

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“ FEDERICO II ”



DOTTORATO DI RICERCA IN
GENETICA
E
MEDICINA MOLECOLARE
XVIII CICLO

**“Ruolo di Htl-1, un componente del complesso RSC di
Saccharomyces cerevisiae, in processi a carico del DNA”**

Tutore

Ch.mo Prof.
John Pulitzer Finali

Candidato

Dr.
Moscariello Mario

Coordinatore:

Ch.mo Prof.
Carmelo Bruno Bruni

Anno Accademico 2005/2006

Indice

Indice

Premessa	pag.1
Introduzione (prima parte)	pag.7
Risultati (prima parte)	pag.14
Introduzione (seconda parte)	pag.44
Risultati (seconda parte)	pag.55
Discussione	pag.64
Materiali e Metodi	pag.75
Bibliografia	pag.85
Allegato	pag.90

Premessa

Premessa

L'unità di base della cromatina è il nucleosoma, costituito da un ottamero di istoni attorno al quale sono avvolti 146 nucleotidi di DNA. L'ottamero è costituito da due molecole per ciascuno dei quattro diversi istoni: H2A, H2B, H3 e H4, il cosiddetto "*core-particle*" istonico. Gli istoni presentano un'estremità N-aminica particolarmente ricca in lisina e sporgente dai nucleosomi. Questi ultimi sono collegati tra loro da DNA *linker*. La cromatina raggiunge un ulteriore grado di condensazione grazie all'istone H1, che lega il DNA *linker* e il centro dei nucleosomi determinando la formazione della fibra di cromatina. Il livello finale di organizzazione è raggiunto quando la fibra di cromatina condensa in un cromosoma metafisico (Figura 1).


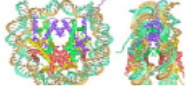




Multiple levels of chromatin structure compact DNA			
Packing ratio	10,000 fold		Diameter
1nm		Double helical DNA	2nm
5		DNA is wrapped around histones to form nucleosomes	11nm
5		Nucleosomes condense to form chromatin fibres	30nm
80		30nm fibres are arranged in loops.	300nm
5		These loops are may be arranged in another spiral to form chromosomes	700nm
2		Metaphasic chromosome	

Figura 1 da Owen-Hughes web-site (www.personal.dundee.ac.uk)

Nei cromosomi la cromatina è inoltre organizzata in domini definiti eucromatina ed eterocromatina, con differente architettura, attività trascrizionale e tempi di replicazione. Il livello di

organizzazione della cromatina gioca un ruolo importante nel regolare l'accessibilità al DNA da parte dei complessi proteici della trascrizione, della replicazione del DNA, della riparazione e della ricombinazione: un'organizzazione compatta della cromatina è indice di bassa attività trascrizionale, mentre una struttura più lassa è indice di accessibilità al DNA e di trascrizione attiva.

Il rimodellamento della cromatina può essere realizzato con modificazioni covalenti delle code istoniche che protrudono dai nucleosomi. Le modificazioni chimiche post-traduzionali più importanti subite dagli istoni comprendono l'acetilazione/deacetilazione, la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione (Goodrich & Tweedie, 2002). Queste modificazioni sono la causa di riarrangiamenti strutturali e funzionali della cromatina e sono perciò elementi essenziali di quello che viene definito "codice istonico epigenetico" (Jenuwein & Allis, 2001). Secondo tale ipotesi, ad una determinata sequenza di modificazioni istoniche corrisponde un'informazione epigenetica interpretata da proteine e complessi proteici, che rimodellano la cromatina e che sono in grado di attivare o reprimere l'attività del gene stesso. Inoltre, la sequenza delle modificazioni istoniche può essere trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie. Ne deriva che al classico codice genetico, basato sulla sequenza delle quattro basi nucleotidiche che formano la doppia elica del DNA, si sovrappone un codice

epigenetico determinato dalle diverse combinazioni delle modificazioni istoniche.

Fra le modificazioni istoniche la meglio caratterizzata è senza dubbio l'acetilazione/deacetilazione, che coinvolge i residui di lisina presenti nelle estremità N-terminali degli istoni. Nel nucleo vi è una continua attività di acetilazione e deacetilazione delle code istoniche, operata da due tipi di enzimi aventi funzione antagonista: le acetilasi (HAT) e le deacetilasi (HDAC) istoniche, due gruppi proteici comprendenti numerose proteine che svolgono una funzione analoga in tutti gli Eucarioti (Pandey et al., 2002). Le code istoniche una volta acetilate allentano il loro legame con il DNA. Di norma, l'acetilazione è associata ad intensa attività trascrizionale e le acetilasi fanno parte di complessi proteici che agiscono come attivatori della trascrizione. Al contrario, una volta deacetilati gli istoni si associano in modo più stretto al DNA; pertanto la deacetilazione è correlata a bassa attività trascrizionale e le deacetilasi fanno parte di complessi con funzione di repressione sulla trascrizione (Lusser, 2002).

In aggiunta alle modificazioni istoniche, in molti metazoi, esistono fattori epigenetici in grado di modificare direttamente la molecola del DNA. Le DNA metiltransferasi (DNMT) metilano citosina in sequenze emimetilate durante la replicazione della doppia elica di DNA. Le citosine sono prevalentemente nelle regioni di eterocromatina caratterizzate da silenziamento trascrizionale (*reviewed in* Goodrich & Tweedie, 2002).

Il rimodellamento della cromatina descrive alterazioni non covalenti determinate da una classe di enzimi, costituita da complessi rimodellatori ATP-dipendenti, che cambiano la struttura cromatinica alterando il legame DNA-istone e riposizionando i nucleosomi in modo da modificare l'accessibilità del DNA ad altre proteine (*reviewed in Tsukyama 2005, Cairn 2005, Johnson 2005*).

In generale si possono descrivere diversi meccanismi base con cui tali complessi interagiscono col genoma e ne influenzano l'espressione genica (Figura 2):

(1) Interazione specifica, con attivatori/repressori trascrizionali (Swi5 nella Fig.2-A), (2) per mezzo di legami con code di proteine istoniche (spesso residui acetilati nella Fig. 2-B), attraverso il riconoscimento diretto di sequenze specifiche di DNA e infine (3) nell'inizio della trascrizione e durante l'elongazione della polimerasi (Fig. 2-C).

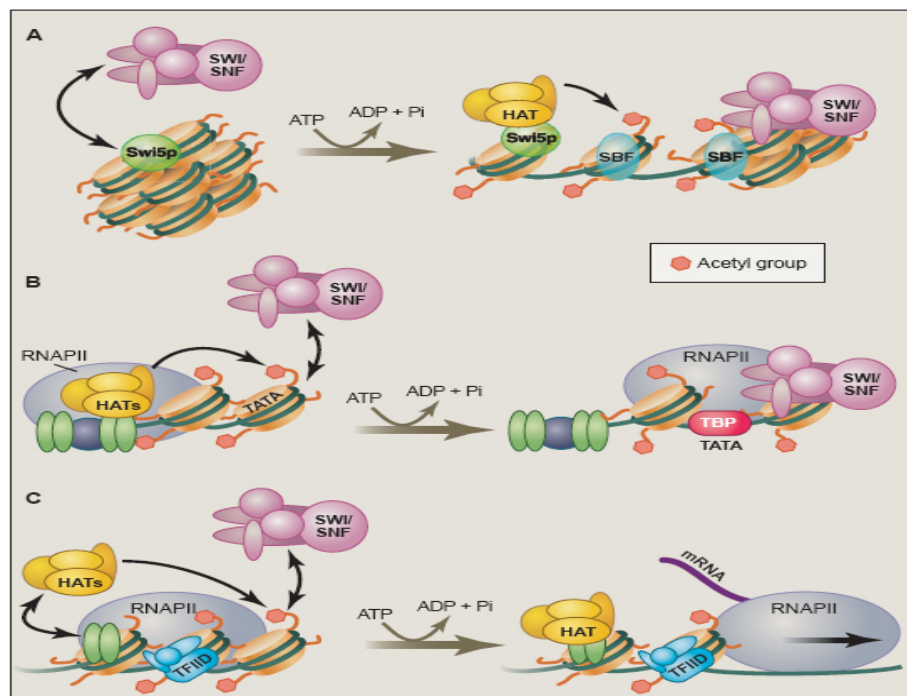


Figura 2 da Fry CJ, Peterson CL (Science 2005, Vol. 295).

I “rimodellatori” sono motori che traslocano il DNA utilizzando l’energia fornita dall’idrolisi di ATP e come illustrato schematicamente nella Figura 3, possono mediare (A) lo scivolamento dei nucleosomi, in cui si assiste ad un cambiamento della posizione del nucleosoma sulla molecola di DNA, la creazione (B) di uno stato rimodellato, in cui il DNA diviene più accessibile ma gli istoni rimangono legati, (C) la completa dissociazione del DNA e degli istoni o (D) la sostituzione degli istoni canonici con differenti forme alleliche.

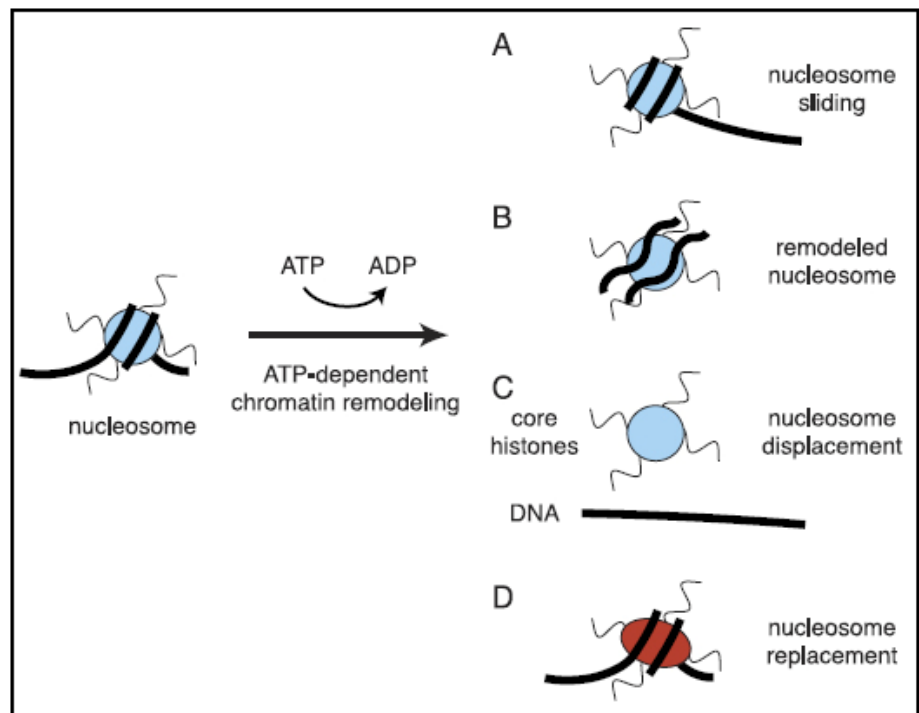


Figura 3 da L. Mohrmann, CP. Verrijzer (Biochimica et Biophysica Acta 2005, Vol. 1681).

Si distinguono differenti classi di complessi dotati di attività di rimodellamento: questo lavoro si incentra sul complesso multiproteico RSC e in particolare su un suo componente accessorio, Htl-1.

Ho diviso la mia tesi in due parti. Nella prima, riassumo e discuto alcuni dei risultati del lavoro allegato in cui confronto fenotipi difettivi, riscontrati in mutanti nulli in HTL1, con i fenotipi riscontrati in mutanti in geni codificanti per componenti “canonici” del complesso RSC. Nella seconda parte considero il ruolo di HTL1 (e quindi RSC) nella riparazione del DNA e specificamente gli effetti che ha, su questo processo, l’inattivazione di HTL1.

Introduzione (prima parte)

Introduzione (prima parte)

Il complesso RSC di lievito: il rimodellamento della cromatina nel controllo della trascrizione e nel ciclo cellulare.

Il complesso Rsc, omologo a SWI/SNF (uno dei primi complessi dotati di attività di rimodellamento della cromatina ad essere descritto), è composto da almeno 18 subunità per dimensioni complessive di 1.1 MDa.

L'analisi cristallografica del complesso ha rivelato una cavità che può contenere il nucleosoma e che le varie subunità forniscono, nell'insieme, un'appropriata superficie d'interazione. Rsc utilizza l'ATP per rimodellare la cromatina descrivendo una perdita di associazione tra il DNA e i nucleosomi e, inoltre, può introdurre superavvolgimenti negativi in DNA purificato e può traslocare tratti di DNA dentro e fuori i nucleosomi. La subunità catalitica del complesso, Sth1, è essenziale per la vitalità della cellula, e oltre all'attività ATP-asiica DNA e cromatina dipendente presenta un bromodominio e i motivi caratteristici delle DNA traslocasi. Per realizzare queste funzioni fisiologiche deve assemblarsi nel complesso multiproteico RSC.

La localizzazione di RSC sui cromosomi di lievito e il suo ruolo nella regolazione trascrizionale è stata realizzata con l'utilizzo di approcci incrociati di immunoprecipitazione della cromatina e di DNA-microarray (Damelin, 2002; Ng et al., 2002). Da questi lavori è emersa una localizzazione del complesso RSC su numerosi promotori

ed il suo coinvolgimento nella attivazione e repressione della trascrizione di geni coinvolti nella biogenesi della parete e in funzioni ribosomali (Moreira, 1999; Angus-Hill, 2001).

Sembra che il complesso si indirizzi, essenzialmente, verso promotori riconosciuti da Pol III e verso alcuni trascritti bersaglio di Pol II (NG et al., 2002) e che la sua localizzazione varia quando le cellule sono esposte a condizioni di stress (Damelin, 2002). E' interessante il dato per cui il profilo d'espressione di alcuni geni, alterato da mutazioni nel complesso Rsc, risenta anche di mutazioni nel complesso NuA4 (che ha attività HAT, ref. Reid, 2000) a sottolineare una interazione funzionale con questi complessi che operano modificazioni a carico della cromatina.

Sebbene sia ancora in corso la completa caratterizzazione del ruolo del complesso RSC nella trascrizione e in altre dinamiche a carico del genoma le attuali indicazioni gli attribuiscono un ruolo nella progressione nel ciclo cellulare (Cao, 1997), nel controllare lo stato trascrizionale del gene CHA1 (Moreira, 1999), nel caricamento delle coesine sulle braccia dei cromosomi (Huang, 2004) e nella riparazione dei danni al DNA (Shim, 2005; Chai, 2005).

Non sorprende, data la moltitudine di funzioni influenzate dal complesso Rsc, che la sua composizione sia molto eterogenea, ma allo stesso tempo, che ci siano subunità altamente conservate a formare un nucleo strutturale. I dati genetici e biochimici, accumulati negli anni, hanno individuato nei fattori Rsc6, Rsc8, Sfh1 ed Sth1 gli

elementi essenziali di un nucleo strutturale sul quale si modula il reclutamento di subunità con funzione stabilizzatrice e/o accessoria.

Data la natura essenziale di questi geni, l'approccio sperimentale per comprenderne il ruolo richiede l'utilizzo di mutanti letali condizionali (termosensibili: ts) oppure di condizioni in cui il gene di interesse è posto sotto il controllo di promotori reprimibili (promotori GAL1 o MET3).

Per la subunità catalitica Sth1 (omologa a quella di SWI/SNF: snf2), sia la deplezione del fattore, in seguito alla repressione della sua sintesi, sia i mutanti letali condizionali (termosensibili) portano ad un arresto con fenotipo da blocco nella transizione G2-M con un contenuto di DNA pari a 2C. In queste condizioni è stata osservata un'alterazione della struttura cromatinica a livello dei centromeri che pregiudica il corretto funzionamento dei cinetocori e che attiva il *checkpoint* specifico che presiede all'assemblaggio del fuso mitotico. Questo fenotipo si spiega col dato genetico e biochimico che lega la subunità Sth1 al complesso delle coesine. L'accurata trasmissione del genoma richiede che i complessi multiproteici delle coesine si stabiliscano e mantengono l'appaiamento dei cromosomi replicati, prima della loro segregazione. Le coesine sono caricate sui cromosomi prima della fase S e legano i cromatidi fratelli durante la replicazione del DNA. In preparazione al momento della segregazione, queste coesine subiscono un taglio proteolitico e una estesa fosforilazione. L'arricchimento di coesine a livello del

centromero deriva dalla capacità intrinseca dell'eterocromatina centromerica di reclutare alti livelli di coesine mentre per i bracci cromosomici è stata osservata una modificazione dello stato cromatinico da parte del complesso Rsc (a ridosso di sequenze ricche in AT disposte a 8-13 Kb di distanza) in previsione del loro caricamento (Huang, 2004).

Un ulteriore legame tra l'attività di rimodellamento e la progressione nel ciclo cellulare viene dal fenotipo di mutanti termosensibili del gene SFH1 che si arrestano, come Sth1, nella transizione G2-M. Significativamente, questa proteina è fosforilata nella fase G1 del ciclo cellulare e defosforilata dopo la progressione attraverso la fase S. Poiché Sfh1 è richiesta per la progressione attraverso G2-M si ritiene che la fosforilazione di Sfh1 regoli negativamente la sua funzione. Gli stessi autori hanno inquadrato le modifiche nello stato di fosforilazione di Sfh1 nelle dinamiche di esclusione, dai cromosomi metafasici del complesso Rsc (Cao, 1997).

La modificazione della cromatina a livello di sequenze promotrici, costituisce un momento importante per il reclutamento dei fattori coinvolti nell'attivazione o repressione trascrizionale. Per i mutanti nelle subunità essenziali Sth1 ed Rsc8 è stato dimostrato un effetto sull'espressione del gene CHA1 (bersaglio di Pol II). Questo gene coinvolto nel metabolismo degli idrossi-amminoacidi serina e treonina è normalmente represso, ma in presenza del substrato amminoacidico nel mezzo di crescita, si ha un induzione di 100 volte

nei livelli di trascritto. Quest'attivazione trascrizionale porta a cambiamenti strutturali a carico delle sequenze riconosciute dall'attivatore trascrizionale Cha4p, che dirige l'assemblaggio del complesso di preinizio della trascrizione. In questi mutanti sia la deplezione di Sth1 che di Rsc8 porta ad un'attivazione costitutiva di CHA1, a sostegno di un modello che prevede un rimodellamento della regione promotrice, che favorisce il legame di proteine con funzione di repressione della trascrizione (Moreira, 1999).

Oltre alle proteine essenziali del *core* i complessi RSC presentano numerose componenti accessorie che determinano una estesa eterogeneità funzionale e contribuiscono ad interfacciare questi complessi verso specifici bersagli cellulari e processi metabolici. Un esempio è offerto dalle subunità Rsc1 ed Rsc2 che esistono in forme distinte del complesso Rsc e mutazioni a loro carico (sebbene tra i due fattori ci sia una grossa omologia) si traducono in differenti manifestazioni fenotipiche. I singoli mutanti delezione (Δ) sono vitali ma, $\Delta rsc1$ è sensibile all'idrossiurea nel mezzo di crescita, mentre $\Delta rsc2$ è termosensibile. Un fenotipo comune alle due mutazioni è una ridotta crescita in presenza di caffeina e in terreno contenente NaCl. Quindi, da una parte, si può ipotizzare un ruolo distinto nel controllo di certe funzioni per le due sub-forme del complesso Rsc (quella con Rsc1 e quella che invece presenta Rsc2), dall'altra sembrano entrambe richieste per determinate transizioni. Proprio quest'ultimo aspetto potrebbe spiegare la natura letale del doppio mutante

delezione $\Delta rsc1/\Delta rsc2$, infatti, se i due complessi avessero come bersaglio un gene essenziale la cellula potrebbe tollerare l'assenza di uno solo dei due fattori. Entrambe le proteine sono accomunate dal possedere un bromodominio (il bromodominio lega residui di acetil-lisina) che lega la porzione amminoterminale degli istoni H3 ed H4 che normalmente sono bersaglio dell'attività delle iston acetilasi e deacetilasi. Quest'interazione tra complesso Rsc e istoni potrebbe concorrere a mantenere in uno stato acetilato il nucleosoma (Cairns, 1999). Altre due subunità accessorie sono Rsc3 ed Rsc30 che formano un eterodimero stabile e contengono un motivo di tipo *zinc cluster*, in genere presente in proteine con attività di legame (sequenza specifica) al DNA (Angus-Hill, 2001). In mutanti di questi elementi si assiste ad arresto nel ciclo cellulare (nella transizione G2-M) e sensibilità allo stress osmotico. Proprio quest'ultimo fenotipo sembra legato alla cascata di eventi che procede attraverso la chinasi centrale, Pkc1. Alcuni fenotipi di *rsc3*, quali sensibilità alla caffeina e alla formammide, possono essere soppressi dall'iperespressione di Pkc1 e la doppia mutazione *rsc3/pkc1* ha conseguenze letali per la cellula. Poiché anche altri mutanti in elementi del complesso Rsc mostrano difetti nella parete, è probabile che Rsc3 cooperi con altre subunità di Rsc per regolare i geni coinvolti nella biogenesi della parete.

Ulteriori indicazioni sul ruolo delle singole subunità sono venute da studi su Rsc7 ed Rsc14 (Wilson, 2006): si è visto che questi fattori

hanno un ruolo strutturale e mostrano una forte interazione genetica con Rsc3 (*e probabilmente ne mediano l'associazione nel complesso*). La loro delezione, non letale, si caratterizza per una generale sensibilità a sostanze che inducono stress cellulare: NaCl, formammide, caffeina e radiazioni ultraviolette. E' significativo, che in questi mutanti si assista ad un abbassamento dei livelli di Rsc8 a conferma di una generale destabilizzazione del complesso. In ultimo, la subunità più piccola, Htl-1, mostra il più ampio spettro di fenotipi e ricapitola molte delle manifestazioni fenotipiche dei mutanti *rsc* (Lanzuolo et al., 2001; Romeo et al., 2002).

Risultati (prima parte)

Risultati (prima parte)

1. Interazione genetica tra HTL-1 e il complesso Rsc.

Il peptide Htl1 quando iperespresso, sopprime due difetti fenotipici, propri di un mutante letale condizionale, *rsc8TS16*, del gene essenziale RSC8: termosensibilità e sensibilità alla formammide (Figura 1A). Un'ulteriore indicazione di interazione genetica è l'osservazione che il doppio mutante $\Delta htl-1/rsc8TS16$ è un letale sintetico anche alla temperatura permissiva di 26 °C (Figura 1B).

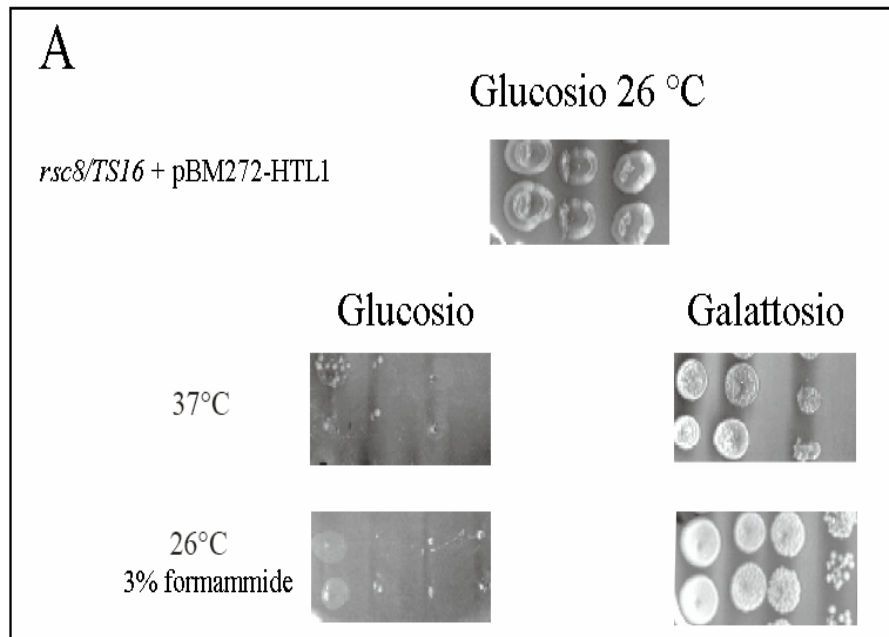


Figura 1A. Due fenotipi di un mutante letale condizionale nel gene essenziale RSC8 (*rsc8TS16*) vengono soppressi dal prodotto del gene HTL-1 clonato sotto il promotore inducibile Gal1 (nel vettore pBM272-HTL-1). Sono riportate due serie, di due trasformanti indipendenti.

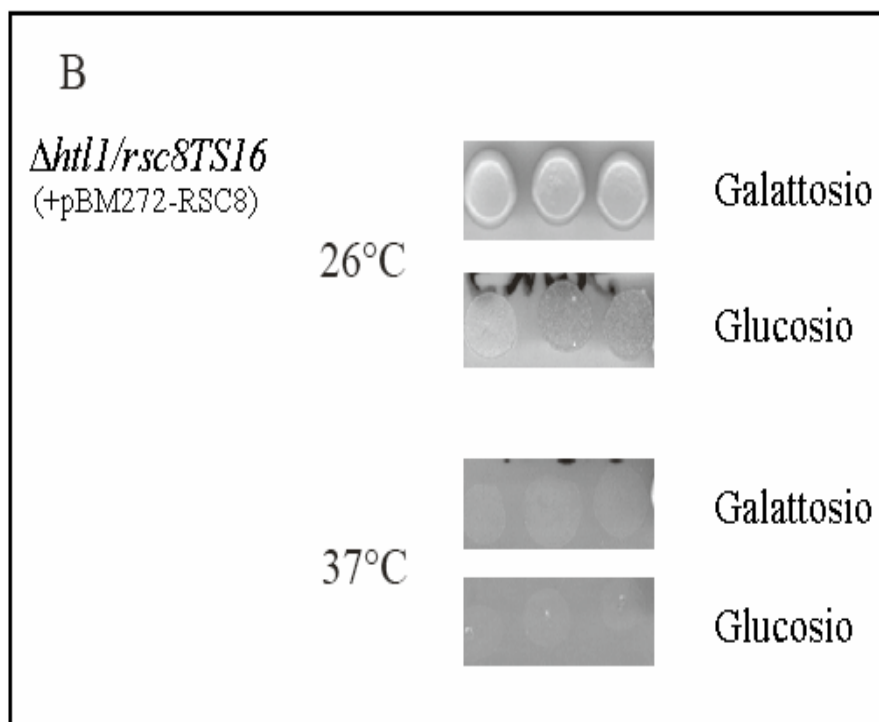


Figura 1B. La distruzione del gene HTL-1 nel ceppo mutante *rsc8TS16* origina un letale sintetico. Nel doppio mutante *Δhtl1/rsc8TS16*, infatti, il blocco dell'espressione ectopica di RSC8 (clonato sotto promotore inducibile da galattosio) determina letalità già a 26 °C.

2. Fenotipo terminale

Studi precedenti hanno mostrato che mutanti termosensibili di componenti del complesso Rsc si arrestano a 37°C con un fenotipo ciclo cellulare-specifico, mentre in mutanti di altri componenti, il fenotipo terminale si presenta eterogeneo.

Romeo et al. (2002) riportano che il fenotipo terminale di mutanti *htl1* nel loro ceppo di lievito è G2/M specifico: cellule con gemma e ploidia raddoppiata. Nei nostri ceppi il fenotipo cellulare è eterogeneo come già osservato da Lanzaolo et al. (2001) (Figura 2A). Per eliminare la possibilità che la discordanza con le osservazioni di Romeo et al. fosse dovuta a mutazioni secondarie ho ripetuto l'esperimento in un ceppo diploide in cui avevo distrutto, in successione, le due copie del gene HTL1. In questo contesto è annullato l'effetto di mutazioni secondarie presumibilmente recessive. Come nei ceppi *htl1* aploidi, la divisione cellulare si arresta entro due ore e le cellule si presentano in eguale proporzione come non-gemmanti e gemmanti, di cui alcune bi-nucleate (Figura 2B). Inoltre la ploidia di mutanti $\Delta ht11$, determinata con un citofluorimetro, non risulta alterata (Figura 2C).

L'incubazione alla temperatura non-permissiva di 37 °C, dei mutanti *htl-1*, ha un differente effetto sulla vitalità a seconda della fase di crescita in cui si trova la popolazione mutante al momento del trasferimento. Dopo otto ore dal trasferimento, la popolazione mutante in fase di crescita logaritmica, riduce al 4% la sua frazione

vitale, mentre la popolazione mutante in fase di crescita stazionaria, non muore (Fig. 2D). In contrasto, il mutante *rsc8T516* sopravvive per almeno 8 ore a 37°C sia in fase logaritmica che in fase stazionaria (Fig. 2E). Inoltre il fenotipo terminale di *rsc8* si distingue per la morfologia: circa la metà delle cellule si presenta con gemma di grosse dimensioni, molte cellule hanno più di una gemma (30%) e nella frazione rimanente non-gemmante si individuano cellule allungate piuttosto che rotonde (Treich, 1997).

Il fenotipo terminale a 37°C di *htl1* suggerisce che in questo mutante non è operativo un *checkpoint*. Ho realizzato esperimenti in cui ho imposto due *checkpoint* a un mutante *htl-1*: uno G2/M trattando le cellule con Nocodazolo[®] (un inibitore, reversibile, del fuso mitotico), ed un *checkpoint* S/G2 con idrossiurea (HU, un inibitore, reversibile, della fase S), prima di procedere al trasferimento alla temperatura di 37 °C. L'imposizione dei *checkpoint* non protegge dalla letalità il mutante *htl1* (Tabella 2).

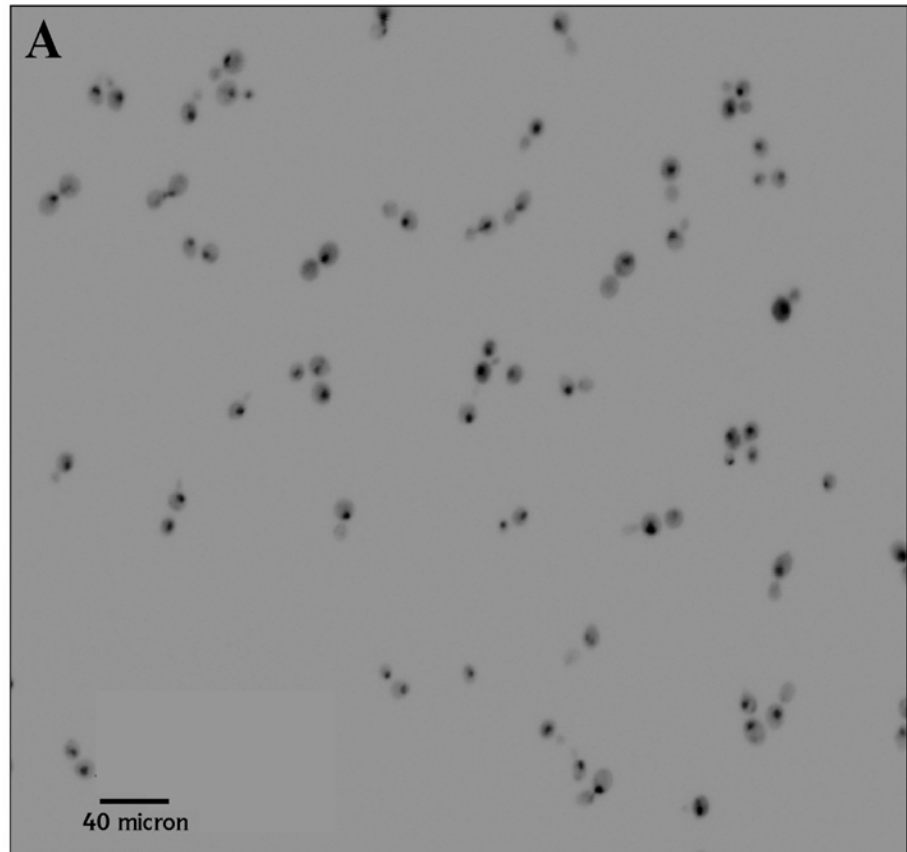


Figura 2A. Immagine invertita, ottenuta per microscopia a fluorescenza (DAPI *staining*), di una coltura in fase logaritmica del ceppo aploide *htl-1*, al tempo 6 ore a 37 °C. Il fenotipo terminale dei mutanti delezione *htl-1* è eterogeneo.

