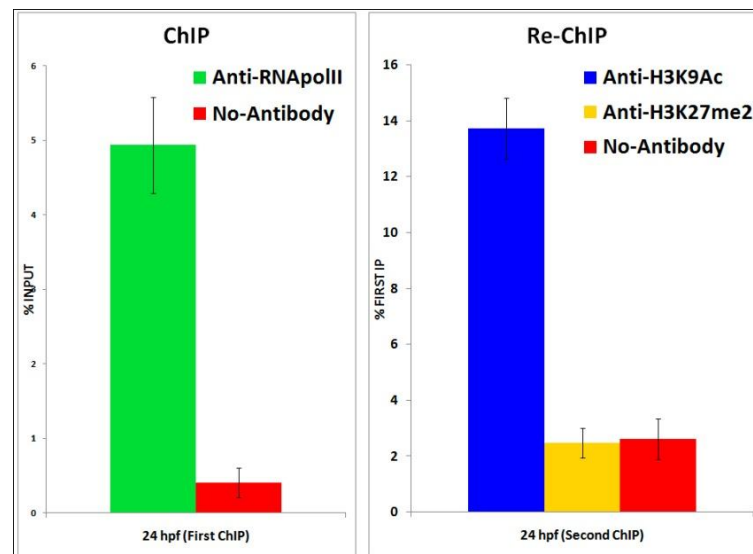


Figura 33: Analisi Re-ChIP del promotore basale di PIT α 2. ChIP- Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-RNAPolIII (verde) e senza anticorpo (rosso). Re-ChIP- Le barre indicano la percentuale di First IP immunoprecipitato con Anti-H3K9ac (blu), con Anti-H3K27me2 (giallo) e senza anticorpo (rosso).

seconda reazione di immunoprecipitazione, condotta sulla cromatina immunoprecipitata in precedenza (First IP), è stata effettuata utilizzando l'anticorpo in grado di riconoscere la lisina 9 acetilata dell'istone H3 e l'anticorpo in grado di riconoscere la lisina 27 dimetilata dell'istone H3. Come si vede dalla Figura 33 (Re-ChIP) si ottiene un picco di DNA immunoprecipitato esclusivamente quando la reazione è condotta usando l'anticorpo -anti-H3K9ac-. Questo risultato permette di escludere la presenza della lisina 27 dimetilata nelle regioni in cui il gene è in attiva trascrizione. Poiché come si vede dalla Figura 32 utilizzando l'anticorpo -anti-H3K27me2- si ottiene un immunoprecipitato utilizzando la cromatina di embrioni bloccati dopo 24 ore dalla fecondazione, avendone escluso la presenza nelle regioni in cui il gene è trascritto posso affermare la presenza di questa specifica modifica nelle regioni in cui il gene non è trascritto. Per avere un'ulteriore

informazione sulla presenza della lisina 27 dimetilata negli stadi di sviluppo più precoci ho deciso di condurre un'altra analisi mediante Re-ChIP utilizzando la cromatina estratta da embrioni bloccati dopo 4 ore dalla fecondazione, uno stadio in cui il gene PIT α 2 non è attivo. La prima reazione di immunoprecipitazione è stata effettuata utilizzando l'anticorpo -Anti-H3K9me2-, la seconda utilizzando gli anticorpi -Anti-RNAPolIII- e -Anti-H3K27me2-. Come si vede dalla Figura 34, si ottiene un picco di DNA immunoprecipitato esclusivamente quando la reazione è condotta usando l'anticorpo diretto contro la lisina 27 dimetilata. Questo risultato ci permette di associare la presenza della lisina 27 dimetilata dell'istone H3 a uno stato non attivo trascrizionalmente del gene PIT α 2.

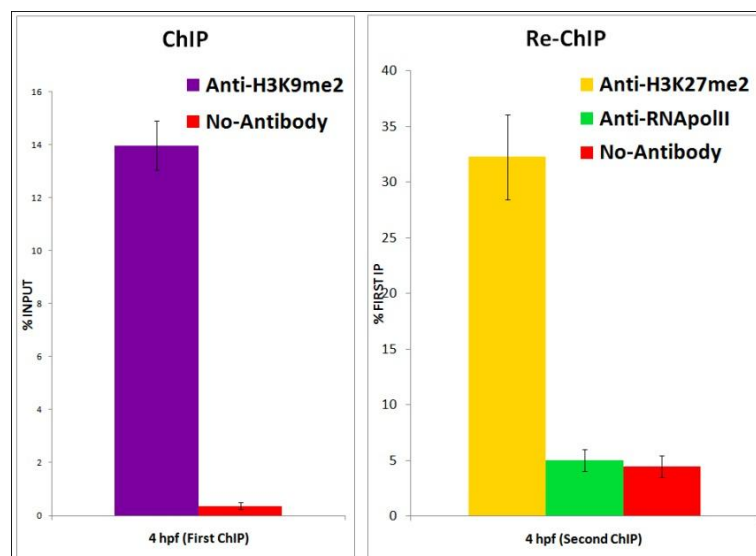


Figura 33: Analisi Re-ChIP del promotore basale di PIT α 2. ChIP- Le barre indicano la percentuale di input immunoprecipitata con Anti-H3K9me2 (viola) e senza anticorpo (rosso). Re-ChIP- Le barre indicano la percentuale di First IP immunoprecipitato con Anti-H3K27me2 (giallo), con Anti-RNAPolIII (verde) e senza anticorpo (rosso).