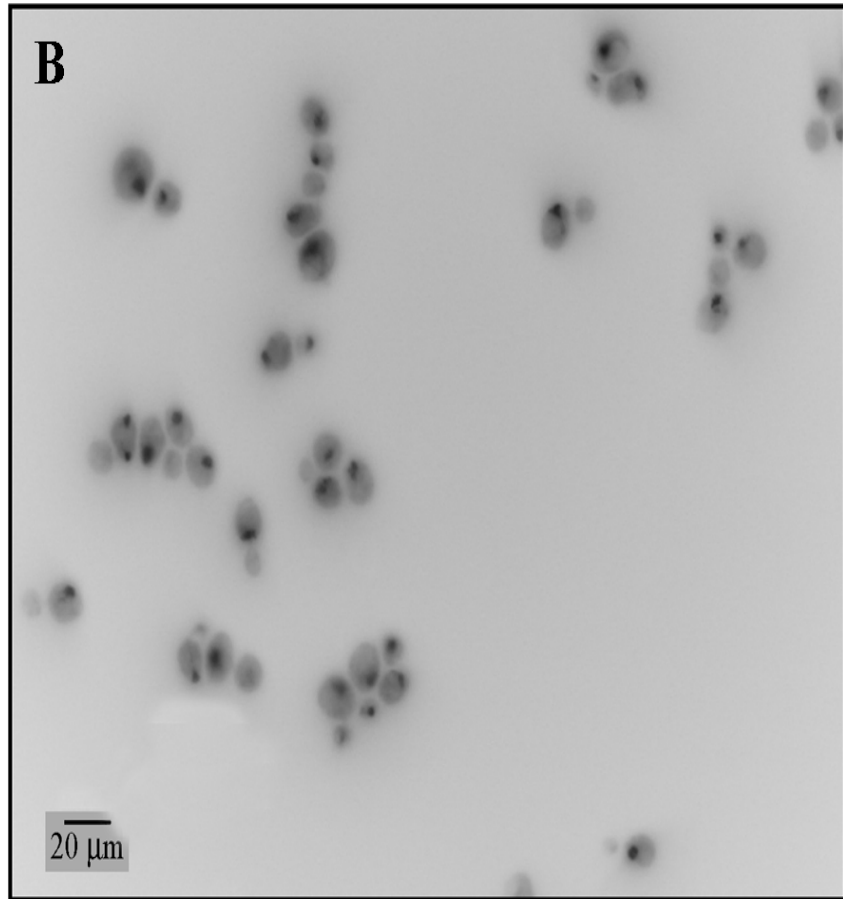


Figura 2B. Immagine invertita, ottenuta per microscopia a fluorescenza (DAPI *staining*), di una coltura in fase logaritmica del ceppo diploide $\Delta htl-1/\Delta htl-1$, al tempo 6 ore a 37 °C. Anche in questo ceppo il fenotipo terminale è eterogeneo.

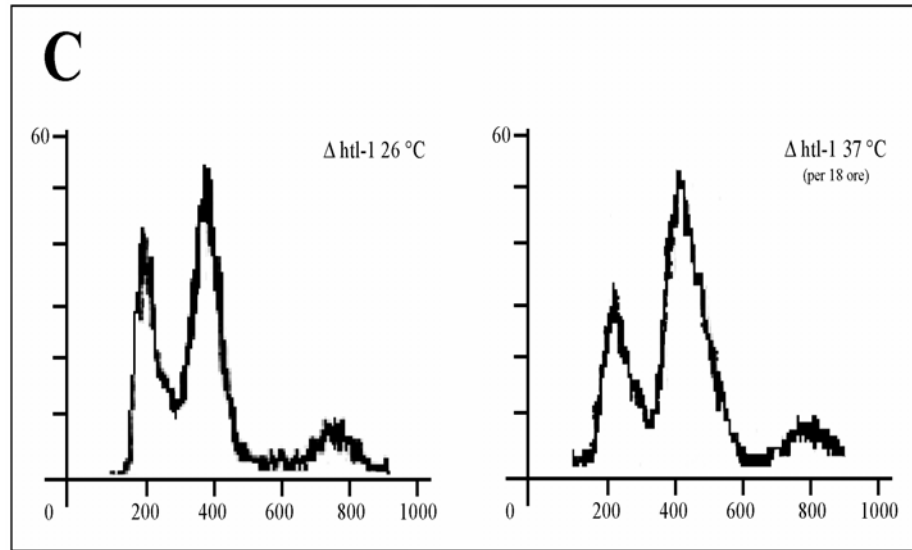


Figura 2C. Analisi citofluorimetrica dei mutanti *htl-1* alla temperatura permissiva di 26 °C (sinistra) e della stessa popolazione trasferita a 37°C per 18 ore (destra).

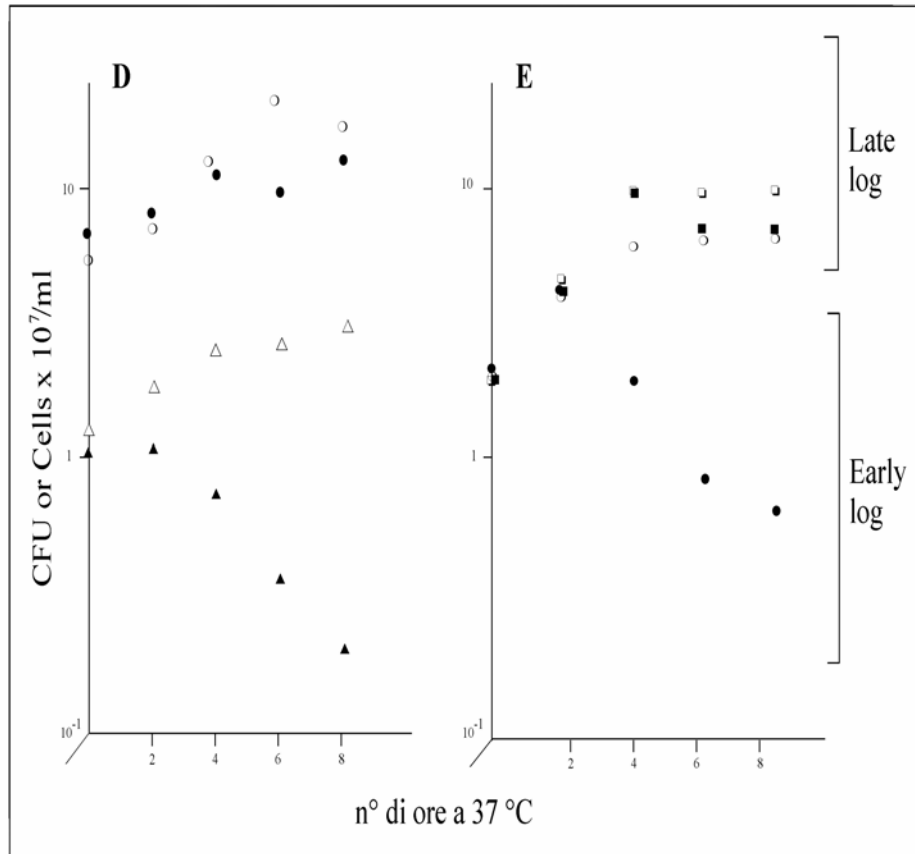


Figura 2D e 2E. (D) Due colture cellulari parallele del mutante *htl-1*, sono state allestite in terreno ricco (YPDA) alla temperatura permissiva di 26 °C e, in seguito, trasferite alla temperatura di 37 °C con differente titolo. Una, in fase precoce esponenziale (*Early Log* EL, 1.1×10^7 cellule/ml), l'altra, in fase tardo logaritmica (*Late Log* LL, 6.0×10^7 cellule/ml). Ai tempi indicati le cellule sono state contate e la frazione vitale deriva dalla capacità di formare colonie dopo piastramento di appropriate diluizioni. La coltura in fase tardo logaritmica tollera (100% vitalità ad 8 ore) l'incubazione alla temperatura non permissiva.

EL: Δ cells, Δ CFU; LL: \circ cells, \bullet CFU.

(E) Confronto tra la popolazione mutante *htl-1* e quella *rsc8/TS16* nella vitalità dopo trasferimento a 37 °C. Entrambe vengono trasferite con un titolo di partenza di $2,0 \times 10^7$ cellule/ml e processate come descritto per 2D. Il mutante *rsc8/TS16* non muore (90% vitalità ad 8 ore).

Δ *htl-1*: \circ cells, \bullet CFU.

rsc8/TS16: \square cells, \blacksquare CFU.

Tabella 2.

	Tempo zero	Tempo 4 ore	Tempo 6 ore	Tempo 8 ore
<i>Wild type</i>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
<i>Wild type</i> + 200 mM HU	100,0%	100,0%	100,0%	76,0%
<i>Wild type</i> + 15µg/ml Noc	100,0%	42,0%	10,0%	1,6%
<i>Δhtl-1</i>	100,0%	17,6%	5,0%	1,8%
<i>Δhtl-1</i> + 200 mM HU	100,0%	21,4%	4,2%	0,8%
<i>Δhtl-1</i> + 15µg/ml Noc	100,0%	12,5%	8,0%	1,3%

In tabella sono riportati i valori relativi alla sopravvivenza di una popolazione selvatica (*wild type*) e una mutante (*Δhtl-1*), in seguito a trasferimento alla temperatura di 37 °C in presenza di idrossiurea (HU) e Nocodazolo (Noc). Ai tempi indicati, il valore percentuale è ricavato dalle CFU ottenute piastrando aliquote note di cellule su terreno solido e incubazione delle piastre alla temperatura di 26 °C. Prima di procedere al piastramento le aliquote cellulari subiscono due lavaggi con acqua. Il mutante *Δhtl-1* mostra valori della vitalità, in HU (200 mM) e Noc (15 ng/ml), confrontabili col controllo non trattato.

3. *I mutanti htl-1 sono sensibili all'idrossiurea (HU).*

L'osservazione che la letalità di mutanti *htl1* a 37 °C si realizza solo se le cellule sono in divisione mi ha suggerito che vi fosse un difetto nella replicazione e/o citochinesi. Ho quindi pensato di saggiare la sensibilità all'idrossiurea che sarebbe indicativa di deficienze nella replicazione e/o riparazione. Ho realizzato un saggio di sensibilità all'idrossiurea su piastre di terreno solido e ho rilevato che il ceppo mutante *htl-1* è ipersensibile all'idrossiurea (già alla concentrazione di 20 mM) ma solo a 30 °C (Figura 3A), temperatura, per altro, permissiva per *htl1*.

Ho verificato che la sensibilità all'idrossiurea fosse legata alla delezione del gene HTL-1 con un esperimento di complementazione in cui una copia ectopica selvatica del gene, e non un'allele nullo (*htl1-3p*), recupera il fenotipo selvatico (Figura 3B).

La sensibilità all'idrossiurea può indicare che l'efficienza nel meccanismo di riparazione è compromessa o che c'è un difetto nell'attivazione di *checkpoint*. In generale, cellule selvatiche o mutanti nei meccanismi di riparazione e replicazione del DNA, arrestate con HU rientrano nel ciclo cellulare in seguito a rimozione dell'idrossiurea. Solo mutanti difettivi nell'attivazione dei *checkpoint* non si arrestano in presenza di HU e l'ingresso in mitosi ha per loro conseguenze letali. Sebbene cellule mutanti *htl-1* si sincronizzino morfologicamente, a 30 °C, in presenza di concentrazioni di HU pari a 200 mM (cellule mononucleate con gemma di grosse dimensioni),

dopo 24 ore di esposizione la maggior parte delle cellule non riprende la divisione dopo rimozione del HU (Tabella 3, a e b). In assenza di Htl1, il rallentamento imposto dal *checkpoint* non è sufficiente a riparare i danni prodotti alle forchine di replicazione dalla mancanza di dNTP e l'entrata in mitosi è letale.

A 37 °C il fenotipo terminale della popolazione mutante $\Delta htl-1$ impedisce la sincronizzazione mediata dall'HU (sia 40 che 200 mM) e le cellule muoiono alla pari della popolazione controllo non trattata con HU (Tabella 3, c e d).

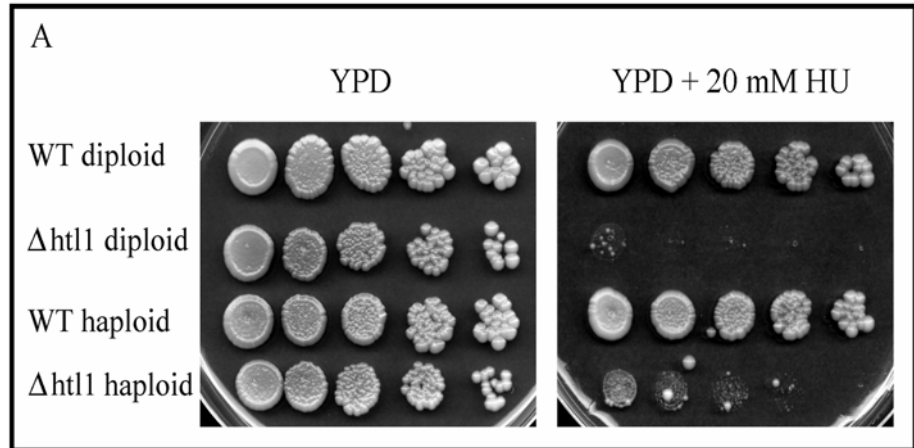


Figura 3A. Aliquote da 5 μ l, di diluizioni seriali (di un fattore 10) di ceppi *Wild type* e mutanti *htl-1* (sia aploidi che diploidi), sono state distribuite su piastre di terreno ricco YPD ed incubate per 48 ore a 30 °C. La delezione del gene HTL-1 conferisce sensibilità all'idrossiurea sia negli aploidi che nei diploidi.

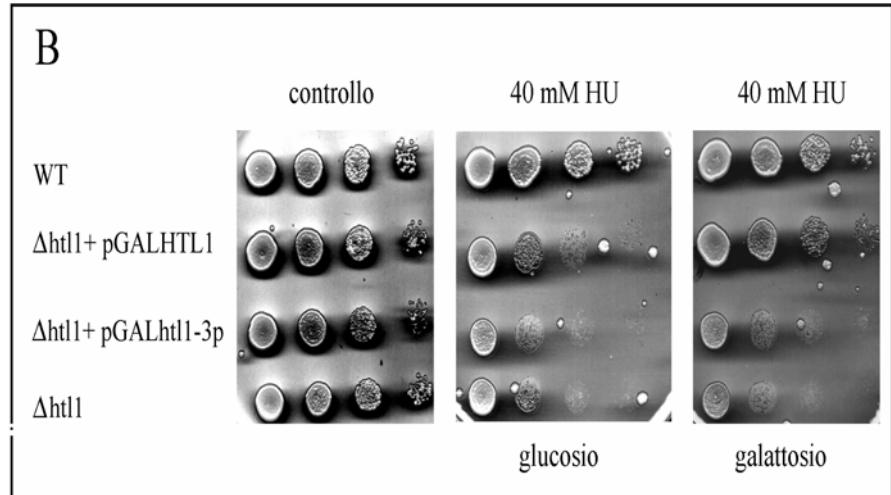


Figura 3B. Il mutante $\Delta htl-1$ è stato trasformato col vettore pSEGAL-3 (PGAL-HTL1, con copia allelica funzionale di HTL-1 sotto promotore inducibile Gal1) e col vettore pSEGAL-4 (PGAL-htl13p, con copia allelica non funzionale di HTL-1 sotto promotore inducibile Gal1). L'incubazione si è protratta per 72 ore su terreno ricco con glucosio (assenza di induzione) e su galattosio (presenza di induzione). Il plasmide con la copia allelica funzionale di HTL-1 complementa la sensibilità all'idrossiurea.

Tabella 3

Sincronizzazione con idrossiurea (HU)

% cellule gemmanti a 30°C (200 mM HU)

a

Ceppo	Wild-type			$\Delta htl1$			
	Ore a 30 °C	0	3	6	0	3	6
-HU				9	25	31	34
+HU 200mM				96			89

% sopravvissuti a 30°C (200 mM HU)

b

Ceppo	Wild-type				$\Delta htl1$				
	Ore a 30 °C	3	6	9	24	3	6	9	24
-HU		100	100	100	100	84	71	65	63
+HU 200mM		81	63	58	43	46	30	7.7	0.05

% cellule gemmanti a 37°C (200 mM HU)

c

Ceppo	Wild-type			$\Delta htl1$			
	Ore a 37 °C	0	2.5	6	0	2.5	6
-HU			31	31		20	36
+HU 200mM		30	80	76	15	40	46

% sopravvissuti a 37°C (200 mM HU)

d

Ceppo	Wild-type			$\Delta htl1$			
	Ore a 37 °C	4	6	8	4	6	8
-HU		100	100	100	17.6	5	1.8
+HU 200mM		100	100	76	21.4	4.2	4.0

Tabella 3.

Le cellule della popolazione mutante $\Delta htl-1$ e del controllo *wild type* hanno subito un trattamento acuto in coltura liquida con 200 mM HU alle temperature di 30 °C e 37 °C. Ai tempi indicati sono state prelevate aliquote destinate all'analisi microscopica e al piastramento su terreno ricco per il calcolo della frazione vitale.

4. *Analisi trascrizionale del locus RNR4, in risposta al trattamento con idrossiurea (HU).*

L'idrossiurea è un inibitore della ribonucleotide reduttasi, RNR. Quest'enzima presiede alla biosintesi dei dNTP e la sua attività enzimatica aumenta in risposta a lesioni al DNA. RNR è un tetramero $\alpha_2\beta_2$ composto da due omodimeri, R1 (α_2) ed R2 (β_2). In lievito, i geni RNR1 ed RNR3 codificano per forme differenti di R1, il gene RNR2 codifica per la subunità R2, ed RNR4 codifica per una proteina R2-simile, che è priva di attività catalitica e gioca un ruolo nella localizzazione del tetramero. I mutanti *rnr4* sono molto sensibili all'idrossiurea. L'attività di RNR è strettamente regolata dalla localizzazione (che può essere nucleare o citosolica), dalla trascrizione e dall'inibizione da parte di Sml1. Sia la trascrizione che l'inibizione sono controllate, in risposta al danno al DNA, dalle proteine del *checkpoint* Mec1 e Rad53. Il complesso Rsc potrebbe essere coinvolto nella regolazione trascrizionale di RNR4, poiché, questo gene è adiacente ad un sito di legame per Rsc ($P-3 \cdot 10^{-4}$) (Ng, 2002).

Ho ipotizzato che la sensibilità all'idrossiurea dei mutanti *htl-1* potesse derivare da una difettiva attivazione trascrizionale del locus RNR4 di cui è descritto un incremento di circa 20 volte nei livelli di trascritto, con un'esposizione a concentrazioni di idrossiurea pari a 200 mM. Allora ho saggiato per analisi *Northern blot* i livelli di RNR4 nella popolazione mutante *htl-1* trattata con HU e non ho

riscontrato differenze rispetto al ceppo di controllo selvatico. Inoltre, la stessa iperespressione del gene HTL-1, nel mutante *htl-1*, sembra non avere effetto sui livelli RNR4 (Figura 4).

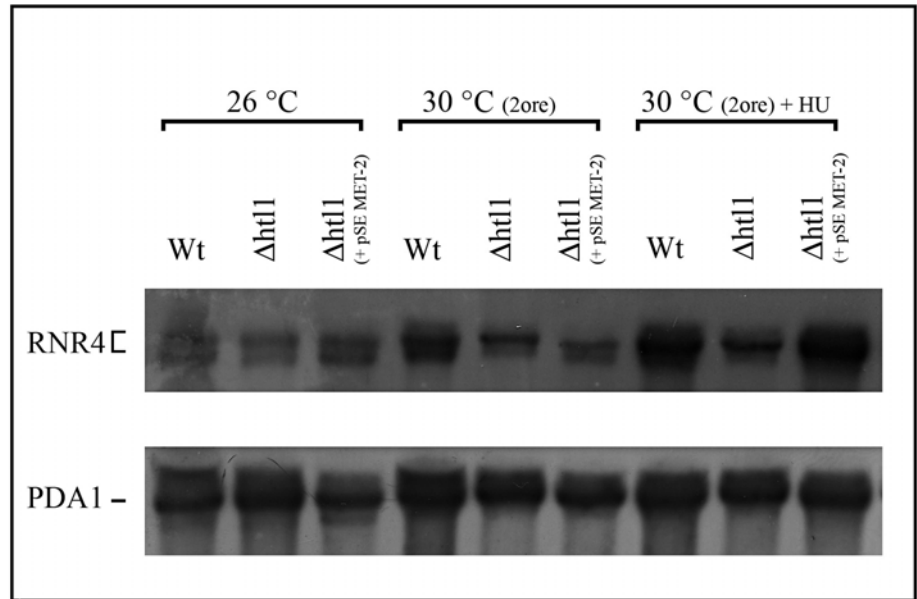


Figura 4. Analisi *Northern blot* della risposta del ceppo selvatico (*WT*) e del mutante $\Delta htl-1$ al trattamento acuto con 200 mM idrossiurea (HU). L'esposizione di 2 ore determina un aumento dei livelli di trascritto RNR4 di circa 20 volte in un ceppo selvatico. Il mutante $\Delta htl-1$, e il mutante $\Delta htl-1$ trasformato con copia ectopica di HTL-1 non mostrano significative differenze rispetto al ceppo selvatico (*WT*). La sonda marcata per il trascritto RNR4 individua le due forme trascritte dal locus, quella a più alto peso è iperespressa come conseguenza dell'esposizione all'idrossiurea.

5. *Analisi trascrizionale del locus CHA1: effetto di HTL1 sul silenziamento trascrizionale.*

L'interazione genetica descritta al punto 1 tra HTL-1 ed RSC8, mi ha portato alla ricerca di geni bersaglio di cui fosse descritta una regolazione trascrizionale mediata da Rsc e in particolare da Rsc8. Un buon candidato sembra essere il gene CHA1 sul cromosoma III che codifica per una serin-treonina idrossilasi e il suo stato trascrizionale è represso in assenza del substrato amminoacidico (ovvero di serina). L'attivazione trascrizionale è operata col riposizionamento di un nucleosoma che occupa l'elemento TATA a monte del promotore e nel mutante *rsc8T516* si ha un'attivazione costitutiva del locus (Figura 5A). Ho ipotizzato che se il prodotto Htl-1 coadiuvasse Rsc8 nella repressione trascrizionale dovevo osservare alterazioni nello stato trascrizionale di CHA1.

I dati raccolti descrivono un'attivazione trascrizionale del locus CHA1 in due differenti subcloni *htl-1*. I mutanti *htl-1* sono generalmente fertili (F) ma, alcuni subcloni, dopo ripetuti cicli di divisione cellulare, diventano sterili (S). Mentre nella popolazione fertile, *htl-1(F)*, l'attivazione trascrizionale di CHA1 mostra penetranza incompleta ed espressività variabile, nei mutanti sterili, *htl-1(S)*, la penetranza è totale e l'espressività costante su alti livelli di induzione (Figura 5B). Ho pensato di confermare l'ipotesi di un coinvolgimento di Htl-1 nella regolazione di CHA1 con un esperimento di complementazione condotto nel ceppo mutante sterile.

In questo esperimento ho utilizzato un vettore in cui HTL-1 è clonato sotto il promotore inducibile MET3 perché il galattosio, usato per indurre il promotore Gal1, reprime la trascrizione del locus CHA1 (dato non mostrato). L'espressione ectopica di Htl-1 ripristina la repressione trascrizionale, propria del ceppo selvatico, nel *locus* CHA1 e conferma il suo ruolo nella regolazione di questo gene (Figura 5C).

Mentre nel mutante *rsc8* e nel mutante *htl-1* fertile, l'effetto è confinato al solo *locus* CHA1, nel mutante *htl-1* sterile l'alterazione dello stato trascrizionale si estende alla contigua cassetta HML (distante 3 chilobasi). Questa cassetta contiene copia allelica silente dell'informazione sessuale *Mat α* e, se derepressa nei ceppi aploidi *Mat a*, genera una condizione di pseudodiploidia che spiega la sterilità dei subcloni mutanti in *htl-1*. Poiché, nell'esperimento citato di complementazione si osserva solo il ripristino della repressione trascrizionale su CHA1 e non il silenziamento della cassetta HML, ho dedotto la presenza di una seconda mutazione (Figura 5D).

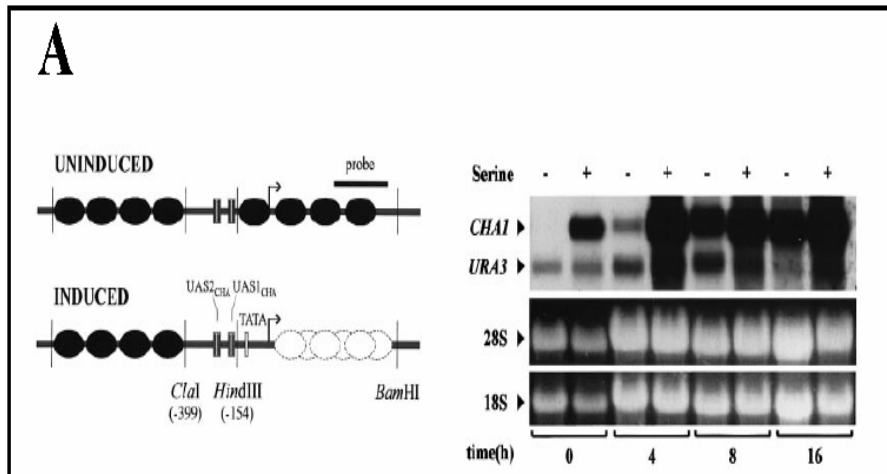


Figura 5A. (da Moreira et al., 1999) Mappa dell'organizzazione cromatinica nel gene *CHA1* in condizioni di induzione e non induzione (rispettivamente se presente o assente serina nel mezzo di crescita). I nucleosomi sono rappresentati come ellissi piene quando organizzati in fase e come ellissi vuote quando posizionati in maniera casuale. Sono anche rappresentate le sequenze riconosciute da fattori *trans*-agenti. Analisi Northern per saggiare l'attività trascrizionale del gene *CHA1*. La deplezione del prodotto RSC8 viene realizzata trasferendo le cellule in terreno contenente glucosio (che reprime il promotore Gal1 che dirige la sintesi di RSC8) e ai tempi indicati aliquote di cellule sono state processate per l'estrazione di RNA totale. Al tempo 4 ore si osserva segnale per *CHA1* anche in assenza di induzione. La colorazione delle bande del ribosomali è usata come controllo di caricamento.

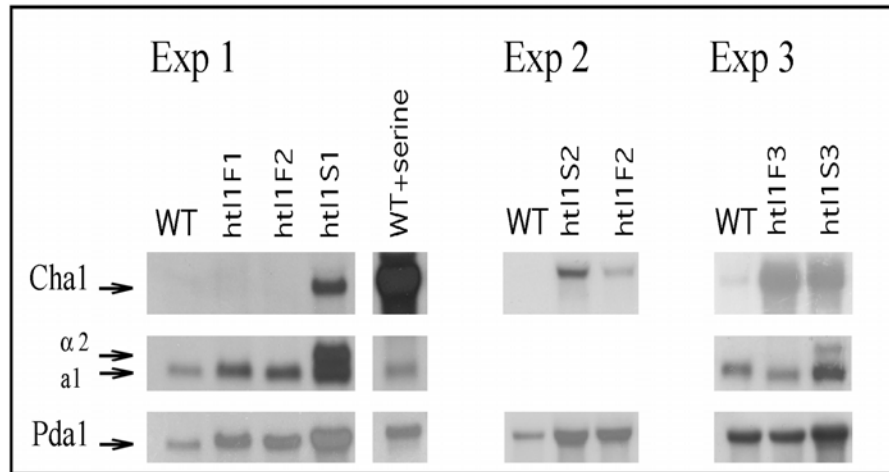


Figura 5B. Analisi *Northern blot* condotta su cloni *htl-1* sterili (sui subcloni *htl1S1*, *S2*, *S3*) e fertili (sui subcloni *htl1F1*, *F2*, *F3*) in tre diversi esperimenti (Exp1, 2, 3) per osservare lo stato trascrizionale del gene *CHA1*. Mentre nei subcloni *htl-1* fertili l'attivazione trascrizionale di *CHA1* mostra sia un'espressività variabile che una penetranza incompleta, nei mutanti *htl-1* sterili la penetranza è totale e l'espressività costante su alti livelli di induzione (per confronto *WT*+serina). Inoltre i cloni *htl-1* sterili mostrano derepressione in HML rivelata nel segnale per $\alpha 2$. La normalizzazione è realizzata seguendo i livelli di *PDA1*.

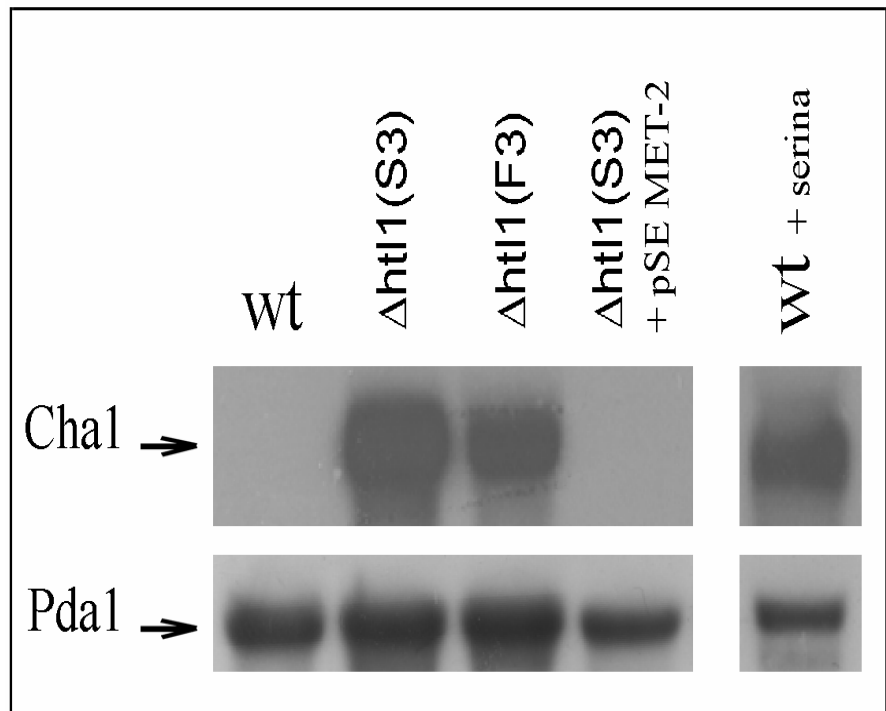


Figura 5C. Analisi *Northern blot* sul subclone sterile $\Delta htl-1$ (S3) trasformato col vettore *pSE MET-2* (presenta il gene HTL-1 sotto promotore inducibile MET3) e cresciuto per alcune generazioni in condizione di induzione. L'espressione ectopica di Htl-1 reprime la trascrizione di CHA1 al pari del controllo selvatico (WT). La normalizzazione è realizzata seguendo i livelli di PDA1.

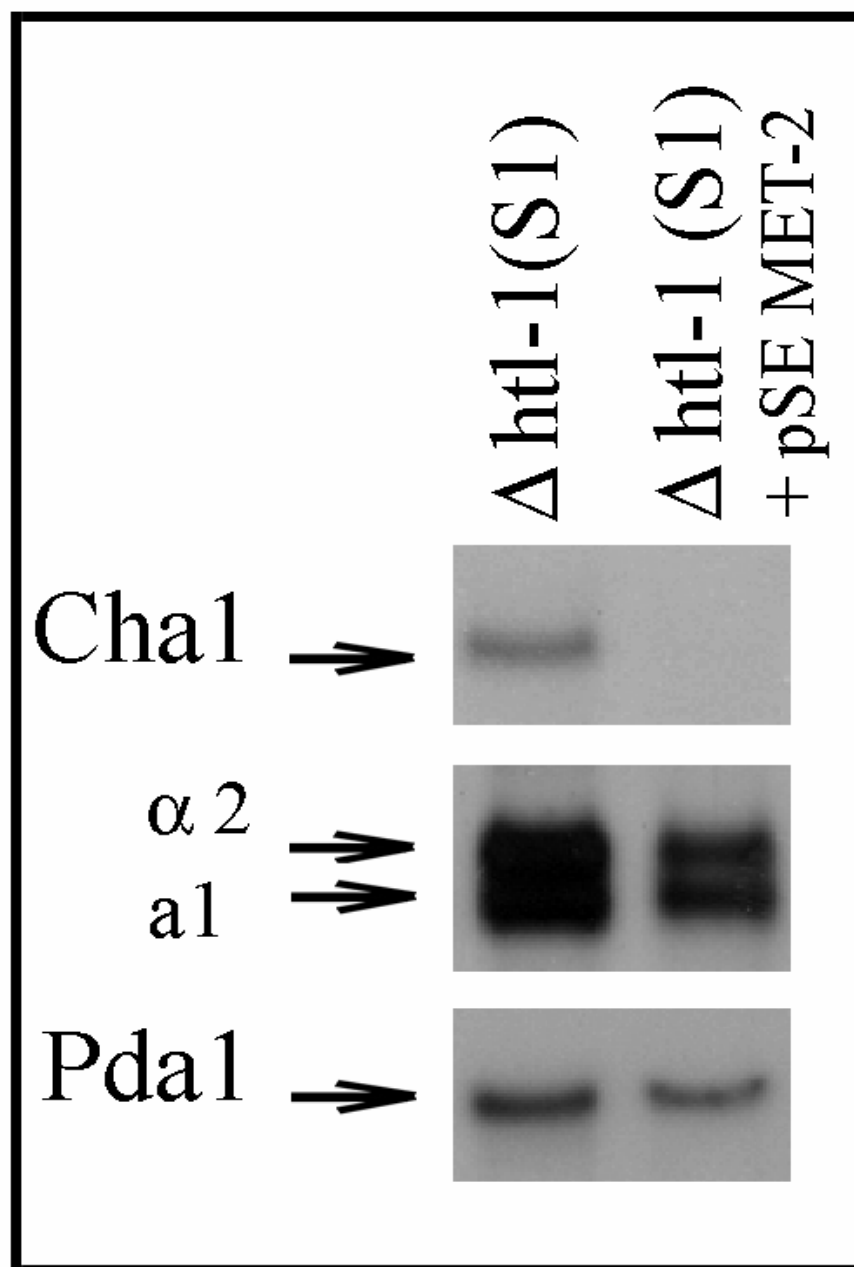


Figura 5D. Analisi *Northern blot* sul subclone sterile (Mat a) $\Delta htl-1$ (S1) trasformato col vettore *pSE MET-2* (presenta il gene HTL-1 sotto promotore inducibile MET3) e cresciuto per alcune generazioni in condizione di induzione. L'espressione ectopica di Htl-1 reprime la trascrizione di CHA1 (vedi Fig.5C) ma non silenzia la cassetta HML come confermato dalla presenza del segnale per $\alpha 2$. La normalizzazione è realizzata seguendo i livelli di PDA1.

6. *Progressione della sterilità nei mutanti $\Delta htl-1$: processo degenerativo o selettivo?*

La progressione fenotipica che approda alla sterilità (non dimentichiamo che i cloni sterili sono in realtà discendenti di quelli fertili) può rientrare in un processo degenerativo o selettivo. Poiché in lievito l'invecchiamento cellulare porta a sterilità interessando (*tra l'altro*) alterazioni nel meccanismo del *silencing*, del mantenimento delle estremità telomeriche nonché del controllo sulla ricombinazione intracromosomale tra le ripetizioni di rDNA ho realizzato esperimenti di *Southern blot* per osservare la lunghezza delle estremità telomeriche e l'eventuale formazione di circoletti di rDNA extracromosomico (ERC). In nessuno dei casi ho osservato significative alterazioni rispetto ai controlli selvatici (Moscariello M., tesi di laurea).

Per saggiare la possibilità non intuitiva che la sterilità conferisse un vantaggio selettivo nella crescita mitotica ho allestito un esperimento di ricostruzione. Ho mescolato, in eguale proporzione, cellule di mutanti $\Delta htl-1$ fertili e cellule di mutanti $\Delta htl-1$ sterili, ho allestito colture liquide sequenziali e ad intervalli regolari ho osservato le fertilità di singoli subcloni. Dopo circa 80 generazioni la popolazione sterile prende il sopravvento sulla fertile (Figura 6A). Questo vantaggio selettivo, ancora una volta, si spiega con la presenza di una seconda mutazione, soppressore parziale del fenotipo *htl-1*, nei ceppi sterili *htl-1(S)*.

Competizione tra $\Delta htl-1(S)$ e $\Delta htl-1(F)$

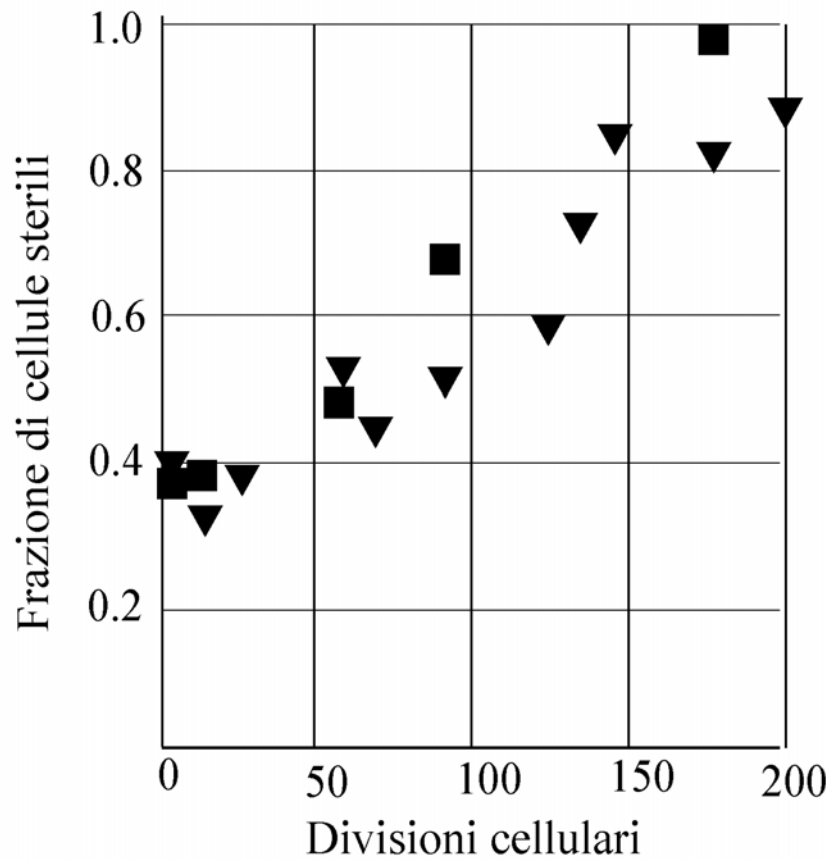


Figura 6A. In questo esperimento di competizione si mescolano quantità equivalenti di popolazioni mutanti *htl-1* fertili e sterili (1:1) distinguibili ciascuna per un proprio marcatore di selezione e si allestiscono colture liquide seriali. Ad intervalli regolari si isolano, in assenza di selezione, qualche centinaio di colonie e per *replica plating* si seguono i marcatori di selezione. In due esperimenti indipendenti, la popolazione sterile ha preso il sopravvento sulla fertile. Nel primo esperimento la popolazione $\Delta htl1(S)$ porta il marcatore HIS3, mentre la popolazione $\Delta htl1(F)$ il marcatore URA3. Nel secondo esperimento i marcatori sono URA3 per la popolazione $\Delta htl1(S)$ e HIS3 per la popolazione $\Delta htl1(F)$.

△ = *htl-1(S)* HIS3+, ■ = *htl-1(S)* URA3+

7. *Una seconda mutazione nei cloni htl-1 sterili, mappa nel locus SIR3 e sopprime alcuni dei fenotipi htl-1.*

Per identificare il soppressore il ceppo sterile $\Delta htl-1(S)$ è stato trasformato con una libreria di lievito e saggiato per il recupero della fertilità. Due cloni indipendenti contenevano l'intera sequenza genica di SIR3, che com'è noto, codifica per un prodotto proteico coinvolto nell'instaurare e mantenere il *silencing* trascrizionale sui loci HM e ai telomeri. In pratica l'inattivazione di SIR3, nei mutanti $\Delta htl-1$, stabilizza la derepressione di CHA1 e desilenza il locus HML inoltre ho osservato che la selezione clonale diretta dalla mutazione in SIR3, ha effetto anche sulla sensibilità all'idrossiurea. Infatti, i mutanti $\Delta htl-1$ sterili sono resistenti all'idrossiurea e quando vengono trasformati con copia selvatica di SIR3, recuperano la fertilità, ma diventano sensibili all'idrossiurea al pari dei mutanti fertili (Figura 7A).

Ad ulteriore conferma del coinvolgimento di SIR3 nelle dinamiche descritte ho distrutto la copia selvatica del gene SIR3 nel mutante $\Delta htl-1$ fertile e il doppio mutante $\Delta htl-1/\Delta sir3$ è risultato essere più resistente all'idrossiurea dei due singoli mutanti (Figura 7B).

La maggiore resistenza del doppio mutante $\Delta htl-1/\Delta sir3$ non può ricercarsi nella sua natura pseudodiploide, poiché, un ceppo diploide omozigote per la distruzione in HTL-1 è sensibile all'idrossiurea (Figura 3A). Quindi, il tipo sessuale non interferisce sulla risposta allo stress genotossico nei mutanti *htl-1*.

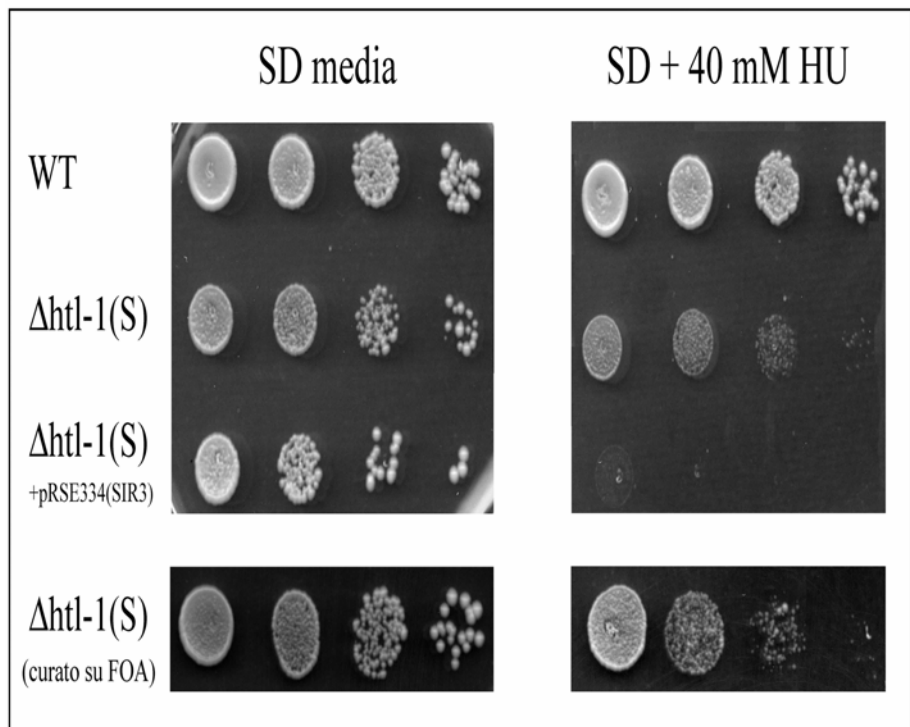


Figura 7A. Aliquote da 5 μ l, di diluizioni seriali (di un fattore 10), sono state distribuite su piastre di terreno minimo SD ed incubate per 72 ore a 30 °C. Il mutante $\Delta htl-1(S)$, trasformato col vettore pRSE334 (che copia allelica di SIR3 e marcatore di selezione URA3) recupera la fertilità, ma diventa sensibile all'idrossiurea (40 mM). Crescendo lo stesso ceppo su FOA (l'acido fluoroorotico, seleziona negativamente le cellule URA3+) ho indotto la perdita del vettore e il ceppo diventa nuovamente resistente all'idrossiurea (pannello inferiore).

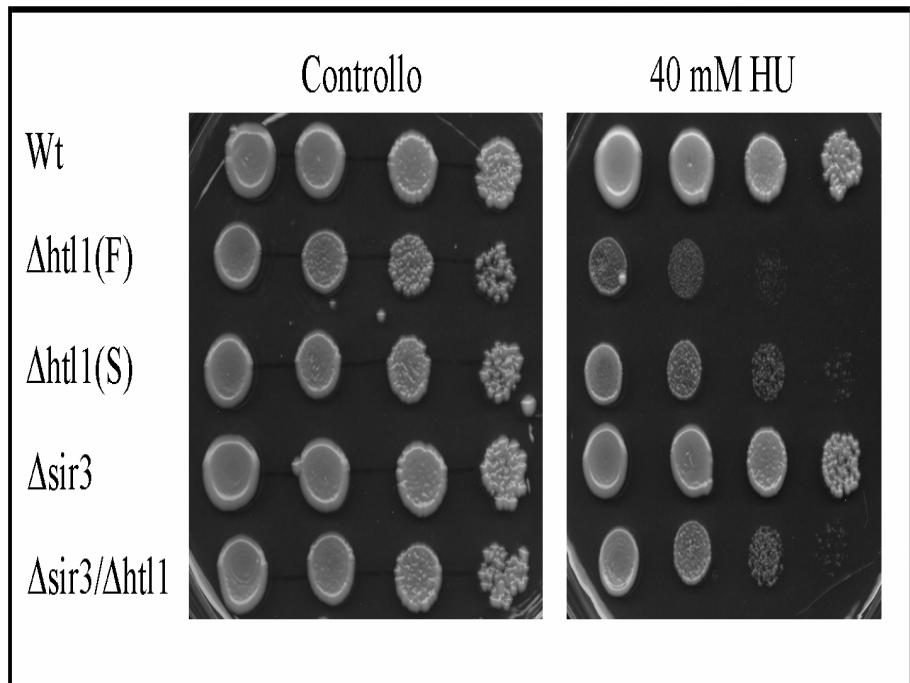


Figura 7B. Saggio di sensibilità all'idrossiurea del singolo mutante $\Delta sir3$ e del doppio mutante $\Delta ht1-1/\Delta sir3$. Aliquote da 5 μ l, di diluizioni seriali (di un fattore 10), sono state distribuite su piastre di terreno ricco YPD incubate per 48 ore a 30 °C. La delezione di SIR3 si traduce in un aumento della resistenza all'idrossiurea del mutante *ht1*, come confermato dal comportamento del doppio mutante $\Delta sir3/\Delta ht1$.

Introduzione (seconda parte)

Introduzione (seconda parte)

Il complesso RSC e la modificazione della cromatina nella riparazione delle interruzioni nell'elica di DNA.

La lesione più deleteria nel genoma è costituita dalle interruzioni che interessano entrambe i filamenti della molecola di DNA (DSBs) e generalmente sono causate o dal metabolismo cellulare o da radiazioni ionizzanti e sostanze genotossiche. Di regola i meccanismi di riparazione operano con due modalità principali: la semplice riligazione delle estremità oppure il recupero dell'informazione perduta da una molecola stampo (donatrice) complementare. Nel primo caso si parla di NHEJ (da Non Homologous End Joining) in cui la saldatura è preceduta da un processamento delle estremità fino ad ottenere regioni di micro omologia e pertanto introduce mutazioni rispetto alla sequenza originaria (è detta *error prone*), nel secondo caso si parla di ricombinazione omologa (Homologous Recombination, HR) e il ripristino della continuità nella molecola di DNA è garantito dalla copia dell'informazione mancante su una molecola stampo con sequenza omologa a quella danneggiata. Quindi, la HR rappresenta una modalità di ripristino dell'informazione che non introduce errori (è detta *error free*). Nella maggior parte degli eucarioti si osserva un ampio ricorso al meccanismo della HR, ma in assenza di uno stampo complementare, la cellula ricorre alla NHEJ. In entrambe i casi la riparazione risente dell'organizzazione cromatinica a livello della lesione e a livello della

sequenza donatrice omologa e numerose indicazioni descrivono un ruolo determinante dei complessi di rimodellamento della cromatina in questi processi (Downs Cotè 2005, Huang 2005, Van Attikum e Gasser 2005, Morrison e Shen, 2005).

Numerosi studi in lievito hanno dimostrato che uno dei primi eventi che segue la formazione di un DSB è la fosforilazione di un residuo di serina, in posizione 129, dell'istone H2A (nei mammiferi si tratta del residuo S139 dell'istone H2AX, Ragakou 1999, Downs 2000), e questa fosforilazione si estende per almeno 50 Kb rispetto al sito di taglio (Downs 2004, Shroff 2004). La fosforilazione dell'istone H2A è coinvolta nel reclutamento dei complessi di rimodellamento della cromatina a livello del danno in modo da descrivere una modificazione nella struttura cromatinica che favorisce il reclutamento dei fattori di riparazione. I complessi coinvolti nella modificazione della struttura cromatinica includono sia HATs (**H**istone **A**cetyl **T**ransferase) che rimodellatori ATP-dipendenti ma anche chinasi, fosfatasi e deacetilasi istoniche. Questi fattori operano in entrambe i meccanismi di riparazione (sia HR, che NHEJ) a sottolineare l'enorme importanza che essi rivestono nel mantenimento dell'integrità genomica.

Come accennato sopra la fosforilazione dell'istone H2A è il primo evento che si verifica a livello di un'interruzione di tipo DSB e sembra che questo residuo fosforilato determini il reclutamento di NuA4 una iston acetil transferasi (HAT) che acetila

l'amminoterminale dell'istone H4 (Bird2002, down2004). Segue il reclutamento dei complessi rimodellatori ATP-dipendenti quali INO80 e SWR1 che interagiscono con gli istoni per mezzo delle subunità Arp4 (Shen, 2003). E' interessante notare che in mutanti dell'acetilasi del complesso NuA4 (*esa1*) non si assiste al richiamo di INO80 e SWR1 e questa indicazione suggerisce una progressione finemente regolata nel reclutamento dei differenti fattori a livello della interruzione.

Da quanto descritto è chiaro che le modifiche covalenti degli istoni, oltre a modificare la struttura del nucleosoma, costituiscono un segnale molecolare per il reclutamento dei numerosi fattori coinvolti nella riparazione e il rimodellamento della regione. Questo rimodellamento, realizzato dai complessi ATP-dipendenti, prepara al momento della riparazione.

Riparazione mediante ricombinazione omologa (HR).

In lievito, la riparazione di DSB è essenzialmente mediata dal meccanismo, privo di errori, della HR; nelle cellule aploidi è richiesta o la presenza di un cromatidio fratello o un'altra regione di omologia (è ovviamente assente il cromosoma omologo). Il meccanismo della HR richiede il prodotto dei geni appartenenti al gruppo epistatico di Rad52 che include Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 ed Xrs2 (*reviewed in Aylon2004 e Dudas2004*). In seguito alla formazione di un DSB, le estremità libere sono

riconosciute e processate dal complesso esonucleasico Rad50/Mre11/Xrs2 che idrolizzano un filamento in direzione 5'-3' e ne deriva l'esposizione di un'estremità a singola elica (è detta *3' protruding*) che viene legata da RPA (Replication Protein A) prodotto dal gene RFA1 di *S. cerevisiae* (Haber 2000). Il successivo reclutamento di Rad52, di Rad54 e dell'eterodimero Rad55/57 comporta la sostituzione di RPA con Rad51 e quindi la ricerca di un filamento omologo complementare (Sung 2000, Symington 2002). L'eterodimero Rad55/57 coopera con Rad51 nella fase iniziale di scambio tra i filamenti (Sung, 1997) a cui segue la replicazione dello stampo omologo da parte della polimerasi, la risoluzione della struttura generata e la ligazione del DNA.

Un meccanismo alternativo che si richiama alla HR ma che non è *error-free* è detto SSA (da *Single Strand Annealing*) e interviene qualora non sia disponibile una sequenza donatrice stampo. E' richiesta, anche in questo caso, l'attività del complesso esonucleasico MRX nonché dei fattori Rad52, Rad59 e Rad27. Il meccanismo di SSA sfrutta l'appaiamento tra sequenze ripetute prossimali al sito di taglio (e sembra risentire delle dimensioni del tratto ripetuto con un *optimum* con circa 200 paia di basi, Sugawara 2000) e si basa su una ricerca di omologia (intramolecolare) e non di invasione (intermolecolare) di uno stampo complementare. Questo spiega come mai il prodotto Rad51 non è essenziale in questo tipo di meccanismo che invece vede il coinvolgimento di Rad52 e Rad59 (Davis 2001).

L'endonucleasi Rad27 è responsabile del taglio delle strutture non appaiate che si generano cui fa seguito l'intervento della ligasi che ripristina la continuità nei due filamenti (Wu, 1999). Il meccanismo di SSA sfrutta il principio della ricerca di omologia, ma rispetto all'HR è caratterizzato dalla delezione di informazione genetica (Sugawara, 2000).

Recentemente è stata descritta la presenza del complesso RSC a livello di un DSB che sembra reclutato dal complesso MRX per mezzo della subunità Mre11 (Shim, 2005). Il reclutamento di RSC sembra precedere quello di altri complessi rimodellatori (e.g. INO80) e gli si attribuisce un ampio ruolo nella riparazione di DSB. È stato dimostrato che i complessi di rimodellamento SWI/SNF ed RSC sono coinvolti nel meccanismo della HR e sono stati individuati sia a livello del sito di taglio sia della sequenza donatrice (Huang 2005, Chai 2005). Poiché SWI/SNF è reclutato a livello della sequenza donatrice prima del momento di invasione dello stampo complementare si ipotizza che possa esporre il DNA nucleosomale al complesso deputato alla ricerca di omologia e permettere quindi il collegamento tra sito di taglio e sequenza donatrice. È rilevante che il complesso RSC sebbene reclutato prima di SWI/SNF a livello del sito di interruzione abbia un ruolo solo dopo l'avvenuta formazione della sinapsi tra la molecola recipiente e la sequenza donatrice tanto da ipotizzare uno scenario in cui l'attività di RSC possa inquadarsi nel momento di risoluzione della struttura che precede la riligazione.

Anche altri complessi con attività di rimodellamento sono reclutati a livello del sito di interruzione; come descritto sopra le subunità Arp4 dei complessi INO80 e SWR1 interagiscono con gli istoni acetilati (H4 in particolare) e si ritiene che favoriscono il processamento delle estremità mediato da MRX per generare molecole a singola elica (*3' protruding ssDNA*) (Morrison 2004, Van Attikum 2004). Addirittura per il complesso INO80 la sua attività ATP-asica di riposizionamento dei nucleosomi è stata messa in relazione anche con le successive dinamiche di sostituzione di RPA con Rad51 (il ssDNA viene ricoperto da RPA ma poi viene sostituita da Rad51). Queste evidenze sottolineano un ruolo assai precoce di questi complessi nella riparazione delle interruzioni mediante meccanismi di HR.

Un' alternativa al riposizionamento dei nucleosomi è offerta dalla sostituzione delle forme canoniche delle proteine istoniche con forme alleliche differenti (*reviewed in* Korber 2004, Cairns 2005). Questo tipo di attività è riconducibile a complessi dotati di attività ATP-asica quali SWR1. Quest'ultimo è responsabile della sostituzione dell'istone H2A con Htz1 (variante allelica dell'istone H2A conosciuta come H2AZ) (Li 2005, Zhang 2005). In pratica la sostituzione è favorita dall'attività ATP-asica che allenta l'interazione tra il dimero H2A/H2B col DNA. Anche per un altro complesso di lievito chiamato SWI1 è stata descritta, al termine dell'evento di riparazione di un danno, un'attività di sostituzione dell'istone fosforilato H2A con la variante Htz1. Al complesso INO80 viene

attribuito un ruolo antagonista ovvero di sostituzione della variante Htz1 con quella H2A qualora l'evento di riparazione non sia ultimato. Un rimodellatore della cromatina dal ruolo distinto durante l'evento di HR è Rad54. Anch'esso membro della superfamiglia SWI2/SNF2 è dotato di attività ATP-asi necessaria per la rimozione di nucleosomi e di altre proteine che legano il DNA in modo da favorire l'accesso alla molecola durante l'evento di ricombinazione (Wolner 2005). Rad54 assiste e interagisce fisicamente con Rad51 durante la ricerca e "l'invasione" di sequenze omologhe donatrici. E' stato suggerito che Rad54 con l'idrolisi di ATP genera superavvolgimenti nella molecola di DNA della struttura sinaptica (in pratica della struttura intermedia a tre che si genera tra ssDNA ricoperta di Rad51 con la doppia elica della sequenza donatrice) e favorisce la ricerca del tratto di omologia (Jaskelioff 2003).

Alle differenti attività dei complessi di rimodellamento e delle modifiche covalenti a carico dell'istone H2A si affiancano nuove modifiche che interessano altre proteine istoniche. In studi recenti, a livello di un DSB si è osservata l'acetilazione dei residui di lisina nelle code ammino terminali degli istoni H3 ed H4 operata dall'acetiltransferasi HAT1 (Tamburini e Tyler 2005). E' stato descritto un ruolo analogo svolto da altre HAT (Esa1 e Gcn5) e un ruolo antagonista di deacetilazione da parte di Sir2, Hst1 e Rpd3. Se da una parte queste modificazioni possono regolare l'accesso al DNA e il reclutamento di complessi di rimodellamento è anche ipotizzabile

uno scenario in cui queste modifiche costituiscono segnali per riavviare la progressione nel ciclo cellulare a riparazione effettuata.

Riparazione senza omologia (Non Homologous End Joining, NHEJ)

In lievito, la NHEJ richiede l'eterodimero Ku70/Ku80 con affinità per le estremità libere del DNA, il complesso della ligasi Lig4/Lif1, e il complesso MRX (Dudasova et al., 2004). La sequenza di eventi nel meccanismo della NHEJ prevede il legame di Ku70/80 all'estremità libere del DNA a livello del sito di taglio (impedendone la degradazione) e il successivo richiamo del complesso MRX. Questo complesso con l'attività esonucleasica facilita il contatto tra le due estremità dell'interruzione e prepara la molecola al successivo intervento di ligazione operato dal complesso Lig4/Lif1 (Hefferin, 2005).

Anche in questo meccanismo di NHEJ al ruolo diretto svolto da questi fattori si associa quello di modificazione della struttura cromatinica. In lievito, il complesso iston deacetilasi Sin3/Rpd3 opera sul residuo di lisina 16 dell'istone H4 e permette un efficiente NHEJ (e non ha alcun ruolo nel meccanismo della HR) (Jazeyeri et al., 2004). Si ritiene che questa modificazione non determini un reclutamento di specifici fattori della NHEJ quanto una migliore competenza a formare la struttura sinaptica tra le estremità da riligare (Fernandez-Capetillo, 2004). Parallelamente alla deacetilazione di

Sin3/Rpd3 (su lisina16) si osserva la fosforilazione a carico di un residuo di serina all'ammino terminale dell'istone H4 che sembra impedire l'acetilazione dell'istone da parte di NuA4 (su lisina16). In definitiva, l'acetilazione mediata da NuA4 (su lys16) è un evento precoce, probabilmente deputato al rilassamento della struttura cromatinica in prossimità del taglio, cui fa seguito l'attività deacetilasica del complesso Sin3/Rpd3 (su lys16) che potrebbe essere richiesta per gli stadi più avanzati dell'evento di riparazione (Utley et al., 2005). In modo parallelo si verifica la fosforilazione del residuo di serina sull'istone H4 che, ostacolando l'eventuale ri-acetilazione da parte di NuA4, potrebbe segnare il ripristino della struttura cromatinica a riparazione completata.

Uno studio recente ha definito il ruolo del complesso RSC nel meccanismo della NHEJ descrivendo un'interazione fisica con i fattori proteici Mre11 e KU80. Inoltre, mutazioni in Mre11 o Ku70 impediscono il reclutamento di RSC a livello del sito di taglio (Shim et al., 2005). Si pensa che l'attività di rimodellamento di RSC possa direttamente contribuire al reclutamento dei fattori coinvolti nella NHEJ oppure facilitare il caricamento delle coesine sull'estremità da risaldare. Si ritiene che anche il complesso INO80 sia importante per una efficiente NHEJ (Van Attikum, 2004).

Ripristino della struttura cromatinica dopo l'evento di riparazione.

Il momento finale di ogni meccanismo di riparazione comporta il ripristino della struttura cromatinica originaria con riassettaggio dei nucleosomi e del locale stato epigenetico. Il fattore di assemblaggio della cromatina CAF-1 è richiesto sia dopo un evento di HR che di NHEJ, in mutanti di questo fattore si osservano riarrangiamenti cromosomici quali traslocazioni e delezioni (Linger and Tyler, 2005). Al termine della riparazione di un danno, oltre al ripristino dell'originaria disposizione dei nucleosomi, la cellula deve rimuovere le diverse modificazioni chimiche a carico degli istoni. La fosforilazione dell'istone H2A può essere revertita direttamente *in situ* oppure per rimozione dell'istone, sua modificazione e reinserimento nel core nucleosomale (semplice riciclo). In lievito è stato identificato un complesso istone-H2A-fosfatasi detto HTP-C che defosforila l'istone H2A dopo averlo rimosso dal sito del DSB (Keogh, 2006). Anche in mammifero esiste un'attività fosfataseica, ma non è chiaro se opera *in situ* oppure trasloca l'istone dal nucleosoma e lo modifica (Chowdhury, 2005).

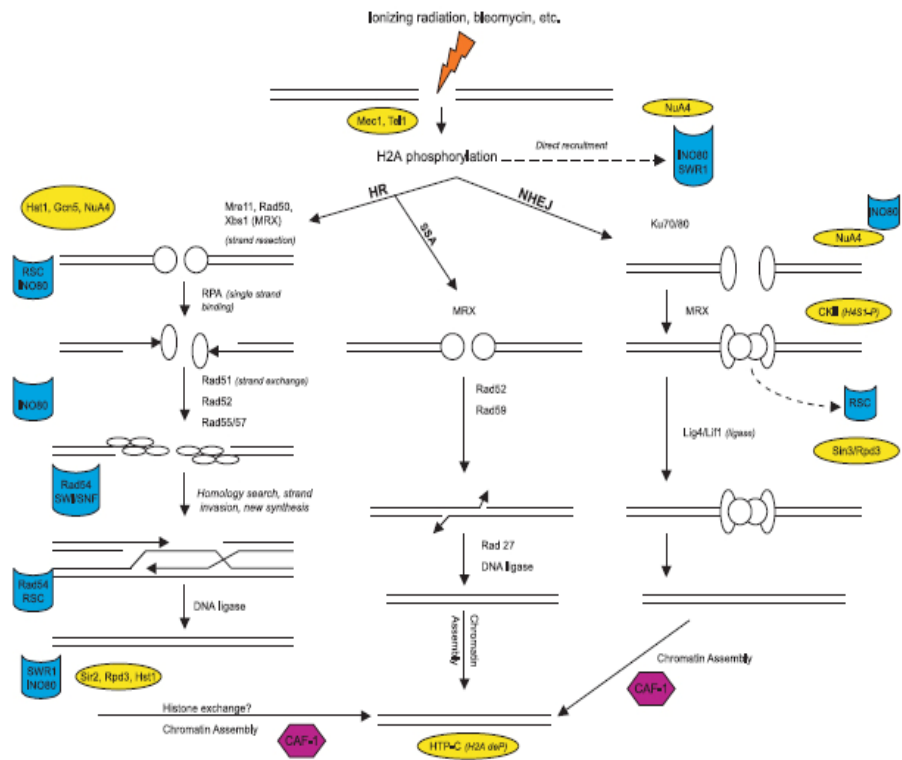


Figura da Ataian Y. and Krebs JE. (Biochem. Cell Biol. 2006 84: 490–504)
 Meccanismi di riparazione delle interruzioni nel contesto della cromatina. La figura descrive i principali meccanismi di riparazione in lievito: la ricombinazione omologa (HR, a sinistra), l'avvolgimento sul singolo filamento (SSA, al centro) e la fusione delle estremità attraverso un meccanismo di non omologia (NHEJ, a destra). Sono indicati i principali fattori coinvolti e quelli che influenzano la struttura cromatinica sono colorati: rimodellatori con attività ATP-asi (blu); enzimi che modificano gli istoni (giallo); fattori di assemblaggio della cromatina (magenta). La fosforilazione dell'istone H2A a livello del sito di DSB porta al legame di numerosi fattori che rimodellano e modificano la cromatina e di fattori coinvolti nel meccanismo di riparazione del DNA. Questi modificatori/rimodellatori della cromatina facilitano la ricerca del tratto omologo da parte di Rad51 nel processo della HR e della risaldataura delle estremità libere nel caso della NHEJ.

Risultati (seconda parte)

Risultati (seconda parte)

8. *Interazione genetica di HTL-1 con geni coinvolti nella riparazione dei danni al DNA.*

A parte la sensibilità all'idrossiurea, i mutanti $\Delta htl-1$ sono ipersensibili al MetilMetanSolfonato (MMS) che alchila le purine e genera tagli nella doppia elica (DSB) (Figura 8A). Lo stesso trattamento con idrossiurea può portare ad un collasso delle forche replicative e a rotture nella doppia elica. La sensibilità agli agenti genotossici suggerisce che Htl1 possa essere coinvolto nella riparazione. Mi sono, quindi, proposto di studiare le interazioni genetiche tra HTL-1 e i due geni RAD52 e KU70 coinvolti nei due percorsi principali di riparazione dei danni nel DNA. E' noto che RAD52 influenza la ricombinazione omologa (HR), mentre il gene KU70, che codifica per una subunità del complesso eterodimerico KU (yKu70p/yKu80p), è necessario per la NHEJ (*Non Homologous End Joining*: fusione delle estremità senza ricorso all'omologia). A 30°C, la delezione di HTL-1 in un ceppo mutante $\Delta ku70$ non ha effetto sulla sopravvivenza o sulla sensibilità all'idrossiurea (il fenotipo osservato sembra essere quello del singolo mutante *htl-1*), mentre dà origine ad un letale sintetico in associazione con una delezione del gene RAD52 (Figura 8B).

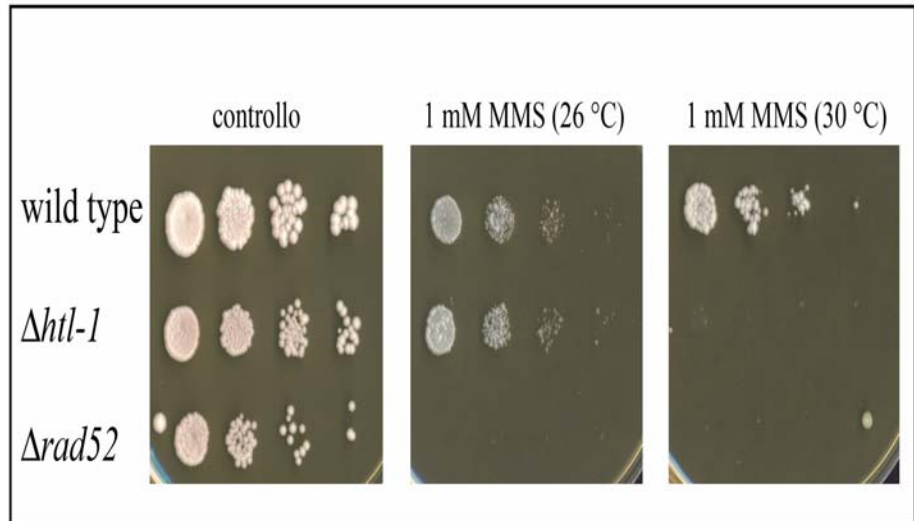


Figura 8A. Esperimento di sensibilità al MetilMetanSolfonato (MMS). Diluizioni seriali dei ceppi indicati sono state distribuite, in replica, su piastre di terreno ricco con e senza MMS e incubate alle temperature di 26 e 30 °C. Il ceppo mutante delezione in RAD52 ($\Delta rad52$) è utilizzato come controllo negativo. Il mutante $\Delta htl-1$, diventa sensibile a partire dalla temperatura di 30 °C.