I risultati ottenuti durante i tre anni di svolgimento del mio progetto di dottorato mettono in luce come per la corretta espressione del gene PIT α 2 siano fondamentali i meccanismi di rimodellamento della cromatina che agiscono sul promotore basale. Inizialmente la presenza di siti ipersensibili alla DNaseI esclusivamente sul DNA estratto da embrioni a uno stadio dello sviluppo in cui il gene è attivo (Figura 18) ha fortemente suggerito che lo stato di compattamento della cromatina subisce una modifica nel corso dell'embriogenesi. Questa evidenza sperimentale è stata in seguito confermata dalle analisi effettuate mediante qChIP. Ho infatti dimostrato nelle prime fasi dello sviluppo embrionale la presenza di modifiche che sono indice di uno stato chiuso della cromatina, la lisina 9 dell'istone H3 trimetilata e dimetilata (Figure 27 e 28) e la lisina 4 dell'istone H3 monometilata (Figura 30), un dato che è in perfetto accordo con il profilo di espressione

del gene $PIT\alpha 2$ in precedenza evidenziato (Figura 9). Sono anche stato in grado di dimostrare che, con il procedere dello sviluppo, queste modifiche responsabili di uno stato chiuso sono progressivamente sostituite da modifiche necessarie per il decompattamento. Infatti, a partire da 20 ore dopo la fecondazione la presenza della lisina 9 dell'istone H3 acetilata e della lisina 4 dell'istone H3 trimetilata si fa via via molto più marcata fino ad ottenere un picco di acetilazione/trimetilazione a 24 ore dalla fecondazione (Figure 26 e 31). Questo dato, che indica l'esistenza di una modificazione dinamica delle code N-terminali di H3 finalizzata all'espressione temporalmente regolata del gene $PIT\alpha 2$, è ulteriormente rafforzato dall'analisi effettuata utilizzando l'anticorpo in grado di riconoscere l'RNA polimerasi II (Figura 29). Quest'ultima analisi dimostra infatti come ci sia una perfetta sovrapposizione temporale tra il reclutamento dell'enzima sulle sequenze del promotore basale e il progressivo instaurarsi di modifiche in grado di determinare uno stato aperto della cromatina. Da notare infine che, dopo 48 ore dalla fecondazione si instaura nuovamente lo stato chiuso della cromatina (dimostrato dalla percentuale di immunoprecipitato che si ottiene utilizzando gli anticorpi *-Anti-H3K9me2-* e *-anti-H3K4me1-* (Figure 27 e 30)). Questi dati, seppur in modo indiretto, dimostrano che per la corretta espressione temporale del gene $PIT\alpha 2$ è fondamentale l'azione concertata di una serie di enzimi responsabili delle modifiche delle code dell'istone H3. Nelle fasi iniziali dello sviluppo la lisina 9 per passare da uno stato trimetilato a uno acetilato deve subire una demetilazione sequenziale e successivamente una acetilazione. Esattamente il contrario accade dopo 36-48 ore dalla fecondazione, infatti viene prima deacetilata e in seguito metilata. La lisina 4 dell'istone H3 invece, subisce una metilazione dopo la 20 ore dalla fecondazione e una demetilazione dopo le 36 ore dalla fecondazione. Risulta evidente quindi che per la regolazione dell'espressione di $PIT\alpha 2$ sono necessarie una serie di attività enzimatiche che agiscono di concerto (probabilmente in seguito all'azione di complessi multimerici) per determinare una finestra temporale in cui lo stato di apertura della cromatina permette l'assemblamento del PIC sul promotore basale e la conseguente trascrizione. Lo stato della cromatina sembra giocare un ruolo chiave anche per la regolazione spaziale dell'espressione. L'analisi effettuata mediante Re-ChIP (Figure 33 e 34) ha messo in evidenza come la lisina 27 dell'istone H3 dimetilata, la cui presenza è costante in tutte le fasi dello sviluppo (Figura 32), si ritrova in regioni di cromatina chiusa. Infatti non è co-localizzata né con l'RNA polimerasi II né con la lisina 9 acetilata dell'istone H3 che sicuramente indicano uno stato di cromatina in attiva trascrizione, mentre è co-localizzata con la lisina 9 dimetilata dell'istone H3 che invece è indice di uno

stato della cromatina che non permette la trascrizione. La metilazione della lisina 27 quindi, potrebbe essere uno dei meccanismi responsabili del mantenimento del silenziamento genico nei territori non neuronali dell'embrione. Studi recenti sono peraltro a favore di questa ipotesi, è stato infatti dimostrato che un ciclo di metilazione/demetilazione della lisina 27 è in grado di reclutare proteine della famiglia Polycomb portando al silenziamento dei geni HOX (Lee et al., 2007)

Materiali e Metodi.

Estrazione di nuclei.