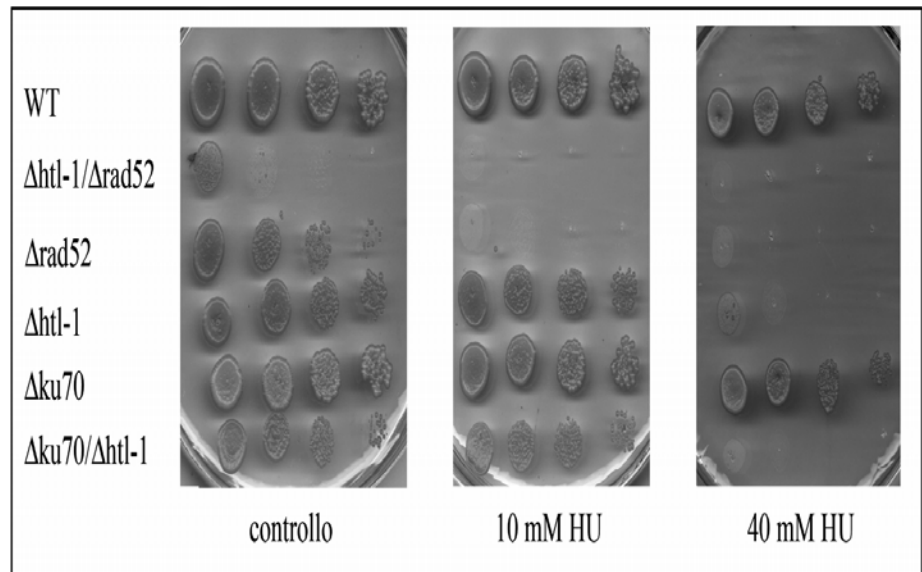


Figura 8B. Saggio di sensibilità all'idrossiurea dei singoli mutanti *Δrad52* e *Δku70* e dei doppi mutanti *Δhtl-1/Δrad52*, *Δhtl-1/Δku70*. Le diluizioni di ciascuna popolazione indicata sono state distribuite su piastre di terreno ricco (YPDA) con e senza idrossiurea. L'incubazione si è protratta per 72 ore a 30°C e ha rivelato la natura letale della doppia mutazione *Δhtl-1/Δrad52*. Inoltre, non si osserva nessun effetto sulla resistenza all'idrossiurea del ceppo doppio mutante *Δhtl-1/Δku70* rispetto al singolo mutante *Δhtl-1*.

9. *Il ruolo di Htl-1 nel meccanismo della Non Homologous End Joining (NHEJ).*

L'osservazione della letalità di *htl1* in associazione con *rad52* e dell'apparente epistasi con *Ku70* suggerisce che Htl1 potrebbe essere coinvolto nella NHEJ. Però, mutazioni in Rad52 sono letali non solo in associazione con mutanti in geni coinvolti nella riparazione del DNA, ma anche nella replicazione, nella segregazione dei cromosomi e nella trascrizione.

Per determinare se Htl-1 avesse un ruolo nella NHEJ di interruzioni nella doppia elica di DNA (DSB), ho utilizzato un saggio di “*saldatura del plasmide*” che misura la capacità delle cellule di riparare, *in vivo*, una interruzione generata da un enzima di restrizione (Boulton e Jackson, 1998). In questo saggio il ceppo di lievito viene trasformato con un plasmide chimerico (costituito da sequenze di lievito ed *E. coli*) linearizzato con un enzima di restrizione che taglia in una regione priva di omologia con il cromosoma di lievito. Poiché il plasmide deve ricircularizzare per propagarsi, il numero di trasformanti ottenuti con il plasmide lineare è una misura dell'efficienza di NHEJ. Per normalizzare le differenze nell'efficienza di trasformazione tra i ceppi e preparazioni di plasmide, in parallelo, si trasforma con quantità equivalenti dello stesso vettore non tagliato. Nella figura 9A è rappresentato il vettore pBTM116 che è usato nel saggio. Per prevenire una risaldatura delle estremità attraverso un meccanismo di ricombinazione omologa, HR, col genoma di lievito

(la HR costituisce il percorso preferenziale in lievito), il sito per il taglio con l'endonucleasi cade in una cassetta procariotica (*LexA*) che non presenta corrispettivi omologhi sulle sequenze cromosomiche di lievito. Ho analizzato la riparazione di molecole di vettore linearizzate con l'endonucleasi EcoRI che genera estremità coesive e con SmaI che genera estremità tronche. La presenza di un tratto di parziale sovrapposizione tra le estremità generate col taglio di EcoRI, in genere, porta ad una saldatura precisa col ripristino del sito di restrizione e per il ceppo selvatico W303-A l'efficienza di riligazione si attesta sul valore del 70%. Al contrario le estremità generate con l'endonucleasi SmaI vengono processate da esonucleasi in maniera più o meno estesa fino alla descrizione di un tratto di microomologia e l'efficienza di ricircolarizzazione si abbassa al 3%. In lievito, a differenza dagli eucarioti multicellulari, la riparazione delle estremità tronche è poco efficiente e non conservativa. In quest'ultimo caso il costrutto plasmidico presenta delezioni di diversa estensione. In figura 9B sono schematizzati, in grafico, i risultati ottenuti trasformando con il costrutto linearizzato con l'enzima EcoRI. Nel saggio, confronto l'efficienza di NHEJ dei ceppi selvatici (aploidi e diploidi) rispetto ai mutanti *htl1*(**F**ertili e **S**terili) e al controllo negativo costituito dal ceppo $\Delta ku70$. Il saggio ha rivelato, per la popolazione mutante $\Delta htl-1(F)$ e solo a 30 °C, un abbattimento significativo rispetto al ceppo selvatico (18% contro 70%) nella capacità di riligare il vettore (Figura 9B). Alla temperatura di 26 °C

non sembrano esserci difetti nel meccanismo di NHEJ tanto che la frequenza di ricircularizzazione, sia per la popolazione selvatica che mutante, si attesta al valore dell'80%. La parallela trasformazione di controllo, in ceppi $\Delta htl-1(F)$ che presentano copia ectopica di HTL-1, ha rivelato il ripristino del profilo di ricircularizzazione del ceppo selvatico; quindi la complementazione conferma il ruolo del peptide Htl-1 nel meccanismo della NHEJ. L'ulteriore abbattimento dell'efficienza di ricircularizzazione nella popolazione mutante *htl-1(S)* (valore osservato del 4%) è probabile conseguenza dell'eterozigotità sessuale Mata/ α che limita il ricorso alla NHEJ come confermato dal ceppo selvatico diploide che, rispetto al valore del 70% dell'aploide, mostra un'efficienza di ricircularizzazione solo del 14%. La trasformazione col costrutto linearizzato con l'endonucleasi SmaI non è risultata molto informativa poiché sia per il ceppo selvatico che per il mutante $\Delta htl-1$ si ha un abbassamento dell'efficienza di trasformazione con valori, rispettivamente, dell'8.5% e 11.4% (Figura 9C).

Rappresentazione schematica del saggio di efficienza della NHEJ in ceppi di lievito.

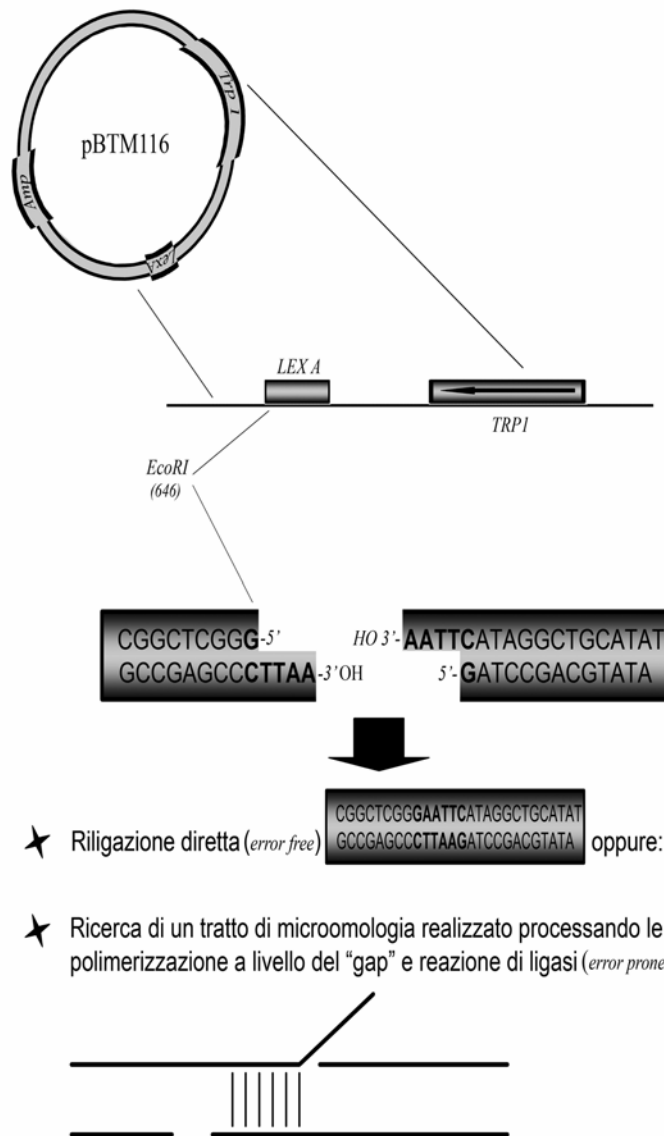


Figura 9A. Modello schematico del saggio di riparazione delle interruzioni sul plasmide. In alto sono mostrati il marcatore di selezione di lievito (TRP1), il gene della β -lattamasi (Amp), e la cassetta bersaglio dell'endonucleasi. La saldatura del taglio può ripristinare il sito di restrizione oppure, in caso di esteso processamento delle estremità, generare delezioni.

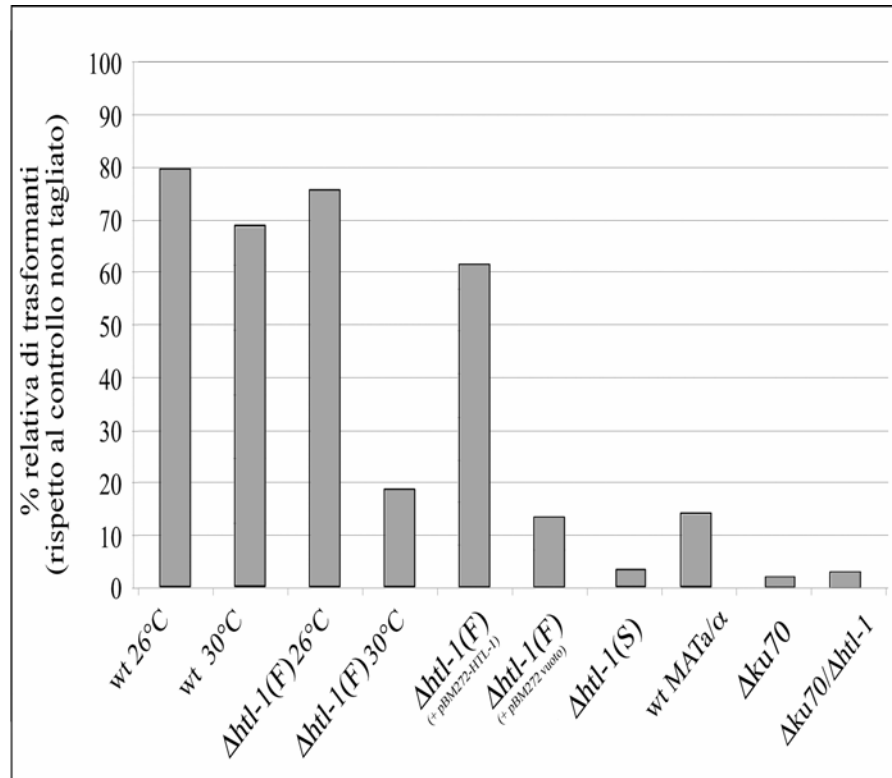


Figura 9B. Saggio di riligazione del vettore per mezzo del meccanismo della NHEJ (*Non Homologous End Joining*). Il mutante $\Delta htI-1(F)$ mostra un abbassamento dell'efficienza di ricircularizzazione del vettore a partire dalla temperatura di 30 °C. L'efficienza di riligazione è espressa come frazione percentuale del numero dei trasformanti ottenuti col vettore linearizzato rispetto a quello ottenuto con quantità equivalenti di vettore circolare chiuso. I dati si riferiscono ad un vettore linearizzato, con estremità coesive, generate dall'endonucleasi EcoRI. Il ceppo mutante $\Delta htI1(F)$ trasformato con copia ectopica di HTL-1 recupera l'efficienza relativa di trasformazione propria del selvatico. I ceppi $\Delta htI1(S)$ e WT Mat a/α (diploide) sono riportati come controllo negativo (l'eterozigosità Mat a/α abbatte il ricorso alla NHEJ). Un altro controllo negativo è rappresentato dal mutante $\Delta ku70$.

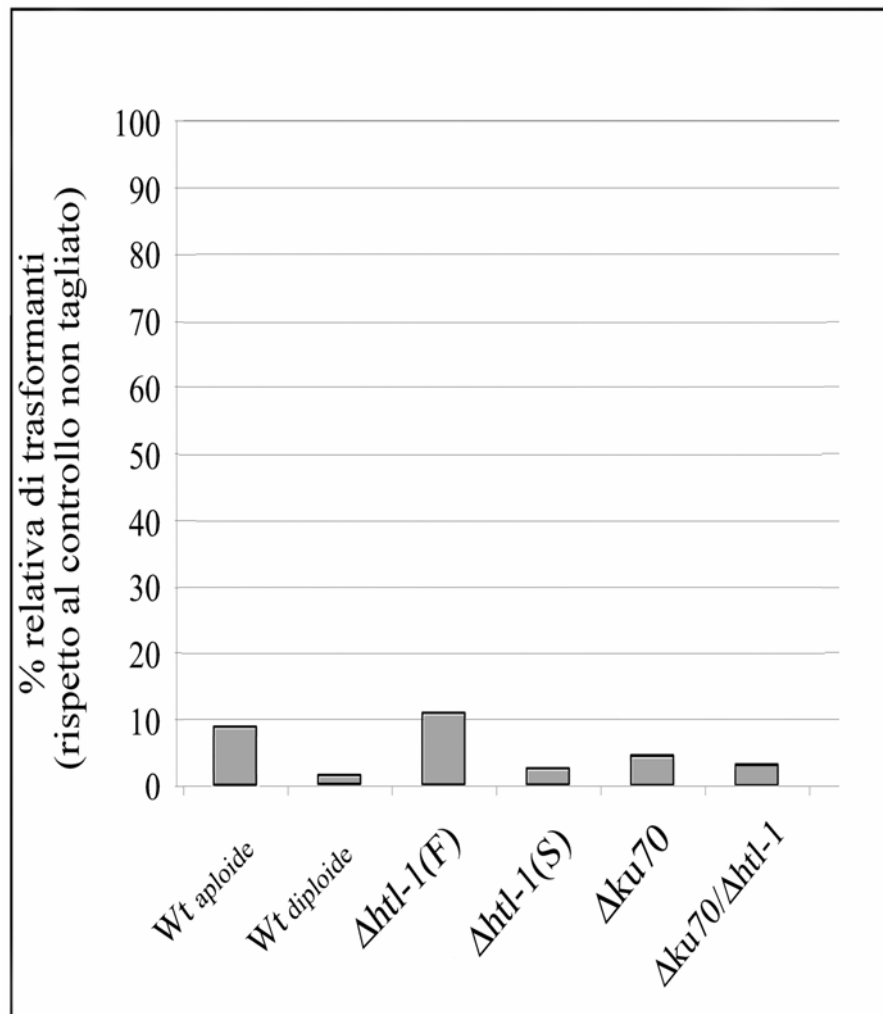


Figura 9C. Saggio di riligazione del vettore per mezzo del meccanismo della NHEJ (*Non Homologous End Joining*). I dati si riferiscono ad un vettore linearizzato, con estremità tronche, generate dall'endonucleasi SmaI. Sia i ceppi aploidi mutanti $\Delta htl1$, che i selvatici *Wt*, mostrano un abbassamento confrontabile dell'efficienza di riligazione. I diploidi *Wt* e gli pseudodiploidi $\Delta htl1(S)$ si caratterizzano per un ulteriore abbattimento dell'efficienza di trasformazione. Un controllo negativo è rappresentato dal mutante $\Delta ku70$.

Discussione

DISCUSSIONE GENERALE

In questa tesi e nel lavoro allegato ho presentato evidenze genetiche e biochimiche, per le quali il prodotto del gene HTL-1 partecipa alla composizione del complesso multiproteico di rimodellamento della cromatina, Rsc. Le mie evidenze convalidano, in generale, precedenti osservazioni (Romeo, 2002; Lu, 2003).

Rsc è direttamente o indirettamente coinvolto in numerosi processi, alcuni dei quali sono essenziali per la vitalità della cellula a 26 e 37 °C. Nel complesso RSC si distinguono diversi subcomplessi che condividono componenti del *core* (codificati dai geni STH1, SFH1, RSC8 RSC6) e si distinguono per la presenza di componenti accessori (codificati dai geni RSC1, RSC2, RSC7, RSC14, RSC3, RSC30, HTL-1). Mentre alcuni dei componenti (compresi tutti quelli del *core*) sono essenziali, la delezione di altri comporta letalità condizionale e fenotipi svariati che comprendono termosensibilità, difetti nell'integrità della parete cellulare, sensibilità all'idrossiurea, sensibilità alle radiazioni ionizzanti e a vari composti genotossici.

La delezione del gene HTL-1 risulta letale a temperature superiore ai 35 °C. Il mio lavoro dimostra che, anche a temperature più basse, *htl1* manifesta un ampio spettro di fenotipi, alcuni a penetranza ed espressività variabile, che ricapitolano molte delle caratteristiche di mutanti *rsc*. L'iperespressione di Htl-1 sopprime la letalità associata ad un allele termosensibile di RSC8, suggerendo che l'interazione Htl1-Rsc8 riguarda una funzione vitale (Sez.1 Risultati). Forse Htl-1

attraverso l'interazione con Rsc8 è importante per la stabilità del complesso e la letalità a 37 °C è dovuta a instabilità generata dall'assenza di Htl-1. Alla luce di questa ipotesi, mi aspettavo che sia i mutanti *htl-1* che *rsc8* (l'allele condizionale TS), alla temperatura non permissiva di 37 °C, dovessero essere caratterizzati dallo stesso fenotipo terminale. In mano mia, il fenotipo terminale è asincrono per i mutanti, in ambedue i geni, in accordo con le osservazioni di Treich et al. (1997) per *rsc8*, ma in disaccordo col blocco G2-M descritto da Romeo et al. (2002) per un mutante *htl1*. Considerando le interazioni genetiche tra HTL-1 e i geni che codificano per diverse subunità del complesso Rsc (RSC8, RSC3, RSC1 e RSC2, ciascuna delle quali descrive specifiche manifestazioni fenotipiche), è ipotizzabile che il danneggiamento di funzioni multiple possa essere una spiegazione plausibile per il fenotipo terminale non-sincrono (Sez.2 Risultati).

UN POSSIBILE RUOLO DI HTLI DURANTE LA REPLICAZIONE.

I mutanti *htl1* muoiono a 37 °C, ma solo in fase di crescita esponenziale, indicando un ruolo del complesso Rsc durante la citochinesi e/o la mitosi. Il controllo dell'integrità del genoma prima dell'entrata in mitosi è critico ed è realizzato da *checkpoint* che monitorano lo stato del genoma e rallentano il passaggio alla mitosi fino a quando eventuali discontinuità nel DNA non siano state riparate. Schematizzando, si può dire che i meccanismi di *checkpoint* consistono di tre parti: una prima, in cui si individua l'evento del ciclo

cellulare aberrante o incompleto, una seconda in cui una cascata di trasduzione del segnale ne indica la presenza e, infine, effettori che arrestano la progressione nel ciclo cellulare fino a completa risoluzione del problema. Quando vi sono difficoltà nella polimerizzazione del DNA, il *checkpoint* della replicazione (*S-checkpoint*) blocca l'attivazione di origini di replicazione tardive e previene attivamente il collasso delle forche di replicazione (Lopes et al 2001). In *Saccharomyces cerevisiae*, la formazione del fuso è simultanea alla replicazione e il *S-checkpoint* impedisce direttamente l'allungamento del fuso prevenendo così l'entrata in anafase (Krisnan e Surana 2005). Il *S-checkpoint* è stato studiato principalmente usando idrossiurea (HU), un inibitore della ribonucleotide reduttasi, che determina arresto della replicazione in seguito a deprivazione di nucleotidi (Krishnan et al., 2005; Lopes et al., 2001). In lievito, è stato dimostrato che le origini precoci di replicazione si attivano in presenza di HU ma si assiste ad uno stallo (reversibile), delle forche replicative nel raggio di 10 chilobasi. Con gli esperimenti di trattamento acuto in presenza di idrossiurea, descritti in precedenza, ho potuto controllare eventuali difetti nell'attivazione del *checkpoint* replicativo dimostrando che, nella popolazione mutante *htl-1*, si ha una (sua) normale attivazione almeno osservando i “*landmarks*” morfologici (arresto con gemma) (Sez.3 Risultati). Tuttavia gli effetti del trattamento sulla sopravvivenza cellulare suggeriscono che qualche cosa non stia funzionando:

- Alla temperatura semipermissiva di 30 °C (dove nel controllo non-trattato la vitalità subisce solo una flessione di circa il 35%, a 24 ore) in presenza di HU la vitalità è ridotta allo 0.05%, a 24 ore, benchè le cellule risultino sincronizzate.
- Alla temperatura non-permissiva di 37 °C le cellule non vengono sincronizzate da HU e muoiono come il controllo non trattato. Sembra dunque che il blocco nella divisione preceda l'attivazione del *checkpoint*.

UN RUOLO DI HTL1 NELLA TRASCRIZIONE.

Come descritto nella Sezione 5 dei Risultati la delezione di HTL1 porta alla derepressione di CHA1 (anche se la penetranza di questo fenotipo è incompleta). Questo dato è coerente con l'osservazione che Htl1 forma un complesso con Rsc8 (Florio et al. vedi lavoro allegato) e con l'ipotesi che Htl1 ha un ruolo in alcune funzioni di Rsc8. Lo stato trascrizionale del locus CHA1 è soggetto a controllo negativo da parte di Rsc8 (Moreira et al., 1999). A parte la penetranza incompleta per cui non ho una spiegazione, è chiaro che Htl1 ha, come Rsc8, un ruolo, diretto o indiretto sulla trascrizione PolII dipendente.

Ho ragionato, quindi, che un'alterazione trascrizionale potesse essere causa della sensibilità all'idrossiurea del mutante *htl-1*. Un evento chiave per la sopravvivenza dopo un danno al DNA e/o situazioni di stress nella replicazione prevede un aumento dei livelli intracellulari

di dNTP realizzato per mezzo dell'enzima ribonucleotide reductasi (RNR). L'enzima RNR catalizza la trasformazione di NDPs a dNDPs, e rappresenta il passaggio chiave nella produzione dei dNTPs necessari per la replicazione del DNA e per la riparazione. In lievito le subunità del complesso RNR sono codificate da 4 geni, RNR1-4 che vengono indotti trascrizionalmente in seguito a danni al DNA o a stress replicativo con una modalità dipendente dal percorso Mec1-Rad53-Dun1. Mutazioni nei geni RNR (con l'eccezione di RNR3) portano a sensibilità ad agenti che danneggiano il DNA e all'idrossiurea, che è un inibitore chimico di RNR. La mia ipotesi era, dunque, che nei mutanti *htl-1* in presenza di HU ci potesse essere una mancata attivazione trascrizionale di geni codificanti componenti della RNR. Per questo motivo, ho saggiato i livelli di mRNA di RNR4 con la tecnica del *Northern Blot* ma non ha evidenziato differenze rispetto al controllo selvatico (Sezione 4 dei Risultati). E' dunque probabile che la sensibilità all'idrossiurea del mutante *htl1* dipenda da un difetto nella replicazione o riparazione.

UN RUOLO DI HTL1 NELLA RIPARAZIONE.

La delezione del gene HTL-1 oltre a sensibilità all'idrossiurea determina sensibilità a raggi gamma e ad agenti radiomimetici (bleomicina e metilmetano sulfonato) che inducono tagli a doppia elica. Tuttavia non è alterata la capacità di riparare tagli, sito-specifici, indotti dalla sintesi costitutiva dell'endonucleasi HO nel sito

MAT (Bennet, 2001). L'interruzione prodotta da HO è riparata in modo efficiente per ricombinazione omologa (HR) Rad52-dipendente, utilizzando, come sequenze donatrici, le due copie alleliche silenti HML ed HMR. Chai et al. hanno dimostrato che il reclutamento di Rad52, a livello dell'interruzione nella doppia elica, non è alterato in mutanti *rsc* ($\Delta rsc1$ ed $\Delta rsc2$) e risulta indipendente da qualsiasi attività di rimodellamento. Questo suggerisce che HTL1 non è coinvolto nella ricombinazione omologa dipendente da Rad52 e che invece possa intervenire, direttamente o indirettamente (forse mediante alterazione dell'espressione genica) in un diverso percorso funzionale.

Per identificare questo percorso, ho analizzato le relazioni epistatiche tra i mutanti *htl-1* e mutanti in geni coinvolti in meccanismi di riparazione mediante ricombinazione omologa (HR, RAD52-dipendente) e nella riparazione non-omologa (NHEJ, KU70-dipendente).

La delezione del gene HTL-1 in un ceppo *rad52* origina un letale sintetico a 30 °C, coerentemente con il fatto che mutanti *htl-1*, mostrano sensibilità all'idrossiurea e ad altre sostanze genotossiche (MMS, Bleomicina), solo a temperature superiori di 30 °C. L'interpretazione della relazione epistatica è complicata dal fatto che *rad52* forma letali sintetici anche in associazione con mutazioni in geni coinvolti, non solo nella riparazione del DNA, ma anche nella replicazione, nella segregazione dei cromosomi e nella trascrizione.

Per contro, il doppio mutante *htl1/ku70* a 30 °C è vitale e ciò mi ha permesso di saggiare il ruolo di Htl1 nel meccanismo della NHEJ, allestendo un saggio di ricircolarizzazione del vettore (Materiali e Metodi, Boulton, 1996). I risultati mostrano a 30°C un abbattimento del ricorso alla NHEJ in *htl1* (18% di efficienza contro il 70% del ceppo selvatico) mentre alla temperatura di 26 °C il valore percentuale dell'efficienza è confrontabile con quello del ceppo selvatico di controllo. Di conseguenza nei mutanti *htl-1*, sembra che la sensibilità all'idrossiurea si manifesta all'aumentare della temperatura, di pari passo con difetti nella NHEJ. Nello stesso esperimento di ricircolarizzazione del vettore emerge che, nel doppio mutante *htl1/ku70*, l'inibizione della NHEJ non è rafforzata e ha un'efficienza di ricircolarizzazione confrontabile con quella del singolo mutante *ku70* (rispettivamente 2% e 1,4%) (Sezioni 8-9 dei Risultati) suggerendo che Htl1 e Ku70 si trovino sullo stesso percorso funzionale. Da notare però, che il singolo mutante *ku70*, benché difettivo nella NHEJ, è resistente all'idrossiurea, suggerendo che la sensibilità all'idrossiurea e il difetto nella NHEJ riguardano processi differenti. Ad esempio la sensibilità all'idrossiurea potrebbe essere dovuta ad un difetto nella replicazione.

L'abbattimento dell'efficienza di ricircolarizzazione nel ceppo *htl-1* sterile, in cui sono coeprressi MATa e MAT α (Sez.5 e 7 Risultati), che assume quasi il valore osservato per il ceppo selvatico diploide, risente dell'eterozigosità sessuale Mata/ α . L'espressione simultanea delle

informazioni Mata e $\text{Mata}\alpha$, infatti, porta a riduzione nel ricorso alla NHEJ se paragonato a quanto osservato per le cellule aploidi che esprimono solamente Mata o $\text{Mata}\alpha$ (Astrom et al. 1999; Clikeman et al. 2001). Vaillant et al.(2001) hanno identificato nel prodotto del gene LIF2 il regolatore positivo della NHEJ la cui attività trascrizionale è potentemente ridotta dall'eterodimero $\alpha 1/\alpha 2$ attivo nelle cellule diploidi e pseudodiploidi.

Lavori recenti attribuiscono al complesso RSC un ampio ruolo nella riparazione di DSB attraverso i percorsi della HR e della NHEJ (Chai et al., 2005) (Shim et al., 2005). Le singole subunità, oppure, le distinte isoforme del complesso RSC, potrebbero indirizzare ai due differenti percorsi di riparazione. Si ipotizza che il complesso Rsc sia coinvolto nelle fasi precoci del processo di riparazione dove la sua attività di riposizionamento dei nucleosomi potrebbe alterare la struttura cromatinica in modo da favorire l'accesso ai fattori della NHEJ e della HR. Il lavoro di Shim et al. (2005) descrive la rapida associazione di Rsc a livello di una interruzione nel DNA e le interazioni fisiche e funzionali, di subunità del complesso, con Ku80 e Mre11. Gli Autori pensano che l'attività di rimodellamento possa modificare la struttura cromatinica a livello dell'interruzione per permettere la giustapposizione delle estremità interrotte e favorirne la saldatura nel percorso della NHEJ. A questo ruolo diretto del complesso nel meccanismo di risaldatura potrebbe affiancarsi un ruolo indiretto di regolazione dell'espressione genica dei fattori

coinvolti nella riparazione. Chai et al. (2005), descrivono un ruolo del complesso Rsc, e specificamente delle subunità accessorie Rsc2 e Rsc3 nella ricombinazione omologa (HR). La riparazione di un'interruzione attraverso la HR è un processo caratterizzato da distinti passaggi. In un primo momento, si osserva il reclutamento degli enzimi coinvolti nella riparazione, l'invasione della sequenza stampo omologa e la reazione finale di ligasi. La presenza del complesso Rsc a livello di un'interruzione, prima degli enzimi coinvolti nella riparazione, suggerisce che il rimodellamento della cromatina facilita il reclutamento del macchinario di riparazione.

Il complesso Mre11/Rad50/Xrs2, le chinasi *ATM-related* Tel1p e *ATR-related* Mec1p sono reclutati con cinetica simile nelle fasi precoci del meccanismo della HR tanto da ipotizzare che possa essere un processamento della struttura cromatinica a richiamare il complesso Rsc (Chai et al., 2005; Lisby et al. 2004).

Secondo Shim et al. (2005) le subunità Rsc8 e Rsc30 del complesso Rsc, hanno un ruolo nel NHEJ. Nei miei esperimenti, il peptide Htl-1 sembra avere un ruolo generale nel NHEJ, come indicato dalla sua letalità del doppio mutante *rad52/htl1* sia dall'abbassamento nell'efficienza della NHEJ (Sezione 9 Risultati). Questo è coerente con l'osservata interazione di Htl1 e Rsc8.

Infine studi recenti coinvolgono il complesso Rsc nella coesione dei cromatidi fratelli (Baetz et al. 2004; Huang et al. 2004) che, è importante nella riparazione postreplicativa. Nel nostro laboratorio

sono stati realizzati esperimenti di competizione tra i meccanismi di HR e NHEJ, che valutano quantitativamente il percorso (HR o NHEJ) compromesso nei mutanti *htl-1* (Florio personal communication). I risultati hanno mostrato che mentre nel tipo selvatico (aploide) è preferita la NHEJ, nel mutante *htl-1* per una stessa lesione a doppia elica al DNA si ha ricorso preferenziale alla HR.

Difetti nella NHEJ (oppure nella replicazione), potrebbero spiegare la comparsa inattesa (il gene HO è inattivo) di diploidi MAT α /MAT α durante la crescita mitotica di mutanti *htl1* di tipo sessuale MAT α . Com'è noto, in lievito esistono due tipi sessuali: α ed α . In cellule aploidi HO quasi ad ogni divisione cellulare si genera un taglio sito specifico (che si allarga a buco) in corrispondenza di un gene sesso specifico (MAT) ad opera dell'endonucleasi HO.

Nella riparazione il buco fa da ricevente per sequenze donatrici che determinano il cambio del tipo sessuale. Forse nei mutanti *htl1* si osserva sporadica conversione del tipo sessuale per la formazione di tagli a doppia elica (forse per un difetto replicativo), che permangono più a lungo che nei ceppi selvatici a causa del NHEJ allargandosi a buchi (*gap*). Nel sito MAT sono riparati per ricombinazione omologa utilizzando sequenze donatrici del tipo sessuale opposto presenti nel sito HML.

UN COLLEGAMENTO TRA REPLICAZIONE E SILENZIAMENTO TRASCRIZIONALE.

Durante la crescita mitotica di mutanti *htl1*, oltre ai diploidi MATa/MAT α di cui ho parlato sopra, compaiono aploidi sterili in cui permane il tipo sessuale MATa. Ho dimostrato, per analisi *Northern blot*, che in questi ceppi *htl1(S)* la cassetta HML (Sezione 5 Risultati) è desilenziata e per complementazione (Sezione 7 Risultati) che i ceppi *htl1* portano una mutazione recessiva in SIR3. La mutazione in SIR3 porta ad un'aumento nella *fitness* mitotica della popolazione *htl-1* sterile, come emerge dall'esperimento di competizione con mutanti *htl-1* fertili (Sez.6 Risultati) ed inoltre, aumenta la resistenza alla idrossiurea (Sez.7 Risultati). Una plausibile spiegazione (la più semplice) per questa parziale soppressione di un fenotipo *htl1* si collega con una maggiore difficoltà nel replicare regioni eterocromatiche che possono rappresentare un ostacolo significativo per mutanti con difetti nella replicazione oppure nel *S-checkpoint*. La perdita del *silencing* potrebbe quindi risultare vantaggiosa come osservato in doppi mutanti *mrc1,rad53-21* (Hu et al., 2001).

Materiali e Metodi

Materiali e Metodi

Ceppi adoperati:

Ceppo	Genotipo	Origine
W303-1a	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52, can1-100, ssd1-d</i>	Thomas e Rothstein, 1989
W303-1b	the isogenic <i>MATα</i> counterpart of W303-1a.	Thomas e Rothstein, 1989
Δhtl-1	W303-1a <i>htl1::HIS3pRS303</i>	Lanzuolo et al., 2001
Δhtl-1 (S) sterile	W303-1a <i>htl1::HIS3pRS303</i> subclone di Δhtl-1	Lanzuolo et al., 2001
MCY3890(<i>rsc8T516</i>)	S288C <i>MATa his3Δ200 lys2-801, leu2-3,112 ura3-52</i>	Treich e Carlson, 1997
Δsir3	W303-1a <i>sir3::LEU2</i>	Pulitzer, 2006
Rad52	W303-1a <i>rad52::TRP1</i>	Lucchini
Ku70	W303-1a <i>ku70::KAN</i>	Lucchini

Vettori adoperati:

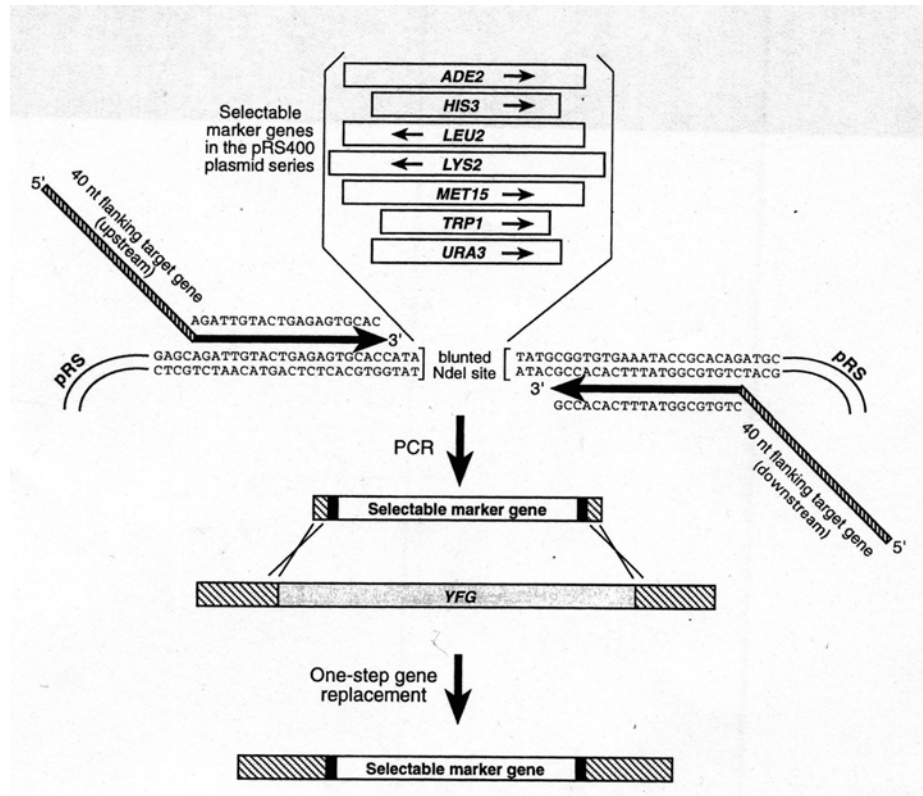
Nome	Origine	Inserito	Utilizzo
pBM272-HTL1	pBM272 (Johnston e Davis, 1984)	ORF di HTL-1 fiancheggiata da 700 paia di basi a valle dell'estremità 3' clonata sotto il promotore Gal1 (Lanzuolo et al., 2001)	Espressione in lievito
pBM272-RSC8	pBM272 (Johnston e Davis, 1984)	ORF di RSC8 clonata come frammento PCR digerito SacII/SalI	Espressione in lievito
pSEGAL-2	pBM272 (Johnston e Davis, 1984)	ORF di HTL-1 che presenta all'estremità N-aminica l'epitopo FLAG e l'epitopo myc all'estremità C-terminale. Clonato come frammento BamHI/SalI ottenutosull'amplificato PCR con gli oligo OSE5 and OSE7	Espressione in lievito
pSEGAL-3	pRS314 (Sikorski e Hieter, 1989)	Frammento EcoRI/SalI (contiene promotore Gal1) recuperato dal vettore PSEGAL-2 e inserito nel vettore pRS314	Espressione in lievito
pSEGAL-3P	pRS314 (Sikorski e Hieter, 1989)	ORF del gene HTL-1 mutata con tre residui di prolina	Espressione in lievito
pSEMET-2	pSEGAL-2	Sostituzione del promotore Gal1 (rimosso digerendo EcoRI/BamHI) col promotore Met3 (clonato come frammento EcoRI/BglII)	Espressione in lievito
pSE334	(Enomoto, 2000)	ORF di SIR3 fiancheggiata dalle sequenze native	Espressione in lievito

Costruzione del ceppo Δ ir3 con tecnica del “one step gene replacement”.

La distruzione genica PCR mediata è basata sul fatto che la ricombinazione omologa in lievito è molto efficiente con frammenti di DNA lineare, e che solo 40 bp di omologia sono richieste per una ricombinazione piuttosto efficiente. La disponibilità dell'intera sequenza genica di *S. cerevisiae* in combinazione con la distruzione genica PCR mediata ha reso possibile la creazione di mutazioni nulle per qualsiasi gene senza necessità di clonarlo. Inoltre, sono stati creati una serie di plasmidi e di ceppi per incrementare l'efficienza di questa tecnica. I plasmidi contengono comuni marcatori selezionabili di lievito clonati all'interno di siti conservati. Questo offre la possibilità di utilizzare un set di primer per PCR per distruggere un gene con un marcatore a scelta. I ceppi di lievito hanno i comuni marcatori per auxotrofie completamente deleti, in modo da eliminare gli indesiderati *background* dovuti a eventi di conversione genica che possono verificarsi tra il marcatore di selezione utilizzato e gli alleli mutati sul cromosoma.

Si procede in questo modo:

Si amplifica per PCR un marcatore di selezione utilizzando *primer* oligonucleotidici che presentano al 5' circa 40 nucleotidi complementari al gene di cui si desidera effettuare la distruzione. L'amplificato, utilizzato per la trasformazione, andrà incontro ad un evento di ricombinazione omologa col gene bersaglio portando al suo interno il marcatore di selezione amplificato. Il protocollo sperimentale prevede una amplificazione per PCR su DNA plasmidico, una purificazione col kit “Quantum prep[®] PCR Kleen Spin column” e seguente trasformazione ad alta efficienza con metodo del Litio Acetato descritto da Gietz e Wood.



da *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)
 Figura che illustra il principio della sostituzione genica del metodo descritto nel testo.

Il marcatore Leu è stato amplificato dal plasmide:
 pRS305 linearizzato con SmaI

Sequenza dei primer utilizzati:

U-primer universal 5'-TTA CAA TGA CCA CGG TTT GTA CAC
 CTG GGG CTG CAA TTT* TGC AAC TGT GCG GTA TTT
 CAC ACC-3'

L-primer universal 5'-GAA GGG TAG AGC AGA GAA GCA
 AAG AGT AGA TAG AAG GCC AGG* ATA GAT TGT ACT
 GAG AGT GCA C-3'

*: in grassetto è evidenziata la parte del primer complementare al gene SIR3; la porzione rimanente è complementare alla regione *polylinker* dei plasmidi di serie pRS ed amplificherà qualsiasi marcatore si trovi clonato all'interno.

Protocollo di trasformazione di *S. cerevisiae* ad alta efficienza
(Gietz R.D, Woods R.A. Methods in Enzymology 350: 87-96)

Questo protocollo può essere utilizzato per generare un numero sufficiente di trasformanti di *S. cerevisiae* in applicazioni che prevedono l'utilizzo di plasmidi integrativi, frammenti di DNA e oligonucleotidi. Può essere, inoltre, adoperato nelle applicazioni che prevedono l'utilizzo di librerie genomiche e nella metodica del doppio ibrido.

1° giorno

- Inoculare il ceppo di lievito in terreno liquido (2X YPD oppure SC) e incubare O/N in agitazione a 200 rpm alla temperatura di 30 °C.

2° giorno

- Determinare il titolo della coltura di lievito disponendo 10 microlitri di cellule in 1ml finale di acqua e leggere allo spettrofotometro (OD 600nm). Per diversi ceppi di lievito un titolo della coltura di 1×10^6 da un valore OD 600nm pari a 1.0.
- Trasferire $2,5 \times 10^8$ cellule in 50 ml di terreno fresco in modo da partire con un titolo di 5×10^6 cellule/ml.
- Incubare in agitazione a 30 °C.
- Quando la coltura cellulare raggiunge il titolo di 2×10^7 (dopo circa 4 ore), centrifugare le cellule a 3000g per 5 minuti, lavare il pellet cellulare in 25 ml di acqua sterile e risospendere le cellule in 1 ml di acqua.
- Centrifugare le cellule per 30' e rimuovere il sovrnatante.
- Aggiungere acqua al volume finale di 1 ml e mischiare energicamente per risospendere le cellule: valutare il titolo delle cellule lavate e aggiustare il volume finale in modo da avere la concentrazione di 2×10^9 cellule/ml.
- Prelevare 100 microlitri di cellule lavate (circa 1×10^8), centrifugare a 13200 rpm per 30' e rimuovere il sovrnatante.

- Preparare la miscela di trasformazione* e conservarla in ghiaccio.
- Aggiungere al pellet cellulare 360 microlitri della miscela di trasformazione e miscelare energicamente.
- Incubare i tubi a 42 °C per 40 minuti.
- Centrifugare a 13200 rpm e rimuovere la miscela di trasformazione.
- Risospendere, delicatamente, il pellet cellulare in 1 ml di acqua e piastrare su terreno selettivo appropriate diluizioni.
- Incubare le piastre a 30 °C per 4-5 giorni.

*: Miscela di trasformazione (per un solo campione):

240 µl PEG 3500 50% w/v

36 µl LiAC1.0M

50 µl DNA-carrier bollito

34 µl DNA plasmidico più acqua

360 µl totali

Colture cellulari.

Per la diversa natura degli esperimenti realizzati, ho adoperato diverse componenti e condizioni di crescita delle cellule:

- Per la valutazione dello stato trascrizionale di CHA1 ed HML, ho adoperato un terreno minimo bufferato con acido succinico ed NaOH (*SD buffered*). L'eventuale presenza di peptone, caratteristica di un terreno ricco, avrebbe portato alla derepressione di CHA1. Partendo da uno striscio su piastra, si allestisce una primaria e di quest'ultima si utilizza un'aliquota per l'inoculo finale (in genere si utilizza una quantità di primaria pari al 10% del volume dell'inoculo). L'inoculo viene posto in agitazione (a 26 °C o 37 °C a seconda delle esperienze) per un periodo di tempo sufficiente per il raggiungimento della concentrazione di 4×10^7 cellule/ml (in tutti gli esperimenti la crescita si è protratta per 16 h). I controlli positivi sull'induzione di

CHA1 sono stati realizzati aggiungendo al terreno di coltura l'amminoacido serina alla concentrazione di 0.1g/l.

- Il trattamento acuto con idrossiurea (200 mM) è stato utilizzato per valutare lo stato trascrizionale di RNR4, per gli esperimenti di vitalità a 37 °C e per l'analisi della corretta attivazione del *checkpoint* replicativo. Le colture cellulari sono state cresciute in terreno ricco YPDA a cui è stata aggiunta l'idrossiurea filtrata. Al raggiungimento del titolo di 3-4x10⁷ cellule/ml le cellule sono state lavate con acqua e processate per l'estrazione di RNA totale oppure piastrate su terreno ricco per il calcolo della frazione vitale.

- Nell'esperimento di competizione un miscuglio di cellule *htl-1* fertili e sterili (in rapporto 1:1, distinguibili per differenti marcatori di selezione) sono state inoculate in terreno ricco YPDA alla concentrazione di 10⁵ cellule/ml, cresciute in agitazione per circa 48 ore a 26 °C e diluite di un fattore di 10³ in terreno fresco. Le diluizioni sono state allestite ogni 48 ore per 15 volte. Periodicamente, le cellule sono state piastrate e le colonie ottenute incrociate, per *replica plating*, con un ceppo incrociatore. La formazione dei diploidi è stata monitorata su appropriato terreno selettivo.

- I terreni di crescita sono descritti da Burke et al., 2000. I saggi di sensibilità su terreno solido prevedono l'aggiunta dell'idrossiurea filtrata prima di versare il terreno con agar. Il saggio viene generalmente realizzato su terreno ricco YPDA ma nel caso di ceppi che presentano costrutti ectopici viene effettuato su terreno minimo SD in modo da mantenere la selezione per il marcatore del costrutto.

Composizione dei terreni

- *SD buffered:*
0.6% Yeast nitrogen base w/o a.acids
2.0% Destrosio

150mM NaOH
1.0% Acido Succinico

- *YPDA*:
1.0% *Yeast extract*
2.0% Peptone
2.0% Destrosio
2.0% Agar

Saggio di ricircularizzazione del vettore

(Boulton SJ. Nucleic Acids Res. 1996 December 1; 24(23): 4639–4648)

Il saggio è descritto in dettaglio nella Sezione 9 dei Risultati.

Minipreparazione di RNA totali da *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Crescere una coltura di *Saccharomyces cerevisiae* a 26 °C in YPD, fino alla fase stazionaria.
2. Prelevare una aliquota di cellule da aggiungere al terreno fresco dell'inoculo, in modo da ottenere all'indomani una concentrazione dell'ordine di $1-5 \times 10^7$ cell/ml.
3. Centrifugare la coltura 5' a 4000 rpm a 4 °C.
4. Risospendere il pellet cellulare in 1 ml di H₂O e trasferire in tubo eppendorf.
5. Centrifugare 2' a 4000 rpm, allontanare la fase acquosa e risospendere in 450 µl di una soluzione: 5 mM DTT, zimolasi (3 unità/ml di coltura), 1M sorbitolo.
6. Incubare 10' a temperatura ambiente, osservare in campo oscuro la comparsa della perdita in rifrangenza e, solo allora, proseguire.
7. Centrifugare 2' a 4200 rpm e risospendere in 470 µl di *buffer* di lisi.
8. Aggiungere immediatamente: 25 µl di SDS 20%, 5 µl di DEPC, 500 µl di RFC.

9. Estrarre 3 volte a 65 °C. Nella prima estrazione* aggiungere 500 µl di RFC, 400 µl nella seconda e 300 µl nella terza.
10. Aggiungere 300 µl di CHCl₃ – alcool isoamilico (24:1).
11. Mischiare 10'' e centrifugare 2' a 13200 rpm.
12. Prelevare la fase e mettere in eppendorf con dentro 30 µl di NaAc 3M. Precipitare con etanolo.
13. Risospendere in 50 µl di H₂O trattata con DEPC.

* nota estrazione:

Mettere i tubi aperti a 65 °C, dopo 2' chiuderli e tenerli ancora 1'. Mischiare i campioni per 15'' e riporli nel bagnetto per 3' (ripetere l'operazione tre volte). Congelare in ghiaccio secco ed alcool e centrifugare 5' a 13200 rpm. Trasferire la fase superiore in un eppendorf contenente 5 µl di MgCl₂(1M)

Soluzioni:

- *Buffer di lisi:*

0.1M NaAc, pH 5.2

0.005 M MgCl₂

- *RFC:*

50 ml fenolo distillato

50 ml cloroformio

2 ml alcool isoamilico

0.1g idrossichinolina

Equilibrato con NaAc 20 mM a pH 5.2

Corsa elettroforetica degli RNA e trasferimento su filtro con blotting tradizionale

- Il gel (agarosio 1.2%) ha un volume di 150 ml; si sciolgono quindi 1.8 gr di agarosio in 110 ml di H₂O sterile + 100 µl di dietilpirocarbonato (DEPC); si aggiungono 15 ml di MOPS 10X e, sotto cappa, 25 ml di formaldeide.
- Per la corsa elettroforetica si può utilizzare una quantità massima di RNA pari a 25 µg (in 12 µl) in una miscela di corsa costituita dal 50% di formammide, 6% formaldeide e MOPS 1X.
- I campioni vengono preventivamente denaturati a 55 °C per 15', segue l'aggiunta della miscela di caricamento e quindi la corsa.

- Il gel viene corso in buffer MOPS 1X con voltaggio costante di 0.5 V/cm^3 . Si segue la banda del blu di bromofenolo e la corsa viene interrotta quando quest'ultima raggiunge la distanza di 8 cm dai pozzetti.
- Al termine della corsa il gel viene immerso per 20' in SSC 20X sterile.
- Il gel viene alloggiato su un supporto di vetro disposto all'interno di una vaschetta contenente SSC 20X; la continuità tra la soluzione salina e il gel è realizzata tramite un ponte di carta Whatman 3MM.
- Sul gel viene adagiato un filtro di nylon asciutto, al di sopra del quale vengono posti 3 fogli di carta Whatmann 3 MM imbevuti di SSC 20X e altri 3 asciutti.
- Per evitare cortocircuitazioni, si dispone della pellicola sui contorni del gel.
- Si procede con ulteriori aggiunte di carta da filtro e alla applicazione di una leggera pressione esercitata per mezzo di pesi.
- Dopo 16 h di *blotting*, si segnano i pozzetti e si lava il filtro in SSC 3X.
- Si lascia asciugare all'aria il filtro, e si procede al fissaggio sotto vuoto alla temperatura di $80 \text{ }^\circ\text{C}$ per 2 ore.

Preparazione sonda e ibridazione del filtro

Protocollo dal kit Amersham *Ready to go labeling kit*®

La procedura descritta permette di marcare 25-50 ng di DNA a $>1 \times 10^9 \text{ dpm}/\mu\text{g}$. Il frammento lineare da marcare deve essere risospeso in TE1X, ad una concentrazione tale che 25-50 ng devono essere contenuti in un volume non superiore ai 45 μl .

- Denaturare il DNA riscaldandolo per 2-3 minuti a $95\text{-}100 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Riporre in ghiaccio per 2 minuti e centrifugare brevemente.
- Aggiungere al tubo di reazione:
-DNA denaturato (25-50 ng) $\leq 45\mu\text{l}$

-[α -³²P] dCTP (300 Ci/mol) 5 μ l

-Acqua distillata al volume finale di 50 μ l

- Incubare a 37 °C per un tempo variabile dai 5 ai 15 minuti.

Il frammento marcato viene direttamente utilizzato per l'ibridazione senza purificazione su colonna.

Protocollo di ibridazione con tampone fosfato.

- Sciacquare il filtro con acqua.
- Preriscaldare due aliquote (10 ml + 10 ml) di soluzione A a 55 °C.
- Preincubare il filtro per 10 min. con 10 ml di soluzione A preriscaldata a 55 °C.
- Denaturare la sonda marcata con NaOH 0.2N finale e aggiungerla a 10 ml di soluzione A preriscaldata.
- Sostituire la soluzione di preibridazione con quella contenente la sonda denaturata.
- Incubare a 55 °C O/N in agitazione.

Soluzione A:

0.5 M Na fosfato pH 7.2

5% SDS

10 mM EDTA pH 7.5

Oligo utilizzati per l'amplificazione di frammenti da marcare come sonde nucleotidiche, negli esperimenti di *Northern blot*:

CHA1:

U-primer 5'-GGT TCC TAC AGC GAC AAA GAA GAG AAT GGT AGA TA-3'

L-primer 5'-CCA TAC CTT TCC AAA CCT TGA ATA ATA CCA TTG TAT AA-3'

PDA1:

U-primer 5'-GCT TGC TGC TTC ATT CAA ACG CCA A-3'

L-primer 5'-CGT CTT CAA ACA AGA TGG ATA ATT T-3'

a1/ α 2:

U-primer 5'-GGA AGA TAA GCA AGA AAA AAT GAA TAA AAT A-3'

L-primer 5'-CCA GAG GCT CAC CGC TCA AGA GGT CCG CTA ATT-3'

RNR4:

U-primer 5'-GTC GGC ATC TAA GCA CTA CAA-3'

L-primer 5'-GGA ACC TAC CCC ATC GCC TGA-3'

Bibliografia

Bibliografia (premessi):

- Goodrich, Tweedie, 2002. Remembrance of things past: Chromatin Remodeling in Plant Development. Annual Review of Cell and Developmental Biology Vol. 18: 707-746
- Jenuwein, Allis, 2001. Translating the histone code. Science. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
- Pandey et al., 2002. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. Nucleic Acids Res. 2002 December 1; 30(23): 5036–5055.
- Lusser, 2002. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. Curr Opin Plant Biol. 2002 Oct;5(5):437-43.
- Tsukiyama 2005. Two Distinct Mechanisms of Chromatin Interaction by the Isw2 Chromatin Remodeling Complex In Vivo. Mol Cell Biol. 2005 November; 25(21): 9165–9174.
- Cairn 2005. Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site. Nat Struct Mol Biol. 2005 Sep;12(9):747-55
- Fry CJ, Peterson CL. Transcription: Unlocking the gates to gene expression. Science. 2002 Mar 8;295(5561):1847-8.
- Mohrmann L, Verrijzer CP.:Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. Biochim Biophys Acta. 2005 Jan 11;1681(2-3):59-73.

Bibliografia (introduzione prima parte):

- Francisco J. Asturias, Wen-Hsiang Chung, Roger D. Kornberg, and Yahli Lorch. Structural analysis of the RSC chromatin-remodeling complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 October 15; 99(21): 13477–13480.
- Moreira, J. M. & Holmberg, S. Transcriptional repression of the yeast *CHAI* gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *EMBO J.* **18**, 2836–2844 (1999).
- Angus-Hill, M. L. *et al.* A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol. Cell* **7**, 741–751 (2001).
- Reid, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O. & Struhl, K. Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol. Cell* **6**, 1297–1307 (2000).
- Damelin, M. *et al.* The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Mol. Cell* **9**, 563–573 (2002).
- Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A. & Struhl, K. Genomewide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* **16**, 806–819 (2002).
- Cao, B R Cairns, R D Kornberg, and B C Laurent. Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 1997 June; 17(6): 3323–3334.
- Huang J, Hsu JM, Laurent BC. The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol Cell.* 2004 Mar 12;13(5):739-50.
- Shim EY, Ma JL, Oum JH, Yanez Y, Lee SE. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2005 May;25(10):3934-44.
- Chai B, Huang J, Cairns BR, Laurent BC. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 2005 Jul 15;19(14):1656-61.
- B. Cairns, A. Schlichter, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. Kornberg, F. Winston. Two Functionally Distinct Forms of the RSC Nucleosome-Remodeling Complex, Containing Essential AT Hook, BAH, and Bromodomains. *Molecular Cell*, Volume 4, Issue 5, Pages 715-723.

Wilson B, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cairns BR. The RSC chromatin remodeling complex bears an essential fungal-specific protein module with broad functional roles. *Genetics*. 2006 Feb;172(2):795-809.

Lanzuolo C., Ederle S., Pollice A., Russo F., Storlazzi A., Pulitzer JF. The *HTLI* gene (YCR020W-b) of *Saccharomyces cerevisiae* is necessary for growth at 37°C, and for the conservation of chromosome stability and fertility. *Yeast* 2001 Vol.18, issue 14, pag.1317-1330.

Romeo, Melinda L. Angus-Hill, Andrew K. Sobering, Yoshiaki Kamada, Bradley R. Cairns,² and David E. Levin. *HTLI* Encodes a Novel Factor That Interacts with the RSC Chromatin Remodeling Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2002 December; 22(23): 8165–8174.

Bibliografia (introduzione seconda parte):

Aylon, Y., and Kupiec, M. 2004. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat. Res.* 566: 231–248.

Ataian Y and Jocelyn E. *Krebs Biochem. Cell Biol.* 84: 490–504 (2006)

Bird, A.W., Yu, D.Y., Pray-Grant, M.G., Qiu, Q., Harmon, K.E., Megee, P.C., et al. 2002. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-

Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell*, **20**: 801–809.

Conconi, A. 2005. The yeast rDNA locus: a model system to study DNA repair in chromatin. *DNA Repair (Amsterdam)*, **4**: 897–908.

Davis, A.P., and Symington, L.S. 2001. The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates singlestrand annealing. *Genetics*, **159**: 515–525.

Downs, J.A., and Cote, J. 2005. Dynamics of chromatin during the repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, **4**: 1373–1376.

Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature (London)*, **408**: 1001–1004.

Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., et al. 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell*, **16**: 979–990.

Dudas, A., and Chovanec, M. 2004. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat. Res.* **566**: 131–167.

Dudasova, Z., Dudas, A., and Chovanec, M. 2004. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 581–601.

Fernandez-Capetillo, O., and Nussenzweig, A. 2004. Linking histone deacetylation with the repair of DNA breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 1427–1428.

Green, C.M., and Almouzni, G. 2002. When repair meets chromatin: first in series of chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**: 28–33.

Haber, J.E. 2000. Partners and pathways, repairing a double-strand break. *Trends Genet.* **16**: 259–264.

Hefferin, M.L., and Tomkinson, A.E. 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amsterdam)*, **4**: 639–648.

Huang, J., Liang, B., Qiu, J., and Laurent, B.C. 2005. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair: remodeling, pairing and re-pairing. *Cell Cycle*, **4**:1713–1715.

Jaskelioff, M., Van Komen, S., Krebs, J.E., Sung, P., and Peterson, C.L. 2003. Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *J. Biol. Chem.* **278**: 9212–9218.

Jazayeri, A., McAinsh, A.D., and Jackson, S.P. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* Sin3p facilitates DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 1644–1649.

Johnson, C.N., Adkins, N.L., and Georgel, P. 2005. Chromatin remodelling complexes: ATP-dependent machines in action. *Biochem. Cell Biol.* **83**: 405–417.

Keogh, M.C., Kin, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., et al. 2006. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature (London)*, **439**: 497–501.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2- related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* **2**: E131.

Korber, P., and Horz, W. 2004. SWRred not shaken; mixing the histones. *Cell*, **117**: 5–7.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., et al. 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell*, **12**: 1565–1576.

Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J.L. 2005. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 18385–18390.

Linger, J., and Tyler, J.K. 2005. The yeast histone chaperone chromatin assembly factor 1 protects against double-strand DNA-damaging agents. *Genetics*, **171**: 1513–1522.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science (Washington, D.C.)*, **303**: 343–348.

Morrison, A.J., and Shen, X. 2005. DNA repair in the context of chromatin. *Cell Cycle*, **4**: 568–571.

Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. 2004. INO80 and gamma- H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodelling to DNA damage repair. *Cell*, **119**: 767–775.

Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**: 905–916.

Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., and Wu, C. 2003. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol. Cell*, **12**: 147–155.

Shim, E.Y., Ma, J.L., Oum, J.H., Yanez, Y., and Lee, S.E. 2005. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 3934–3944.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. 2004. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* **14**: 1703–1711.

Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J.E. 2000. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 5300–5309.

Sung, P., Prakash, L., Matson, S.W., and Prakash, S. 1987. RAD3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 8951–8955.

Sung, P., Trujillo, K.M., and Van Komen, S. 2000. Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **451**: 257–275.

Symington, L.S. 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 630–670.

Tamburini, B.A., and Tyler, J.K. 2005. Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 4903–4913.

Tsukiyama, T. 2002. The in vivo function of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 422–429.

Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Osley, M.A. 2005. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature (London)*, **438**: 379–383.

Uitley, R.T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., and Cote, J. 2005. Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 8179–8190.

van Attikum, H., and Gasser, S.M. 2005a. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*, **4**: 1011–1014.

van Attikum, H., and Gasser, S.M. 2005b. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 757–765.

van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. 2004. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, **119**: 777–788.

Wolner, B., and Peterson, C.L. 2005. ATP-dependent and ATP-independent roles for the Rad54 chromatin remodeling enzyme during recombinational repair of a DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* **280**: 10 855 – 10 860.

Wu, X., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. 1999. A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: the order of strand annealing and nucleolytic processing events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 1303–1308.

Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, **123**: 219–231. strand break repair. *Nature (London)*, **419**: 411–415.

Cairns, B.R. 2005. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 185–190.

Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R., and Laurent, B.C. 2005. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* **19**: 1656–1661.

Bibliografia (discussione):

Craig B. Bennett, L. Kevin Lewis, Gopalakrishnan Karthikeyan, Kirill S. Lobachev, Yong H. Jin, Joan F. Sterling, Joyce R. Snipe & Michael A. Resnick. Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nature Genetics* 29, 426 - 434 (2001).

Treich I., Carlson M. Interaction of a Swi3 Homolog with Sth1 Provides Evidence for a Swi/Snf-Related Complex with an Essential Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. and cellular Biology* Vol. 17, 4, 1768–1775 (1997).

Chai B, Huang J, Cairns BR, Laurent BC. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 2005 Jul 15;19(14):1656-61.

Boulton SJ, Jackson SP. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* 1996 December 1; 24(23): 4639–4648.

Åström S, Okamura S., Rine J. Yeast cell-type regulation of DNA repair. *Nature* 397, 310 (1999).

Cliekeman JA, Khalsa GJ, Barton SL, Nikoloff JA. Homologous recombinational repair of double-strand breaks in yeast is enhanced by MAT heterozygosity through yKU-dependent and -independent mechanisms. *Genetics.* 2001 February; 157(2): 579–589.

Frank-Vaillant M, Marcand S. NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway. *Genes Dev.* 2001 Nov 15;15(22):3005-12.

Shim EY, Ma JL, Oum JH, Yanez Y, Lee SE. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2005 May;25(10):3934-44.

Lisby M, Rothstein R. DNA repair: keeping it together. *Curr Biol.* 2004 Dec 14;14(23):R994-6. Review.

Baetz KK, Krogan NJ, Emili A, Greenblatt J, Hieter P. The ctf13-30/CTF13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex RSC, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion.

Mol Cell Biol. 2004 Feb;24(3):1232-44.

Strom L, Lindroos HB, Shirahige K, Sjogren C. Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. MolCell.2004Dec22;16(6):1003-15.

E. Ünal, A. Arbel-Eden, U. Sattler, R. Shroff, M. Lichten, J. Haber, D. Koshland. DNA Damage Response Pathway Uses Histone Modification to Assemble a Double-Strand Break-Specific Cohesin Domain. Molecular Cell (2004), Volume 16, Issue 6, Pages 991-1002

Hu F., Alcasabas A., Elledge SJ., 2001. Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. Genes Dev **15**: 1061-1066.

Krishnan V., Surana U., 2005 Taming the spindle for containing the chromosomes. Cell Cycle **4**: 376-379.

Lopes, Cotta-Ramusino, Pelliccioli, Liberi, Pievani et al., 2001. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. Nature **412**: 557-561.

Allegato

A study of biochemical and functional interactions of Htl1 p, a putative component of the *Saccharomyces cerevisiae*, Rsc chromatin remodeling complex.

KEYWORDS: silencing, hydroxyurea, *Rsc8*, *SIR3*,

Carolina Florio¹, Mario Moscariello¹, Sara Ederle, Rossella Fasano, Chiara Lanzaolo² and John F. Pulitzer*

Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Biologia, Via Cinthia - 80126 - Naples. *Italy*

² present address: Dulbecco Telethon Institute, Institute of Genetics and Biophysics "Adriano Buzzati-Traverso" CNR, Via Pietro Castellino 111, 80131 Napoli, *Italy*

¹ C.F. and M.M contributed equally to the work reported here.

*Address for correspondence:

John F. Pulitzer

Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Biologia, Via Cinthia - 80126 - Naples. *Italy*

e-mail pulitzer@unina.it

Phone 39-081679092, Fax 39-081679233

ABSTRACT

HTL1, a small gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a 78-aminoacid peptide that influences the performance of a wide range of cellular processes (Lanzuolo et al. Yeast; 2001; **18**: 1317). Genetic interactions and co-immunoprecipitation experiments indicate a role for *Htl1p* in functions controlled by *RSC*, a multiprotein, ATP-dependent, chromatin-remodeling complex (Lu et al. Mol Genet Genomics 2003; 269:321) (Romeo et al., Mol Cell Biol; 2002; **22**, 8165). *Htl1p* and *RSC* components, share the property of associating with TBP a component of general multiprotein transcription factor TFIID (Sanders et al. Mol Cell Biol. 2002 **22**: 4723). We confirm, by integrating genetic and biochemical experiments, that *Htl1p* binding to the *RSC* complex is direct and physiologically relevant and show that it is mediated by *Rsc8p*, a core component of the *RSC* complex. Deletion of *HTL1*, like depletion of *Rsc* core subunits (Moreira et al. Embo Journal 1999 **18**: 2836), leads to constitutive transcription of the *CHAI* locus. This transcriptional phenotype exhibits variable penetrance. Deletion of *HTL1* also leads to hydroxyurea hypersensitivity at 30°C, suggesting a defect in replication/repair. This defect leads, during cell growth, to selection of mutations at the *SIR3* locus that suppress hydroxyurea sensitivity.