Uova di riccio di mare *P. lividus* sono state separate dalle gonadi in acqua di mare (filtrata attraverso filtri millipore da 0,45 µm), e fecondate con una quantità appropriata di spermatozoi provenienti da individui della stessa specie. In media 5L di uova fecondate (alla concentrazione media di 5000/ml) sono stati posti a 18°C con agitazione in acqua di mare filtrata attraverso millipore ed addizionata di antibiotici (50 µg/ml benzilpenicillina, 30 µg/ml streptomycina, 10 µg/ml sulfadazina) fino al raggiungimento dello stadio di sviluppo desiderato (morula o gastrula). Nel caso della preparazione di colture di embrioni allo stadio di morula la fecondazione viene fatta in presenza di PABA (acido para-amminobenzoico) per inibire l'irrigidimento della membrana di fecondazione (che normalmente verrebbe "lisata" ad uno stadio successivo a quello di morula) e facilitarne quindi la rimozione necessaria per la successiva preparazione della frazione nucleare. Gli embrioni sono stati quindi raccolti per sedimentazione e lavati una volta con KCl 0,55 M e una volta con una soluzione di glucosio 1 M. Dopo centrifugazione a 1.800 rpm per 5 min. il pellet embrionale è stato risospeso in un egual volume di una soluzione 0,64 M saccarosio, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM spermidina, 0,1 mM PMSF, e diluito con ugual volume di una soluzione di composizione uguale alla precedente ma contenente 0,32 M saccarosio. A questo punto è stata ottenuta la rottura della membrana cellulare; per gli embrioni allo stadio di morula mediante passaggio attraverso 3 membrane con pori di dimensioni decrescenti (1x 150 µm, 1x 75 µm e 10x 48 µm), mentre per gli embrioni allo stadio di gastrula mediante omogenizzazione in "Dounce" (100 colpi pestello B). Dopo avere aggiunto al lisato/omogenato 2 volumi di una soluzione 2 M saccarosio, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM spermidina, 0,1 mM PMSF, 20 ml della soluzione così ottenuta sono stati stratificati su un cuscinetto di saccarosio (costituito da 11,5 ml di una soluzione 1,8 M saccarosio, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM spermidina, 0,1 mM PMSF), ed i nuclei pellettati per centrifugazione a 15000 rpm per 30 min. a 4°C. Il pellet di nuclei è stato risospeso in una soluzione 100mM KCl, 20 mM HEPES pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM spermidina, 0,1 mM PMSF, 20% glicerolo e conservato in azoto liquido.

Amplificazione mediante PCR.

I frammenti di DNA sono stati amplificati utilizzando l'enzima Taq polimerasi in presenza di un appropriato buffer di reazione, MgCl₂ 1,5 mM c.f., dNTP 200 μM c.f. di ognuno dei quattro dNTP. Le coppie di oligonucleotidi utilizzate sono:

E6D (5'-CGGTTGACAACCGCTGACGT)

E6R (5'-CATGATGATACATTATTTCGAATTCGAAGTA)

e

Real-Prom-1D (5'-GCGCCGAAACGGAATTCAATA)

Real-Prom-1R (5'-GATGATACATTATTTCGAATTCGAAG).

Amplificazione mediante Real Time PCR.

Tutte le amplificazioni sono state effettuate utilizzando il kit SsoFast EvaGreen Supermix kit (BioRad) in un volume finale di 20 μl utilizzando la coppia di primers

Real-Prom-1D (5'-GCGCCGAAACGGAATTCAATA)

Real-Prom-1R (5'-GATGATACATTATTTCGAATTCGAAG).

I campioni sono stati quantificati mediante una curva standard. I risultati ottenuti, sono stati normalizzati mediante il metodo della percentuale di input (Haring et al., 2007).

Marcatura con T4 polinucleotide Kinasi.

Gli oligonucleotidi sintetici sono stati marcati terminalmente incubando 10 picomoli di ognuno di essi per 30 min a 37°C in presenza di 50 μCi di μ-³²P ATP (10 picomoli) e 10 unità di polinucleotide chinasi di T4. Dopo 30' la reazione è stata bloccata denaturando l'enzima a 80°C per 10 min. e il DNA è stato precipitato con alcool etilico assoluto e CH₃COONa 3M (pH 5,2). Gli oligonucleotidi sono stati quindi recuperati mediante centrifugazione a 13.000 RPM, ed i pellets così ottenuti sono stati risospesi in 10 μl e utilizzati direttamente nella reazione di PCR

Digestione con DNaseI della cromatina nucleare e purificazione del DNA.

2×10^7 nuclei (circa 10 μ g) sono stati centrifugati a 600g per 10 minuti e il pellet risospeso in 500 μ l di Buffer D (0,15mM Spermina, 0,5mM Spermidina, 15mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2mM EGTA, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0,2mM EDTA.). E' stata aggiunta la DNaseI a concentrazioni crescenti (0, 0.4, 0.8, 1, 4, 6 unità) e la reazione è stata avviata aggiungendo 4mM MgCl e 2mM CaCl₂. I campioni sono stati incubati in ghiaccio per 5 minuti e la reazione è stata interrotta mediante l'aggiunta di 10mM EDTA. Per la purificazione del DNA i nuclei sono stati centrifugati a 600g per 10 minuti. I pellet sono stati risospesi in 100 μ l di 50mM Tris-HCl pH8, 0,2mM EDTA e incubati con 50 μ g di RNasi A per 30 minuti a 37° C. Sono stati aggiunti 300 μ l di una soluzione contenente 4M Guanidinio-Isotiocianato, 420mM Sodio Citrato, 8,3% Sarcosile. Dopo un'incubazione di 30 minuti sono state eseguite 2 estrazioni con fenolo-cloroformio e 1 con cloroformio. Il DNA è stato precipitato con etanolo assoluto e risospeso in H₂O.

Analisi di restrizione.

Il DNA estratto dai nuclei è stato sottoposto ad analisi di restrizione utilizzando diversi enzimi di restrizione (*EcoRI*, *SaII*) nelle condizioni di 1-10 unità di enzima per ogni μ g di DNA a 37°C, O.N.. L'analisi dei frammenti di DNA ottenuti con i diversi enzimi è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'0,8%.