1. Introduction

The *Saccharomyces cerevisiae* *HTL1* gene encodes a 78 amino acid peptide. Both protein and RNA are present at relatively low levels (Lanzuolo et al., 2001), (Romeo et al., 2002), (this paper). Essential only at temperatures above 35°C, *HTL1* plays an important role in controlling the stable function of a wide range of cellular processes. Incubating *htl1* mutants at temperatures ranging from 26°C to 37°C causes an assortment of phenotypic abnormalities, graded in severity from alteration of chromosome segregation and/or replication, and progressive loss of fertility at 26°C (Lanzuolo et al., 2001), to formamide, hydroxyurea hypersensitivity (see below), and impaired non homologous end joining (Moscariello et al in preparation) at 30°C, to cell death at 37°C. Some defective phenotypes exhibit incomplete penetrance (Lanzuolo et al., 2001). Although *Htl1p* is non-essential for growth at temperatures below 35°C, genetic and biochemical experiments (Romeo et al., 2002) (Lu et al., 2003b) indicate transient or substoichiometric interaction with *Rsc*, an essential, abundant SWI/SNF related, multiprotein chromatin remodeling complex, (Cairns et al., 1999). *Htl1p* is detected by mass spectrometry in affinity-purified complexes in combination with *Rsc* components and TBP (an essential subunit of all three eukaryotic RNA polymerases) (Graumann et al., 2004; Sanders et al., 2002). *Rsc*, a 1.1 MDa complex composed of up to 18 subunits, uses ATP catalysis to remodel chromatin by loosening the association of DNA to nucleosomes. Four proteins (*Sth1p*, *Rsc8p/Swh3p*, *Sfh1p* and *Rsc6p*) compose a structural core (Treich et al., 1998) common to all canonical *Rsc* subgroups. Other components *Rsc1p*, *Rsc2p*, *Rsc3p* and *Rsc30p* are present in distinct forms of the complex (Cairns et al., 1999).

Crystallographic analysis of *Rsc* reveals a cavity that may accommodate the nucleosome (Asturias et al., 2002). The various *Rsc* subunits besides providing collectively an appropriate surface for nucleosome interaction exhibit individually conserved domains for chromatin, protein-protein and DNA interactions. *Rsc* promotes transcriptional silencing (Moreira and Holmberg, 1999), segregation, by regulating the association of cohesin with chromosomes arms (Huang et al., 2004) and, as recently observed, DNA repair (Chai et al., 2005); (Shim et al., 2005); (van Attikum and Gasser, 2005).

In this paper we present new data that extend the range of *htl1* defective phenotypes to DNA replication/repair and transcriptional repression, covering the gamut of defective phenotypes associated with many of the *Rsc* subcomplexes. In addition, we reexamine and validate the physiological relevance of *Htl1p* binding to *Rsc in vitro*. Our data suggest that a conserved helical domain in *Htl1p* is important for function and for binding to *Rsc8p*, a component of the core of *Rsc* subcomplexes. In addition we uncover an unexpected interaction between *HTL1* and *SIR3*. Mutations in the *SIR3* locus enhance a transcriptional effect of *HTL1* inactivation and apparently suppress defects in replication/repair.

2. Materials and methods

2.1 Strains, plasmids, and growth conditions.

Saccharomyces strains used in this study are isogenic derivatives of *W303-1A* or *W303-1B* (Thomas and Rothstein, 1989) or of *KY117* (Struhl, 1982). *HTL1* mutants disrupted with *HIS3* (*YJP1*) or *URA3* (*YJP3*) have been described (Lanzuolo et al, 2001). *RSC8* mutant *swb3ts* was a gift from Marion Carlson. *RSC8* disruptants were constructed by one step gene replacement of the entire gene by *LEU2* (*YJP4*).

Yeast growth media and protocols are as described (Burke et al 2000). The

Escherichia coli strain was *DH5 α* .

For expression in yeast, DNA fragments were cloned in yeast expression vector *pBM272* (Johnston and Davis, 1984). When tryptophan was required as a selective marker, constructs in *pBM272* were recloned with the adjacent *GALI* promoter, as EcoRI- Sall fragments into EcoRI XhoI digested *pBR314* (*pSEGAL-3*). For expression in *E. coli*, fragments were cloned into *pASK-IBA3* or *pASK-IBA5* (IBA GmbH). In these plasmids transcription is induced from the tetA promoter/operator, by the addition of anhydrotetracycline [13].

2.2.Competition experiment.

A 1/1 mixture of *Ωhtl1*(F) and *Ωhtl1*(S) were inoculated into YPD medium at a concentration of approximately 10^5 cells/ml, grown by agitation for about 48 hours at 26°C and diluted by a factor of 10^3 into fresh media. Dilutions were repeated every 48 hours 15 times. Periodically cells were plated, patched and crossed to an appropriate tester strain by replica plating. Diploid formation was monitored on appropriate SD selective medium.

2.3 Molecular Biology and Genetic techniques.

Cloning and epitope tagging were performed by PCR based techniques. PCR products were cloned into expression vectors that drive transcription from the *GAL1* promoter (*pSEGAL-2*, *pSEGAL-3*, *pSEGAL-4*, *pSEGAL-5*) or the *MET3* promoter (*pSEMET-2*). For bacterial expression PCR products were cloned into vector *pASK IBA -3* or *-5*, following instructions accompanying the Strep-tag 2 reagent kit (IBA GmbH). The following PCR primer pairs were used.

For *RSC8-strep* in *pBM272 (pSEGAL-5)*:

5'GAAAGGCCTGGATCCGTATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTT3';

5'GAAAGGCCTGCCCCATTTTTCCAAGAACGCGTGAATC3'.

For *RSC8* in *pASK-IBA5 (pCF1)*:

5'GAAAGGCCTCCGCGGTGAGCGACACTGAAAAGGATA'3;

5'GAAAGGCCTCTCGAGATTACAATGACCACGGTTTGTACACCT

GGGGCTGCAATTT'3.

For *FLAG-HTL1-myc* in *pBM272 (pSEGAL-2)*:

5'GAAAGGCCTGGATCCTATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGTCACA
GAACAACACAATCAGCTC3';

5'GAAAGGCCTTTCGTCGACCTA(CAAGTCTTCTTCAGAAATAAG

TTTTTGTTTC)_{X3}CTTTTCCTTTTCATTTTCAAAGCATC3'.

For *HTL1- myc* in *pASK-IBA3 (pCF2)*:

5'GAAAGGCCTAGGTCTCAAATGTCACAGAACAACAATCAGCTCAAT3';

5'GAAAGGCCTTTCGTCGACCTA(CAAGTCTTCTTCAGAAATAAGTTTTGT
TC)_{X3}CTTTTCCTTTTCATTTTCAAAGCATC3'.

For *htl1-3P-myc (pCF3)*:

5'GAAAGGCCTGGATCCTATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGTCACA

GAACAACACAATCAGCTC3’;

5’GAAAGGCCTGCATATGTTTTCTCTTTGAGATGGTGGCTGAAATGCTGTTG
GATTTTTTCAGCGTTACATTGTTGTAAGCT3’

All constructs were tested by sequencing and (when applicable) by complementation.

2.4 Hydroxyurea sensitivity.

Cells were grown in YPD or SD liquid media and 10-fold serial dilutions of cells spotted on appropriate plates containing from 0 to 40mM hydroxyurea, and incubated for 3-4 days at 30°C

2.5 Rescue of fertility

*htl1*Δ (SG33) (*MATa*) was transformed with a multicopy *YEp24*-based genomic *S. cerevisiae* library. Fertility was tested by crossing to appropriate *MATα* strains

2.6 RNA analysis.

Total RNA was isolated from yeast cells grown in buffered supplemented minimal media (Moreira and Holmberg, 1998) extracted and resolved on agarose–formaldehyde gels as previously described (Lanzuolo et al, 2001). Probes for transcript detection were ³²P-labelled PCR fragments covering positions 1300 to 1554 for *CHAI* and -18 to 618 for *a1/α2* and 72 to 1237 for *PDAI* (Wenzel et al, 1995). *PDAI* hybridization was used for normalization.

2.7 Preparation of yeast whole-cell extract

For overexpression of tagged proteins in yeast, strains were grown at 26°C in selective minimal media containing galactose at 26°C to a concentration of 3-5x10⁷ cell/ml. Extracts were prepared according to the protocols in the Nurse Lab Fission Yeast Manual

(www.sanger.ac.uk/PostGenomics/S_pombe/docs/nurse_lab_manual.pdf), with

minor modifications. Cells were harvested, washed with water and resuspended to a density of 2.8×10^9 cell/ml in Breaking buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 12% glycerol, 200 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (SIGMA) (1/100 dilution) and PMSF 1 mM). Cells were pelleted by centrifugation at 13K rpm and resuspended in twice the cell volume of breaking buffer, placed in 14 ml polypropylene tubes, and disrupted with 1 ml of 0.5 mm acid washed glass beads (Sigma), by vortexing at high speed for three 1 min intervals interrupted by 4 min of cooling on ice. Extracts were clarified with a 10 min spin at 10K rpm in a microfuge at 4°C. Protein concentrations were determined with the Bio-Rad protein assay kit.

2.8 Preparation of E. coli extracts.

Escherichia coli DH5 α was used for bacterial expression of tagged fusion proteins cloned in vector *pASK IBA -3* or *-5*, following instructions accompanying the Strep-tag 2 reagent kit (IBA GmbH). Cells were grown in LB medium containing 50 μ g/ml ampicillin at 37°C to an OD₅₅₀ of 0.5. Induction with anhydrotetracycline and extract preparation was according to the instructions of the manufacturer (IBA GmbH).

To test for association of *Htl1p* with *Rsc8p* containing complexes in yeast extracts we used immunoprecipitation assays of co-expressed tagged proteins and *in vitro* pull-down assays of individually expressed proteins.

To test for association of bacterially expressed *Htl1p* with *Rsc8p* we used *in vitro* pull-down assays of individually expressed proteins.

2.8 Co-precipitation with Strep-tactin magnetic beads.

Strep-tactin is an engineered streptavidin (Voss and Skerra, 1997). 3 mg of protein extracts from yeast cells coexpressing *Flag-Htl1myc* and *Strep-Rscp8* or *Flag-Htl1myc* and *Rsc8* driven from *Gal* promoters (control extract), in IP buffer (50 mM

Tris-Cl [pH 7.5], 10% glycerol, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10mM DTT) was loaded onto 400µl of Strep-Tactin Magnetic Beads (IBA). Levels of input Flag-Htl1primyc and Strep-Rscp8 were determined by Western blotting of 50 µg aliquots of extracts. After overnight incubation at 4°C the beads were washed twice with IP buffer, twice with A buffer containing 250mM NaCl and 0.05% Tween-20. Beads were then incubated for 2 hours at 4°C in A buffer containing 10 mM Biotin. The eluate was precipitated with TCA-DOC (1/100 vol. of 2% DOC (Na deoxycholate), 1/10 vol of TCA), resuspended in 20 µl of SDS sample buffer, loaded on a 15% SDS-polyacrylamide gel and analyzed by western blotting with anti-Flag antibodies (Sigma) for immunoblot detection of Flag-Htl1p and Steptavidin alkaline phosphatase conjugate (IBA) for detection of *Strep-Rsc8p*.

We also performed reciprocal immunoprecipitations of co-expressed proteins using *FLAG* beads. Because of the lower background, Strep-magnetic beads were preferred for the experiments described.

2.10 Pull down assay.

Bait *Strep-Rsc8p* from crude yeast or bacterial extracts was pre-bound to Strep-Tactin Magnetic Beads (IBA) : 500 µg (bacterial) to 750 µg (yeast) extract/ 100µl Strep-Tactin magnetic beads (IBA).

Level of input bait *Strep-Rsc8p* in extract was determined by Western blotting of 50 µg (yeast) or 10 µg (bacterial) aliquots.

After washing, 400µl (yeast) or 100µl (bacteria) immobilized Rsc8p bait was incubated overnight at 4°C, on a roller drum, with 500 µg (bacterial) to 3000 µg (yeast) of extracts expressing Htl1p prey. Level of input prey in extract was determined by Western blotting of 10 µg (bacterial) or 50 µg (yeast) aliquots. Beads

were then washed and processed as described above. The source of yeast extracts was strain *YJP4*, expressing tagged *Strep-Rsc8p* (*pSEGAL-5*), and strain *YJP1* transformed with *pSEGAL-3* expressing either tagged wild-type *FLAG-Htl1p- myc* or *pSEGAL-4* expressing tagged mutant *FLAG-Htl1-3P-myc*.

The source of bacterial extracts was strain *DH5 α* transformed with *pCF1* expressing tagged *Strep-Rsc8p*, *pCF2* expressing tagged wild-type *Htl1p- myc*, *pCF3* expressing tagged mutant *Htl1p-3P- myc*.

3. RESULTS

3.1 Cell death at 37°C

Exponentially growing, but not stationary phase, *htl1* mutants die when transferred to 37°C. (Figure 1A). In contrast, a temperature sensitive allele of *RSC8* survives prolonged incubation at the non-permissive temperature (Figure 1B).

By microscopy, the terminal phenotype at 37°C of Δ *htl1* mutants appears to vary in different yeast strains. Romeo et al (2002) report a prevalently cell-cycle specific arrest in G2 which we fail to observe by microscopy in three different Δ *htl1* strains (Lanzuolo et al., 2001) (*W303* haploid, *W303* diploid and *KY117*). In figure 2A we show a representative micrograph of the terminal phenotype observed in Δ *htl1* *W303a*. The asynchronous arrest of Δ *htl1* is further confirmed by FACS analysis in strain *W303a* (Figure 2B).

3.2. *Htl1* mutants are Hydroxyurea sensitive.

The fact that actively dividing *htl1* cells die at 37°C, while non-dividing cells survive, suggest an irreparable malfunction at cell division or replication. To test for malfunction at replication we treated *htl1* cells with hydroxyurea.

Hydroxyurea, an inhibitor of ribonucleotide reductase, depletes the dNTP DNA

precursor pools resulting in the accumulation of short single stranded DNA intermediates and double-stranded DNA breaks. These DNA intermediates activate the DNA synthesis and G2/M checkpoints, delaying progression through S- and G2 phases enabling repair before entry into mitosis. Many yeast mutants defective in replication or repair fail to grow in the presence of relatively low concentrations of hydroxyurea 10-200 mM that only slow down growth of wild-type cells. Although *htll* mutants are insensitive to hydroxyurea at 26°C, they fail to grow at 30°C in the presence of concentrations of hydroxyurea greater than 20-40 mM (Figure 3A). Hydroxyurea hypersensitivity is complemented by expression of the wild-type *HTL1* allele but not by expression of an *htll* null allele (3P-*htll*, see below), demonstrating that hypersensitivity is specifically due to the lack of *Htl1* (Figure 3B).

Hypersensitivity to hydroxyurea may indicate that repair is compromised, yet could also be caused by inefficient checkpoint activation. Wild type cells and mutants involved in DNA replication and repair, recover after removal of inhibitory concentrations of hydroxyurea. However, mutants that impair checkpoint activation proceed inappropriately into mitosis and die. Although microscopy indicates that *htll* mutants are synchronized by treatment with 200 mM hydroxyurea at 30°C, the cells die after prolonged incubation at 30°C (0.05% survival after 24 hours, Table 3) suggesting that the checkpoint eventually fails. At 37°C the Δ *htll* terminal phenotype prevents HU synchronization and more than 90% of the cells die within 6 hours (Table 1).

Hydroxyurea sensitivity is a distinctive feature of *RSC1* disruptants (Cairns et al., 1999) encoding an auxiliary component of the *RSC* complex.

3.3. Formamide sensitivity

Deletion mutants of *HTL1* are formamide sensitive, a characteristic they share with

point mutations in *RSC8* (Treich et al., 1998) and null mutations of auxiliary gene *RSC2* (Cairns et al., 1999). Formamide sensitivity is complemented by expression of the wild-type *HTL1* allele but not by expression of an *htl1* null allele (*3P-htl1*, see below), demonstrating that hypersensitivity is specifically due to the lack of *Htl1p* (Figure 4)

3.4 Effects of *Htl1p* disruption and *Rsc8p* depletion on transcription of *CHAI*.

The reported *HTL1* genetic interactions with *RSC8* led us to posit that *Htl1p* is accessory to one or more cellular functions affected by *Rsc8p*. In search of a function that might involve the interplay of *Htl1p* and *Rsc8p*, we directed our attention to the transcriptional state of the *CHAI* locus on chromosome III.

CHAI transcription is induced about a hundred fold by serine or threonine. Activation requires the *Cha4p* activator, and induction results in the displacement of a nucleosome, that overlaps the TATA element under non-inducing conditions.

Cha4p, constitutively bound to the *CHAI* promoter, is prevented from functioning by histone H3 (Sabet et al., 2003). Basal transcription in wild type cells, in absence of inducers is somewhat idiosyncratic. In our hands, it is raised by incubation at 37°C and inhibited by growth in galactose at 26°C or methionine (data not shown)

Depletion of *Rsc8p* leads, perhaps indirectly (Ng et al., 2002), to *CHAI* derepression (Moreira and Holmberg, 1999).

If *Htl1p* is a coadjutant of *Rsc8* in *CHAI* repression, deletion of *HTL1* should directly or indirectly affect *CHAI* transcription. Our results are consistent with a role of *Htl1p* in *CHAI* repression. Deletion of *HTL1* leads to an increase in *CHAI* basal transcription (Figure 5). We show results obtained with two different subclones of $\Delta ht11$: fertile $\Delta ht11$ (F) and sterile $\Delta ht11$ (SG33). Sterile subclones emerge after

repeated cell divisions (Lanzuolo et al., 2001). While in fertile $\Delta htl1$ (F) subclones transcript levels of *CHAI* vary extensively between experiments, perhaps reflecting fluctuations in the fraction of cells transcribing *CHAI*, in $\Delta htl1$ (SG33) *CHAI* transcript levels are more consistent. Since incomplete penetrance leads to ambiguous results in complementation experiments we used a sterile strain, $\Delta htl1$ (SG33), to confirm *Htl1p* dependence of *CHAI* transcription. In contrast to the effect of *Rsc8p* depletion and to fertile HTL1 disruptants, in sterile $\Delta htl1$ (SG33) transcriptional derepression extends from *CHAI* to the adjacent *HML* silent mating type locus. Expression of plasmid borne wild type *Htl1p* in $\Delta htl1$ (SG33) abolishes *CHAI* serine independent derepression confirming that *Htl1p* does indeed play a role in *CHAI* repression (Figure 6A lane 4 and 6B, lane 4). However HML silencing is not recovered by expression of wild type *Htl1p* (Figure 6B) indicating that $\Delta htl1$ (SG33) has acquired an additional mutation (see below).

In sum, null mutations of the *HTL1* gene appear to reproduce the effects of mutations in genes encoding both auxiliary and core *Rsc* subunits. *HTL1* disruptants are sensitive to hydroxyurea and formamide. Hydroxyurea sensitivity is a distinctive feature of auxiliary gene *RSC1* disruptants (Cairns et al., 1999), while formamide sensitivity is characteristic of auxiliary gene *RSC2* disruptants and some core gene *RSC8* point mutants. Furthermore *htl1* deletion, like *Rsc8p* depletion, affects transcriptional silencing (Moreira and Holmberg, 1999). In addition, as we show elsewhere (Moscariello et al, in preparation) double strand break repair (DSB) is defective in $\Delta htl1$. Impairment of double strand break repair by NHEJ is a feature of *rsc8* and *rsc30* mutants (Shim et al., 2005).

The non-synchronous terminal phenotype of $\Delta htl1$ at 37°C (at least in our strains) appear to differ from that observed (G2/M arrest) in mutants of individual *Rsc* core

components. However, since deletion of *HTL1* simultaneously recapitulates the effect of mutations in multiple Rsc subunits, this difference is perhaps to be expected.

3.5. Point mutants that abolish *HTL1* function prevent *Htl1p*/Rsc physical interactions.

The range of phenotypic effects of *HTL1* mutants suggests that *Htl1p* associates, at least transiently, with diverse Rsc subcomplexes, presumably by interaction with a single Rsc core component. Genetic interactions and the results of a two-hybrid assay suggest that *Rsc8p* is the most likely interactor for *Htl1p*. We searched for structural features of the peptide that might be responsible for specific protein-protein interaction with Rsc. Mutational disruption of the structure should simultaneously abolish *Htl1p* binding to Rsc and impair function.

The choice of mutants was based on two observations:

- 1) Although *Htl1p* is not present in most eukaryotes, it is highly conserved among many distantly related budding yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. gossypii*, *S. kluyveri*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis*) (Figure 7).
- 2) Two putative helical tracts are apparent within the extended region of amino acid identities. Assuming that helicity was likely to be important for function, we compared the effects of amino acid replacements (leucine, tryptophan), expected to be chemically compatible, with proline replacements that were likely to disrupt helical structure in conserved region.

Leu30 in the conserved helical tract was replaced with either Trp or Pro (structural constraints usually exclude proline from alpha helical domains) and Ser31 was replaced with Leu. Function of the resulting *htl1* mutants driven from either *GAL* or *MET* promoters was tested by complementation of temperature sensitivity (Figure 8A). Replacement with Trp had no effect while replacement with Pro strongly

impaired complementation driven from the *MET* promoter. Disappointingly no impairment in complementation was observed when mutant proteins were expressed from the *GAL* promoter (Figure 8B) (galactose driven overproduction is required to visualize *Rsc/Htl1p* interaction). The single mutations do not affect protein stability and have little effect on *Rsc* binding under our experimental conditions. (Figure 8C). We further disrupted the helical tract by replacing three leucines (Leu24, Leu29, Leu30) (Figure 7) with prolines. The triple mutant (*htl1-3P*) is recessive and inactive in complementation of temperature sensitivity (Figure 9A) as well as hydroxyurea and formamide sensitivity, even when transcription is driven by the *GAL* promoter (Figures 3B, 4B).

Crude extracts of cells co-expressing 3P-FLAG/myc and FLAG/myc derivatives of *Htl1p* were incubated with *Rsc8*-Strep containing *RSC* complexes bound to magnetic Strep-tactin beads. The triple proline substitution does not affect protein level but completely abolishes binding of *Htl1p* to the *RSC* complex (Figure 9B). Pull-down experiments performed by incubating *Rsc8*-Strep beads with extracts of cells expressing *Htl1p*-Flag confirm this result (Figure 9C).

3.6. *In vitro* binding of bacterially produced *Htl1p* and *Rsc8p*

Previous evidence (Lu et al., 2003a; Romeo et al., 2002) and our own experiments suggest genetic interaction between *RSC8* and *HTL1*. We tested for direct binding to of *Htl1p* to *Rsc8p* using bacterially produced proteins in an *in vitro* binding assay. *Htl1p* wild type and mutant *Htl1p-3P* were expressed as fusion proteins to myc epitopes (*Htl1p-myc*) and *Rsc8p* as a fusion to the Strepavidin binding Strep-tag II epitope (*Strep-Rsc8p*).

Strep-Rsc8p protein was immobilized on magnetic Strep-tactin beads and incubated with an *E. coli* extracts expressing wild type and mutant *Htl1p-myc* proteins. Bound

proteins were eluted with biotin and analyzed by western blotting. Binding of *Htl1p-myc* to Strep-tactin beads depends on prebound *Strep-Rsc8* and is abolished in the *Htl1p-3P* mutant (Figure 10). The *in vitro* binding of bacterially synthesized *Rsc8p* and *Htl1p* retain binding properties observed in yeast extracts, strongly suggesting that *Rsc8p* is an important vehicle for the interaction of *Htl1p* with the *RSC* complex in yeast cells.

In summary, although a single Leu30-Pro replacement has little effect on binding to *Rsc* it significantly impairs *Htl1p* function. A more extensive disruption of the helix, by a triple proline replacement, completely abolishes both *Htl1p* function and binding to the *RSC* complex in yeast cells and to *Rsc8p in vitro*.

These results show that the putative helical domain in *Htl1p* has an important role both in *Htl1p* function and in *Htl1p* binding to *Rsc8p*.

3.7. *Rsc8* stability.

While this work was in progress *Rsc7*, a new component of the *RSC* complex was identified (Wilson et al., 2006). Disruption of *RSC7* leads to *Rsc8* instability and confers sensitivity to temperature and to agents that cause DNA damage, microtubule depolymerization, and cell wall integrity. *Rsc7p*, a 58 kDa non essential subunit of *Rsc* (WILSON *et al.* 2005), displays functional similarities to *Htl1p*. *Rsc7p* interacts in a two hybrid screen with *Rsc8p* (Uetz et al., 2000). Wilson et al (Wilson et al., 2006) have shown that *Rsc7p* is involved in both core and accessory *Rsc* functions. Akin to *Htl1p*, overexpression of *Rsc7p*, suppresses a temperature sensitive mutation of *Rsc8p*. The decrease in the protein level of *Rsc8p* in *RSC7* disruptants impairs the interaction of *Rsc8p* with *Rsc3*. This interaction is important in promoting the association of the *Rsc3p/Rsc30p* heterodimer with the *RSC* complex. Although *Htl1p*

co-precipitates with only a small fraction of *Rsc8p*, the phenotypic properties of *htl1* disruptants suggest that *Htl1p* affects many if not most *Rsc* dependent functions perhaps by transitory binding to *Rsc8p*, a core subunit of all described *Rsc* subcomplexes. With these considerations in mind we tested the effect of *HTL1* disruption on *Rsc8p* levels. As shown in Figure 11, *Rsc8p* levels are not affected.

3.8. A secondary mutation in sterile $\Delta ht11$ (SG33) clones is a partial suppressor of *ht11* and maps at the *SIR3* locus.

Sterility is a frequent occurrence during outgrowth of *MATa* haploid *ht11* disruptants.

Sterile $\Delta ht11$ subclones are either *Mata/Mat α* diploids or, like $\Delta ht11$ (SG33),

haploids (Lanzuolo et al., 2001). In reconstruction experiments, sterile $\Delta ht11$

subclones, including haploid $\Delta ht11$ (SG33) are at a distinct advantage over $\Delta ht11$ (F)

suggesting that $\Delta ht11$ (SG33) carries a suppressor of an *ht11* deficiency (Figure 12).

To identify the suppressor, we screened for recovery of fertility in $\Delta ht11$ (SG33)

clones transformed with a multicopy *YEP24* based genomic library. We isolated two

independent plasmid clones, suppressing the sterile phenotype, both of which carried

the *SIR3* gene. This gene encodes a protein involved in establishing and maintaining

transcriptional silencing by interaction with *Sir2p* and *Sir4p*, and histone H3 and H4

tails. To determine if a single copy of the *SIR3* gene alone would cure sterility we

transformed $\Delta ht11$ (SG33) with centromeric plasmid *pRSG.3* (Palladino et al., 1993)

which carries the *SIR3* gene flanked by its native promoter. Fertility was fully

recovered (data not shown). *Sir3p* is apparently detrimental in *ht11* mutants. In

conclusion, inactivation of *SIR3* leads to loss of silencing at *HML* (as previously

established) and apparently stabilizes transcriptional derepression of *CHAI* in $\Delta ht11$

(SG33). Previous work had shown that full *CHAI* transcriptional repression is

dependent on *SIR4* (Moreira and Holmberg, 1998), but not on *SIR3* (Wyrick et al.,

1999).

3.9. Null mutants in *SIR3* suppress hydroxyurea sensitivity of *htl1* mutants.

As shown above (Figure 3) $\Delta htl1$ mutants are very sensitive to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea (HU). Remarkably, $\Delta htl1$ (SG33) is resistant to HU. Resistance is due to the *sir3* mutation. HU resistance is lost and fertility is restored in *SIR3* transformants (Figure 13).

Conversely, curing of the plasmid results in loss of fertility and restoration of hydroxyurea resistance. Sir3 is probably limiting and a single extra copy of *SIR3* has been known to partially suppress mutant phenotypes associated with non-*sir3* mutation. To ensure that suppression of *htl1* hypersensitivity to hydroxyurea is actually due to a *sir3* deficiency we disrupted *SIR3* by insertion of a LEU2 fragment. The $\Delta htl1, \Delta sir3$ double mutant is more resistant to hydroxyurea than the individual single mutants (Figure 13B).

Hydroxyurea resistance might be due to loss of transcriptional silencing in *htl1, sir3* strains. Since $\Delta htl1, \Delta sir3$ mutants co-express *Mata/α*, they are subject to diploid-like regulation, which alters DNA repair pathways in yeast, inhibiting non homologous end joining (NHEJ) (Astrom et al., 1999; Lee et al., 1999). However as we have seen (Figure 3A), a diploid strain, homozygous for the $\Delta htl1$ mutation is even more hypersensitive to hydroxyurea, than the haploid $\Delta htl1$ (F) strain. Resistance of $\Delta htl1$ (SG33) to hydroxyurea does not depend on cell type.

In conclusion, a recessive mutation in the *SIR3* gene is responsible for recovery of hydroxyurea resistance in *htl1* sterile subclones, perhaps by attenuating a replication defect due to lack of *Htl1p*.

4. Discussion

Co-precipitation of *Htl1p* with *Rsc*, in yeast extracts, suggests that *Htl1p* is stably associated with only a specific subclass of the *Saccharomyces cerevisiae* chromatin remodeling complex (Romeo et al., 2002). Alternatively, *Htl1p* binding might be transitory and concern all or most Rsc subclasses. Low affinity binding in vitro to Rsc8p, a core component of all Rsc subcomplexes (Sections 3.5 and 3.6), is consistent with this idea. Also suggestive is the observation that deletion of *HTL1* leads to impairment of a wide range of functions, recapitulating phenotypic effects of mutational alteration or depletion of diverse *Rsc* subunits: *Rsc8p* (formamide sensitivity, non homologous end joining and impairment of transcriptional silencing), *Rsc1p* (hydroxyurea sensitivity, DNA repair), *Rsc2p* (formamide sensitivity) and *Rsc3p* (cell death at 37°C). *Rsc8p* is a core component presumably shared by all subcomplexes, *Rsc1p* is an auxiliary component, defines one subcomplex, while *Rsc2p* also an auxiliary component defines another (Cairns et al., 1999). *Rsc3p*, present in 80-90% of RSC complexes, co-precipitates with both *Rsc2* and *Rsc1* (Angus-Hill et al., 2001) (and presumably the *Rsc8p* core component). Genetic data support these interactions: $\Delta htl1$ displays synthetic lethality with conditional mutants of *RSC3* and *RSC8* while temperature sensitivity of $\Delta htl1$ is suppressed by *Rsc3p* overproduction. The simultaneous impairment of multiple functions, affected by the four components in different *Rsc* subcomplexes would be a plausible explanation for the non-synchronous terminal phenotype of $\Delta htl1$ at 37°C.

Disturbance of the putative conserved helical structure of *Htl1p* by proline substitution impairs function and, in the case of a triple proline substitution, abolishes both function and binding to *Rsc8p*. These observations, besides validating the biological relevance of the binding experiments, suggest that the helical structure of *Htl1p* is critical. A small α -helix may be well suited for interaction with a binding

pocket buried in the interaction surfaces involved in protein-protein and protein-DNA interactions. Perhaps the *Htl1p* peptide, by way of its specific binding to *Rsc8p*, regulates the interaction of the *Rsc* core with other *Rsc* components.

Alternatively *Htl1p* might affect binding to DNA. A special domain (SWIRM), found in *Rsc8* and its homologue *Swi3*, has been shown to exhibit a helix-turn-helix DNA-binding motif and that both SWIRM domains are essential for the proper assembly and in vivo functions of their respective complexes (Da et al., 2006). Recombinant peptides bearing *Swi3p* and *Rsc8p* SWIRM domains bind DNA, but the *Rsc8p* domain binds with ten-fold lower affinity. Perhaps *Htl1p* increases *Rsc8p* affinity for DNA by providing an additional stabilizing helix.

We have uncovered an unexpected connection between *HTL1* and *SIR3*.

Mutations that inactivate *SIR3* increase the fitness of Δ *htl1* and suppress hydroxyurea sensitivity of Δ *htl1* (Sections 3.8, 3.9). We can only speculate about the mechanism. *Sir3p* is a component of the silencing complex that includes *Sir2p*, *Sir4p*, *Rap1p*, *ABF1*, and the conserved N-termini of histones H3 and H4, all of which are required for heterochromatin formation and transcriptional inactivation at telomeres and the silent mating loci. Condensed heterochromatin is a barrier to replication and must be unraveled to allow penetration by the DNA replication machinery. *Rsc* may play a role in this unraveling. It has been shown that *in vitro* *Rsc* cooperates with histone chaperones *ASF1* and *Nap1* in disassembling nucleosomes (Lorch et al., 2006). In mammalian cells *ACF* (an ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) is required for DNA replication through heterochromatin (Collins et al., 2002). Also, as discussed above (Section 3.2), checkpoint control may be impaired in Δ *htl1*. Checkpoint mutants may have problems coping with heterochromatin replication barriers. In fact *rad53* mutants are partially suppressed by *sir* mutants (Hu et al.,

2001). Also chromatin alteration in *htl1* mutants might lead to improper *Sir3p* spreading, hindering recovery from DNA damage induced by hydroxyurea.

Since both *HTL1* (Section 3.4) and *SIR3* inactivation lead to transcriptional alteration, hydroxyurea sensitivity might be the indirect result of these changes. *SIR3* inactivation leads to simultaneous expression of *MATa/MAT α* , that in turn affects the expression of genes involved in DNA repair (Valencia et al., 2001). However, coexpression of *MATa/MAT α* is not responsible for hydroxyurea resistance of Δ *htl1,sir3* (Section 3.9). Impairment of the expression of genes involved in ribonucleotide reductase (RNR) activity would also be a plausible cause for hydroxyurea sensitivity. However we find no alteration of *RNR4* regulation in Δ *htl1* or Δ *htl1,sir3* (data not shown).

Acknowledgments

We thank M. Carlson, D. Shore, J.Berman, S.Gasser and N. Piatti for plasmids and strains. We acknowledge support from CNR Programma Biomolecole per la Salute Umana and COFIN-2001 (MURST). CL, C.F. and M.M. were supported by pre-doctoral fellowships from the University of Naples cofinanced by the Fondo Sociale Europeo.

References

Angus-Hill, M.L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Cairns, B.R. (2001) A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles

- for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell*, **7**, 741-751.
- Astrom, S.U., Okamura, S.M. and Rine, J. (1999) Yeast cell-type regulation of DNA repair. *Nature*, **397**, 310.
- Asturias, F.J., Chung, W.-H., Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (2002) Structural analysis of the RSC chromatin-remodeling complex. *PNAS*, **99**, 13477-13480.
- Cairns, B.R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R.D. and Winston, F. (1999) Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol Cell*, **4**, 715-723.
- Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R. and Laurent, B.C. (2005) Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev*, **19**, 1656-1661.
- Collins, N., Poot, R.A., Kukimoto, I., Garcia-Jimenez, C., Dellaire, G. and Varga-Weisz, P.D. (2002) An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet*, **32**, 627-632.
- Da, G., Lenkart, J., Zhao, K., Shiekhattar, R., Cairns, B.R. and Marmorstein, R. (2006) Structure and function of the SWIRM domain, a conserved protein module found in chromatin regulatory complexes. *PNAS*, **103**, 2057-2062.
- Hu, F., Alcasabas, A.A. and Elledge, S.J. (2001) Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes Dev*, **15**, 1061-1066.
- Huang, J., Hsu, J.M. and Laurent, B.C. (2004) The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol Cell*, **13**, 739-750.

- Lanzuolo, C., Ederle, S., Pollice, A., Russo, F., Storlazzi, A. and Pulitzer, J.F. (2001) The HTL1 gene (YCR020W-b) of *Saccharomyces cerevisiae* is necessary for growth at 37 degrees C, and for the conservation of chromosome stability and fertility. *Yeast*, **18**, 1317-1330.
- Lee, S.E., Paques, F., Sylvan, J. and Haber, J.E. (1999) Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Curr Biol*, **9**, 767-770.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B. and Kornberg, R.D. (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly *in vitro*. *PNAS*, **103**, 3090-3093.
- Lu, Y.M., Lin, Y.R., Tsai, A., Hsao, Y.S., Li, C.C. and Cheng, M.Y. (2003) Dissecting the pet18 mutation in *Saccharomyces cerevisiae*: HTL1 encodes a 7-kDa polypeptide that interacts with components of the RSC complex. *Mol Genet Genomics*, **269**, 321-330.
- Moreira, J.M. and Holmberg, S. (1998) Nucleosome structure of the yeast CHA1 promoter: analysis of activation-dependent chromatin remodeling of an RNA-polymerase-II-transcribed gene in TBP and RNA pol II mutants defective *in vivo* in response to acidic activators. *Embo Journal*, **17**, 6028-6038.
- Moreira, J.M. and Holmberg, S. (1999) Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *Embo Journal*, **18**, 2836-2844.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2002) Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. PG - 806-19. *Genes Dev*, **16**.
- Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L. and Gasser, S.M. (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast

telomeres. *Cell*, **75**, 543-555.

- Romeo, M.J., Angus-Hill, M.L., Sobering, A.K., Kamada, Y., Cairns, B.R. and Levin, D.E. (2002) HTL1 encodes a novel factor that interacts with the RSC chromatin remodeling complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **22**, 8165-8174.
- Sabet, N., Tong, F., Madigan, J.P., Volo, S., Smith, M.M. and Morse, R.H. (2003) Global and specific transcriptional repression by the histone H3 amino terminus in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4084-4089.
- Shim, E.Y., Ma, J.L., Oum, J.H., Yanez, Y. and Lee, S.E. (2005) The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, **25**, 3934-3944.
- Treich, I., Ho, L. and Carlson, M. (1998) Direct interaction between Rsc6 and Rsc8/Swh3, two proteins that are conserved in SWI/SNF-related complexes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3739-3745.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Nature*, **403**, 623-627.
- Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M.B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S.E., Schar, P. and Haber, J.E. (2001) NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **414**, 666-669.
- van Attikum, H. and Gasser, S.M. (2005) ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*, **4**, 1011-1014.

- Voss, S. and Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, **10**, 975-982.
- Wenzel, T. J., A. W. Teunissen and H. Y. De Steensma, (1995) PDA1 mRNA: a standard for quantitation of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* superior to ACT1 mRNA. *Nucleic Acids Res* **23**: 883-884.
- Wilson, B., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Cairns, B.R. (2006) The RSC Chromatin Remodeling Complex Bears an Essential Fungal-Specific Protein Module With Broad Functional Roles. *Genetics*, **172**, 795-809.
- Wyrick, J.J., Holstege, F.C., Jennings, E.G., Causton, H.C., Shore, D., Grunstein, M., Lander, E.S. and Young, R.A. (1999) Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature*, **402**, 418-421.

Figure Legends

Figure 1. Survival at 37°C.

A) Differential survival of early and late log cultures of *YJPI* (Δ *htl1*) shifted to 37°C.

Yeast cultures were grown, in YPDA at 26°C, to a concentration of either $1.1 \cdot 10^7$ cells/ml (early log:EL) or 6.10^7 cells/ml (late log:LL) and shifted to 37°C. At the times indicated cells were counted and survival was determined by counting colony forming units (CFU) after plating appropriate dilutions.

EL: cells ▲, CFU ▲; LL: cells ○, CFU ●

B) Comparing survival, at 37°C, of early log cultures ($2 \cdot 10^7$ /ml) of *YJPI* (Δ *htl1*) and *MCY3890 swh3-ts16 (rsc8)*. Yeast cultures were grown, in YPDA at 26°C, and processed as in Figure 1A.

YJPI (Δ *htl1*) : cells ■, CFU ●; *MCY3890 swh3-ts16 (rsc8)* :cells □, CFU ○.

Figure 2. The terminal phenotype of *Htl1* deletion mutants shifted to 37°C is heterogeneous.

A) Inverted image obtained by fluorescence microscopy (DAPI staining) of log-phase cultures of *YJPI* (Δ *htl1*) arrested for 6 hrs at 37°C.

B) Flow cytometry of log-phase culture of *YJPI* (Δ *htl1*) incubated at 26°C or shifted to 37°C for 18 hrs.

Figure 3. Hydroxyurea (HU) sensitivity.

Aliquots (5 μ l) of serial 10-fold dilutions of wild type (*W303a*) and mutant *htl1* (*YJPI*) cultures were spotted onto YEPD plates, with or without 20-40mM hydroxyurea, and were grown for 48 hrs at 26°C or 30°C as indicated.

A) Deletion of *HTL1* leads to HU sensitivity at 30°C in haploid and diploid strains.

B) Plasmid bearing functional *HTL1* alleles complement HU sensitivity

YJPI (Δ *htl1*) was transformed with *pSEGAL-3* (P_{GAL} FLAG/myc tagged HTL1) (a functional allele) or *pSEGAL-4* (P_{GAL} FLAG/myc tagged htl13P) (a non functional allele) (See below) and grown for 72 hrs at 30° on YEPD or YEPG plates.

Figure 4. **Formamide sensitivity.**

Plasmids bearing functional HTL1 alleles complement formamide sensitivity.

YJPI (Δ *htl1*) was transformed with *pSEGAL-3* (P_{GAL} FLAG/myc tagged *HTL1*) (a functional allele) or *pSEGAL-4* (P_{GAL} FLAG/myc tagged htl13P) (a non functional allele) (See below) and grown for 72 hrs at 30° on YEPD or YEPG plates containing 2% Formamide.

Figure 5. **Transcriptional derepression of *CHAI* and *HML* in fertile and sterile subclones of *YJPI* (Δ *htl1*).**

A) In sterility prone disruptants 50% of the cells were sterile after 160 divisions.

Sterile (*htl1S1*, *htl1S2*, *htl1S3*) subclones of *htl1* and fertile clones (*htl1F1*, *htl1F2*, *htl1F3*) were analyzed in three different experiments. Northern analysis was performed on total RNA as described (Materials and Methods). *PDAI* hybridization was used for loading normalization. *CHAI* RNA induced by growth of wild-type cells in the presence of serine (1g/liter) is shown for comparison.

B) *CHAI* in *YJP4* (Δ *rsc8*), harboring plasmid *pSEGAL-5* expressing GAL1 driven - *Rsc8p* was shifted to Glucose containing media leading to the arrest of *RSC8* transcription. Cell division continues for 6-8 generations, leading to progressive depletion of *Rsc8p*. Time in hours after shift to glucose is indicated. *CHAI* RNA induced by growth of wild-type cells in the presence of serine (1g/liter) is shown for comparison.

Figure 6. ***CHAI* repression depends on *Htl1p*.**

Sterile subclones clones (*htl1S1* and *htl1S3*) were transformed with plasmid *pSEMET2* (*P_{MET}-HTL1*) and grown for a few generations under inducing conditions. Northern analysis was performed on total RNA as described (Materials and Methods). *PDA1* hybridization was used for loading normalization. *CHAI* RNA induced by growth of wild-type cells in the presence of serine (1g/liter) is shown for comparison.

Figure 7. *Htl1p* is conserved in budding yeasts.

Alignment of aminoacid sequences obtained by conceptual translation of nucleotide sequences of various budding yeast strains. The three conserved leucines mutated to proline in the 3P mutant studied are shown.

Figure 8. Effect of single aminoacid replacements on complementation of temperature sensitivity and on binding to *Rscp*.

HTL1 disruptants were transformed with plasmid borne *wild-type* or mutant alleles of *HTL1*. Individual single mutants and the wild type control were transcribed from the *MET3* promoter (A) or *GAL1* promoter (B). Serial dilutions (10-fold) were spotted on complete SD medium with or without methionine at the temperatures indicated (A) or on Galactose plates at 37°C (B). (C) Co-immunoprecipitation of *Rsc8p* and *Htl1p* with Streptactin magnetic beads. Crude extracts (3mg), derived from *htl1Δ*, $\Delta rsc8$ strains, harboring plasmids coexpressing; GAL1 driven *Strep-Rsc8* and *Flag-Htl1p-myc* wild-type (WT) or mutant (Leu³⁰-Pro) protein, were bound to of Strep-Tactin Magnetic Beads (IBA). Levels of input protein were determined by Western blotting of 50 µg aliquots of extracts.

Figure 9. Effect of the *htl1-3P* mutations on complementation and binding of *Htl1p* to the RSC complex.

A. *YPJ1* ($\Delta htl1$) was transformed with *pSEGAL-3* (*P_{GAL}* FLAG/myc tagged

HTL1) or pSEGAL-4 (P_{GAL} FLAG/myc tagged *htl1 3P*) and grown for 72 hrs at 26°C or 37°C on YEPD or YEPG plates.

B. Co-immunoprecipitation of *Rsc8p* and *Htl1p* WT or *Htl1p-3P* with Streptactin magnetic beads. Protein extracts (3mg), derived from *htl1Δ*, *rsc8Δ* strains, harboring plasmids coexpressing *Strep-Rsc8p* and *Flag-Htl1p-myc* wild-type protein (WT) or mutant 3P protein (3P), were bound to Strep-Tactin Magnetic Beads (IBA). Levels of input *Flag-Htl1pmyc* and *Strep-Rsc8p* were determined by Western blotting of 50 μg aliquots of extracts. Non tagged *Rsc8p* (NS) and *Htl1p* (NF) were included as controls.

C Pulldown of *Rsc8p* and *Htl1p* WT or *Htl1p-3P* expressed in yeast Protein extracts (3 mg), derived from *htl1Δ*, *rsc8Δ* strains, harboring plasmids expressing Strep-Rsc8 or Rsc8, were bound to of Strep-Tactin Magnetic Beads (IBA). Yeast extract (3 mg) expressing *FlagHtl1p-myc* was added to the beads and allowed to bind at 4°C over-night. Bound proteins were detected on 15% SDS-polyacrylamide gels by western analysis with a Steptavidin alkaline phosphatase conjugate (*Rsc8p-Strep*) (IBA) or anti-Flag antibodies (Sigma) (*FlagHtl1p-Trimyc*).

Figure 10. **Pulldown of *Rsc8p* and *Htl1p* WT or *Htl1p-3P* expressed in *E. coli*.**

Proteins were expressed and prepared in *E. coli* *DH5α* as described in Materials and Methods. Bacterial extracts (500 μg) expressing *Strep-Rsc8p* or the empty vector were bound to Strep-Tactin magnetic beads (IBA). Protein extracts (500 μg) expressing (wild-type or -3P) *Htl1p-myc* were added to the beads and allowed to bind at 4°C overnight. Bound proteins were detected by western analysis

with a Steptavidin alkaline phosphatase conjugate (*Strep-Rsc8p*) (IBA) and an alkaline phosphatase conjugated anti-Myc antibody (Invitrogen). Levels of input *Htl1pmyc* (wild type and -3P) and *Strep-Rsc8p* were determined by Western blotting of 10 µg aliquots of extracts. CP is a control protein included in the *Stre-p* detection kit.

Figure 11. ***Rsc8p* is stable in absence of *Htl1p***

10 µg of protein extracts *HTL1* wild type or *htl1Δ* strains, harboring a plasmid encoding *Strep-Rsc8p*, were resolved on an SDS- polyacrylamide gel. Levels of *Strep-Rsc8p* in, were detected by Western analysis with a Steptavidin alkaline phosphatase conjugate. Equivalent transfer of protein was checked by staining the membrane with Ponceau S.

Figure 12. **Competition of *htl1Δ(SG33)* and *htl1Δ(F)***

A) *htl1Δ (SG33)* strains out-compete *htl1Δ (F)* after many generations of mitotic growth (section 2.2). The experiment was repeated twice with different isolates :
▲ (*htl1::HIS3*), ■ (*htl1::URA3*)

Figure 13. **Hydroxyurea (HU) sensitivity and its suppression by mutations in *SIR3*.**

Aliquots (5 µl) of serial 10-fold dilutions of wildtype (*W303a*) and mutant *htl1 (YJPI)* cultures were spotted onto SD or YEPD plates, with or without 40mM hydroxyurea, and were grown for 48 hrs at 30°C.

A) *Δhtl1 (SG33)* strains were transformed with centromeric plasmid *pRSE334*, bearing a functional copy of the *SIR3* locus. Serial dilutions were spotted on SD plates, with or without 40mM hydroxyurea as indicated.

B) Disruption of *SIR3* in an *Δhtl1 (F)* background suppresses hydroxyurea sensitivity.

Ten-fold serial dilutions were spotted on YEPD plates, with or without 40mM hydroxyurea as indicated. $\Delta htl1$ (SG33) is included as a control.

Table 1. YEAST STRAINS

Strain	Genotype	Source
KY117	<i>MATa his3-del200, ade2-101, trp1-del1 ura3-52 lys2-801</i>	Struhl (1982)
YCL1	<i>MATa his3-del200, ade2-101, trp1-del1 ura3-52, lys2-801 htl1::URA3pRS306</i>	Lanzuolo et al 2001
W303-1a	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52, can1-100, ssd1-d</i>	Thomas and Rothstein, 1989
W303-1b:	the isogenic <i>MATα</i> counterpart of W303-1a.	Thomas and Rothstein, 1989
YJP1	W303-1a <i>htl1::HIS3pRS303</i>	Lanzuolo et al 2001
YJP3	W303-1b <i>htl1::URA33pRS306</i>	This study
YJP4	W303-1a <i>rsc8::LEU2</i>	This study
YJP5	W303-1a <i>htl1::HIS3pRS303, Rsc8::LEU2[pSEGAL-5(RSC8)]</i>	
D 273 -2A	(<i>MATα, ade1, his1</i>)	Cold Spring Harbor
YJP2	(<i>MATα, lys2-801</i>)	Lanzuolo et al 2001
W301-1a /b	<i>MATa/α ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 can1-100, ssd1-d)</i>	Lanzuolo et al 2001
YJP5	W303-1a /b <i>htl1::HIS3pRS303/ W303-1b htl1::URA33pRS306</i>	By separate gene disruption of <i>HTL1</i> alleles in <i>W301-1a /b</i>

TABLE 2
PLASMIDS

Name	Backbone	Features	Use
pBM272		<i>URA3 GAL1/GAL10</i> promoter {Johnston, 1984 #301}	Yeast Expression
pRS314		<i>TRP1</i> {Sikorski, 1989 #149}	Cloning
pRLGAL-1	pBM272	<i>P_{GAL} HTL1</i> ORF flanked by 700 bp downstream sequence (PCR fragment) served by GAL promoter. (Lanzuolo et al 2001)	Yeast Expression
pSEGAL-2	pBM272	<i>P_{GAL} HTL1</i> ORF fused to 5' FLAG and 3' myc epitope by PCR (oligos OSE5 and OSE7). BamHI-SalI fragment	Yeast Expression
pSEGAL-3	pRS314	EcoRI-SalI fragment (including <i>P_{GAL}</i> promoter and downstream sequence) from pSEGAL-2 into pRS314	Yeast Expression
pSEGAL-4	pRS314	<i>P_{GAL} htI13P HTL1</i> ORF, with three Proline replacements, fused to 5' FLAG and 3' Myc tags.	Yeast Expression
pSEGAL-5	pBM272	<i>P_{GAL} RSC8</i> ORF fused with 3' Strep tag	Yeast Expression
pSEMET-2	pSEGAL-2	Eco-BglII fragment containing <i>P_{MET}</i> promoter replaces EcoRI-BamHIGAL promoter	Yeast Expression
pASK-IBA3		TET _{p_o} + 3' Strep tag (IBA GmbH)	E. coli expression
pASK-IBA5		TET _{p_o} + 5' Strep tag (IBA GmbH)	E. coli expression
pCF1	pASK-IBA5	RSC8 ORF as a SacII SalI by PCR (oligos OSE1, OSE2) fused to 5' Strep tag	E. coli expression
pCF2	pASK-IBA3	TET _{p_o} <i>HTL1</i> ORF fused to 3' Myc tags by PCR (oligos OSE5 and OSE6)	E. coli expression
pCF3	pASK-IBA5	TET _{p_o} <i>htI13P HTL1</i> ORF fused to 3' Myc tag	E. coli expression
pRSE334		SIR3 ORF flanked by native sequences {Enomoto, 2000 #677}	Gap repair

Florio et al

TABLE 3

Hydroxyurea synchronization

% budded cells at 30°C (200 mM HU)

Strain	<i>Wild-type</i>			$\Delta htl1$			
	Hours at 30°	0	3	6	0	3	6
-HU				9	25	31	34
+HU 200mM				96			89

% Survival at 30°C (200 mM HU)

Strain	<i>Wild-type</i>				$\Delta htl1$			
	Hours at 30°	3	6	9	24	3	6	9
-HU	100	100	100	100	84	71	65	63
+HU 200mM	81	63	58	43	46	30	7.7	0.05

% budded cells at 37°C (200 mM HU)

Strain	<i>Wild-type</i>			$\Delta htl1$			
	Hours at 37°	0	2.5	6	0	2.5	6
-HU			31	31		20	36
+HU 200mM	30	80	76	15	40	46	

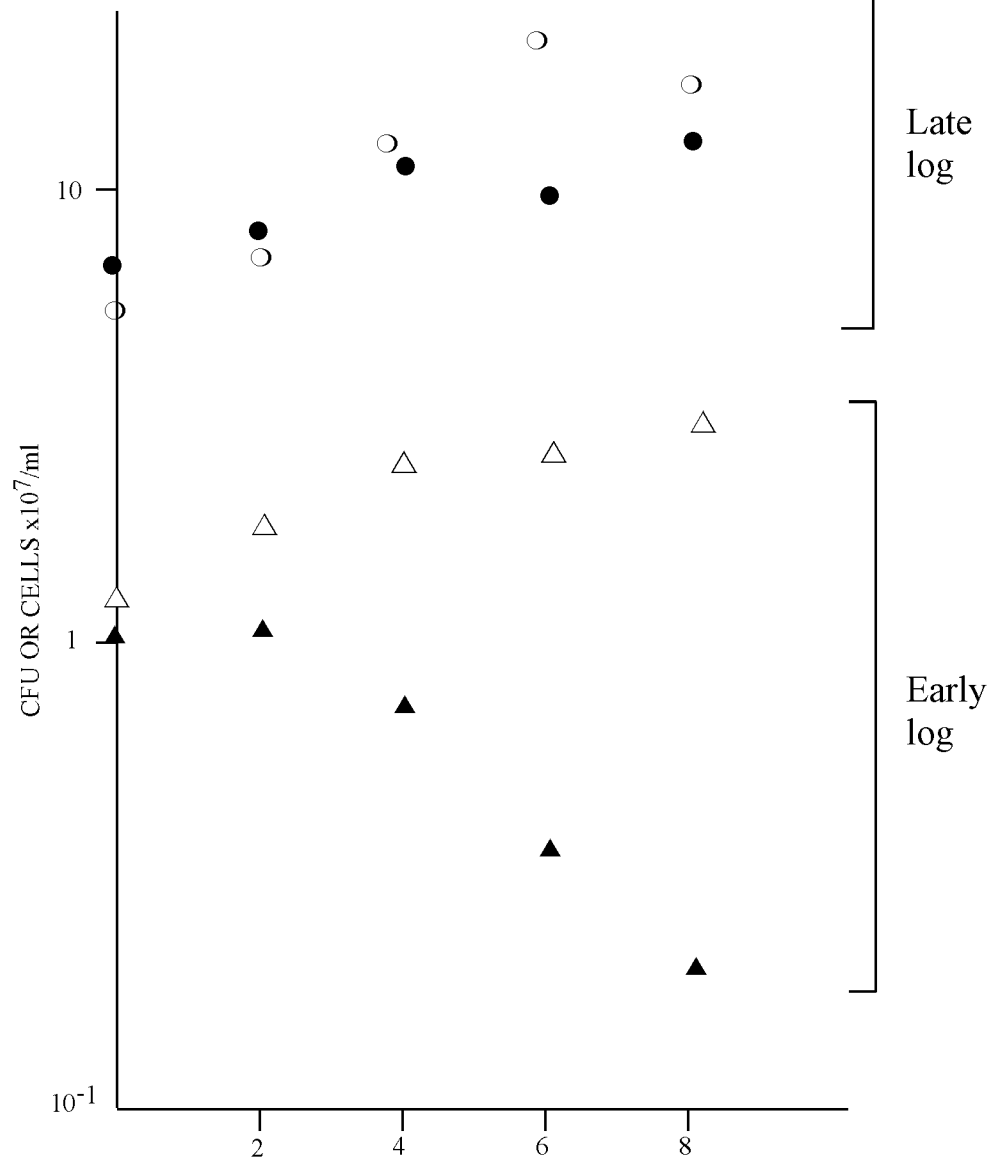
% Survival at 37°C (200 mM HU)

Strain	<i>Wild-type</i>			$\Delta htl1$		
	Hours at 37°	4	6	8	4	6
-HU	100	100	100	17.6	5	1.8
+HU 200mM	100	100	76	21.4	4.2	4.0

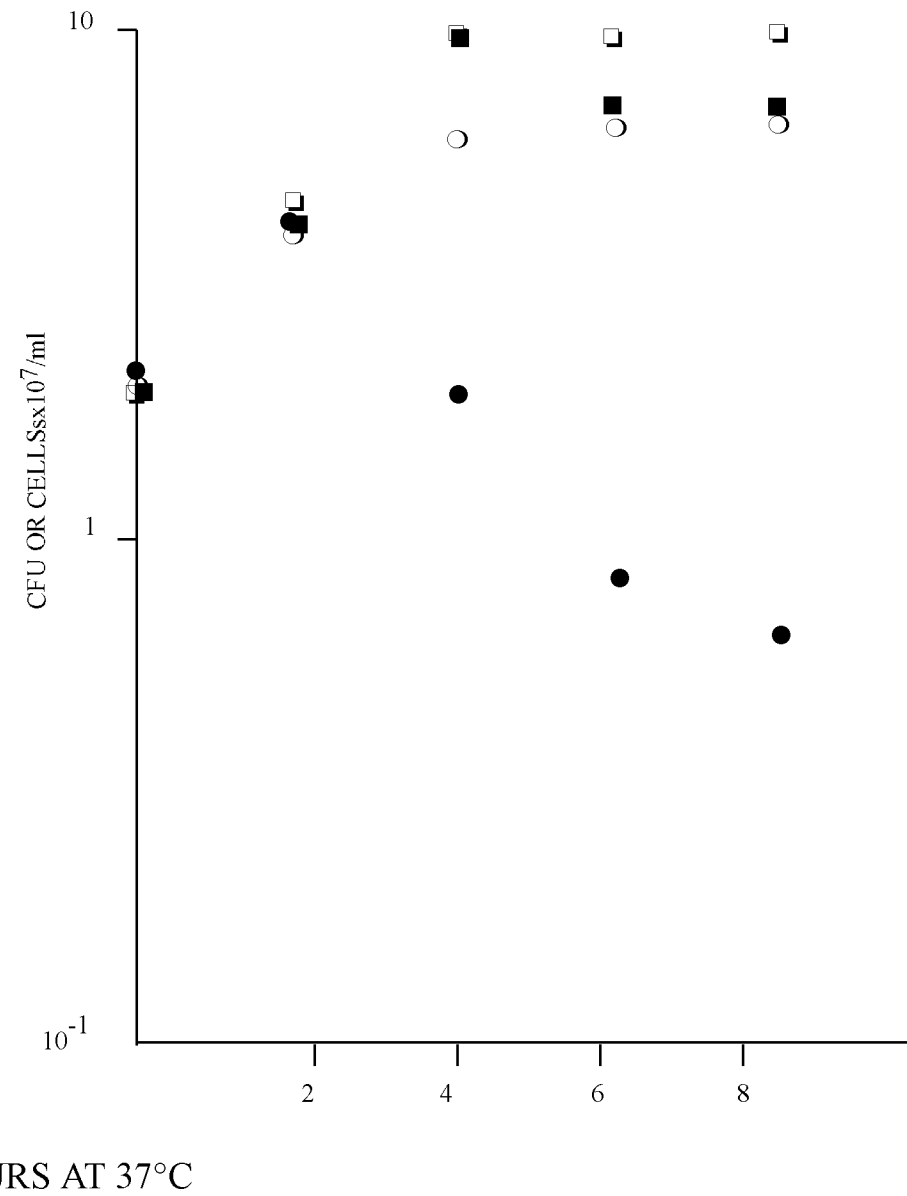
Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 1
Florio et al 2006

A



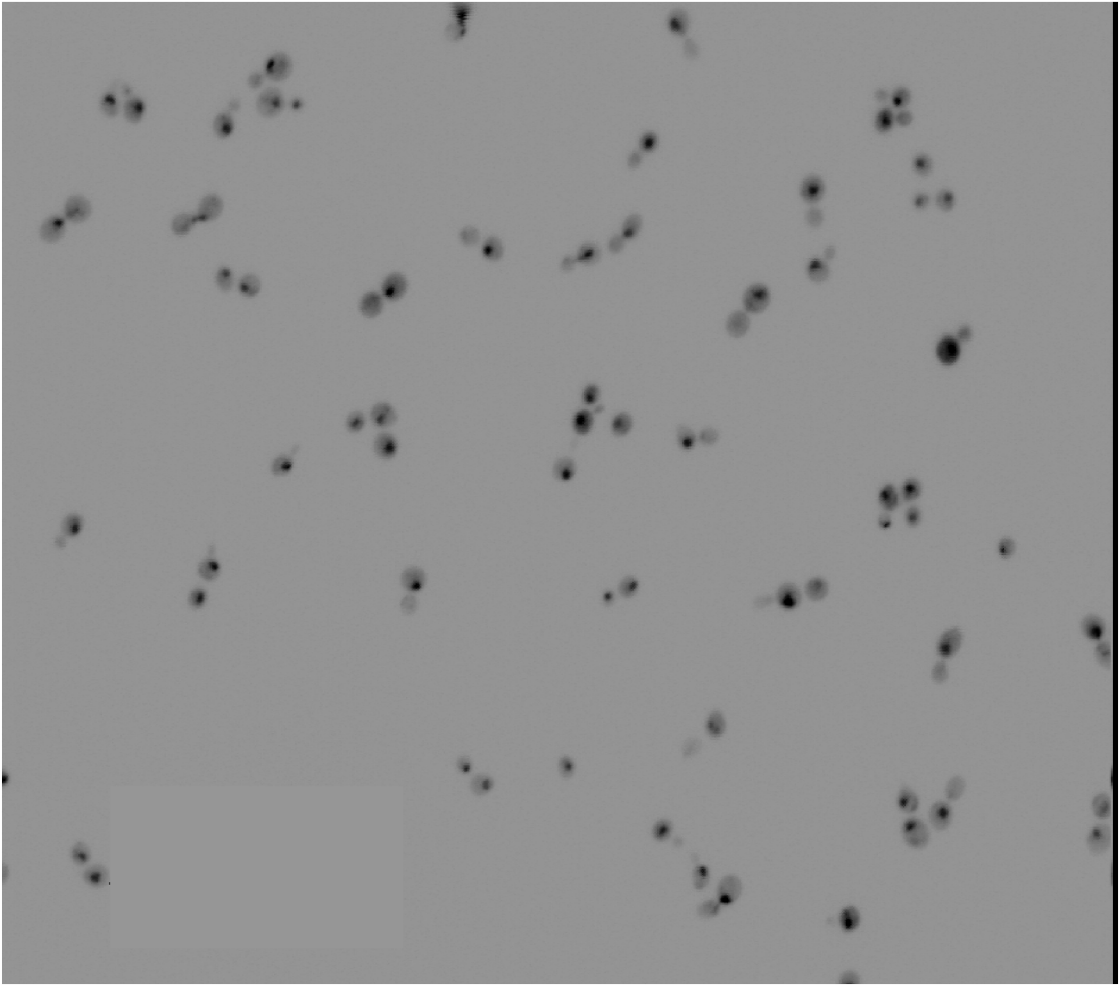
B



HOURS AT 37°C

Figure 2

A



B

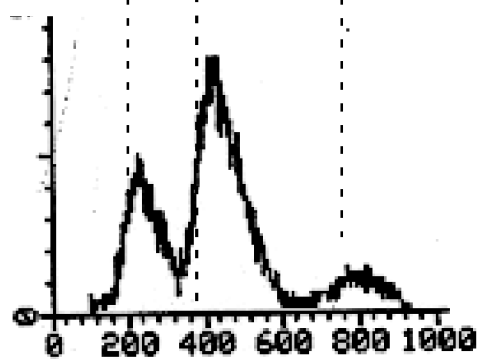
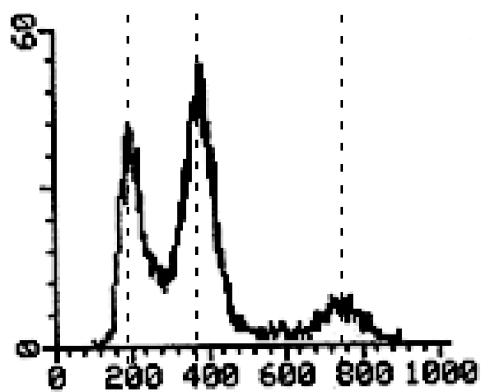
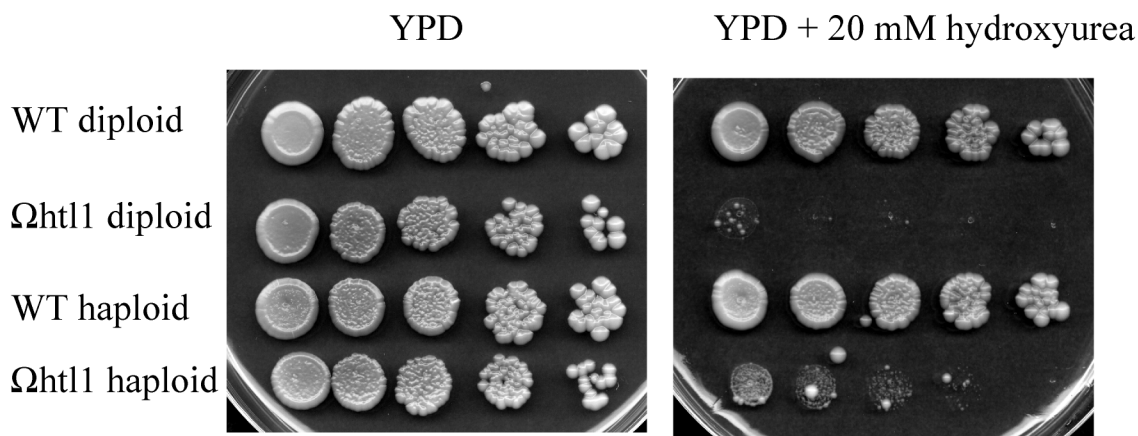
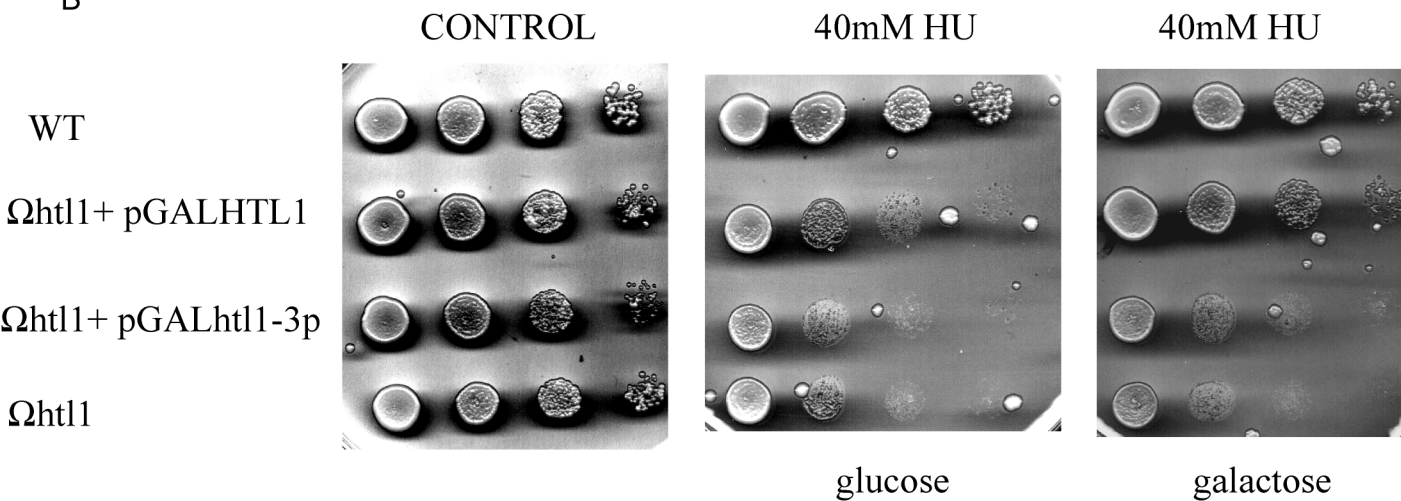