Southern Blot e ibridazione

I frammenti di DNA ottenuti dalle digestioni con enzimi di restrizione del DNA genomico, sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'0,8% e quindi sono stati trasferiti ("blotting") su una membrana di nylon. Il trasferimento del DNA dal gel al filtro di nylon è avvenuto per capillarità utilizzando il tampone salino 20X SSC (1X SSC: 3 M NaCl, 0.3 M sodio citrato). Il filtro di nylon, dopo il blotting è stato lavato con una soluzione di 2X SSC per rimuovere eventuali tracce di agarosio e l'eccesso di NaCl. Quindi i frammenti di DNA sono stati fissati al filtro lasciando quest'ultimo a 80°C, per due ore. I filtri di nylon sono stati preibridati a 65°C per 30 minuti in una soluzione di 6xSSC, 5xDenhardt (100x Denhardt=2% polivinil pirolidone, 2% Ficoll, 2% BSA), 0,5% SDS

(Sodio Dodecil Solfato) contenente 20 µg/ml di DNA di spermi di salmone denaturato. L'ibridazione è stata condotta in una soluzione con la stessa composizione contenente inoltre la sonda radioattiva specifica (1-1,5x10⁶ cpm/ml= 5-10 ng/ml) e la reazione di ibridazione è stata incubata a 65°C (o a 50°C) per tutta la notte. I filtri sono stati quindi lavati a 65°C in 2xSSC, 0,5% SDS, in 1xSSC, 0,5% SDS e in 0,2xSSC, 0,5% SDS (per un lavaggio ad alta stringenza) e infine esposti a lastre autoradiografiche a una temperatura di -80°C per tempi variabili in base all'intensità del segnale radioattivo.

Immunoprecipitazione della cromatina

Gli embrioni allo stadio di sviluppo desiderato vengono fissati in formaldeide, alla concentrazione finale dell'1% in acqua di mare filtrata ed agitati per 10 minuti. La reazione di cross-linking viene bloccata aggiungendo glicina alla concentrazione finale di 125 mM ed agitando per 5 minuti. Gli embrioni vengono lasciati sedimentare e poi centrifugati (4 minuti a 400 rpm) e risospesi in 10 volumi di cell lysis buffer (10 mM HEPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0,5% NP40 ed inibitori delle proteasi). Vengono poi lasciati 10 minuti in ghiaccio. Se necessario si passano al dounce per 5-15 colpi, per assicurare il rilascio di tutti i nuclei. Si centrifuga 10 minuti a 3000 rpm per pellettare i nuclei. Questi vengono poi risospesi in 2,5 volumi di nuclear lysis buffer (50 mM tris pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS ed inibitori delle proteasi) e incubati in ghiaccio per 10 minuti. La cromatina viene sonicata con microtip di brason sonifier 250. I detriti vengono allontanati per centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti. Il supernatante così ottenuto viene aliquotato e conservato in azoto liquido. Si prelevano 25 µl di cromatina, si aggiungono 0,5 µl di RNasi (20 mg/ml) e si incuba per 20 minuti a 37°C. Si aggiungono 2,6 µl di 10% SDS (1% finale) e 0,6 µl di proteinasi K (20 mg/ml) e si incuba per 30 minuti a 56°C. Vengono fatte tre estrazioni con fenolo-cloroformio e si precipita il DNA con 0,3 M finale NH₄Ac e 2,5 volumi di EtOH, per 30 minuti in ghiaccio secco. Si centrifuga 10 minuti a 13000 rpm e si lava il pellet con EtOH al 70%. Il pellet viene risospeso in 8 µl di acqua e si carica tutto con 3 µl di colorante su gel d'agarosio 1%. Tutte le reazioni di immunoprecipitazione sono state effettuate con il kit CHIP-IT EXPRESS KIT della ACTIVE MOTIF secondo protocollo variando solamente la quantità di cromatina usata. I campioni immunoprecipitati sono stati analizzati mediante P.C.R. alle condizioni descritte precedentemente. Per le analisi di tipo Re-ChIP la cromatina immunoprecipitata con la prima reazione è stata incubata per 15

minuti con 100 μ l di CHIP elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1%SDS) a 68°C per rimuovere l'eccesso di anticorpo. Le successive reazioni di immunoprecipitazione sono state effettuate con il kit CHIP-IT EXPRESS KIT della ACTIVE MOTIF secondo protocollo. Le immunoprecipitazioni sono state condotte utilizzando i seguenti anticorpi (precedentemente testati contro proteine di *Paracentrotus lividus*): Anti-RNAPolII (Abcam #ab24759), Anti-H3K9ac (Abcam #ab4441), Anti-H3K9me2 (Abcam #ab1220), Anti-H3K9me3 (Abcam #8898), Anti-H3K4me3 (Abcam #ab1012), Anti-H3K4me1 (Abcam #ab8895) e Anti-H3K27me2 (Abcam #ab24684).

Bibliografia.

- Alexandraki, D, and Ruderman, J.V. (1983). Evolution of alpha q- and beta-tubulin genes as inferred by the nucleotide sequences of sea urchin cDNA clones .J Mol Evol. 1983; 19(6) : 397-410.
- Allis CD, Chicoine LG, Richman R, Schulman IG. (1985). Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Dec;82(23):8048-52.
- Amore, G. and Davidson, E.H.(2006). Cis-regulatory control of cyclophilin, a member of ETS-DRI skeletogenic gene battery in the sea urchin embryo. Dev. Biol. May 5;293(2): 555-64.
- Amore, G.,Yavrouian, R.G.,Peterson,K.J.,Ransik,A.,McClay, D.R. and Davidson, E.H.(2003).Spdeadringer, a sea urchin embryo gene required separately in skeletogenic and oral ectoderm gene regulatory networks. Dev. Biol.,261,;55-81.
- Anstrom, J.A. (1992). Microfilaments,cell shape changes, and the formation of primary mesenchyme in sea urchin embryos. J.Exp.Zool.264,312-322.
- Arnone, M. I. and Davidson, E. H. (1998). Cis-regulation downstream of cell type specification: a single compact element controls the complex expression of the CyIIa gene in sea urchin embryos. Development 125, 1381-1395.
- Arnone, M.I., Bogarad,L.D.,Collazzo, A.,Kirchhamer,C.V., Cameron, R.A.,Rast, J.P., Gregorians, A., and Davidson, E.H.(1997). Green fluorescent protein in sea urchin: new experimental approaches to transcriptional regulatory analysis in embryos and larvae. Development 124,4649-4659.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC and Kouzarides T (2001). “Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by HP1 chromo domain”. Nature 410: 120-124.
- Belda-Iniesta C, R. Perona, J. Carpeno, S. Chattopadhyay, E. Casado, P. Cejas, J. Vara, C. Guerra, M. Baron (2004). Do beta-tubulin pseudogenes really matter?. The Lancet Oncology, Volume 5, Issue 5, Pages 271-272 C.
- Benke, O., and Forer, A. (1967). Evidence for four classes of microtubules in individual cells. J. Cell Sci. 2, 169-192.
- Berger, S.L., 2002. Histone modification in transcriptional regulation. Curr. Opin. Gen. Dev. 12: 142-148.
- Bisgrove,B.W., and Burke, R.,D. (1986) Development of serotonergic neurons in embryos of sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. Develop.Growth and Differ.,28(6) 569-574.
- Bo, J., and Wensink, P. C. (1989). The promoter region of the drosophila $\alpha 2$ -tubulin gene directs testicular and neural specific expression. Development (Cambridge, UK) 106, 581-587.

- Bobinsec, Y., Marcaillou, C., Debec, A. (1999). Microtubule polyglutamylation in *Drosophila melanogaster* brain and testis. *Eur. J. Cell. Bio. Sep*;78(9) :671-4.
- Bre, M.H., Redeker, V., Vinh, J., Rossier, J., Levilliers, N. (1998). Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmatic and stable axonemal microtubules in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell. Sep*;9(9):2655-65.
- Britten, R.J., Cetta, A., Davidson, E.H., (1978). The single-copy DNA sequence polymorphism of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Cell* 15, 1175–1186.
- Bryan, J., and Wilson, L. (1971). Are cytoplasmatic microtubules heteropolymers? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1762-1766.
- Cairns BR, Kim YJ, Sayre MH, Laurent BC, Kornberg RD. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Mar* 1;91(5):1950-4.
- Cameron, R. A. and Davidson, E. H. (1989). The oral-aboral axis of a sea urchin embryo is specified by first cleavage. *Development* 106, 641-647.
- Cameron, R. A. and Davidson, E. H. (1990). Segregation of oral from aboral ectoderm precursors is completed at fifth cleavage in embryogenesis of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 137, 77-85.
- Cameron, R. A. and Davidson, E. H. (1991). Cell type specification during sea urchin development. *TIG*, July 1991 vol 7 n° 7.
- Casano C, Ragusa M, Cutrera M, Costa S, Gianguzza F.(1996). Spatial expression of alpha and beta tubulin genes in the late embryogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Int J Dev Biol. Oct*;40(5):1033-41.
- Casano C, Roccheri MC, Maenza L, Migliore S, Gianguzza F. (2003). Sea urchin deciliation induces thermoresistance and activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell Stress Chaperones Spring*;8(1):70-5.
- Chan, S. et al. (1992). SpCOUP-TF: a sea urchin member of the steroid/Thyroid hormone receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol 89, pp. 10568-10572.
- Chang P and Stearns T (2000). “Delta-Tubulin and Epsilon-Tubulin: the new Human Centrosomal Tubulins Reveal new Aspects of Centrosome Structure and Function”. *Nat. Cell Biol.* 2(1): 30-5.
- Cheers, M. S. and Etensohn, C.A.(2005). P16 is an essential regulator of skeletogenesis in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 283, 384-396.
- Chrétien, D., Fuller S.D., Karsenti E. (1995). Structure of growing microtubule ends :two dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol*,129:1311-1328.

- Chu B, Wilson TJ, McCune-Zierath C, Snustad DP, Carter JV. (1998) Two beta-tubulin genes, TUB1 and TUB8, of *Arabidopsis* exhibit largely nonoverlapping patterns of expression. *Plant Mol Biol.* Jul;37(5):785-90. *Plant Mol Biol.* 1998 Jul;37(5):785-90.
- Chu, B. et al., (1993). Alteration of β -tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103, 371-377.
- Coffman, J.A. and Davidson, E. H. (1997). Spmyb functions as an intra-modular repressor to regulate spatial expression of CyIIIa in sea urchin embryos. *Development* 124, 4717-4727.
- Coffman, J.A., Davidson, E.H. (2001). Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 203, 18-28.
- Coffman, J.A., Dickey-Sims, C., Haug, J.S., McCarthy, J.J. and Robertson, A.J. (2004). Evaluation of developmental phenotypes produced by morpholino antisense targeting of sea urchin Runx gene. *BMC Biol.* May 7.2:6.
- Costa, S., Ragusa, M.A., Drago, G., Casano, C., Alaimo, G., Guida, N., and Gianguzza, F. (2004). Sea urchin neural $\alpha 2$ tubulin gene: isolation and promoter analysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 316, 446-453.
- Cox KH, Angerer LM, Lee JJ, Davidson EH, Angerer RC. (1986). Cell lineage-specific programs of expression of multiple actin genes during sea urchin embryogenesis. *J. Mol. Biol.* Mar 20;188(2):159-72.
- Cox, M.E., and Maness, P.F. (1993). Tyrosine Phosphorylation of α -tubulin is an early response to NGF and pp60^{v-src} in PC12 cells. *J. Mol. Neurosci.* 4, 63-71.
- Czermin B., Schotta G., Hulsmann B.B., Brehm A., Becker P.B., Reuter G. and Imbof A. (2001). "Physical and functional association of SU(VAR) 3-9 and HDAC1 in *Drosophila*". *EMBO rep.* 2: 915-919.
- Davidson EH, Erwin DH. (2006). Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science.* Feb 10;311(5762):796-800.
- Davidson, E. H., Cameron, R. A., Ransik, A. (1998). Specification of cell fate in the sea urchin embryo: summary and some proposed mechanism. *Development* 125, 3269-3290.
- Davie JR, 1997; *Molecular Biology Reports* 24: 197-207.
- Di Bernardo, M., Gianguzza, F., Ciaccio, M., Palla, F., Colombo, P., Di Blasi, F., Fais, M., and Spinelli, G. (1989). Nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding for beta-tubulin of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Nucleic Acids Res.* 1989 Jul 25;17(14):5851.
- Diaz-Nido, J. et al. (1990). Phosphorylation of a neuronal-specific β -tubulin isotype. *J. Biol. Chem.* 265, 13949-13954.