Figure 3
Click here to download high resolution image
Florio et al

A



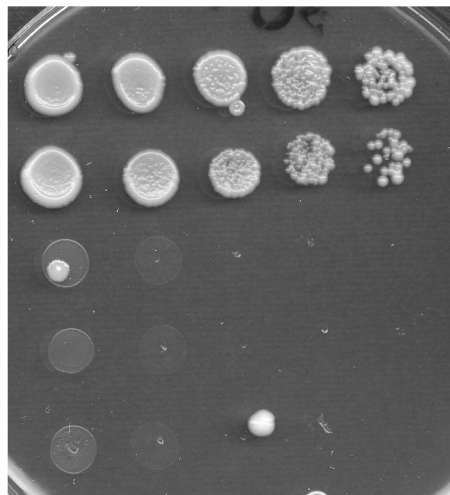
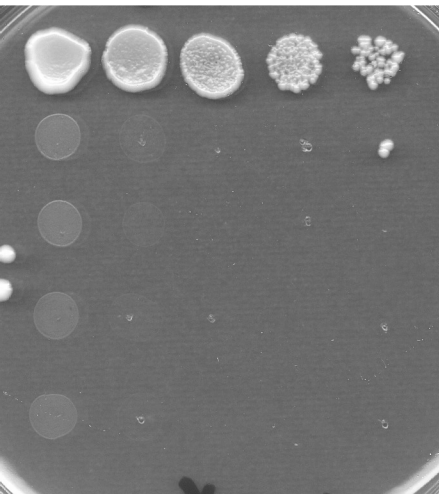
B



COMPLEMENTATION IN 2% FORMAMIDE (30°C)

GLUCOSE

GALACTOSE



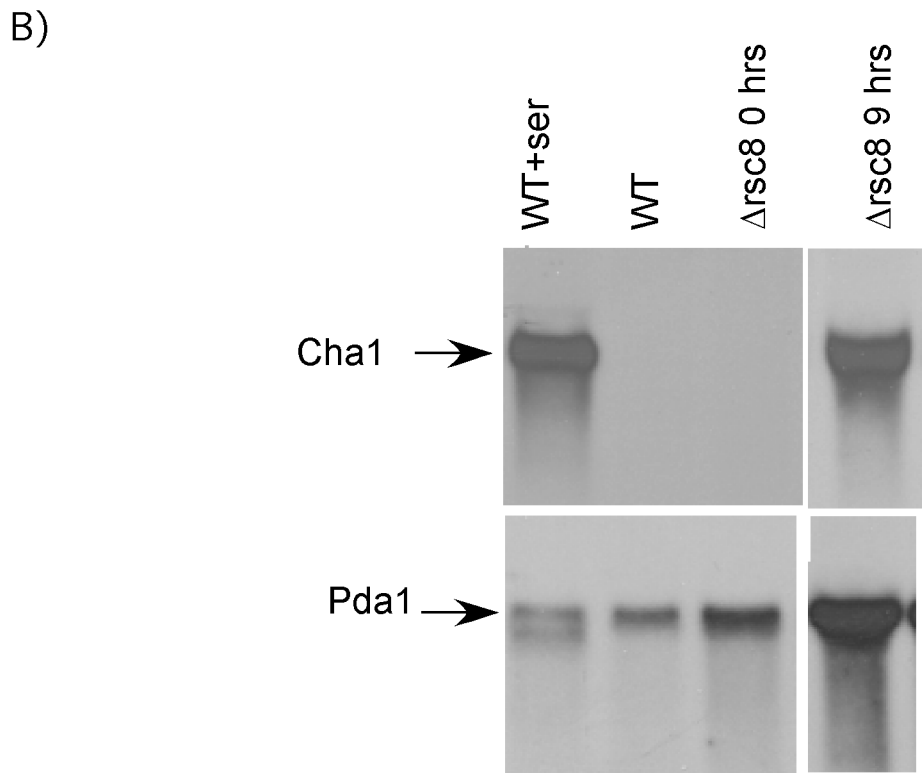
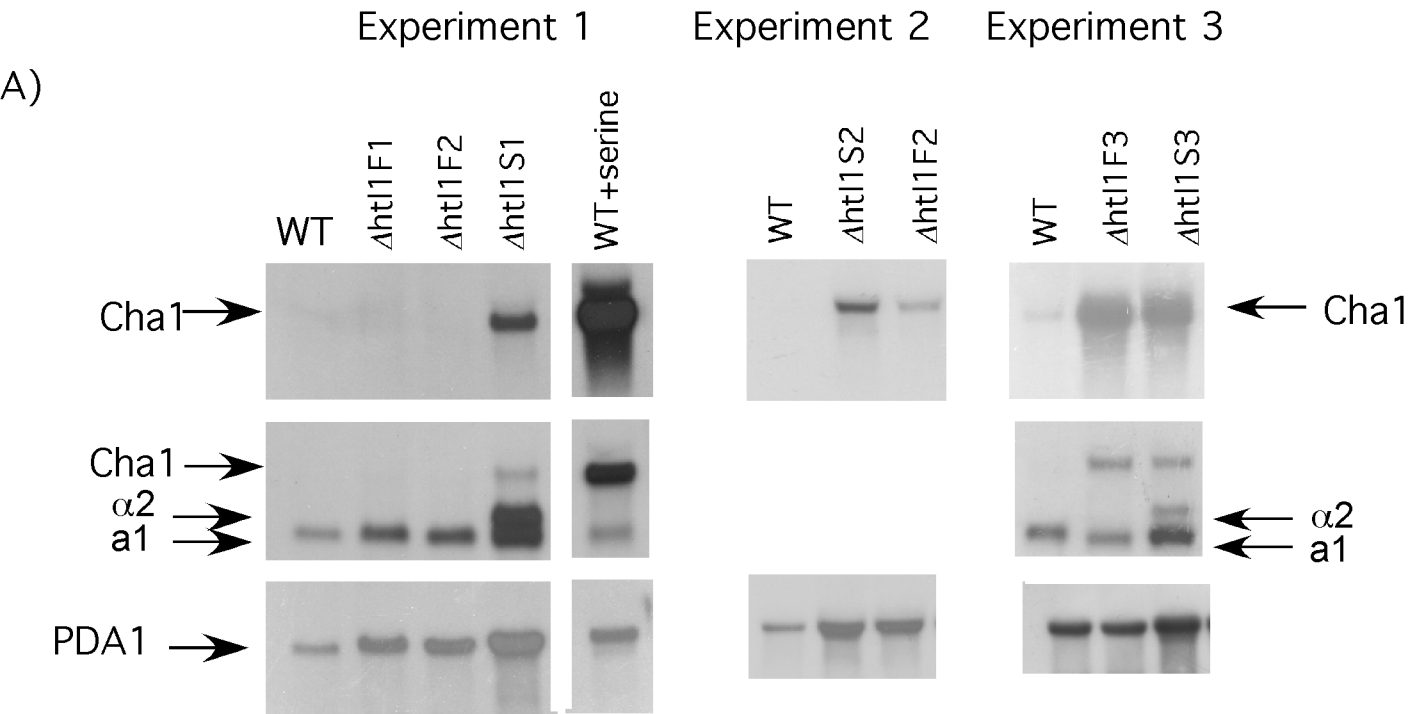
303a WT

Δ htl1+pGAL HTL1

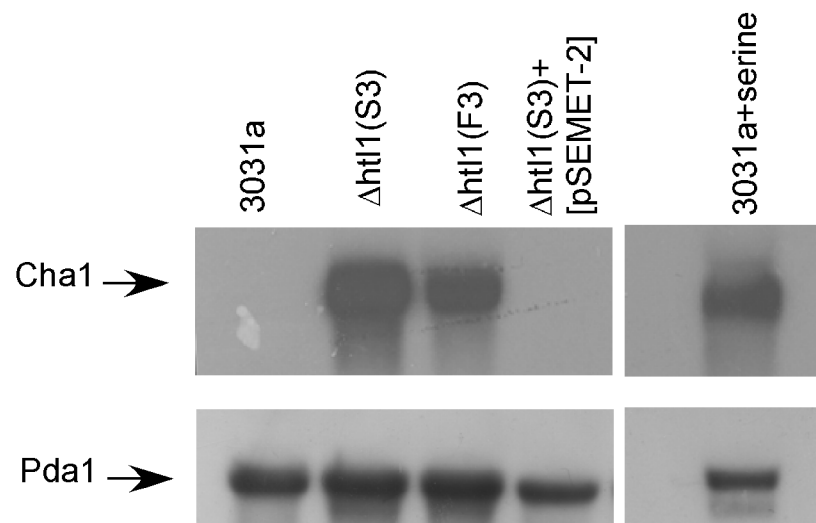
Δ htl1+pGALhtl1-3P

Δ htl1+ vector

Δ htl1



A)



B)

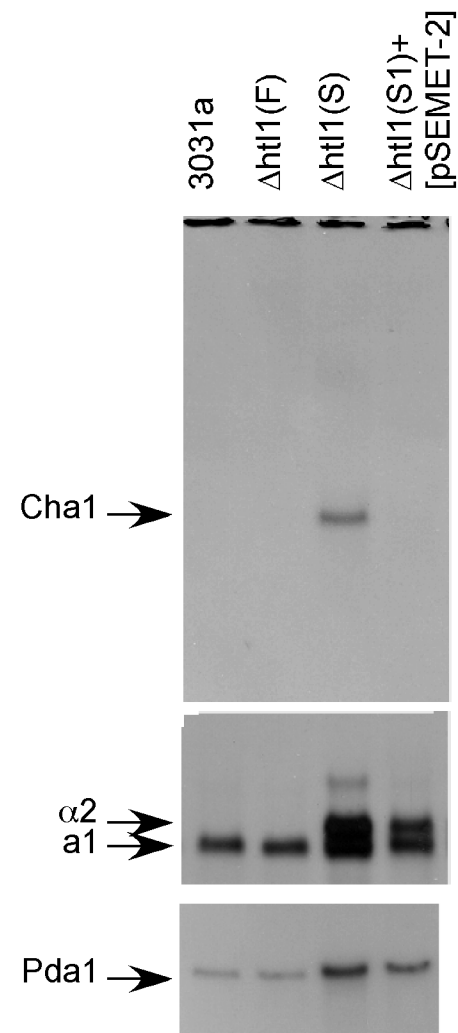
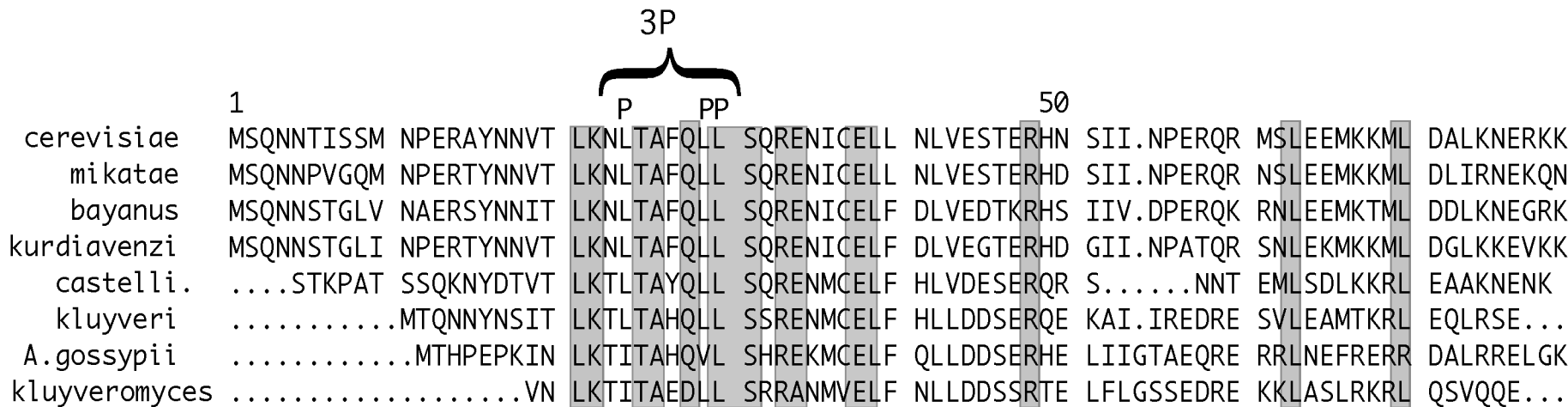
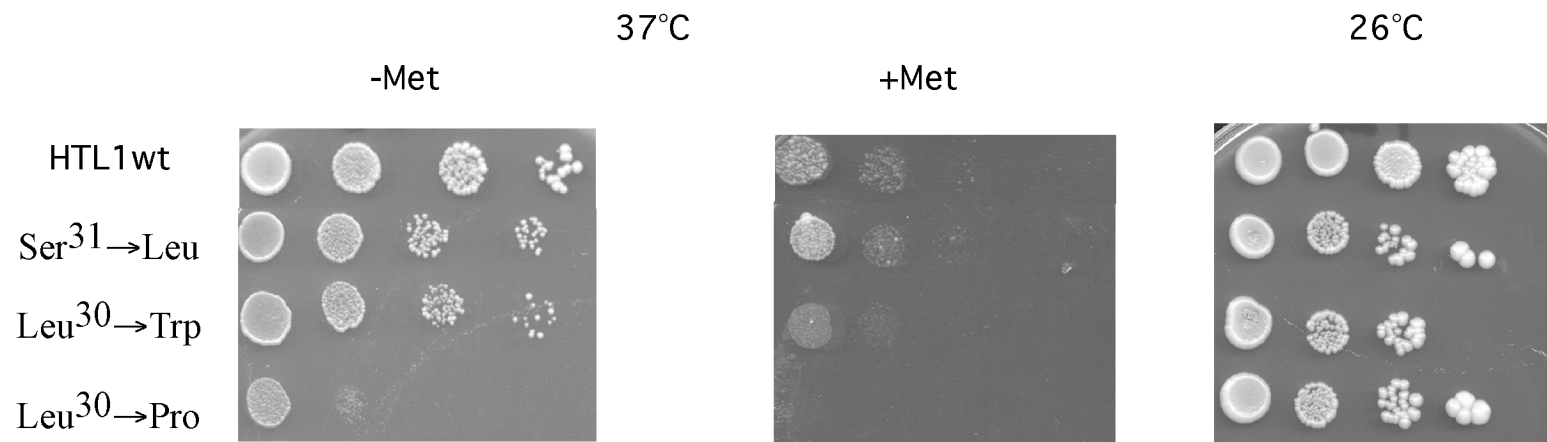


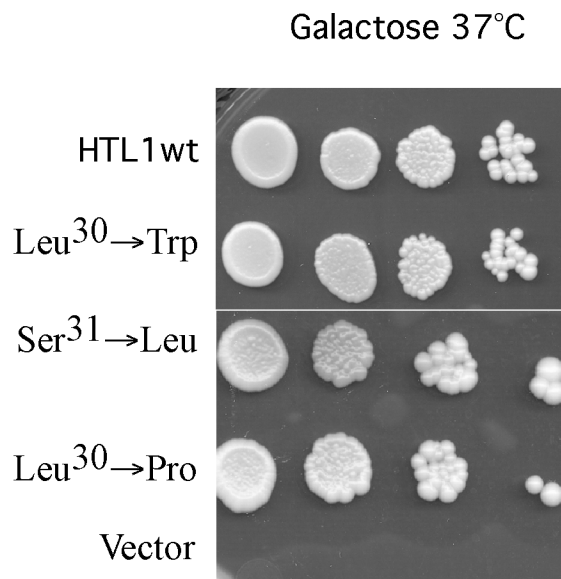
Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)
 Florio et al 2006



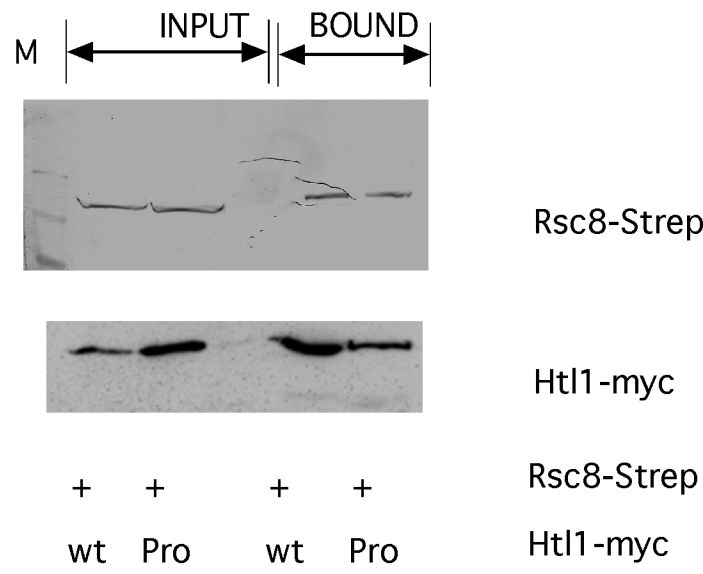
A) MET3 driven expression



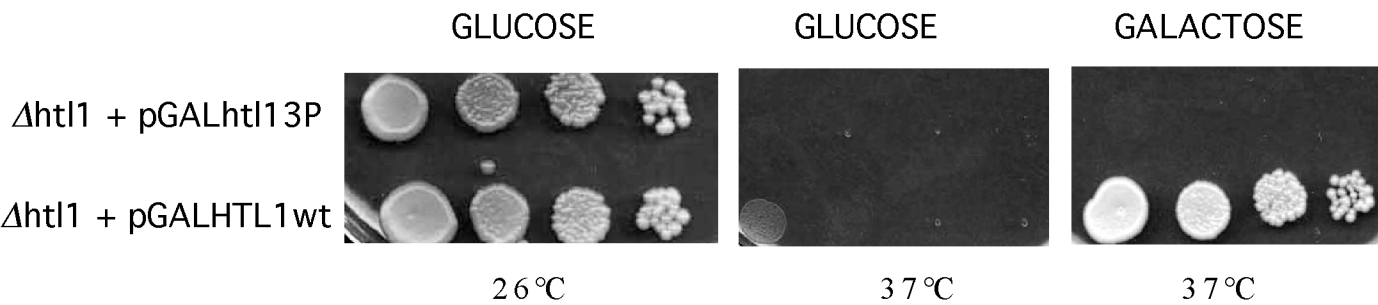
B) GAL driven expression



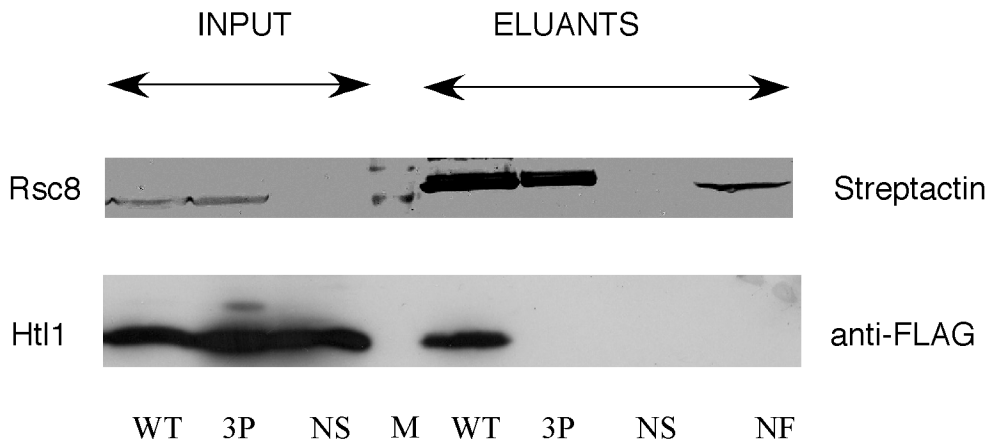
C) Binding



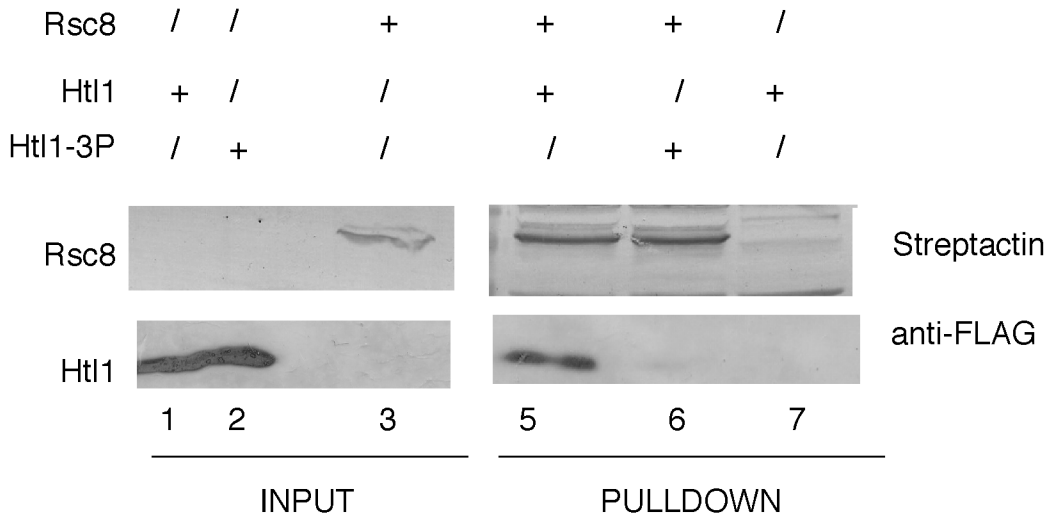
A) COMPLEMENTATION



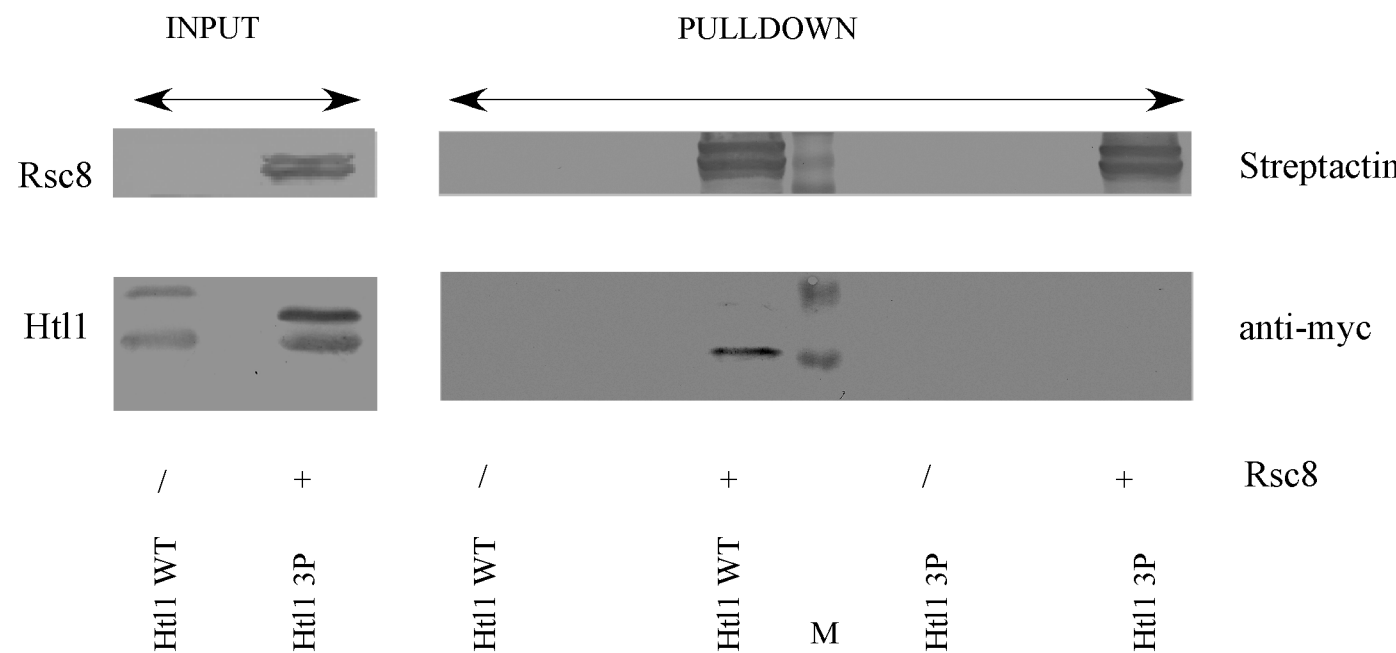
B) CO-EXPRESSION



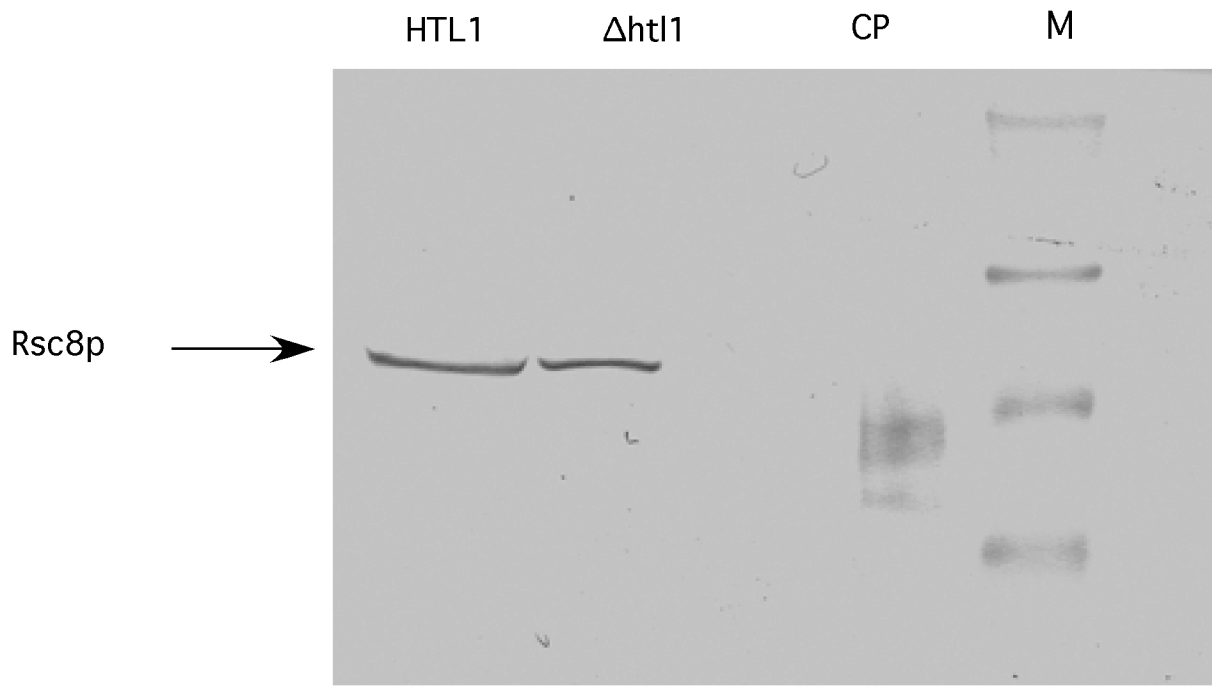
C) PULL-DOWN

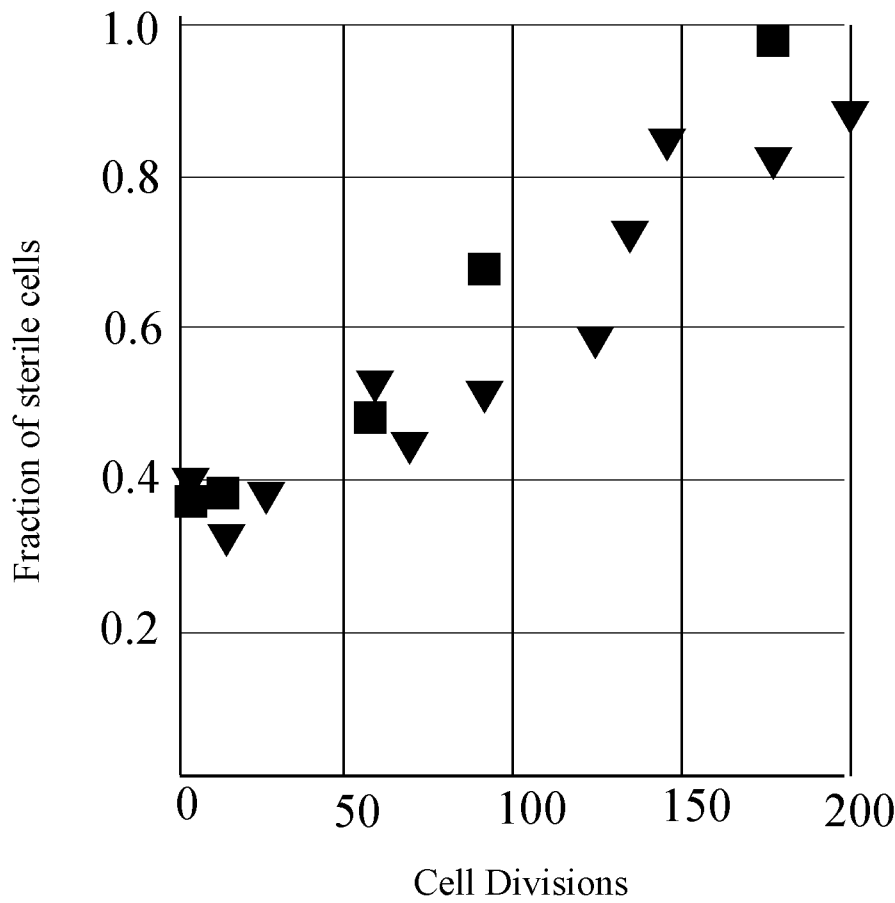


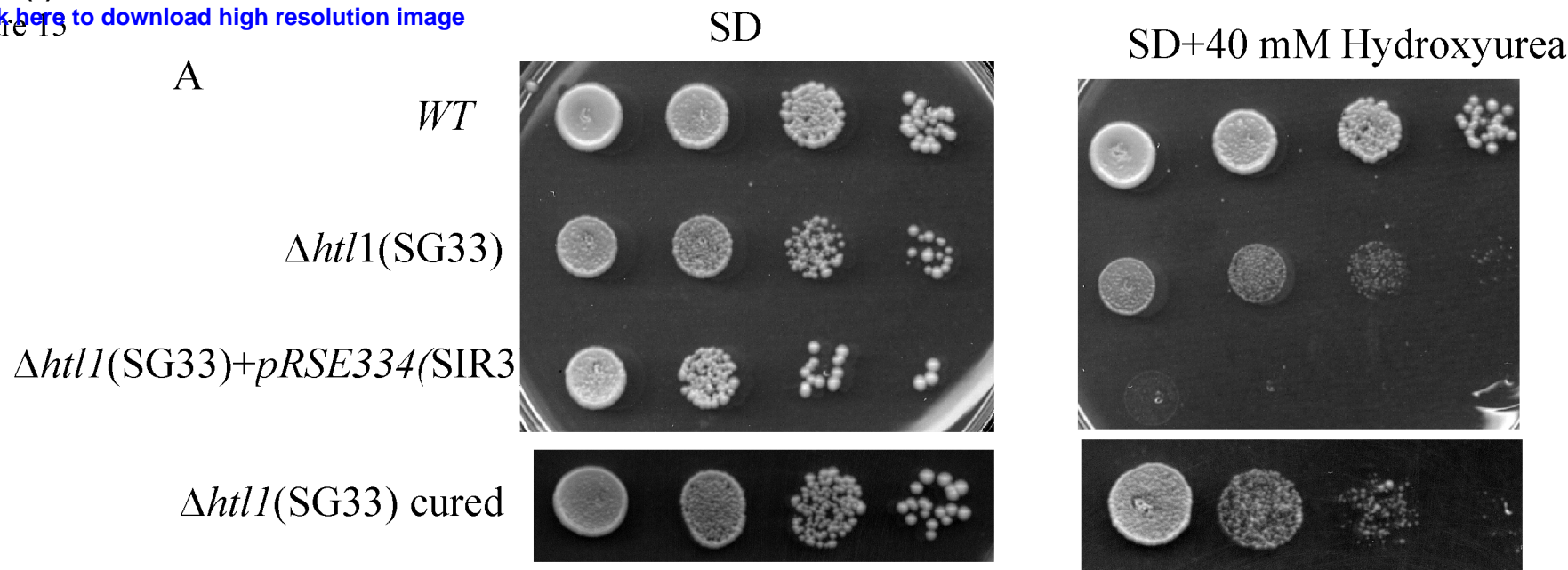
[Click here to download high resolution image](#)



Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)

Competition of $htl1\Delta(SG33)$ and $htl1\Delta(F)$ 

**B****YEPD****YEPD+40mM HU**