- Dibb NJ, Newman AJ (1989). "Evidence That Introns Arose at Proto-Splice Sites". *The EMBO Journal* vol. 8 no. 7, 2015-2021.
- Dijk, K. (2005). Monomethyl Histone H3 Lysine 4 as an Epigenetic Mark for Silenced Euchromatin in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, vol 17, 2439–2453.
- Dutcher, S.K. (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Current Opinion in Microbiology*, 6:634-640.
- Eddè, B. et al. (1990). Post-translational glutamylation of α tubulin. *Science* 247, 83-85.
- Eipper, B.A. (1972) Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2283-2287.
- Ettensohn, C.A, Illies, M.R., Oliveri, P., De Jong L. (2003). Alx1, a member of Cart1/Alx3/Alx4 subfamily of paired-class homeodomain proteins, is an essential component of the gene network controlling skeletogenic fate specification in the sea urchin embryo. *Development* 130, 2917-2928.
- Ettensohn, C.A. and McClay, D. R. (1986) The regulation of primary mesenchyme cell migration in the sea urchin embryo: transplantations of cell and latex beads. *Dev. Biol.* 117, 380-391.
- Fascher KD, Schmitz J, Hörz W. (1990). Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* Aug;9(8):2523-8.
- Fernandez-Serra, M., Consales, C., Livigni, A. and Arnone, M. (2004). Role of the ERK-mediated signaling pathway in mesenchyme formation and differentiation in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.*, 268, 384-402.
- Fuller, S.D., Gowen B.E., Reinsch S., Sawyer, A., Buendia, B., Wepf, R., Karsenti E. (1995). The core of the mammalian centriole contains gamma-tubulin. *Curr Biol.* Dec 1;5(12):1384-93.
- Fulton, C. and Simpson, P.A. (1976) Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multi-tubulin Hypothesis. In "Cell Motility" (R. Goldman et al), Vol. 3, pp. 987-1005. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Geisberg JV, Struhl K. (2004). Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation, a method for analyzing co-occupancy of proteins at genomic regions in vivo. *Nucleic Acids Res.* Nov 1;32(19):e151.
- Geyp, M. et al. (1996). Increased Tubulin acetylation accompanies reversion to stable ploidy in vincristine-resistant CCRF-CEM cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 87, 117-122.
- Gianguzza, F., Casano, C., and Ragusa, M. (1995). α -Tubulin marker gene of neural territory of sea urchin embryos detected by Whole-mount in situ Hybridization. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 447-483.

- Gianguzza, F., Di Bernardo, M.G., Fais, M., Palla, F., Casano, C., Russo, R., and Spinelli, G. (1990). Sequence and expression of *Paracentrotus lividus* α tubulin gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 4915.
- Gianguzza, F., Di Bernardo, M.G., Sollazzo, M., Palla, F., Ciaccio, M., Carra, E., and Spinelli, G. (1989). DNA sequence and pattern of expression of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) α -tubulin genes. *Mol. Reprod. Dev.* 1, 170-181.
- Giudice, G. (1986). The sea urchin embryo a developmental biological system, pgg. 45-46.
- Giudice, G. (1995). Genes of the sea urchin embryo: an annotated list as of December 1994. *Develop. Growth Differ.* 37, 221-242.
- Grewal SI and Rice JC (2004). "Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs". *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 230-38.
- Gu, W. et al. (1988) Generation of antisera that discriminate among mammalian α -tubulins: introduction of specialized isotypes into cultured cells results in their coassembly without disruption of normal microtubule function. *J. Cell Biol.* 106, 2011-2022.
- Han M, Grunstein M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell.* Dec 23;55(6):1137-45.
- Haring M., Offermann S., Danker T., Horst I., Peterhansel C. and Stam M., (2007). "Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization". *Plant Methods*, 3:11.
- Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW and Crane-Robinson C, (1994); "Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain"; *EMBO J* 13(8): 1823-30.
- Holey, H.D., Turner, F.R., Raff, E.C. (2000). A transient specialization of the microtubule cytoskeleton is required for differentiation of the *Drosophila* visual system. *Dev Biol.* May 15;221(2):375-89
- Holloway, S.P. et al. (1990). The tubulin genes of the Human malaria parasite *Plasmodium Falciparum*, their chromosomal location and sequence analysis of the α -tubulin II gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 257-270.
- Hörstadius, S. (1973). *Experimental embryology of echinoderms*. Clarendon Press, Oxford.
- Hyams, J. S., and Lloyd, C.W. (1994). "Microtubules". Wiley-Liss, New York.
- Job D., Valiron O., Oakley B. (2003). "Microtubule nucleation." *Curr Op Cell Biol*, 15:111-117.
- Kann, M.L., Soues, S., N., Fouquet, J.P. (2003). Glutamylated tubulin :diversity of expression and distribution of isoforms. *Cell Motil Cytoskeleton.* May; 55(1):14-25.

- Kerrigan LA, Croston GE, Lira LM, Kadonaga JT. (1991). Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila* Krüppel gene by the GAGA factor. *J Biol Chem.* Jan 5;266(1):574-82.
- Kirchhamer, C.V. and Davidson, E.H. (1996). Spatial and temporal information processing in the sea urchin embryo: modular and intra-modular organization of the *CyIIIa* gene cis-regulatory system. *Development* 122, 333-348.
- Köhler, J., Schäfer-Preuss, S. And Buttgerit, D., (1996). Related enhancers in the intron of the $\beta 1$ tubulin gene of *Drosophila melanogaster* are essential for maternal and CNS-specific expression during embryogenesis. *Nucleic Acid Reserch*, Vol 24, No.13:2543-2550
- Kornberg RD, Lorch Y. (1999). Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Apr;9(2):148-51.
- Kraush, E. et al. (1981). Complete amino acid sequence of β -tubulin from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4156-4160.
- Kuo MH, Allis CD. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays.* Aug;20(8):615-26.
- Kurihara, H. and Amemiya, S. (2005). Developmental potential of small micromeres in sea urchin embryos. *Zoological Science* 22, 845-852.
- Liang A, Ruiz F, Heckmann K, Klotz C, Tollon Y, Beisson J, Wright M. (1996). Gamma-tubulin is permanently associated with basal bodies in ciliates. *Eur J Cell Biol.* Aug;70(4):331-8
- Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhatar R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science.* Oct 19;318(5849):447-50. Epub 2007 Aug 30.
- Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD and Felsenfeld G (2001). "Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus". *Science* 293(5539): 2453-55.
- Little M, Seehaus T (1988). "Comparative Analysis of Tubulin Sequences". *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 90B no. 4 ,655-670.
- Lu Q, Wallrath LL, Granok H, Elgin SC. (1993). (CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila hsp26* gene. *Mol Cell Biol.* May;13(5):2802-14.
- Ludueña, R.F. et al. (1977). Structure of the tubulin dimer. *J. Biol. Chem.* 252, 7006-7014.
- Maingon R, Gerke R, Rodriguez M, Urbina J, Hoenicka J, Negri S, Aguirre T, Nehlin J, Knapp T and Crampton J (1988). "The Tubulins Genes of *Tripanosoma cruzi*". *Eur. Journal Biochem.* 15; 171(1-2): 285-91.

- Mandelkow, E.M., Mandelkow E., Milligan R.A.(1991).Microtubules dynamics and microtubules caps.a time-resolved Cryo-electron microscopy study. J.Cell.Bio.,114:977-991.
- Margutti-Pinto ME, Khan A, Scaife JA and Fothergill-Gilmore LA (1995). “Organization and structure of an *Onchocerca* β -tubulin gene”. Braz J Med Biol Res (10):1043-53.
- Mary, J., Redeker,V., Le Caer,J.P., Promè, J.C., Rossier,J.(1994). Class I and IV β -tubulin isotypes expressed in adult brain are glutamylated. FEBS letters,353,89-94.
- Mary,J. Redeker,V., Le Caer,J.P.,Rossier,J. Schmitter, J.M.(1996). Posttraslational modification in the C-terminal tail of axonemal tubulin from sea urchin sperm. Jur.Biol, Chem. Vol.271,n° 17, Apr 26,9928-9933.
- Matthews KA, Miller DF et al. (1989). “Developmental distribution of RNA and Protein products of the *Drosophila* α -tubulin gene Family”. Dev. Biol. 132(1): 45-61.
- McKean,P.G., Baines,A., Vaughan,S.,Gull, K. (2003). Gamma-tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the Eukaryotic Flagellum. Curr Biol., 13:598-602.
- Moody, S. A. (2002). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III β -tubulin gene. Gene 294, 269-277.
- Nakajima, Y., Kaneko,H.,Murray,G. and Burke,R.D. (2004). Divergent patterns of neural development in larval echinoids and asteroids. Evolution & Development 6:2,95-104.
- Nakajma, Y. (1986). Development of the nervous system of sea urchin embryos: formation of ciliary bands and the appearance of two types of ectoneural cells in the pluteus. Develop. Growth and Differ., 28 , 531-542.
- Nakajma, Y. (1986). Presence of a ciliary patch in preoral epithelium of sea urchin plutei. Develop. Growth and Differ., 28, 243-249.
- Nogales,E. and Wang,H.W. (2006). Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly:how and why?. Curr. Opi. Cell. Biol. 18 ,179-184.
- Nogales,E., Wolf, S.G., Downing K.H.(1998):Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. Nature,391:199-203.
- Noma K, Allis CD, Grewal SI. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. Science. Aug 10;293(5532):1150-5.
- Oakley,C.E.,Oakley, B.R. (1989).Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. Nature,338:662-664.
- Otim,O., Amore,G., andDavidson, H.E.(2004). SpHnf6, a transcription factor that executes multiple function in sea urchin embryogenesis. Dev.Bio. 273, 226-243.

- Raff, E.C. (1994). The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function Wiley-liss, Inc.
- Ransick A, Davidson EH. (1998). Late specification of Veg1 lineages to endodermal fate in the sea urchin embryo. *Dev Biol.* Mar 1;195(1):38-48.
- Ransick, A. Cameron, R. A. and Davidson, E. H. (1996). Postembryonic segregation of the germ line in sea urchins in relation to indirect development. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* vol 93, pp. 6759-6763.
- Redeker,V., Frankfurter, A., Parker, S.K., Rossier, J., Detrich, H.W. 3rd.(2004) Posttranslational modification of brain tubulins from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*:reduced C-terminal glutamylation correlates with efficient microtubule assembly at low temperature. *Biochemistry.* Sep 28;43(38):12265-74.
- Redeker,V., Levilliers, N., Vinolo, E., Rossier, J., Jaillard, D., Burnette, D., Gaertig, J., Bre M.H..(2005). *J. Biol. Chem.* Jan 7;280(1):596-606.
- Redeker,V., Levilliers, N.,Schmitter, J.M., Le Caer,J., Rossier, J.,Adoutte,A.,Brè, M.H. (1994).Polycylation of tubulin:a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*, Vol.266, 9 December, 1688-1691.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih,G.T., Meyhofer, E.,Gaertg, J.,Verhey, K.J. (2006).Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* Nov 7;16(21):2166-2172.
- Reinke (2004). Anatomy of a hypersensitive site. *Biochimica et Biophysica Acta* 1667 24-29.
- Robertson, A., Bilenky, M., Tam, A. (2008). Genome-wide relationship between histone H3 lysine 4 mono- and tri-methylation and transcription factor binding. *Genome Res.* 2008 18: 1906-1917.
- Rougvie AE, Lis JT. (1990). Postinitiation transcriptional control in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* Nov;10(11):6041-5.
- Ruderman, J.V. and Alexandraki, D. (1983) *Submicrosc Cytol*, 15(1); 349-352.
- Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schafer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T., and Reuter, G. (2007). Heterochromatin Formation in *Drosophila* is Initiated through Active Removal of H3K4 Methylation by the LSD1 Homolog SU(VAR)3-3. *Mol. Cell* 2007.02.025.
- Samaras N, Spithill TW. (1987). Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. *Mol. Biochem. Parasitol.* Oct;25(3):279-91.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002).“Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3”. *Nature* 419: 407–411.

- Simpson RT, Stafford DW. (1983). Structural features of a phased nucleosome core particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Jan;80(1):51-5.
- Shi TL and Perlin MH (2001). “The β -tubulin-encoding gene from *Microbotryum violaceum*: unusual in a variety of ways”. *Curr Genet.* 39(4):253-63.
- Smrzka O.W., Delgehr, N. and Bornens, M.(2000). Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian δ -tubulin. *Current Biology* ,10, 413-416.
- Sosa H and Milligan RA (1996). “Three-dimensional structure of Ncd-decorated microtubules obtained by a back-projection Method”. *J. Mol. Biol.* 260(5): 743-55.
- Strahl BD, Allis CD. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature.* Jan 6;403(6765):41-5.
- Theurkauf WE, Alberts BM et al. (1993). “A central Role for Microtubules in the Differentiation of *Drosophila* oocytes”. *Development* 118(4) 1169-80.
- Vaughan,S. Attwood, T., Navarro,M., Scott,V., McKean,P.,Gull,K.(2000). New tubulins in protozoal parasites. *Curr. Biol*,10:R258-R259.
- Verdone L, Camilloni G, Di Mauro E, Caserta M. (1996). Chromatin remodeling during *Saccharomyces cerevisiae* ADH2 gene activation. *Mol. Cell. Biol.* May;16(5):1978-88.
- Wade RH and Chretien D (1993). “Cryoelectron Microscopy of Microtubules”. *Struct. Biol.* 110(1): 1-27.
- Wallrath LL, Lu Q, Granok H, Elgin SC. (1994). Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays.* Mar;16(3):165-70. Review.
- Wesseling, J. G. et al. (1989). Nucleotide sequence and expression of a β tubulin gene from *Plasmodium Falciparum*, a malarial parasite of man. *Gene* 83, 301-309.
- Wilson, P.G. and Borisy, G.G. (1997). Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *BioEssays* Vol 19, n° 6, 451-454.
- Yaguchi,S., Kanoh,K.,Amemiya,S.,Katow,H. (2000).Initial analysis of immunochemical cell surface properties, location and formation of the serotonergic apical ganglion in sea urchin embryos. *Develop. Growth Differ.* 42,479-488.
- Yuh, C., and Davidson, E. H. (1996).Modular cis-regulatory organization of Endo16, a gut-specific gene of the sea urchin embryo. *Development* 122, 1069-1082.
- Yuh, C., Ransik, A. and Davidson, E. H. (1994). Complexity and organization of DNA-protein interactions in 5'-regulatory region of an endoderm-specific marker gene in sea urchin embryo. *Mechanism of development* 47, 165-186.
- Yuh,C., and Davidson, E.H. (2005).Br1/2/4, the predicted midgut regulator of the endo 16 gene of the sea urchin embryo. *Dev.Bio.* 281, 286-298.

- Yuh, C.H., Li, X., Davidson, E.H., Klein, W.H. (2001). Correct expression of *spec2a* in the sea urchin embryo requires both *Otx* and other cis regulatory elements. *Dev. Biol.*, Apr 15, 232(2):424-38.

Indice

Introduzione	pagina 1
Risultati e discussione	pagina 40
Materiali e metodi	pagina 62
Bibliografia	pagina 68